

การผลิตเซลล์ยีสต์จากอาหารเพาะเลี้ยงจากพืชเพื่อการผลิตโพรไบโอติกอัดเม็ดแบบฟองฟู



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF YEAST CELLS FROM PLANT BASED MEDIUM FOR EFFERVESCENT  
PROBIOTIC TABLETS PRODUCTION



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

Department of Food Technology

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเซลล์ยีสต์จากอาหารเพาะเลี้ยงจากพืชเพื่อการผลิต โพรไบโอติกอัดเม็ดแบบพองฟู
โดย	น.ส.ณัฐนันท์ บุรณวณิชวงศ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ  
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	
.....	ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)	
.....	กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กิติพงษ์ อัครกุล)	
.....	กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิดา โชติช่วง)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอง จันทร์ประสาทสุข)	

ณัฐนันท์ บุรณวณิชวงศ์ : การผลิตเซลล์ยีสต์จากอาหารเพาะเลี้ยงจากพืชเพื่อการผลิตโพรไบโอติกอัดเม็ดแบบฟองฟู.  
( PRODUCTION OF YEAST CELLS FROM PLANT BASED MEDIUM FOR EFFERVESCENT PROBIOTIC  
TABLETS PRODUCTION) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ยีสต์โพรไบโอติกแบบเม็ดฟูที่ใช้เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* via. Boulardii (S. Boulardii) จากคัลเจอร์น้ำผัก-ผลไม้ ประกอบด้วยขั้นตอน (i) ประเมินสภาวะน้ำหมักสำหรับเพาะเลี้ยงโดยใช้น้ำองุ่นที่มีค่าของแข็งที่ละลายได้ (TSS) 12 °brix เป็น based medium แปรค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วง 3.0-5.0 เพาะเลี้ยงแบบเขย่า ที่ 150 rpm อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ii) ศึกษาสมบัติการเจริญของ S. Boulardii ในน้ำผัก-ผลไม้ 3 ชนิด ได้แก่ น้ำองุ่น น้ำใบบวบ และน้ำกระเจี๊ยบ (ปรับ TSS 12 °brix ที่ pH 4.0) เพาะเลี้ยงที่สภาวะเดียวกับ (i) ติดตามการเจริญของยีสต์และสมบัติของน้ำหมัก ที่ 0 8 24 32 และ 48 ชั่วโมง พบว่ายีสต์เจริญในน้ำกระเจี๊ยบและน้ำองุ่นไม่ต่างกันอย่างไรอย่างมีนัยสำคัญ ( $11.58 \pm 0.21 \log \text{CFU/mL}$  และ  $11.44 \pm 0.64 \log \text{CFU/mL}$  ตามลำดับ) โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu \text{Max}$ ) ที่ 0.018 และ 0.017  $\log \mu/h$  ตามลำดับ น้ำใบบวบ  $10.59 \pm 0.16 \log \text{CFU/mL}$  ( $\mu \text{Max} = 0.016 \log \mu/h$ ) และอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YMB ซึ่ง  $10.11 \pm 0.06 \log \text{CFU/mL}$  ( $\mu \text{Max} = 0.010 \log \mu/h$ ) การเปลี่ยนแปลงสมบัติของน้ำหมักมีความสอดคล้องกับการเจริญของยีสต์ และเมื่อพิจารณาปริมาณยีสต์ที่มากและคุณสมบัติของน้ำหมักที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด จึงเลือกใช้น้ำกระเจี๊ยบในการศึกษาขั้นตอนต่อไป (iii) ศึกษาความสามารถในการทนสภาวะจำลองระบบย่อยอาหารและความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงจากน้ำกระเจี๊ยบเปรียบเทียบกับยีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน YMB พบว่า ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงจากน้ำกระเจี๊ยบมีการรอดชีวิตสูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) และมีความสามารถในการยึดเกาะสูงกว่ายีสต์ที่เพาะเลี้ยงจาก YMB และจากการศึกษาสัณฐานวิทยาและวิธีการสีบัพนธุ์ ด้วยวิธีส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิซชัน (TEM) พบว่า ยีสต์จากน้ำกระเจี๊ยบมีผนังเซลล์หนาและสีบัพนธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ ในขณะที่ยีสต์จาก YMB มีผนังเซลล์บางกว่าและสีบัพนธุ์แบบอาศัยเพศโดยการพิชชัน จึงส่งผลให้ยีสต์จากน้ำกระเจี๊ยบมีปริมาณเซลล์สูงกว่า YMB และ (v) ประเมินการผลิตเซลล์ยีสต์ด้วยการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์การหมัก พบว่า จำนวนเซลล์ของยีสต์น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดปริมาตร จึงต้องเพิ่มระยะเวลาการหมักเป็น 72 ชั่วโมง และ การผลิตเม็ดฟูโดยใช้ยีสต์จากน้ำหมักกับส่วนผสมอื่นๆ ในอัตราส่วน ผงยีสต์ที่เพาะเลี้ยงจากกระเจี๊ยบ และ ผงกระเจี๊ยบแห้งบด อย่างละ 25-30% กรดซิตริกและโซเดียมไบคาร์บอเนต อย่างละ 10-15% น้ำตาลซูโครส 10-15%, โพลีไวนิลไพโรลิโดน (Polyvinylpyrrolidone, PVP) โพลีเอธิลีน ไกลคอล (Polyethylene Glycol, PEG) และ สารยึดเกาะ 3-5% ตามลำดับ ขึ้นรูปเป็นเม็ด 3.35 กรัม ใช้แรงตอกเม็ดที่ 35 นิวตัน พบว่ามีน้ำหนักเฉลี่ย  $3.38 \pm 0.02$  กรัม ความแข็ง  $46.88 \pm 0.97$  นิวตัน ความกรอบ  $1.07 \pm 0.86\%$  จะได้เม็ดฟูที่ละลายตัวในน้ำที่อุณหภูมิ 37°C ภายใน 5 นาที มีเซลล์ที่มีชีวิต  $10 \log \text{CFU/เม็ด}$  ที่แขวนลอยในน้ำที่มีกลีโค-รสของกระเจี๊ยบ เก็บรักษาในช่องอุณหภูมิเย็นภายใต้สภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิห้องได้ 15 วัน

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร  
ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

# # 6370116723 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORD: Probiotic yeast *S. Boulardii* Fermented juice Alternative media Effervescent tablet

Natthanan Buranavanitvong : PRODUCTION OF YEAST CELLS FROM PLANT BASED MEDIUM FOR EFFERVESCENT PROBIOTIC TABLETS PRODUCTION. Advisor: Assoc. Prof. Cheunjit Prakitchaiwattana, Ph.D.

The study aimed to develop yeast probiotic effervescent tablets from *Saccharomyces cerevisiae* via. *Boulardii* (*S. Boulardii*) cultivated in Plant-based media. (i) Fermentation conditions for culturing of *S. Boulardii* using grape juice with Total soluble solids (TSS) 12 °brix as a based medium were evaluated. pH was varied in the range of 3.0-5.0. Yeast was cultivated at 150 rpm, 30 °C for 48 hours. (ii) The growth properties of *S. Boulardii* in fruit and vegetable juices: grape, Gotu kola and roselle juices under the same condition as conducted in (i) were studied (TSS 12 °brix at pH 4.0). Yeast growth was monitored at 0, 8, 24, 32 and 48 h. Yeast in roselle and red grape juice had the highest specific growth rate ( $\mu$  Max) 0.018 and 0.017 log  $\mu$ /h with 11.58±0.21 and 11.44±0.64 log CFU/mL, respectively. Yeast growth in Gotu kola juice had  $\mu$ Max 0.016 log  $\mu$ /h, 10.59±0.16 log CFU/mL and the standard medium (YMB) had  $\mu$ Max 0.010 log  $\mu$ /h, 10.11±0.06 log CFU/mL. The properties of fermented juices were related to yeast growth. Fermented roselle juice had high viable population with the highest antioxidant activity, relative to the others, therefore was chosen for the next step. (iii) The tolerability of simulated gastrointestinal tract; gastric and bile salt, and ability of adhesion (% hydrophobicity) of yeast in roselle juice were evaluated comparing to yeast in YMB. The results indicated that the survivability of yeast in roselle juice was higher than YMB. Cell morphology and reproduction were investigated using Transmission electron microscopy (TEM) showed that yeast in roselle juice had a thick cell wall with asexual reproduction by budding while yeast in YMB had a thin cell wall with sexual reproduction by fission. Therefore, the amount of yeast in roselle juice was higher than YMB. (v) Yeast was cultivated in a bioreactor, it was found that amount of yeast cells was lower than that obtained culturing in the flask requiring cultivation time to 72 h. Effervescent tablets were prepared with formula including yeast roselle powder and dried roselle powder 25-30%, citric acid, sodium bicarbonate and sucrose 10-15% and Polyvinylpyrrolidone (PVP), Polyethylene glycol (PEG) and binder 3-5%, respectively for producing 3.35 g per tablet using force at 35 N. The average tablets weight was 3.38±0.02g, hardness 46.88±0.97 N, friability 1.07±0.86% and effervescent tablets disintegrated in water at 37°C in 5 minutes. Roselle juice derived from single effervescent tablet contained viable yeast 10 log CFU/tablet of viable cells suspended per tablet. Shelf-life of probiotic effervescent tablets in an aluminium bag under vacuum condition at room temperature was 15 days.

Field of Study: Food Technology

Student's Signature .....

Academic Year: 2021

Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ในการทำวิจัยด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ รวมถึงให้ข้อคิดที่ดีในการทำงานเสมอมา ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานต์ เศรษฐชัยมงคล รองศาสตราจารย์ ดร. กิติพงศ์ อัครตระกูล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐธิดา โชติช่วง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรอน จันทรประสาทสุข ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำ ตรวจสอบ กลั่นกรอง และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร และ ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือ รวมถึงอำนวยความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยต่างๆ จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชา วิทยาการ เกษษกรรมและเกษตรอุตสาหกรรม คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย รวมถึงให้ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยต่างๆ จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารในการสนับสนุนและให้ความช่วยเหลือที่ดีเสมอมา ท้ายสุดนี้ กราบขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจ ส่งเสริม และสนับสนุนเสมอมา

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากกลุ่มวิจัย (STAR) “การพัฒนาอาหารและวัตถุดิบอาหารจากนวัตกรรมกรรมกรหมักด้านจุลินทรีย์”

ณัฐนันท์ บุรณวณิชวงศ์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ .....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ .....	2
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 จุลินทรีย์โพรไบโอติกและสมบัติความเป็นโพรไบโอติก .....	3
2.1.1 โพรไบโอติก (Probiotic) และ จุลินทรีย์โพรไบโอติก.....	3
2.2 ยีสต์โพรไบโอติกสายพันธุ์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>Boulardii</i> ( <i>S. Boulardii</i> ).....	7
2.2.1 ประวัติและความเป็นมาของสายพันธุ์ <i>S. Boulardii</i> .....	7
2.2.2 การประเมินคุณสมบัติการเจริญ (growth kinetic) ลักษณะสัณฐานวิทยาและการ สืบพันธุ์ของเซลล์ยีสต์ (morphology and reproduction).....	8
2.2.2.1 การประเมินคุณสมบัติการเจริญ (growth kinetic).....	8
2.2.2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาและการสืบพันธุ์ของเซลล์ยีสต์.....	10
2.2.2.3 ประโยชน์ของยีสต์โพรไบโอติก <i>S. Boulardii</i> .....	13
2.2.3 สภาวะการเพาะเลี้ยงและสารอาหารที่ส่งผลต่อการเจริญของยีสต์โพรไบโอติก.....	17
2.2.3.1 แหล่งอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของยีสต์.....	17

<b>2.3</b>	<b>การผลิตเม็ดโพรไบโอติกแบบฟู.....</b>	<b>23</b>
2.3.1	ส่วนประกอบและส่วนผสมอื่นๆของตำรับยาเม็ดฟู.....	24
2.3.2	การตอกเม็ด (tableting).....	26
2.3.3	ความคงตัวและบรรจุภัณฑ์ .....	27
2.3.4	คุณสมบัติของเม็ดฟู .....	27
2.4	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	28
<b>บทที่ 3</b>	<b>วิธีการทดลอง .....</b>	<b>29</b>
3.1	วัตถุประสงค์ อุปกรณ์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	29
3.1.1	วัตถุประสงค์ .....	29
3.1.2	อุปกรณ์ .....	29
3.1.3	สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	30
3.1.3.1	สารเคมี .....	30
3.1.3.2	อาหารเลี้ยงเชื้อ .....	31
3.1.4	การเตรียมตัวอย่าง.....	31
3.1.4.1	การเตรียมน้ำกระเจียบ.....	31
3.2	ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	31
3.2.1	การพัฒนากระบวนการผลิตเซลล์ยีสต์ <i>S. Boulardii</i> โดยใช้ Plant based medium เป็นสับสเตรท.....	31
3.2.1.1	การเตรียมเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง .....	31
3.2.1.2	การประเมินสภาวะ Plant based medium เซลล์ยีสต์ .....	32
3.2.2	ศึกษารูปแบบการเจริญของ Plant based medium เป็นสับสเตรท.....	32
3.2.3	ศึกษาสมบัติของเซลล์และการสืบพันธุ์หลังจากเพาะเลี้ยงใน Plant based medium.....	34
3.2.4	การผลิตยีสต์โพรไบโอติกอัดเม็ดแบบฟองฟู .....	35
3.2.4.1	การเตรียมเซลล์ยีสต์จากน้ำหมัก เพื่อตอกเม็ดโพรไบโอติกแบบฟองฟู .....	35



3.2.4.1.1 การผลิตเซลล์ในถังปฏิกรณ์การหมัก .....	35
3.1.4.1.2 การเตรียมผงเซลล์ยีสต์จากน้ำหมัก .....	35
3.1.4.2 การตอกเมล็ดและทดสอบคุณสมบัติเมล็ดฟู .....	36
3.1.4.2.1 การตอกเมล็ดเพื่อผลิตเมล็ดฟู.....	36
3.2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	37
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	38
4.1 การประเมินสภาวะน้ำสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ .....	38
4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์จาก Plant based medium เป็นสับสเตรท .....	39
4.2.1 การเจริญของยีสต์ใน Plant based media ที่แตกต่างกัน .....	39
4.2.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพ (Physicochemical properties) ของ Plant based media .....	42
4.2.3 การเปลี่ยนแปลงของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ของ Plant based media .....	46
4.2.3.1 วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) .....	46
4.2.3.2 วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds, TPC) .....	48
4.2.3.3 วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant).....	49
4.2.4 การเตรียมเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ในการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ และการผลิตโพรไบโอติกอัดเม็ดแบบฟองฟู.....	51
4.2.4.1 การเจริญของยีสต์และการเปลี่ยนแปลงของกรดอินทรีย์ในน้ำกระเจี๊ยบ .....	51
4.2.4.2 องค์ประกอบของน้ำกระเจี๊ยบหลังหมัก .....	52
4.3 สมบัติของเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกระเจี๊ยบ .....	54
4.3.1 การทนต่อสภาวะเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและเกลือแร่.....	54
4.3.2 ความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ของยีสต์.....	56
4.3.3 การศึกษาสมบัติและการสืบพันธุ์ของยีสต์ .....	58

4.4 การผลิตเซลล์ยีสต์สำหรับกระบวนการทำเม็ดโพรไบโอติกแบบฟองฟู .....	61
4.4.1 การเตรียมผงยีสต์น้ำกระเจี๊ยบและการผสมสารอื่นๆ เพื่อผลิตเม็ดโพรไบโอติกแบบฟองฟู.....	61
4.4.2 การผลิตและการทดสอบทางกายภาพของโพรไบโอติกอัดเม็ดแบบฟองฟู.....	61
4.4.3 อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ .....	64
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	66
5.1 สรุปผลการทดลอง .....	66
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	67
บรรณานุกรม.....	68
ภาคผนวก ก การตรวจวิเคราะห์ทางเคมี .....	79
ก.1 การวัด pH.....	79
ก.2 การวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid, °brix).....	79
ก.3 การวัดปริมาณกรดทั้งหมดด้วยวิธี Titratable acidity .....	79
ภาคผนวก ข การตรวจวัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ .....	80
ข.1 การวัดปริมาณทั้งหมดของแอนโทไซยานิน โดยวิธี pH-differential method .....	80
ข.2 การวัดปริมาณทั้งหมดของฟีนอลิก (Total phenolic content).....	81
ข.3 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) .....	83
ภาคผนวก ค โครมาโตแกรมของสารอินทรีย์ .....	84
ประวัติผู้เขียน.....	89

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ต่างๆที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก .....	4
ตารางที่ 2.2 ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียและยีสต์โปรไบโอติก .....	6
ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง <i>S. cerevisiae</i> และ <i>S. Boulardii</i> .....	7
ตารางที่ 2.4 ผลิตภัณฑ์จากยีสต์โปรไบโอติกที่วางจำหน่ายในท้องตลาด.....	16
ตารางที่ 2.5 ข้อดีและข้อเสียของเม็ดโปรไบโอติกแบบฟู่.....	24
ตารางที่ 4.1 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ จากการแปรค่าแรงที่ใช้ในการตอกโปรไบโอติก อัดเม็ดแบบฟู่.....	62
ตารางที่ 4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ จากการใช้แรง 35 นิวตัน ในการตอกโปรไบโอติก อัดเม็ดแบบฟู่.....	62
ตารางที่ 4.3 อายุการเก็บรักษา จำนวนยีสต์ที่มีชีวิต และลักษณะของผลิตภัณฑ์ .....	65

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 เปรียบเทียบขนาดของเซลล์ยีสต์ *S. Boulardii* และแบคทีเรีย *Salmonella* Typhimurium ด้วยวิธี Scanning electron micrographs ..... 5

ภาพที่ 2.2 รูปแบบการเจริญของยีสต์..... 9

ภาพที่ 2.3 ไดอะแกรมการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของยีสต์ ด้วยวิธีการแตกหน่อ ..... 11

ภาพที่ 2.4 สัณฐานวิทยาของยีสต์ สายพันธุ์ *S. cerevisiae* เมื่อเกิดการแตกหน่อ ..... 11

ภาพที่ 2.5 ไดอะแกรมการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์ ด้วยวิธีการฟิชชัน (fission)..... 12

ภาพที่ 2.6 ประเภทของสารประกอบที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ..... 21

ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์..... 22

ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของสารประกอบแอนโทไซยานิน ..... 23

ภาพที่ 2.9 เครื่องตอกเม็ดยา (A) ชนิดสากเดี่ยว และ (B) ชนิดไฟฟ้า..... 26

ภาพที่ 4.1 การเจริญของ *S. Boulardii* ในน้ำอุ่น..... 39

ภาพที่ 4.2 อัตราการเจริญของ *S. Boulardii* ที่เวลาต่างๆ ใน Plant based media 3 ชนิด..... 41

ภาพที่ 4.3 การเจริญของ *S. Boulardii* ที่เวลาต่างๆ ใน Plant based media 3 ชนิด ..... 41

ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ใน Plant based media 3 ชนิด ..... 43

ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง ใน Plant based media 3 ชนิด ..... 45

ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดทั้งหมดของ Plant based media ทั้ง 3 ชนิด..... 45

ภาพที่ 4.7 ปริมาณแอนโทไซยานินของน้ำอุ่นและกระเจี๊ยบ ก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ..... 47

ภาพที่ 4.8 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของ Plant based media ทั้ง 3 ชนิด ..... 49

ภาพที่ 4.9 การต้านสารอนุมูลอิสระของ Plant based media ทั้ง 3 ชนิด..... 50

ภาพที่ 4.10 การติดตามจำนวนและอัตราการเจริญของ *S. Boulardii* ระหว่างการเพาะเลี้ยง ในน้ำกระเจี๊ยบ โดยใช้ถังปฏิกรณ์การหมัก ..... 52

ภาพที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส .....	53
ภาพที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดมาลิก แลคติก อะซิติก ซิตริก และซักซินิก .....	54
ภาพที่ 4.13 จำนวนการรอดชีวิตของยีสต์ในสภาวะเลียนแบบน้ำย่อยจำลองในกระเพาะอาหาร .....	55
ภาพที่ 4.14 จำนวนการรอดของยีสต์ในสภาวะเลียนแบบเกลือน้ำดี .....	56
ภาพที่ 4.15 ความสามารถในการยึดเกาะของยีสต์ ที่บ่มในคลอโรฟอร์มและเอธิล อะซิเตท .....	57
ภาพที่ 4.16 การศึกษาสัณฐานวิทยาและการสืบพันธุ์ของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงจากน้ำกระเจียบ และ YMB .....	60
ภาพที่ 4.17 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ยีสต์โพรไบโอติกกระเจียบอัดเม็ดแบบฟองฟู.....	63
ภาพที่ 4.18 ขนาดความกว้างและสูงของยีสต์โพรไบโอติกกระเจียบอัดเม็ดแบบฟองฟู .....	63
ภาพที่ 4.19 ลักษณะการฟูของยีสต์โพรไบโอติกกระเจียบอัดเม็ด .....	63
ภาพที่ 4.20 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาในถุงอลูมิเนียม ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะ สุญญากาศ .....	65
ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	82
ภาพที่ ค.1 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 0.....	84
ภาพที่ ค.2 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 8.....	84
ภาพที่ ค.3 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 24.....	85
ภาพที่ ค.4 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 48.....	85
ภาพที่ ค.5 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 72.....	86
ภาพที่ ค.6 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 0 .....	86
ภาพที่ ค.7 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 8 .....	87
ภาพที่ ค.8 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 24.....	87
ภาพที่ ค.9 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 48.....	88
ภาพที่ ค.10 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 72.....	88

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันได้มีแนวทางการส่งเสริมสุขภาพโดยการใช้โพรไบโอติก ซึ่งสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ทั้งแบคทีเรียและยีสต์หลายสายพันธุ์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีสมบัติแตกต่างกันไป บทบาทและหน้าที่ของโพรไบโอติก คือ ป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคยึดจับกับผิวลำไส้ ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค รักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย และกระตุ้นการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน ในอดีตมนุษย์ได้รับโพรไบโอติก จากการรับประทาน โยเกิร์ต ชีส กิมจิ ส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) เช่น *Lactobacillus* หรือ *Bifidobacterium* และ ยีสต์ที่เป็นโพรไบโอติก ทางการค้า มีเพียงสายพันธุ์เดียว คือ *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* (S. Boulardii) ซึ่งมีขนาดของเซลล์ใหญ่และผนังเซลล์หนา มีความสามารถในการทนกรด-ด่าง อุณหภูมิ และสารปฏิชีวนะได้ดี ทำให้มีจุดเด่นที่แตกต่างจากแบคทีเรียโพรไบโอติก อีกทั้งยังช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน รักษาสมดุลในระบบทางเดินอาหาร และสามารถรักษาโรคท้องร่วงต่างๆได้อีกด้วย เช่น โรคท้องร่วงอย่างรุนแรงในเด็กและทารก โรคท้องร่วงในนักท่องเที่ยว (Traveler's Diarrhea) ท้องเสียจากการติดเชื้อ *Clostridium difficile* ท้องเสียจากการใช้ยาปฏิชีวนะ และโรคท้องร่วงเฉียบพลัน (Acute diarrhea disease) (Surawicz et al., 1989) โดยส่วนมากผู้ผลิตได้นำ S. Boulardii จะถูกนำมาผลิตในรูปแบบยาเม็ดและผงชงดื่ม เนื่องจากหากใช้ผสมในอาหารหรือเครื่องดื่ม จะแสดงกิจกรรมการหมักน้ำตาลและส่งผลต่อกลิ่นและรสชาติของอาหารได้ ทำให้รูปลักษณะไม่ดึงดูดหากจะใช้บริโภคเป็นอาหารเสริมสุขภาพ และบางรูปแบบก็ใช้ยากคือ ผงกระจายตัวในน้ำยากและดื่มยาก ดังนั้นหากสร้างทางเลือกในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยีสต์โพรไบโอติกให้มีความน่าสนใจมากขึ้นจะเป็นช่องทางให้ผู้บริโภคได้ใช้ประโยชน์จากโพรไบโอติกชนิดนี้ได้มากขึ้น งานวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนายีสต์โพรไบโอติกเป็นยาอัดเม็ดในรูปแบบฟองฟู่ต้นทุนต่ำ (Effervescent tablets) ที่มีกลิ่น สีส และรสชาติเป็นน้ำผัก-ผลไม้ ซึ่งมีข้อดีคือ ง่ายต่อการรับประทาน ทั้งสำหรับเด็กและผู้ใหญ่ ลดปัญหาการกลืนยาก สะดวก พกพาง่าย และร่างกายยังได้รับประโยชน์จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบได้ในน้ำผัก-ผลไม้ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งช่วยลดความเสี่ยงในการเป็นโรคหัวใจและมะเร็ง และลดปริมาณคอเลสเตอรอล (Lobo et al., 2010) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำผัก-ผลไม้มีสารอาหารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของยีสต์ โดยได้จำนวนเซลล์สูง

ได้รับประโยชน์จากน้ำผัก-ผลไม้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำผัก-ผลไม้ จึงเป็นอีกทางเลือกสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ต้นทุนต่ำ อีกทั้งยังเพิ่มมูลค่าให้แก่ผัก-ผลไม้

## 1.2 วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสมบัติการเจริญของยีสต์ *S. Boulardii* ในน้ำผัก-ผลไม้ เพื่อผลิตเซลล์ยีสต์ และศึกษาปัจจัย ส่วนผสม และการรอดชีวิตของยีสต์ในการเตรียมโพรไบโอติกอัดเม็ดแบบฟองฟู รวมถึงปัจจัยที่ใช้ในการผลิตโพรไบโอติกอัดเม็ดแบบฟองฟู



## บทที่ 2 วารสารปริทัศน์

### 2.1 จุลินทรีย์โพรไบโอติกและสมบัติความเป็นโพรไบโอติก

#### 2.1.1 โพรไบโอติก (Probiotic) และ จุลินทรีย์โพรไบโอติก

โพรไบโอติก (probiotic) คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตเมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์หรือสัตว์ จะมีผลป้องกันหรือรักษาโรค โดยมนุษย์ได้รับโพรไบโอติกมาตั้งแต่สมัยโบราณ แต่ได้ศึกษาอย่างจริงจังในช่วงศตวรรษที่ 20 ในระยะแรกค้นพบว่า แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) เช่น *Lactobacillus* และ/หรือ *Bifidobacterium* ที่สามารถพบได้ทั่วไป เช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว กิมจิ ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลแลคโตส ได้เป็นกรดแลคติก และกรดอื่นๆ เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และสามารถสร้างแบคทีริโอซิน (bacteriocin) หรือ เอทานอล (ethanol) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ และรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่น มีรายงานสมบัติพิเศษเพิ่มเติม ได้แก่ ลดปริมาณคลอเลสเทอรอลในกระแสเลือด และกระตุ้นภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Czerucka et al., 2007 และ ประมวล ทรายทอง, 2007)

ปัจจุบันมีแนวทางส่งเสริมสุขภาพโดยการใช้โพรไบโอติกซึ่งสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่มีชีวิต จากประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 นิยามว่าโพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อร่างกายได้รับจะมีผลป้องกันและรักษาโรคบางประเภทได้และมีปริมาณจุลินทรีย์คงเหลืออยู่ไม่น้อยกว่า 6 log CFU/mL ตลอดอายุการเก็บรักษา (FAO/WHO, 2001)

นอกจากนั้นแล้วโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพจะต้องผ่านการประเมินคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก ได้แก่ (1) การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร (resistance to gastric acidity) (2) การทนต่อเกลือน้ำดี (bile salt resistance) (3) ความสามารถในการเกาะติดกับเยื่อเซลล์ผิว และ (4) ฤทธิ์ของเอนไซม์ไฮโดรเลสในการย่อยเกลือน้ำดี (bile salt hydrolase activity) จากประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร มาตรา 5 และ 6 แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522



เมื่อร่างกายได้รับจะเป็นประโยชน์สุขภาพ ช่วยป้องกันและรักษาโรคต่างๆ โดยส่วนใหญ่แบคทีเรียจะถูกนำมาผลิตเป็นโพรไบโอติก แบคทีเรียที่เป็นทางการค้า เช่น *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, และ แบคทีเรียไม่ผลิตกรดแลคติกบางชนิด (non-lactic acid bacteria) (ดังแสดงในตารางที่ 2.1) อย่างไรก็ตามปัจจุบันค้นพบว่า ยีสต์ก็มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกได้เช่นกัน และสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* (*S. Boulardii*) ได้รับการจดลิขสิทธิ์ (เลขสิทธิบัตร WO 2015/189337) และผลิตเป็นทางการค้า

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ต่างๆที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก

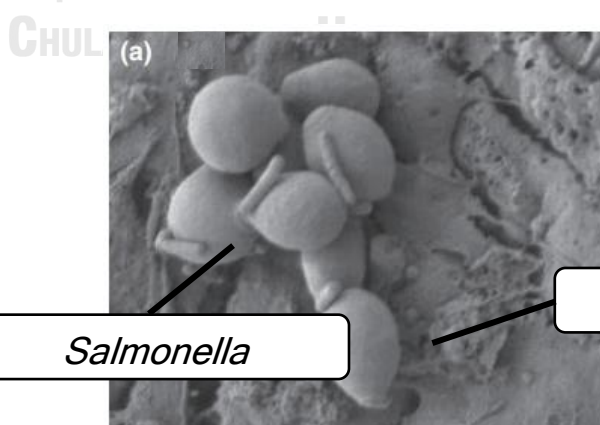
<i>Lactobacilli</i>	<i>Bifidobacteria</i>	Other	Yeast
		<i>Streptococcus</i>	
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>thermophilus</i>	<i>Sacchromyces cerevisiae</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. longum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Saccharomyces Boulardii</i>
<i>L. farciminis</i>	<i>B. lasctis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	
		<i>Propionibacterium</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>freudenreichii</i>	
		<i>Escherichia coli nessle</i>	
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. breve</i>	1917	
<i>L. plantarum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Bacillus clauui</i>	
<i>L. reuteri</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Bacillus oligonitrophilis</i>	
<i>L. rhamnosus (GG)</i>	<i>B. adolescents</i>		
<i>L. salivarius</i>			
<i>L. delbrueckii sub Bugaricus</i>			
<i>L. brevis</i>			
<i>L. callobiosus</i>			
<i>L. curvatus</i>			
<i>L. fermentum</i>			
<i>L. helviticus</i>			

ที่มา ประมวล ทรายทอง (2550)

### ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโพรไบโอติกและยีสต์โพรไบโอติก

จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารส่วนมากเป็นแบคทีเรีย 99% ยีสต์มีเพียง 1% ของจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียเป็นโพรคาริโอต ทำให้มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกแตกต่างจากยีสต์ที่จัดอยู่ในกลุ่มยูคาริโอต ลักษณะของเซลล์ยีสต์รูปไข่ยาว 10  $\mu\text{M}$  กว้าง 5  $\mu\text{M}$  และมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ของแบคทีเรียถึง 10 เท่า (ดังแสดงในภาพที่ 2.1) ยีสต์สามารถเจริญได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่กว้างและอุณหภูมิที่สูงกว่าแบคทีเรีย โดยยีสต์และแบคทีเรียมีองค์ประกอบของผนังเซลล์ต่างกัน ยีสต์มีผนังเซลล์หนา ส่วนของผนังเซลล์มี 2 ชั้น ชั้นนอกประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส ซึ่งมีส่วนประกอบเป็น ฟอสโฟเพปทิโดแมนแนน (phosphopeptidomannan, PPM) และ ฟอสโฟไลโปแมนแนน (phospholipomannan, PLM) ผนังชั้นในประกอบด้วยไคตินและเบต้ากลูแคน ในขณะที่แบคทีเรียมีส่วนประกอบหลักเป็นเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งเป็น n-acetyl glucosamine ที่เป็นองค์ประกอบของไคติน ต่อกับ n-acetyl muramic acid ซึ่งเป็นน้ำตาลอะมิโน (amino sugar) ที่พบเฉพาะในผนังเซลล์ของแบคทีเรียเท่านั้น ในแบคทีเรียแกรมลบสามารถพบไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lypopolysaccharide, LPS) และแกรมบวกจะมี lipoteichoic acid (LTA) เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ ส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของสิ่งมีชีวิตตรวจจับและตอบสนองต่อแบคทีเรียและยีสต์ต่างกัน และจากคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้โพรไบโอติกมีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายแตกต่างกัน นอกจากนี้ยีสต์ยังมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและไม่ถ่ายทอดสารพันธุกรรม การดื้อยาปฏิชีวนะอีกด้วย (ดังแสดงในตารางที่ 2.2) (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. (2555); ประมวลทรายทอง. (2560); Czerucka et al., (2007))

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2.1 เปรียบเทียบขนาดของเซลล์ยีสต์ *S. Boulardii* และแบคทีเรีย *Salmonella Typhimurium* ด้วยวิธี Scanning electron micrographs

ที่มา : Czerucka et al., (2007)

**ตารางที่ 2.2** ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียและยีสต์โพรไบโอติก

	แบคทีเรีย	ยีสต์
พบใน human flora	99%	1%
ขนาดของเซลล์	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M
องค์ประกอบของผนังเซลล์	ส่วนประกอบหลักคือ Peptidoglycan LPS (แกรมลบ) LTA (แกรมบวก)	แบ่งเป็น 2 ชั้นชั้นนอกเป็นน้ำตาลแมนโนส (PPM+PLM) ชั้นในเป็นไคตินและเบต้ากลูแคน
ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการเจริญ	6.5-7.5	4.5-6.5
อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ	10-80 °C	20-30 °C
ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ	X	/
ความสามารถในการถ่ายทอดยีนต่อยาปฏิชีวนะ	/	X

LPS, Lipopolysaccharide; LTA, Lipoteichoic acid; PPM, Phosphopetidomannan; LPM, Phospholipomannan

ที่มา (Czerucka et al., 2007)

### ความแตกต่างระหว่าง *S. Boulardii* และ *S. cerevisiae*

ในอดีตถึงแม้ว่ายีสต์ *S. Boulardii* และ *S. cerevisiae* ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีลักษณะที่ใกล้เคียงและมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมและโครโมโซม แต่เมื่อศึกษาในระดับโมเลกุลด้วยวิธีต่างๆ เช่น pulse-field gel electrophoresis (PFGE), randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) และอื่น ๆ พบว่า สายพันธุ์ทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างกันที่ส่วนของคลัสเตอร์และองค์ประกอบทางพันธุกรรม transposon of yeast (Ty) ทำให้ยีสต์ *S. Boulardii* และ *S. cerevisiae* ถูกระบุว่าต่างสายพันธุ์กัน (Pais et al., 2020) แต่ปัจจุบัน พบว่า *S. Boulardii* มีการพัฒนาสายวิวัฒนาการระดับโมเลกุล นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงในการจำแนกสายพันธุ์เป็น *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* แม้ว่าจะมีบางคุณลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น ความสามารถในการใช้กาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน หรือความสามารถในการผลิตแอสโคสปอร์ (ascospores) ก็ไม่ถือว่าเป็นความแตกต่างของสายพันธุ์ (ดังแสดงในตารางที่ 2.3) (Staniszewski et al., 2021)

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง *S. cerevisiae* และ *S. Boulardii*

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. boulardii</i>
ความสามารถในการเจริญที่ 37 °C	X	/
ความสามารถในการใช้กาแลคโตส	/	X
ความสามารถในการสร้างแอสโคสปอร์	/	X
อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ	30 °C	37 °C
ความต้านทานต่อ pH 2.0 (1 ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่รอด 30 %	จำนวนเซลล์ที่รอด 75 %
ความต้านทานต่อ pH 8.0	/	/
ลักษณะการถ่ายทอดโครโมโซม (Ploidy)	Diploid หรือ Haploid	Haploid

ที่มา Staniszewski et al., 2021

## 2.2 ยีสต์โพรไบโอติกสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* (*S. Boulardii*)

### 2.2.1 ประวัติและความเป็นมาของสายพันธุ์ *S. Boulardii*

ยีสต์ถูกนำมาใช้ประโยชน์ตั้งแต่สมัยโบราณ นำมาผสมเป็นอาหาร เช่น ขนมปัง หรือเครื่องดื่ม แอลกอฮอล์ เช่น การผลิตเบียร์ Boozah เมื่อปี 1923 นักจุลวิทยาชาวฝรั่งเศส ได้สังเกตว่าชาวบ้านรักษาโรคท้องร่วงโดยการดื่มน้ำที่ต้มจากเปลือกลิ้นจี่และมังคุด เมื่อนำมาคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ พบว่ายีสต์มีความสามารถในการรักษาโรคดังกล่าว จัดอยู่ในสกุล *Saccharomyces* จึงได้ตั้งชื่อยีสต์ชนิดนี้ว่า *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* (*S. Boulardii*) (Hossain et al., 2020)

ซึ่ง *S. Boulardii* ถูกจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานโดยอยู่ในสกุล *Saccharomyces* ใน strain *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* ดังนี้

### อนุกรมวิธานของยีสต์ *S. Boulardii*

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	<i>Saccharomycotina</i>
Class	<i>Saccharomycetes</i>
Order	<i>Saccharomycetales</i>
Family	<i>Saccharomycetaceae</i>
Genus	<i>Saccharomyces</i>
Species	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Strain	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

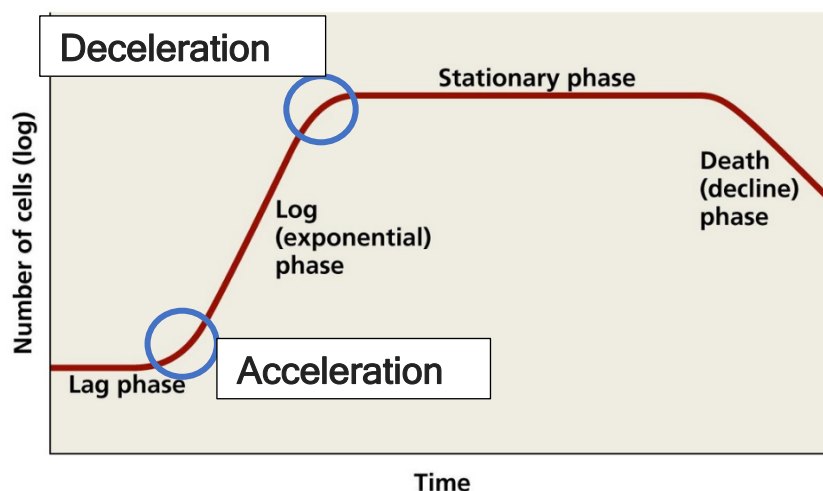
var. *Boulardii*

## 2.2.2 การประเมินคุณสมบัติการเจริญ (growth kinetic) ลักษณะสัณฐานวิทยาและการสืบพันธุ์ของเซลล์ยีสต์ (morphology and reproduction)

### 2.2.2.1 การประเมินคุณสมบัติการเจริญ (growth kinetic)

การประเมินการเจริญเติบโตของยีสต์เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องวัดอัตราการเจริญในด้านปริมาณ ซึ่งอาจเสนอในรูปแบบของ เส้นกราฟจำนวนเซลล์ต่อเวลา และสามารถรายงานผลเกี่ยวกับการเจริญได้หลายรูปแบบ เช่น อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ (Specific growth rate) ระยะเวลาทวีคูณของจำนวนเซลล์ (doubling time) หรือประสิทธิภาพในการเจริญ (growth yield) (Veshareh et al., 2021) โดยอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ (specific growth rate) เป็นการศึกษาการเจริญของยีสต์ จากจำนวนเซลล์ที่เปลี่ยนแปลง ( $dx$ ) ที่เวลานั้นๆ ( $dt$ ) ซึ่งการเจริญของยีสต์ มีการเจริญแบบเอ็กโพเนนเชียล (exponential growth) แบ่งออกเป็นระยะต่างๆ (ดังแสดงในภาพที่ 2.2) ดังนี้

- **Lag phase** เป็นระยะที่ยีสต์ใช้ในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม และยังไม่มีการสร้างเซลล์ใหม่เกิดขึ้น
- **Acceleration phase** ยีสต์อยู่ในระยะเร่งการเริ่มต้นการเจริญเติบโต
- **Exponential (log) phase** ยีสต์เข้าสู่ระยะที่มีการเจริญมากที่สุด จำนวนเซลล์มีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและคงที่ โดยมีการเจริญแบบทวีคูณ และจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นนั้นจะมีความสอดคล้องกับปริมาณสารอาหารที่มีในระบบ
- **Deceleration phase** อัตราเร่งการเจริญของยีสต์เริ่มชะลอ เริ่มมีการตายของยีสต์เกิดขึ้น
- **Stationary phase** เนื่องจากอัตราเร่งการตายเท่ากับอัตราเร่งการเจริญ กราฟจึงแสดงให้เห็นว่ายีสต์มีจำนวนคงที่
- **Death phase** ยีสต์มีอัตราเร่งการตายสูง เนื่องจากเซลล์ที่มีอายุมากขึ้นและสภาพแวดล้อมเริ่มไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น สารอาหารในระบบถูกใช้จนหมดลง (Asuhaim et al., 2013)



ภาพที่ 2.2 รูปแบบการเจริญของยีสต์

ที่มา: ดัดแปลงจาก A Level Revision. (2015)

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของยีสต์ (Camacho-Ruiz et al., 2003)

**ธาตุอาหาร (nutrient)** ยีสต์ต้องการสารอาหารที่เป็น แหล่งคาร์บอน เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน เช่น กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส แหล่งไนโตรเจน ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน ช่วยในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์เช่น กรดอะมิโนและโปรตีนต่างๆ และรูปสารอนินทรีย์ เช่น ไนเตรท และ/หรือ แอมโมเนียม นอกจากนี้ยังต้องการสารประกอบบางชนิดเพื่อทำหน้าที่เป็น growth factor เช่น วิตามิน

**ความเป็นกรด-ด่าง (pH)** ยีสต์สามารถเจริญได้ใน pH ช่วงที่กว้าง 3.5 ถึง 7.0 แต่จะสามารถเจริญได้ดีที่ pH 4.0-6.0 หากต่ำกว่า 3.0 และ/หรือ สูงเกิน 6.0 ยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ หรือเจริญได้ไม่ดี นอกจากนี้ pH ยังสามารถลดโอกาสการปนเปื้อนกับจุลินทรีย์อื่นๆในระหว่างการหมัก

**อุณหภูมิ** ยีสต์สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 40 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส หากอุณหภูมิสูงกว่านี้ จะส่งผลต่อผลผลิตที่ได้จากการหมัก และการอยู่รอดของยีสต์ลดลง

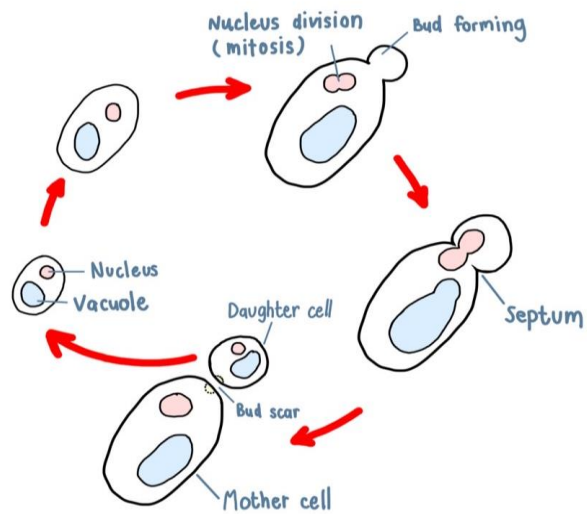
**การให้อากาศ** ยีสต์ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการหายใจ ยีสต์ที่อยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนมากจะส่งผลให้ยีสต์เพิ่มจำนวนเซลล์ แต่หากออกซิเจนมีน้อยหรือไม่เพียงพอ ยีสต์จะเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอล

### 2.2.2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาและการสืบพันธุ์ของเซลล์ยีสต์

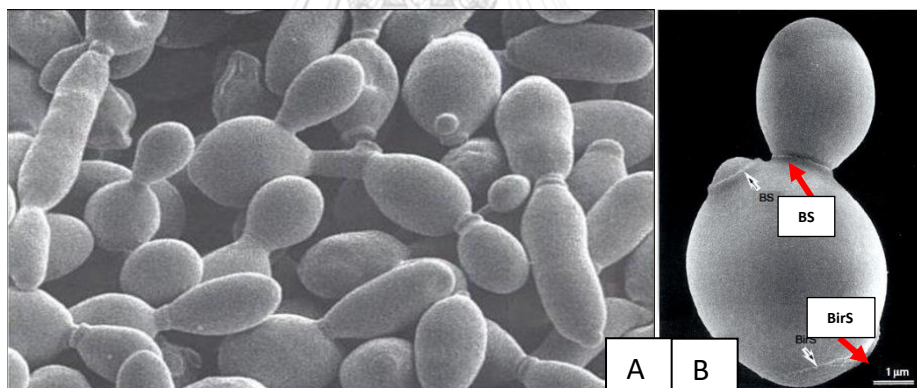
ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ ยีสต์จะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยวิธีการแตกหน่อ (budding) และ การแตกหน่อแบ่งเป็น 3 ประเภท ได้แก่

- 1 การแตกหน่อที่ขั้วเดียว (monopolar budding) จะสามารถแตกหน่อได้เพียงปลายด้านเดียว
- 2 การแตกหน่อสองขั้ว (bipolar budding) จะแตกหน่อทั้งด้านขั้วและปลายของเซลล์
- 3 การแตกหน่อหลายขั้ว (multipolar budding) ซึ่งสามารถเกิดได้ทุกรอบด้านของเซลล์ (Yarrow et al., 1998) โดย *S. Boulardii* มีการสืบพันธุ์ด้วยวิธีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว

การแตกหน่อเริ่มโดยเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมสร้างแวคิวโอล และเกิดการสะสมได้เยื่อหุ้มเซลล์ ตรงตำแหน่งที่จะเกิดการแตกหน่อ ซึ่งภายในของแวคิวโอลล้นบรรจุไลติกเอนไซม์ (lytic enzyme) ทำหน้าที่ย่อยสลายผนังเซลล์โดยเฉพาะส่วนที่เป็นโพลีแซ็กคาไรด์ ทำให้ผนังเซลล์อ่อนตัวลง นอกจากนี้แวคิวโอยังมีสารตั้งต้นที่ใช้สำหรับสังเคราะห์ผนังเซลล์อยู่ เมื่อเอนไซม์ถูกปล่อยออกมา จะส่งผลให้ผนังเซลล์อ่อนตัวและพองออกเป็นหน่อ จากนั้นออร์แกเนลล์และนิวเคลียสที่ได้จากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสจะถูกส่งไปยังเซลล์ลูก โดยมีโครโมโซมเพียง 1 ชุด (haploid cell) สร้างผนังกัน (septum) ระหว่างเซลล์แม่และเซลล์ลูก เมื่อผนังสมบูรณ์ เซลล์ลูกจะแยกออกจากเซลล์แม่ (ดังแสดงในภาพที่ 2.3) ซึ่งเซลล์แม่นั้นสามารถแตกหน่อใหม่ได้ทันที ซึ่งจะเกิดรอยแผลจากการแตกหน่อ (bud scar) ส่วนเซลล์ลูกนั้นจะต้องรอเซลล์มีการเจริญจนมีขนาดวิกฤตก่อน จึงจะสามารถแตกหน่อได้ (Yarrow et al., 1998) เซลล์ลูกที่เกิดจากการสืบพันธุ์ ด้วยวิธีการแตกหน่อ จะมีขนาดเล็กกว่าเซลล์แม่ รูปร่างไม่สมมาตร โดยเซลล์จะมีสัณฐานวิทยาแบบรี (ellipsoidal) (ดังแสดงในภาพที่ 2.4) (Zhao et al., 2017)



ภาพที่ 2.3 ไดอะแกรมการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของยีสต์ ด้วยวิธีการแตกหน่อ  
ที่มา: ดัดแปลงจาก Jahangeer et al., 2019



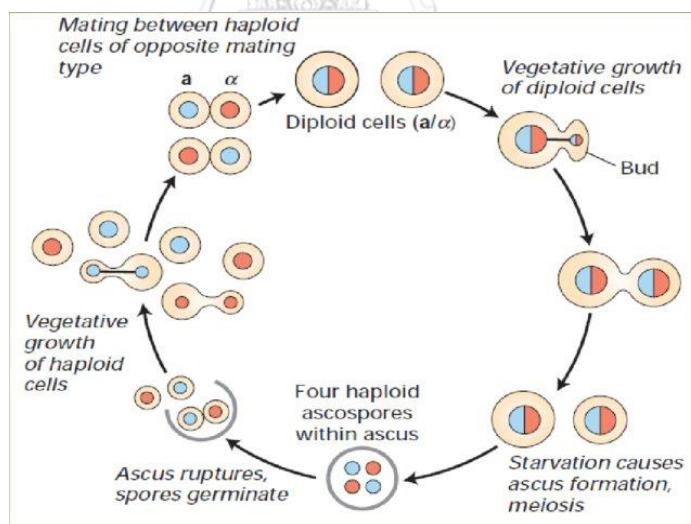
ภาพที่ 2.4 สัณฐานวิทยาของยีสต์ สายพันธุ์ *S. cerevisiae* เมื่อเกิดการแตกหน่อ  
(A) การแตกหน่อของยีสต์ และ (B) รอยแผลจากการแตกหน่อของเซลล์ลูก (bud scar, BS) และ รอย  
แผลจากการแตกหน่อจากเซลล์แม่ (birth scar, BirS)

ที่มา: Aksit., 2012



เมื่อยีสต์อยู่ในสภาวะที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญ (high-stress condition) เช่น สารอาหาร ยีสต์จะมีการปรับตัว โดยเปลี่ยนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยวิธีแตกหน่อ เป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วยวิธีการฟิชชัน (fission) (Zhao et al., 2017)

โดย *S. Boulardii* จัดเป็น แอสโคไมซีตัส ยีสต์ (ascomycetous yeast) เป็นยีสต์ที่สร้าง แอสโคสปอร์ (ascospore) ที่ถูกบรรจุภายในถุงแอสคัส ซึ่งส่วนมากจะมี 1 ถึง 4 สปอร์ ซึ่งสร้างจาก เซลล์ที่นิวเคลียสมีชุดโครโมโซมจำนวน 1 ชุด (haploid cell) และ mating type ที่ตรงข้ามกัน (a และ  $\alpha$ ) เกิดการผสมกัน รวมเข้ากับไซโทพลาสซึม และนิวเคลียส สร้างเป็นไซโกต (zygote) เป็น เซลล์ที่มีโครโมโซม 2 ชุด (diploid cell) เมื่อยีสต์อยู่ในสภาวะขาดอาหาร จะเกิดการแบ่งเซลล์แบบ ไมโอซิส (meiosis) ได้โครโมโซม 1 ชุดที่มี 4 นิวเคลียส ที่ถูกบรรจุในถุงแอสคัส (ascus) จากนั้นแต่ละ นิวเคลียสจึงพัฒนาเป็นแอสโคสปอร์ (ascospore) ที่มีโครโมโซม 1 ชุด เปลี่ยนเป็นแอสคัส (ดังแสดง ในภาพที่ 2.5) (Herskowitz et al., 1988) เซลล์ที่ได้จากการแบ่งเซลล์จึงมีขนาดเท่ากัน มีความ สมมาตร (symmetry) และเซลล์มีสัณฐานวิทยาแบบกลม (round)



ภาพที่ 2.5 ไดอะแกรมการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์ ด้วยวิธีการฟิชชัน (fission)

ที่มา: Aksit., 2012

### 2.2.2.3 ประโยชน์ของยีสต์โพรไบโอติก *S. Boulardii*

*S. Boulardii* สามารถออกฤทธิ์ได้หลายรูปแบบ ทั้งในการส่งเสริมสุขภาพ ป้องกัน และรักษาโรค เนื่องจากมีสมบัติ ดังต่อไปนี้

**ต้านทานต่อปฏิชีวนะ** ยาปฏิชีวนะถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาและป้องกันจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยมีวิธีฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายวิธี เช่น ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในแบคทีเรีย ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์หรือทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ อย่างไรก็ตามเมื่อรักษาด้วยยาปฏิชีวนะระยะหนึ่ง ประสิทธิภาพของยาจะลดลงและไม่สามารถรักษาโรคได้เหมือนเดิม เนื่องจากแบคทีเรานั้นสามารถปรับตัวให้ทนต่อยาปฏิชีวนะได้ หรือเกิดการดื้อยา การดื้อยาเกิดได้หลายสาเหตุ เช่น แบคทีเรียขับยาปฏิชีวนะออกนอกเซลล์โดยอาศัย efflux pump เพื่อลดความเข้มข้นของยา ป้องกันหรือขัดขวางไม่ให้ยาเข้าไปทำลายเซลล์โดยพัฒนาผนังเซลล์ให้หนาขึ้น หรือสร้างเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนแปลงหรือย่อยยาปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นการเกิดโดยธรรมชาติของแบคทีเรีย และอีกหนึ่งสาเหตุคือแบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์ เนื่องจากแบคทีเรียได้รับยีนต้านทานยาปฏิชีวนะจากแบคทีเรียเซลล์อื่นๆ ซึ่งอาจเป็นสายพันธุ์เดียวกันหรือคนละสายพันธุ์ก็ได้ ในทางกลับกันแบคทีเรียไม่สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาให้กับยีสต์ได้ ดังนั้นการใช้ยีสต์โพรไบโอติกจึงช่วยลดปัญหาการดื้อยาสำหรับผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะ (Surawicz et al., 1989 และ Czerucka et al., 2007)

**ผลต่อภาวะโภชนาการของร่างกาย** หลังจากได้รับสารพิษจากเชื้อก่อโรค เช่น *Escherichia coli* และ/หรือ แบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ทำให้เกิดอาการท้องร่วง ส่งผลให้เกิดการสูญเสียน้ำและเกลือแร่ ยีสต์จะไปกระตุ้นเอนไซม์ adenylate cyclase เพื่อลดการปล่อยเกลือออกนอกร่างกาย ทำให้สามารถช่วยลดอาการเสียน้ำและเกลือแร่ได้ (ประมวล ทราयทอง, 2560)

**รักษาและป้องกันโรคท้องร่วง-ท้องเสีย** โรงพยาบาลมีการนำ *S. Boulardii* มาใช้ในการรักษาโรคท้องร่วง เช่น ท้องร่วงเฉียบพลันในเด็ก (acute diarrhea in children) โรคท้องร่วงจากการเดินทาง (Traveler's diarrhea) หรือท้องร่วงที่เกิดจากเชื้อก่อโรค เช่น *E. coli* และ/หรือ *Vibrio spp.*, เมื่อร่างกายได้รับยีสต์ ยีสต์จะดูดซับสารพิษบริเวณลำไส้ โดยการผลิตเอนไซม์ protease ออกสู่นอกเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้สามารถลดความเป็นพิษจากเชื้อและยับยั้งการยึดเกาะของสารพิษบริเวณลำไส้ได้ทำให้สามารถรักษาและป้องกันอาการท้องเสียได้ (ประมวล ทราयทอง, 2560; Surawicz et al., 1989; Czerucka et al., 2007)

**กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน** ยีสต์สามารถผลิตเอนไซม์เซอรีนโปรทีเอส (serine protease) เพื่อเร่งปฏิกิริยาโปรทีโอไลซิส (proteolysis) ในการย่อยสลายสารพิษและทำลายโปรตีนขนาดเล็กของ *Clostridium difficile* (*C. difficile*) โดยเอนไซม์จะย่อยสลายที่สารพิษเอ (toxin A) ที่เชื้อสร้างขึ้น ซึ่งสารพิษนี้เป็นตัวกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวเข้ามาสู่บริเวณลำไส้ และเกิดการหลั่งสาร cytokine ส่งผลให้เกิดอาการถ่ายเหลว และไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกัน Immunoglobulin A (IgA) ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันธรรมชาติที่คอยดักจับเชื้อก่อโรคและต้านสารพิษในลำไส้ (Czerucka et al., 2007)

**เพิ่มระดับเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารอาหาร** เมื่อได้รับยีสต์ชนิดนี้เป็นประจำ กรดและ metabolize ต่างๆ รวมถึง polyamines จะทำให้เกิดการหลั่งเอนไซม์ เช่น มอลเตส (maltase) และ ซูเครส (sucrase) ส่งผลให้น้ำตาลโมเลกุลคู่ถูกเปลี่ยนเป็นสารน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น น้ำตาลซูโครส (sucrose) จะแตกตัวเป็นน้ำตาลกลูโคส (glucose) และ ฟรุคโตส (fructose) ร่างกายจึงสามารถดูดซึมเข้ากระแสเลือดได้ทันที (ประมวล ทราญทอง, 2560)

**ปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร** ยีสต์โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เมื่อร่างกายได้รับยีสต์โพรไบโอติก จะช่วยส่งเสริมและรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบ เมื่อจุลินทรีย์ประจำถิ่นเกิดเสียสมดุล เช่น การได้รับยาปฏิชีวนะ หรือ การได้รับเชื้อก่อโรคเข้าสู่ร่างกาย ยีสต์โพรไบโอติกจะเข้าแทนที่เชื้อก่อโรค และ/หรือ แย่งสารอาหารที่เชื้อก่อโรคใช้ในการเจริญ รวมถึงสร้างเอนไซม์เพื่อยับยั้งและทำลายสารพิษจากเชื้อก่อโรค (Czerucka et al., 2007) และจากการศึกษาของ Kotowska และคณะ (2005) ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับการรักษาโรคท้องร่วงเฉียบพลันในเด็ก โดยทดสอบในเด็ก 269 คน อายุเฉลี่ย 6 เดือน ถึง 14 ปี ที่ป่วยจากการติดเชื้อทางเดินหายใจ และหูดอักเสบ และเริ่มรักษาด้วยยาปฏิชีวนะทางปาก หรือ หลอดเลือดดำ ใน 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการสุ่มรักษาด้วย *S. Boulardii* ปริมาณ 250 mg 2 ครั้ง ต่อวัน ในจำนวนผู้ป่วย 132 คน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมด้วยการใช้ยาหลอก (placebo) ในจำนวนผู้ป่วย 137 คน พบว่ามีผู้ป่วยที่เป็นโรคท้องร่วงเฉียบพลันทั้งหมด 38 คน จาก 246 คน ที่มีอาการถ่ายเหลวมากกว่า 3 ครั้ง ต่อวัน ระหว่างที่ได้รับยาปฏิชีวนะ โดยมีผู้ที่ได้รับ *S. Boulardii* ป่วย 9 คน จาก 119 คน คิดเป็น 8% โดยมีสาเหตุจาก *C. difficile* 3 คน ในขณะที่ชุดควบคุมนั้น พบผู้ป่วย 29 คน ใน 127 คน คิดเป็น 23% เกิดจาก *C. difficile* 10 คน จึงสรุปได้ว่าผู้ที่ได้รับ *S. Boulardii* ช่วยให้จุลินทรีย์ในร่างกายมีความสมดุล จึงสามารถป้องกันและลดความเสี่ยงจากโรคท้องร่วงเฉียบพลันได้อย่างมีนัยสำคัญ

จากประโยชน์ที่กล่าวมาข้างต้น พบว่า *S. Boulardii* มีความสามารถในการรักษา และป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้มีการนำยีสต์โพรไบโอติกมาผลิตและพัฒนาเป็น ผลิตภัณฑ์

#### 2.2.2.4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ยีสต์โพรไบโอติก

ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์มากมายในท้องตลาดเกี่ยวกับการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย ซึ่งยีสต์โพรไบโอติกได้รับการยอมรับจากแพทย์และการยืนยันจากงานวิจัยว่าสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ บริษัท Biocodex มีชื่อเสียงเกี่ยวกับยีสต์โพรไบโอติกและการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากอย่างต่อเนื่อง ซึ่งทางบริษัทได้ผลิตยีสต์ในรูปแบบเชื้อแห้ง และจำหน่ายในรูปแบบผงและแคปซูล ปัจจุบันมีจะเห็นได้ว่ามีหลายบริษัทหันมาให้ความสนใจ ผลิต และจัดจำหน่ายกันมากขึ้น (ดังแสดงในตารางที่ 2.4) (Abid et al., 2022)



ตารางที่ 2.4 ผลิตภัณฑ์จากยีสต์โพรไบโอติกที่วางจำหน่ายในท้องตลาด

Commercial Probiotic Product	Probiotic Strain	Serving per Pack	Company	Country	Dose per Capsule Or Tablet	Stability at 25 °c	Colony Forming Unit (CFU)	Cost
Reflor (Single strain)	<i>Saccharomyces Boulardii</i> Iyo	10 Capsules	Biocodex	Turkey	250 mg	✓	5 x 10 <sup>9</sup> CFU	16\$
Inteflor	<i>Saccharomyces Boulardii</i> + 1 bacterial probiotic strain	30 Capsules	Yamamoto Research	United States	150 mg	✓	15 x 10 <sup>9</sup> CFU	20\$
Ultimate Flora Probiotic	<i>Saccharomyces Boulardii</i> + 10 bacterial probiotic strain	31 Capsules	Renew Life	United States	—	✓	25 x 10 <sup>9</sup> CFU	16\$
Florstor	<i>Saccharomyces Boulardii</i> Iyo	20 Capsules	Biocodex	United States	250 mg	✓	5 x 10 <sup>9</sup> CFU	20\$
<i>Saccharomyces Boulardii</i>	<i>Saccharomyces Boulardii</i>	100 Capsules	Kirkman	United States	150 mg	✗	3 x 10 <sup>9</sup> CFU	39\$
<i>Saccharomyces Boulardii</i>	<i>Saccharomyces Boulardii</i>	120 Capsules	Allergy Research Group	United States	150 mg	✗	3 x 10 <sup>9</sup> CFU	12\$
<i>Saccharomyces Boulardii</i> 10B	<i>Saccharomyces Boulardii</i>	120 Capsules	Pure Therapro Rx	United States	—	✗	10 x 10 <sup>9</sup> CFU	21\$
Nexabiotic	<i>Saccharomyces Boulardii</i>	60 Capsules	Dr Flormulas	United States	150 mg	✓	17 x 10 <sup>9</sup> CFU	21\$
Flora	<i>Saccharomyces Boulardii</i>	30 Capsules	Institute Rosell Lafelmano	Belgium	—	✓	10 x 10 <sup>9</sup> CFU	14\$
Daily Prodiotic	<i>Saccharomyces Boulardii</i>	100 Capsules	Florastor	United States	250 mg	✓	10 x 10 <sup>9</sup> CFU	19\$
<i>Saccharomyces Boulardii</i> PLUS MOS	<i>Saccharomyces Boulardii</i>	90 Capsules	Jarrow Formulas	United States	—	✓	5 x 10 <sup>9</sup> CFU	22\$
Perenterol	<i>Saccharomyces Boulardii</i> Iyo	100 Capsules	Biocodex	Germany	250 mg	✓	5 x 10 <sup>9</sup> CFU	20\$

ที่มา: Abid et al., 2022

## 2.2.3 สภาวะการเพาะเลี้ยงและสารอาหารที่ส่งผลต่อการเจริญของยีสต์โพรไบโอติก

### 2.2.3.1 แหล่งอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของยีสต์

อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces* มีสูตรผสมที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยง โดยแหล่งสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ถูกจำแนกออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

**แหล่งคาร์บอน (Carbon source)** เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญสำหรับกิจกรรมและการเจริญของเซลล์ เช่น กาแลคโตส (galactose) ซูโครส (sucrose) ฟรุคโตส (fructose) มอลโตส (maltose) แลคโตส (lactose) กลูโคส (glucose) และแป้งบางชนิด (starch) (Chin et al., 2015 และ Yang et al., 2019)

**แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source)** เป็นแหล่งที่ส่งผลต่อจำนวนเซลล์และการเจริญเช่นเดียวกัน เช่น ทริปโตเนน (tryptone) เคซีน (casein) สารสกัดยีสต์ (yeast extract) เพปโตเนน (peptone) บีฟเอ็กซ์แทรกซ์ (beef extract) แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ยูเรีย (urea) ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ซิเตรท (diammonium hydrogen citrate) ไตรแอมโมเนียมซิเตรท (triammonium citrate) แอมโมเนียมไนเตรท (ammonium nitrate) แอมโมเนียมคลอไรด์ (ammonium chloride) โพแทสเซียมไนเตรท (potassium nitrate) (Chin et al., 2015 และ Yang et al., 2019)

**พรีไบโอติก (Prebiotics)** เป็นอาหารหนึ่งที่ร่างกายไม่สามารถย่อยและดูดซึมได้ที่ลำไส้เล็ก แต่จะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่มีชีวิต และ เช่น ฟรุคโต-โอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharides, FOS) กาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์ (galacto-oligosaccharides, GOS) ไชโล-โอลิโกแซคคาไรด์ (xylo-oligosaccharides, XOS) ไอโซ-มอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (isomalto-oligosaccharides, IMO) และ อินูลิน (inulin) เป็นต้น (Davani-Davari et al., 2019) มีรายงานว่า การเติมพรีไบโอติกลงในยีสต์ เพื่อใช้เป็นคริโอโพรเทกแทนต์ (cryoprotectant) สำหรับการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) พบว่า การเพาะเลี้ยงยีสต์ในไซโล-โอลิโกแซคคาไรด์ และอินูลิน ยีสต์สามารถปกป้องเซลล์ได้ดีขึ้น 20 % โดยมีจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตสูงกว่า 10 log CFU/mL (Guowei et al., 2018)

### 2.2.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับห้องปฏิบัติการและกึ่งอุตสาหกรรม

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานที่นิยมใช้เพาะเลี้ยงยีสต์ในระดับห้องปฏิบัติการ เช่น yeast extract peptone dextrose (YPD หรือ YEPD) มีส่วนประกอบเป็น g/L: peptone 10 g, glucose 20 g และ yeast extract 10 g หรือ yeast extract peptone glycerol (YPG) มีส่วนประกอบดังนี้ g/L: peptone 20 g, glucose 20 g และ yeast extract 10 g และอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในงานวิจัย คือ yeast malt (YM) เป็นอาหารประเภท complex media และมีส่วนประกอบคือ g/L: yeast extract 3 g, Malt extract 3 g, peptone 5 g และ glucose 10g

สำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ในระดับกึ่งอุตสาหกรรม พบว่า เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์โดยการปรับสัดส่วนปริมาณแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส (glucose) น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) แหล่งไนโตรเจน เช่น โซเดียมไนเตรด (sodium nitrate) สารสกัดยีสต์ (yeast extract) นอกจากนี้ปริมาณเซลล์ขึ้นอยู่กับขนาดของถังหมักที่ใช้เพาะเลี้ยงการให้อากาศและการควบคุม pH (Chin et al., 2015)

### 2.2.3.3 อาหารทางเลือกสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ (alternative medium)

หลายงานวิจัยได้ทดลองเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำผัก-ผลไม้ โดยเฉพาะน้ำผลไม้ที่มีสมบัติและสารอาหารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์ ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์อย่างกว้างขวาง ยกตัวอย่างเช่น Fratianni และคณะ (2014) ศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์โพรไบโอติกในน้ำเบอร์รี่รวม และนำเซลล์มาห่อหุ้มด้วยวิธี encapsulate โดยใช้ แอลจีเนต (alginate) อินูลิน (inulin) และ แซนแทนกัม (xanthan gum) พบว่า เซลล์สามารถเจริญได้เช่นเดียวกันและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มส่งผลให้เซลล์มีอัตราการอดสูงขึ้นในน้ำย่อยระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง และยังสามารถดูดซึมสารแอนโทไซยานินจากน้ำผลไม้ และจากงานวิจัยของ Farinazzo และคณะ (2020) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์โพรไบโอติกในน้ำแอปเปิล พบว่า นอกจากสามารถเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำผลไม้แล้ว ยังสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้อีกด้วย

องุ่นถูกนำมาทำไวน์ตั้งแต่สมัยโบราณและเหมาะสมมากกว่าผลไม้ชนิดอื่นๆ และเป็นน้ำผลไม้ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ เนื่องจากมีน้ำตาล กรด และสารอาหารที่เหมาะสมแก่การเจริญ โดยไม่จำเป็นต้องเติมหรือปรับแต่งส่วนผสมอื่นๆ นอกจากนี้องุ่นเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลก สามารถปรับตัวได้ดีทั้งในเขตหนาว กึ่งร้อน และร้อนสำหรับประเทศไทยนั้นนิยมบริโภคเป็นองุ่นสด สามารถปลูกได้ดี มีการเจริญเติบโตดี ให้ผลผลิตสูง สามารถปลูกได้ทุกภูมิภาคของไทย

นอกจากนี้ยังยังสามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ลูกเกด แยม เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (Sabra et al., 2021)

สารอาหารหลักในน้ำองุ่นแดงประกอบด้วย โปรตีน 0.40% ไขมัน 0.09% คาร์โบไฮเดรต 15.6% โดยมีน้ำตาล 14% ประกอบด้วยฟรุกโตส 7.42% กลูโคส 6.61% (รวมถึงน้ำตาลซูโครส แลคโตส มอลโตสในปริมาณน้อย) แร่ธาตุ ได้แก่ แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม แมงกานีส ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โซเดียม ซิงค์ วิตามิน ได้แก่ วิตามินบี วิตามินซี ไทอามีน ไนซิน นอกจากนี้ยังองุ่นมีกรดหลักคือ กรดซิตริกและมาลิก นอกจากนี้ยังองุ่นยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ เควอซีทิน (quercetin) รูติน (rutin) และ ไมเซอิติน (myricetin) และ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ ได้แก่ ไซยานิดิน (cyanidin) มัลวิดิดิน (Malvidin) และ เดลฟินิดิน (delphinidin) เป็นต้น (Cosme et al., 2018)

อย่างไรก็ตามสำหรับน้ำผักที่ใช้เพาะเลี้ยงยังมีงานวิจัยค่อนข้างน้อย เช่น จากการศึกษาของ Bzducha-Wróbel และคณะ (2018) ศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์โพรไบโอติกในน้ำมันฝรั่ง (potato juice) พบว่า นอกจากจะช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์แล้ว ยังช่วยเพิ่มอัตราส่วนของ mannoprotein ที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ ส่งผลให้เซลล์มีความแข็งแรงขึ้น และ จากการศึกษาของ Yang และคณะ (2019) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์โพรไบโอติกโดยใช้น้ำกลอยจีน (Chinese jam) เป็นสับสเตรท พบว่า สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์และผลิตสารประกอบที่ระเหยได้ เช่น เอสเทอร์ (esters) แอลเคน (alkanes) แอลกอฮอล์ (alcohols) และ คีโตน (ketone) เพื่อพัฒนากลิ่นและรสของน้ำหมัก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้สมุนไพรไทยที่สามารถพบได้ทั่วไป และนิยมนำมาผลิตเป็นเครื่องดื่ม ได้แก่ น้ำใบบัวบก และ น้ำกระเจียว

**บัวบก (*Centella asiatica* L.)** เป็นพืชผักล้มลุก สมุนไพร สามารถพบได้ในหลายประเทศ เช่น อินเดีย ศรีลังกา จีน อินโดนีเซีย มาเลเซีย และไทย (Mohd Zainol et al., 2009) นำมาทำเป็นเครื่องดื่ม อาหาร และยารักษาโรค สารอาหารในใบบัวบกประกอบด้วย โปรตีน 4.0% ไขมัน 0.2% คาร์โบไฮเดรต 6.7% แร่ธาตุ ได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก และวิตามิน ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินบี1 วิตามินบี2 และวิตามินบี3 วิตามินซี ไนอะซิน เบต้าแคโรทีน (กลุ่มวิจัยอาหารเพื่อโภชนาการ สำนักโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, 2018)



นอกจากนี้ มีสารหลักที่พบในบัวบกจัดอยู่ในกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ไกลโคไซด์ (triterpenoid glycoside) เช่น กรดเอเชียติก (asiatic acid) เอเชียติโคไซด์ (asiaticoside) กรดมาดีคาสสิก (madecassic acid) และสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบซึ่งแสดงสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบที่จัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ เช่น นารินจิน (naringin) เควอซีทิน (quercetin) และ รุทีน (rutin) (Mohd Zainol et al., 2009)

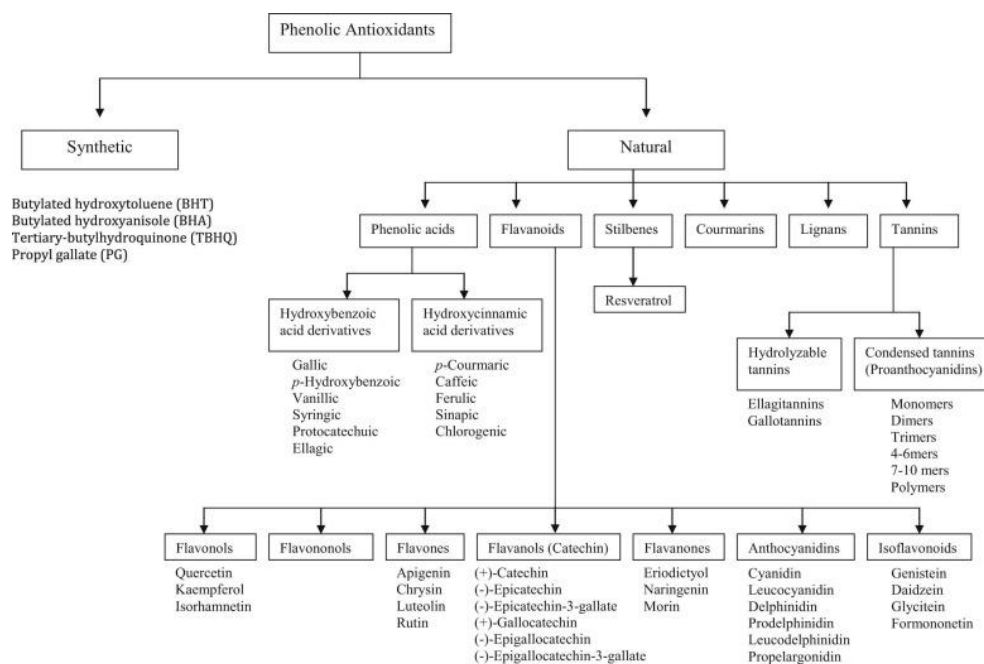
**กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.)** เป็นพืชสมุนไพรที่กลีบดอกนิยมนำมา เป็นเครื่องดื่ม อาหาร สีสผสมอาหาร และยาสมุนไพรเพื่อรักษาโรค ดอกของกระเจี๊ยบมีสีแดงซึ่งมีสาร แอนโทไซยานิน เป็นสารประกอบที่จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีสารประกอบหลักคือ delphinidin-3-sambubioside และ cyanidin-3-sambubioside และมีสารประกอบฟีนอลิกสูง เช่น quercetin myricetin ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Wong et al., 2002)

สารอาหารในกระเจี๊ยบ ได้แก่ โปรตีน 1.7% ไขมัน 0.1% คาร์โบไฮเดรต 5.84% ซึ่ง ประกอบไปด้วย กลูโคส 1.29% ฟรุคโตส 1.12% และซูโครส 0.87% (กลุ่มวิจัยอาหารเพื่อโภชนาการ สำนักโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, 2018) กรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดซิตริก (citric acid) กรดซักซินิก (succinic acid) กรดออกซาลิก (oxalic acid) กรดทาร์ทาลิก (tartaric acid) กรดมาลิก (malic acid) และ กรดฮิบิสคัส (hibiscus acid) ส่งผลให้น้ำกระเจี๊ยบมีรสเปรี้ยว (Izquierdo-Vega et al., 2020)

จะเห็นได้ว่านอกจากสารอาหารแล้ว ในผัก-ผลไม้ยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) เป็นสารประกอบในอาหารที่ส่งผลต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องมีฤทธิ์อย่างเจาะจง และต้องไม่มีโทษต่อร่างกายหรือมีผลข้างเคียงน้อย โดยทั่วไป

พ

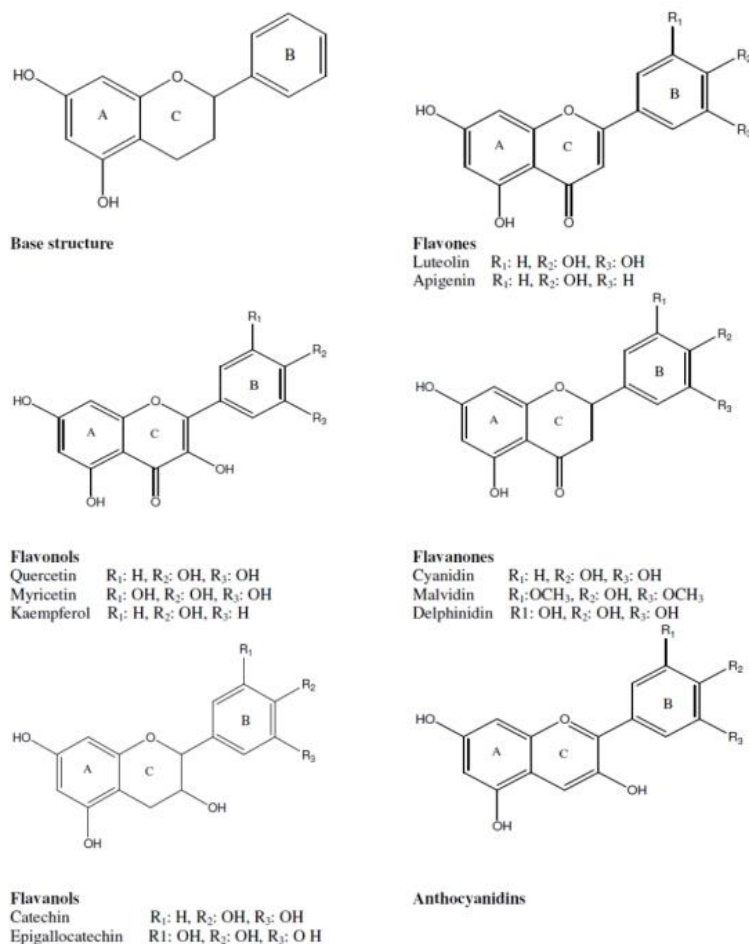
โพลีฟีนอล (polyphenols) เป็นองค์ประกอบเชิงหน้าที่ในอาหาร ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สามารถยับยั้งและชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เป็นสาเหตุการเกิดอนุมูลอิสระ (Garcia-Salas et al., 2010) สารต้านออกซิเดชันธรรมชาติ เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acids) แทนนิน (tannins) หรือ ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) (ดังแสดงในภาพที่ 2.6) (Shahidi et al., 2015 และ Lee et al., 2021)



ภาพที่ 2.6 ประเภทของสารประกอบที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา: Shahidi, F., 2015

กลุ่มของฟลาโวนอยด์นั้นเป็นสารประกอบฟีนอลประเภทโพลีฟีนอล มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนแอโรมาติก มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโมเลกุล (ดังแสดงในภาพที่ 2.7) และละลายน้ำได้ มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง โรคหัวใจและระบบไหลเวียนโลหิต ได้แก่ ฟลาโวนอล (flavonol) ฟลาโวนอน (flavonone) ฟลาโวน (flavone) ฟลาโวนอล (flavanol) ไอโซฟลาโวน (isoflavone) คาเทชิน (catechin) และ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) (Tanwar et al., 2012)



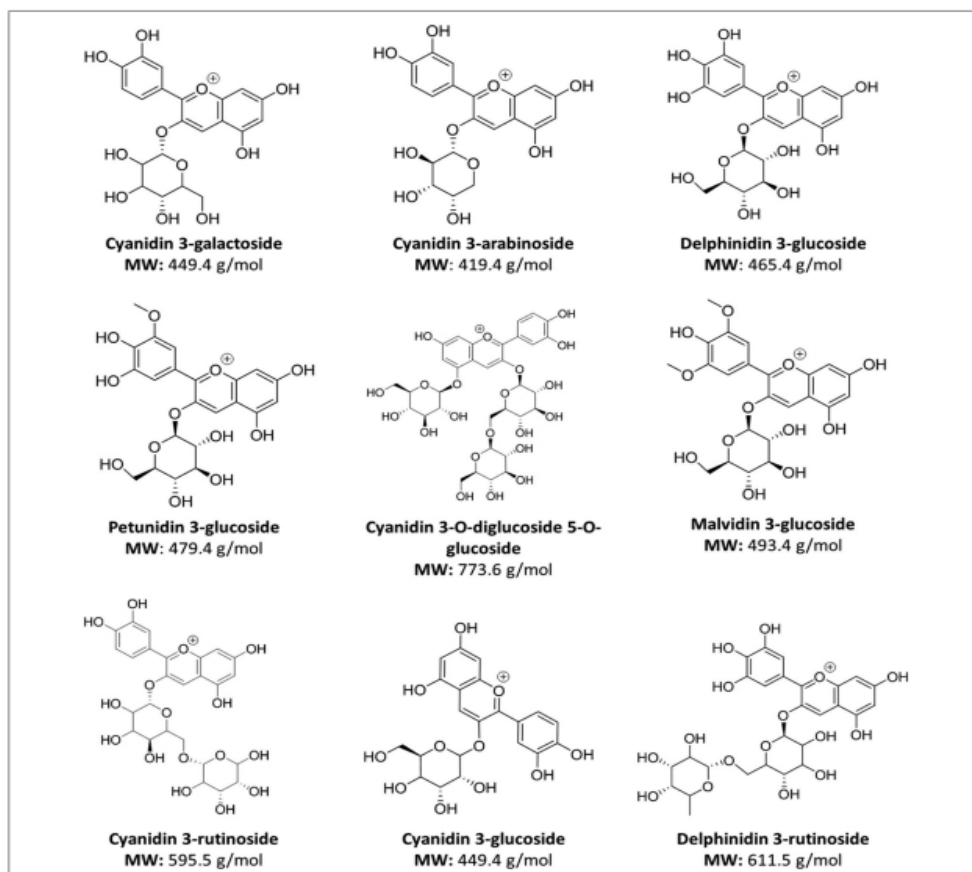
ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์

ที่มา: Tanwar et al., 2012

CHULALONGKORN UNIVERSITY

แอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นรงควัตถุที่พบในดอกและผลไม้ ให้สีแดง ม่วง และน้ำเงิน ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ ช่วยต้านอนุมูลอิสระ ลดอัตราความเสี่ยงของโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน ลดระดับคอเลสเตอรอล และป้องกันโรคมะเร็ง (Khoo et al., 2017) สีของแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับความเป็นกรดต่าง โดย pH ต่ำกว่า 3 จะทำให้แอนโทไซยานินมีสีแดง pH 7-8 จะทำให้มีสีม่วง หาก pH สูงกว่า 11 จะทำให้ มีสีน้ำเงิน สารแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนไปตามสภาวะของกรด-ด่าง อุณหภูมิ และโครงสร้างของสาร โดยมีโครงสร้างแบบ C6-C3-C6 เช่น ไชยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) พีโอนิดิน (peonidin) เพทูนิดิน (petunidin) มัลวิดิดิน (malvidin) และ พีลาร์โกนินิดิน (pelargonidin) (ดังแสดงในภาพที่ 2.8) อาหารที่เป็นแหล่งของแอน

โทไซยานิน เช่น องุ่นแดง ทับทิม เบอร์รี่ กระหล่ำปลีม่วง กระเจี๊ยบ หรือดอกอัญชัน เป็นต้น (Cortez et al., 2017)



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของสารประกอบแอนโทไซยานิน

ที่มา: Cortez et al., 2017

## 2.3 การผลิตเม็ดโพรไบโอติกแบบฟู่

ผลิตภัณฑ์จากยีสต์โพรไบโอติกส่วนมากถูกนำมาผลิตในรูปแบบของยาเม็ด ผง และ เม็ดยาแบบฟองฟู ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารเคมี เม็ดยาที่มีประสิทธิภาพจะสามารถละลายได้ง่าย ช่วยให้ร่างกายสามารถดูดซับยาได้อย่างรวดเร็ว โดยการผลิตยาในรูปแบบเม็ดฟู่มีทั้งข้อดีและข้อเสีย ดังนี้ (ดังแสดงในตารางที่ 2.5) (Ipci et al., 2016)

## ตารางที่ 2.5 ข้อดีและข้อเสียของเม็ดโพรไบโอติกแบบฟู

ข้อดีของเม็ดฟู	ข้อเสียของเม็ดฟู
1. เกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว	1. มีรสชาติไม่พึงประสงค์จากองค์ประกอบของเม็ดฟูบางชนิด
2. ไม่จำเป็นต้องกลืนเป็นยาเม็ด	2. เม็ดฟูมีขนาดใหญ่ ต้องใช้บรรจุภัณฑ์ขนาดพิเศษ
3. สะดวกในการพกพา	3. ต้นทุนในการผลิตสูงเนื่องจากใช้ส่วนผสมหลายชนิดและปริมาณสารที่เพิ่มขึ้น
4. มีความน่ารับประทานมากขึ้น	
5. มีความเสถียรและร่างกายสามารถดูดซึมได้เร็ว	
6. ยาสามารถออกฤทธิ์ได้อย่างแม่นยำ	

ที่มา Patel et al., 2018

### 2.3.1 ส่วนประกอบและส่วนผสมอื่นๆของตำรับยาเม็ดฟู

ยาเม็ดฟูทั่วไปประกอบด้วยสารที่เป็นกรดและต่าง ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วในน้ำ และจะปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา

- 1) **ตัวยาค้ำคูณ** โดยส่วนมากเป็นตัวยาค้ำคูณที่สามารถละลายได้ในน้ำ
- 2) **ยาสำหรับเกิดฟองฟู (effervescent base)** เป็นส่วนผสมของสารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาฟองฟู การเกิดฟองฟูเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรด (เช่น กรดซิตริก หรือ กรดทาร์ทาลิก) และต่าง (เช่น โซเดียมไบคาร์บอเนต)

**สารที่มีฤทธิ์เป็นกรด** สามารถเลือกใช้ได้จาก 3 แหล่ง ได้แก่

- กรดอาหาร (food acids) เช่น

**กรดซิตริก (citric acid)** เป็นกรดอินทรีย์ที่เป็นกรดอ่อน ละลายน้ำได้ดี ให้รสชาติเหมือนผลไม้ อาจใช้ในรูปแบบ monohydrate (ไม่ดูดความชื้นที่ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) หรือ anhydrous (ไม่ดูดความชื้นที่ความชื้นสัมพัทธ์ 50-75%)

**กรดทาร์ทาลิก (tartaric acid)** ละลายน้ำได้ดี รสชาติอ่อนกว่ากรดซิตริก (ไม่ดูดความชื้นที่ความชื้นสัมพัทธ์ 65% ซึ่งดีกว่ากรดซิตริก แต่มีความเป็นเป็นกรดน้อยกว่า ราคาแพง และตอกเม็ดได้ประสิทธิภาพไม่ดี

**กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid)** ละลายได้ดี ไม่ดูดความชื้นแต่ถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย สามารถใช้ผสมยาที่ไวต่อความชื้นได้เพราะกรดแอสคอร์บิกไม่ดูดความชื้น แต่ตอกเม็ดได้ประสิทธิภาพไม่ดี

กรดอื่นๆ เช่น กรดฟอร์มิก กรดนิโคตินิก กรดมาลิก กรดซัคซินิก เป็นต้น

- แอซิดแอนไฮดรไรต์

ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดเพื่อเตรียมตำรับยาเม็ดฟู หากเลือกใช้แอซิดแอนไฮดรไรต์ จะไม่สามารถใช้น้ำในการเตรียมตำรับได้เพราะจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอ่อนก่อนนำไปใช้ได้ เช่น glutaric anhydride (สามารถละลายได้ในน้ำเย็น แต่มีรสชาติไม่ดี) citric anhydride และ succinic anhydride เป็นต้น

- เกลือของกรด

เช่น เกลือไฮโดรคลอไรด์ของกรดอะมิโน (นิยมใช้เมื่อต้องการเลี่ยงการเพิ่มความเข้มข้นของอิเล็กโทรไลต์ในสูตรยา มีราคาสูง ดูดความชื้นไว) โซเดียมไดไฮโดรเจนซิเตรต (sodium dihydrogen citrate) ไดไฮโดรเจนไฮโดรเจนซิเตรต (dihydrogen citrate) และโซเดียมแอซิดฟอสเฟต (sodium acid phosphate) (ไม่ดูดความชื้นต่ำและละลายน้ำได้ดี)

**สารที่มีฤทธิ์เป็นด่าง** เป็นสารจำพวกคาร์บอเนตหรือไบคาร์บอเนต โดยส่วนมากจะนิยมใช้ไบคาร์บอเนตมากกว่า เช่น

- โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) เป็นนิยมใช้เนื่องจากละลายน้ำได้ดี ไม่เป็นพิษ ราคาถูก สามารถปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ 52% โดยน้ำหนัก มีความชื้นต่ำกว่า 1% ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% และที่ความชื้นสัมพัทธ์ 85% สารจะดูดความชื้นและสลายตัว และที่อุณหภูมิสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส สารจะเปลี่ยนเป็นโซเดียมคาร์บอเนต

- โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) สามารถใช้ได้ทั้งในรูปแบบ anhydrous, monohydrate และ decahydrate มีความสามารถละลายน้ำได้ดี

- โพแทสเซียมไบคาร์บอเนต (potassium bicarbonate) สามารถละลายน้ำได้ สลายตัวที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส และดูดความชื้นที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80%

- โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate) ละลายน้ำได้ดี และดูดความชื้นได้ดีมากที่ความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่า 2%

3) **สารช่วยอื่นๆ ที่นิยมใช้สำหรับการเตรียมตำรับยาเม็ดฟู** เช่น สารช่วยลื่น สารช่วยในการเกาะตัวหรือแตกตัว เป็นต้น โดยพิจารณาจากสารที่มีความชื้นต่ำ ละลายน้ำได้ดี เช่น

- สารช่วยลื่น (lubricants) สารช่วยลื่นที่ใช้ในการเตรียมยาเม็ดฟู่มีข้อจำกัดในการใช้ คือ ต้องไม่เป็นพิษ ไม่มีรสชาติ และละลายน้ำได้ดี เช่น สเตียเรต (stearate) มีลักษณะไม่ละลายน้ำ เกิดชั้นฟิล์มและเป็นฟองบนผิว โซเดียมเบนโซเอตที่เติมหมู่ซิลิโคน (siliconized sodium benzoate) และโพลีเอธิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) ซึ่งในงานวิจัยได้ใช้โพลีเอธิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) ในการเป็นสารช่วยลื่น เพื่อเป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยยา ทำให้มีความคงตัว (Taymouri et al., 2019)
- สารยึดเกาะ (binders) อาจส่งผลให้ตัวยาละลายช้าลง เช่น polyvinylpyrrolidone (PVP) มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ และสามารถดูดซับน้ำได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังเป็นสารยึดเกาะแล้ว ยังเป็นสารที่ช่วยเพิ่มการละลายสำหรับยาที่ละลายยากได้อีกด้วย (Taymouri et al., 2019)
- สารช่วยไหล (glidants) อาจไม่จำเป็นต้องใช้ในการเตรียมตำรับยาเม็ดฟู่ที่มีการผลิตขนาดใหญ่ แต่ในการผลิตระดับเล็ก สารมีปริมาณน้อย อาจจะติดที่ข้างในเครื่องตอกได้
- สารแต่งรสหวาน (sweeteners) อาจเลือกใช้ซูโครสหรือน้ำตาลแอลกอฮอล์ในการเตรียมตำรับยาเม็ดฟู่

### 2.3.2 การตอกเม็ด (tableting)

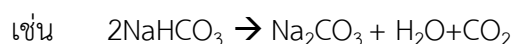
การตอกโดยตรง สารที่ต้องการตอกจะต้องไหลดี ไม่แยกผสม และสามารถตอกได้โดยตรง และการตอกไฟฟ้าชนิดสากเดี่ยวหรือชนิดหมุนเวียน (rotary) จะต้องเติมสารช่วยลื่นเพื่อช่วยลดปัญหาที่เกิดจากการติดที่ผิวหน้าสาก (ดังแสดงในภาพที่ 2.9)



ภาพที่ 2.9 เครื่องตอกเม็ดยา (A) ชนิดสากเดี่ยว และ (B) ชนิดไฟฟ้า

### 2.3.3 ความคงตัวและบรรจุภัณฑ์

ปัญหาสำคัญของผลิตภัณฑ์ของเม็ดยาแบบฟองฟูคือ สูญเสียความสามารถในการเกิดฟองฟู หากเก็บไว้นานหรือสัมผัสกับความชื้นเนื่องจากเม็ดฟูส่วนมากดูดความชื้นได้ดี ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย ได้ง่ายหาบรรจุในบรรจุภัณฑ์ที่ไม่เหมาะสม



ดังนั้น บรรจุภัณฑ์ควรป้องกันความชื้นได้ดี เช่นการห่อเม็ดยาด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ และบรรจุใส่หลอดโลหะเพื่อป้องกันการสัมผัสความชื้น และเก็บในสภาวะที่มีความชื้นต่ำโดยเม็ดยาต้องไม่ชื้นหรือแตกหักระหว่างบรรจุ (Patel et al., 2018; Taymouri et al., 2019; พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์., 2004)

### 2.3.4 คุณสมบัติของเม็ดฟู

การทดสอบสมบัติทางกายภาพของเม็ดฟู (Nagashima et al., 2013)

ความแปรปรวนของน้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดฟู (Mean weight) สุ่มชั่งตัวอย่างด้วยเครื่องชั่ง จำนวน 10 เม็ด ดำรับที่ผ่านการประเมินจะต้องมีค่าความแปรปรวนไม่เกิน 5%

ทดสอบความแข็งของเม็ดฟู (Hardness test) เป็นการทดสอบความแข็งของเม็ดฟูจากแรงกดหรือทำให้แตกภายใต้แรงกดตัวอย่างต่อเนื่อง จำนวน 10 เม็ด โดยใช้เครื่องทดสอบความแข็ง โดยมีหน่วยเป็นนิวตัน คำนวณค่าเฉลี่ย ค่าความแข็งที่น้อยที่สุดที่ยอมรับได้อยู่ที่ 30 นิวตัน

ทดสอบการกร่อนของเม็ดฟู (Friability) เป็นการทดสอบความแข็งแรงกระแทกโดยใช้เครื่อง Friabilator จำนวน 10 เม็ด ทำการวัดที่ 25 rpm เป็นเวลา 4 นาที โดยค่าน้ำหนักที่เสียไปต้องมีค่าไม่เกิน 1%

ทดสอบการแตกตัว (Disintegration) โดยวัดจากเวลาที่ใช้ในการแตกตัว ในน้ำกลั่นที่ อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส ทดสอบโดยใช้เครื่อง Disintegration apparatus จำนวน 6 เม็ด โดยเวลาที่ยอมรับได้ต้องไม่เกิน 5 นาที

### การทดสอบความเสถียรและอายุการเก็บของเม็ดฟู

เก็บผลิตภัณฑ์เม็ดฟูที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน ตรวจนับเซลล์ทุก 15 วัน (0 15 30 45 และ 60) (Nagashima et al., 2013)



## 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของ Nagashima และคณะ (2013) ได้ศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยการนำยีสต์และแบคทีเรียโพรไบโอติกมาผลิตในรูปแบบผงและเม็ดฟู พบว่า กรดทาร์ทาริก กรดซิตริก โพลีไวนิลไพร์โรลิโดน (polyvinylpyrrolidone, PVP) และหญ้าหวาน ส่งผลเสียต่อการเจริญของยีสต์โพรไบโอติก โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) ซูโครส (sucrose) ส่งผลดีต่อการเจริญของเซลล์ เมื่อศึกษาแรงที่ใช้ในดอกเม็ด 20 40 และ 60 นิวตัน พบว่า ที่ 20 นิวตัน จำนวนยีสต์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \geq 0.05$ ) เมื่อใช้แรงในการดอก 40 และ 60 นิวตัน พบว่า จำนวนเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน ในบรรจุภัณฑ์พลาสติก พบว่า จำนวนเซลล์ยีสต์ในรูปแบบผงลดลงน้อยกว่า 0.3 logarithm cycle ในขณะที่จำนวนเซลล์ในรูปแบบอัดเม็ดลดลงถึง 2.3 logarithm cycle ซึ่งการลดลงอาจเกิดจากการใช้แรงในการดอกที่สูงเกินไป จึงส่งผลกระทบต่อผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น การบาดเจ็บ ทำให้เซลล์ในรูปแบบเม็ดฟูมีจำนวนลดลงมากกว่ารูปแบบผง

นอกจากนี้ Zhao และคณะ (2020) ได้ศึกษาการพัฒนาการผลิตโพรไบโอติกอัดเม็ดในรูปแบบฟองฟู ที่มีส่วนผสมของผงโสมจีน (*Panax ginseng* F.A. Meyer) และรากสมุนไพรรจีน *Polygonatum sibiricum* โดยใช้แบคทีเรีย สายพันธุ์ *Lactobacillus* 3 species ที่ผสมกันในรูปแบบผง ศึกษาอัตราการรอดของแบคทีเรียหลังการดอกเม็ด โดยแต่ละสูตรมีปริมาณผง *Lactobacillus* กรดซิตริก โซเดียมไบคาร์บอเนต โพลีไวนิลไพร์โรลิโดน และ โพลีเอทิลีน ไกลคอล ที่เท่ากัน แตกต่างกันที่ปริมาณของผงโสมจีนและรากสมุนไพรรจีน หลังจากดอกเม็ด พบว่า สูตรที่มีปริมาณผงโสมจีนและสมุนไพรรจีนมากที่สุด เข้มมีอัตราการรอดสูงที่สุด แต่เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 15 วัน พบว่า จำนวนเซลล์ลดลง 2.35 logarithmic cycles และที่ 60 วัน พบว่าเหลือจำนวนเซลล์มีชีวิตรอดเพียง 5.80 logarithmic cycles ซึ่งการลดลงนี้อาจเกิดจากเชื้อได้รับความเสียหาย จึงส่งผลให้เซลล์มีอัตราการตายสูง

### บทที่ 3 วิธีการทดลอง

#### 3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

##### 3.1.1 วัตถุดิบ

- น้ำอุ่นแดง บริษัท ทิปโก้ฟู้ดส์ จำกัด
- น้ำใบข้าวบด บริษัท เย็นใจเฮิร์บ จำกัด
- ดอกกระเจียวแห้ง ไร่ศักดิ์ศิลป์ จากจังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย
- ยีสต์โพรไบโอติก สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* var. Boulardii ในรูปแบบผงแห้ง (Lyophilized) บริษัท ไบโอบิโอดีท จำกัด

##### 3.1.2 อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, Thailand)
- เครื่อง pH meter (LAQUAtwin-pH22, Horiba, Japan)
- เครื่องเขย่า (Shaker, witeg, Germany)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical balance, Mettler Toledo ML1602/01, Switzerland)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance, Mettler Toledo ML1604/01, Switzerland)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันไอ (Autoclave, Tommy SX-700, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge, KUBOTA 5310, Japan)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge, Micro22R Hettich, Germany)
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer, Vortex-2 Genie, USA)
- เครื่องไมโครเวฟ (Microwave, LG MS2127CW, Thailand)

- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Biospectrometer, Eppendorf, Germany)
- เครื่องปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet Class II, Telstar Bioultra, USA)
- เครื่องอบลมร้อน (Hot air oven, WTB Binder FD 115, Germany)
- เครื่องตอกเม็ดคยา (Thailand)
- เครื่องวัดความแข็ง (Schleuniger-2E, Amtrex, USA)
- เครื่องวัดการกร่อน (ZT-31, Erweka, Germany)
- เครื่องทดสอบการละลาย (TAP, Erweka, Germany)
- ตู้แช่แข็ง -20 °C (Deep freezer, Sanyo, Biomedical freezer, Japan-Thailand)
- ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator, Memmert, India)
- ตู้เย็น 4 °C (Refrigerator, Mitsubishi, Thailand)
- ถังปฏิกรณ์การหมัก (BEMT-T-5L, Marubishi, Thailand)
- Vacuum extractor (HVAC engineering corporation ltd, Thailand)
- Food dehydrator (IKE, China)

### 3.1.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 3.1.3.1 สารเคมี

- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Germany)
- 95 % ethyl alcohol (Merck, USA)
- Bile salt (Merck, USA)
- Chloroform (RCI Labscan, Thailand)
- Dipotassium hydrogen phosphate (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Univar, United State)
- Ethyl acetate (QRec, New Zealand)
- Hydrochloric (Merck, USA)

- Lactic acid (Loba chemie, USA)
- Methanol (RCI Labscan, Thailand)
- Potassium chloride (Merck, USA)
- Potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Univar, United State)
- Pepsin (Sigma, USA)
- Sodium chloride (Merck, USA)
- Sodium bicarbonate
- Sodium hydroxide (Ajax Finechem, New Zealand)

### 3.1.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Peptone (HiMedia, India)
- Yeast malt agar, YMA (HiMedia, India)
- Yeast malt broth, YMB (HiMedia, India)

### 3.1.4 การเตรียมตัวอย่าง

#### 3.1.4.1 การเตรียมน้ำกระเจี๊ยบ

นำดอกกระเจี๊ยบแห้ง จากไร่ศักดิ์ศิลป์ จังหวัดนครราชสีมา มาผลิตเป็นน้ำกระเจี๊ยบที่โรงปฏิบัติการต้นแบบแปรรูปอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ เก่งคอย สระบุรี โดยเตรียมดอกกระเจี๊ยบแห้ง 1 kg ในน้ำปริมาตร 10 L (10% w/v) เพื่อทำการพาสเจอร์ไรส์ ที่อุณหภูมิ 63-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองด้วยตะแกรงที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำน้ำกระเจี๊ยบที่ได้เข้าเครื่องทำเข้มข้นแบบสุญญากาศ (Vacuum extractor) ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (TSS) 15 องศาบริกซ์ บรรจุในถุงอลูมิเนียม เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หากต้องการนำตัวอย่างน้ำกระเจี๊ยบไปใช้ในการทดลอง ให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลาย แล้วจึงนำไปใช้ในการทดลอง ประยุกต์จากวิธีของ Wu et al., 2018 และ Chumsri et al., 2008

### 3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.2.1 การพัฒนากระบวนการผลิตเซลล์ยีสต์ *S. Boulardii* โดยใช้ Plant based medium เป็นสับสเตรท

##### 3.2.1.1 การเตรียมเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง

ทำ glycerol stock โดยการ activate ยีสต์ *S. Boulardii* CNCM I-745 จาก Bioflor ปริมาณ 1 ซอง ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อบพเพลท ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที เพาะเลี้ยงบนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YMA ด้วยวิธี streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YMA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบลักษณะโคโลนีและการปนเปื้อน จากนั้นเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานแบบเหลว (YMB) โดยใช้เครื่องเขย่าที่ 150 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บเป็น yeast glycerol stock ด้วยการ เจือจางกลีเซอรอลในน้ำกลั่น ด้วยอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำกลีเซอรอลที่เตรียมไว้ผสมกับยีสต์จาก YMB ด้วยอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ activated เพื่อใช้เพาะเลี้ยงในรอบถัดไปโดยไม่เกิดการกลายพันธุ์ นำยีสต์จาก glycerol stock เกลี่ยยีสต์ลงบนเพลท YMA ด้วยวิธี streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เตรียมยีสต์เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงใน Plant based media โดยการเขี่ยโคโลนีจาก YMA ลงใน YMB เลี้ยงแบบเขย่า 150 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และล้างเซลล์ยีสต์ โดยปั่นเหวี่ยงที่ 4500 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ทิ้งส่วนใส (supernatant) ให้เหลือเพียงตะกอนเซลล์ยีสต์ จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl) ที่ความเข้มข้น 0.85 % โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง 4500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ยีสต์ตกตะกอน และ resuspended ด้วยโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.85 % และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร

##### 3.2.1.2 การประเมินสถานะ Plant based medium เซลล์ยีสต์

เตรียมสับสเตรทเพาะเลี้ยงจากน้ำอุ่นแดง ปรับสถานะของน้ำหมัก โดยแปรค่า pH เป็น 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 และปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TSS) เป็น 12 องศาบริกซ์ เติมหาล้าเชื้อยีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน YMB ที่ผ่านการล้างเซลล์แล้ว จากข้อ 3.2.1.1 เติมหลงในน้ำอุ่นที่เตรียมไว้ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 6 log CFU/mL เพาะเลี้ยงยีสต์โดยเขย่า 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญของยีสต์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทุก

0 8 24 32 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีการเกลี่ยเพลท (spread plate technique) บน YMA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกสภาวะการเพาะเลี้ยงเบื้องต้นที่ได้ผลผลิตเซลล์เชิงคุณภาพและปริมาณที่เหมาะสม

### 3.2.2 ศึกษาแบบการเจริญของ Plant based medium เป็นสับสเตรท

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงจาก Plant based media ได้แก่ น้ำอุ่นแดง น้ำใบบัวบก และ น้ำกระเจี๊ยบ ปรับสภาวะของน้ำหมักตามสภาวะที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 3.2.1.2 เต็มกล้าเชื้อยีสต์ที่เตรียมจาก 3.2.1.1 ติดตามการเจริญของยีสต์ในน้ำหมักทั้ง 3 ชนิด ทุก 0 8 24 32 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนยีสต์ด้วยวิธีเดียวกับข้อ 3.2.1.2 วัดสมบัติทางเคมีกายภาพ (ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ความเป็นกรด-ด่าง และ ปริมาณกรดทั้งหมด) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (สารต้านอนุมูลอิสระ , ปริมาณฟีนอลิก, แอนโทไซยานิน) และ ปริมาณสารอินทรีย์ (น้ำตาลและกรด) โดยคัดเลือกสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ได้ผลผลิตเซลล์เชิงคุณภาพและปริมาณที่เหมาะสมและสมบัติของ Plant based medium หลังหมัก

การตรวจวัดสมบัติทางเคมีกายภาพของสับสเตรทหลังหมัก โดยวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (total soluble solid, TSS) ด้วย refractometer, ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วย pH meter และปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity) ด้วยวิธีไตเตรท ด้วยการคำนวณจากน้ำหนักโมเลกุลของกรดซิตริก และกรดแลคติก (Khan et al., 2020 และ Chanitara, 2005)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ของน้ำอุ่นแดง น้ำใบบัวบก และ น้ำกระเจี๊ยบ รายงานในรูปแบบของ % inhibition ดัดแปลงจากวิธี Martin-Gomez et al., 2021

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอล (total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ของน้ำอุ่นแดง น้ำใบบัวบก และ น้ำกระเจี๊ยบ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร และแสดงผลในรูปแบบ มิลลิกรัมแกลลิคต่อลิตร (mg GAE/L) ดัดแปลงจากวิธี Martin-Gomez et al., 2021

การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน (anthocyanin content) ด้วยวิธี pH differential method สำหรับน้ำอุ่นแดงพาสเจอร์ไรส์และน้ำกระเจี๊ยบ วัดการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 700 นาโนเมตร แสดงผลในหน่วย มิลลิกรัม ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตร (mg C3GE/L) ดัดแปลงจากวิธี Fratianni et al., 2014

การวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ โดยปั่นเหวี่ยงเซลล์ยีสต์ที่ได้จาก 3.2.4.1.1 และยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน YMB ด้วยวิธีเดียวกับข้อ 3.2.1.1 นำส่วนใสปริมาตร 10 mL บรรจุในขวดสีชาแยกชนิดกรด ได้แก่ กรดมาลิก กรดอะซิติก กรดซิทริก กรดซัคซินิก และกรดแลคติก ด้วยเครื่อง HPLC (Agilent HPLC 1100 series) โดยใช้คอลัมน์ Mightysil RP 18 ขนาด 4.6 x 150 mm, 5  $\mu$ M เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ที่ pH 2.0 ปริมาตรในการฉีด 5  $\mu$ L และแยกชนิดน้ำตาล ได้แก่ ซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส ด้วยเครื่อง HPLC (Agilent HPLC 1100 series โดยใช้คอลัมน์ Zorbax NH2 ขนาด 4.6 x 150 mm, 5  $\mu$ M เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ Acetonitril : DI water ในอัตราส่วน 80:20 ปริมาตรในการฉีด 5  $\mu$ L โดยส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Food Research and Testing Laboratory)

### 3.2.3 ศึกษาสมบัติของเซลล์และการสืบพันธุ์หลังจากเพาะเลี้ยงใน Plant based medium

นำเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการประเมินจากข้อ 3.2.2 เปรียบเทียบกับยีสต์ที่เพาะเลี้ยงยีสต์ใน YMB หลังบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### การทนสภาวะกรดและน้ำย่อยของ *S. Boulardii* ในกระเพาะอาหาร

เตรียมสภาวะเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร โดยการชั่งเพปซิน 1 g เติมลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 L ปรับ pH 2.0 โดยใช้ไฮโดรคลอริก (hydrochloric, HCl) ที่มีความเข้มข้น 1 นอร์มอล หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล จากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่คัดเลือกจาก 3.2.2 และยีสต์จาก YMB ปริมาตร 1 mL ในสารละลายสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหารปริมาตร 9 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที ตรวจนับจำนวนยีสต์ที่รอดชีวิตทุก 30 นาที วิธีเดียวกันกับข้อ 3.2.1.2

#### การทนสภาวะเกลือน้ำดีของ *S. Boulardii* ในลำไส้

เตรียมสารละลายเกลือน้ำดี โดยผสมเกลือน้ำดี (bile salt) 6 g โปแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 6.39 g และ ไดโปแทสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (dipotassium hydrogen phosphate,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 0.52 g

ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 L ปรับ pH 6.8 นำยีสต์ที่ผ่านการบ่มน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร เป็นเวลา 30 60 90 และ 120 นาที ปริมาตร 1 mL เติมลงในสารละลายเกลือ น้ำดี ปริมาตร 9 mL บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 นาที แล้วตรวจวัดจำนวนยีสต์ที่รอดชีวิตเช่นเดียวกับ ข้อ 3.2.1.2

### ความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้

นำเซลล์ยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.2 และ ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน YMB ปริมาตร 20 mL ล้าง เซลล์ 2 ครั้ง โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer solution, PBS) ด้วยวิธี เดียวกันกับ 3.1.1.1 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เจือจางเซลล์ให้อยู่ในช่วงการดูดกลืนแสง 0.6-0.8 จากนั้นนำเซลล์ปริมาตร 5 mL เติมลงในไซลีน (xylene) คลอโรฟอร์ม (chloroform) และเอซิล อะซิเตท (ethyl acetate) ปริมาตร 1 mL ผสมให้ เข้ากันในหลอดทดลองโดยใช้เครื่องผสมสาร ตัวอย่างละ 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ตัวอย่างจะเกิดการแยกเป็น 2 ชั้น นำแต่ละชั้นไปวัดค่าการดูดกลืน แสงที่ 600 นาโนเมตร รายงานผลเป็น % hydrophobicity ดัดแปลงจากวิธีของ Hossain et al., 2020

### ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และการสีบพันธุ์ของ *S. Boulardii*

ศึกษารูปร่าง ความหนาของผนังเซลล์ และวิธีการสีบพันธุ์ด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างแบบ thin section โดยการเซลล์ นำยีสต์ที่ประเมินได้จากข้อ 3.2.2 และ ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน YMB เป็น เวลา 48 ชั่วโมงแล้ว ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยวิธีเดียวกับข้อ 3.1.1.1 และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อให้เซลล์ ตกตะกอน ทิ้งส่วนใส และเติม 2.5% Glutaraldehyde ใน 0.1M Sodium phosphate buffer (pH 7.4) เพื่อทำให้คงสภาพครั้งที่ 1 (first fixative) ตามวิธีของ Bzducha-Wróbel et al., 2018 ส่ง วิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Scientific and Technological Research Equipment Centre, STREC)

### 3.2.4 การผลิตยีสต์โพรไบโอติกอัดเม็ดแบบฟองฟู

#### 3.2.4.1 การเตรียมเซลล์ผงยีสต์จากน้ำหมัก เพื่อตอกเม็ดโพรไบโอติกแบบฟองฟู

##### 3.2.4.1.1 การผลิตเซลล์ในถังปฏิกรณ์การหมัก

โดยปรับสภาวะและเพาะเลี้ยงยีสต์ใน Plant based medium ที่ประเมิน จากข้อ 3.2.2 เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์การหมักขนาด 5 L ปริมาตร 1.5 L อัตราการให้อากาศ 100-



120 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของยีสต์ที่ 0, 8, 24, 32, 48, 56 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญเช่นเดียวกับ 3.2.1.2

#### 3.1.4.1.2 การเตรียมผงเซลล์ยีสต์จากน้ำหมัก

นำน้ำหมักที่ได้จาก 3.2.4.1.1 ปริมาตร 1 L แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 50 mL และปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.1.1 เพื่อให้เซลล์ยีสต์ตกตะกอน เทส่วนใส (supernatant) ออกครึ่งหนึ่ง และนำส่วนตะกอนเซลล์และน้ำหมักที่เหลือในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร จากนั้นเทใส่ถาดอลูมิเนียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เติมแป้งดัดแปร (modified starch) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน อบแห้งที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นบดแผ่นยีสต์จากน้ำหมักที่ได้ให้ละเอียด วัดค่ากิจกรรมของน้ำ (water activity) ของผงยีสต์จากน้ำหมัก โดยต้องมีค่าต่ำกว่า 0.6 ตรวจสอบการเจริญเช่นเดียวกับ 3.2.1.2

ประเมินชนิดและปริมาณของส่วนผสมสำหรับผลิตเม็ดฟู โดยมีสารประกอบหลัก ได้แก่ ผงเซลล์ยีสต์จากน้ำหมัก สารสำหรับเกิดฟองฟู สารเพิ่มกลิ่น-รส สารยึดเกาะ และสารช่วยไหล ประเมินสูตรเบื้องต้น โดยการทำเม็ดด้วยที่ตอกเม็ดมือ เมื่อได้สูตรที่ต้องการจึงนำไปตอกเม็ดด้วยเครื่องตอกชนิดไฟฟ้า

#### 3.1.4.2 การตอกเม็ดและทดสอบคุณสมบัติเม็ดฟู

##### 3.1.4.2.1 การตอกเม็ดเพื่อผลิตเม็ดฟู

นำผงยีสต์ที่ผสมแล้วจากข้อ 3.2.4.1.3 ไปตอกเม็ดด้วยเครื่องตอกเม็ดยา โดยแปรแรงที่ใช้ในการตอก 20 25 30 35 และ 40 นิวตัน ตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ในหัวข้อ 3.2.1.2

##### 3.1.4.2.2 การประเมินสมบัติของเม็ดโพรไบโอติก

โดยการตรวจวัดค่าดังต่อไปนี้ ตามวิธีของ Nagashima et al., (2013)

##### ตรวจวัดน้ำหนักเฉลี่ยของโพรไบโอติกอัดเม็ด (Mean weight)

ทดสอบโดยการนำตัวอย่างโพรไบโอติกอัดเม็ดที่ได้ จำนวน 10 เม็ด จากนั้นทำการสุ่มชั่ง ค่าเฉลี่ยที่สามารถยอมรับได้ต้องมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่เกิน 5%

##### ตรวจวัดความแข็งของโพรไบโอติกอัดเม็ด (Hardness)

ตรวจวัดความต้านทานของโพรไบโอติกอัดเม็ดจากแรงกดหรือทำให้แตกภายใต้แรงกดดันอย่างต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องทดสอบความแข็ง (hardness tester) ตรวจวัดความ

ต้านทานโดยการนำตัวอย่างโพรไบโอติกอัดเม็ด จำนวน 10 เม็ด ทำการคำนวณ ค่าเฉลี่ย มีหน่วยเป็น นิวตัน (N) โดยค่าความแข็งที่น้อยสุดจากงานวิจัยอ้างอิง อยู่ที่ 30 นิวตัน

#### ตรวจวัดการกร่อนของโพรไบโอติกอัดเม็ด (Friability)

เป็นการทดสอบจากแรงกระแทกหรือแรงเสียดสี โดยใช้เครื่อง Friabilator ทดสอบจากการนำตัวอย่างโพรไบโอติกอัดเม็ดจากข้อ 3.2 จำนวน 10 เม็ด ทำการวัดที่ 25 rpm เป็นเวลา 4 นาที โดยค่าน้ำหนักที่มากที่สุดที่เสียไป ต้องไม่เกิน 1%

#### ตรวจวัดการแตกตัวของโพรไบโอติกอัดเม็ด (Disintegration)

ตรวจวัดเวลาที่ใช้ในการสลายตัวของเม็ดฟู่ โดยการนำตัวอย่างโพรไบโอติกอัดเม็ด จำนวน 6 เม็ด ละลายในน้ำกลั่นที่ อุณหภูมิ  $37 \pm 2$  องศาเซลเซียส จากนั้นวัดโดยใช้เครื่อง disintegration apparatus โดยเวลาที่สามารถยอมรับได้ต้องไม่เกิน 5 นาที

#### 3.1.4.2.3 ประเมินอายุการเก็บรักษาและจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต

นำยีสต์โพรไบโอติกแบบเม็ดฟู่ที่ผ่านการประเมินจาก 3.1.4.2.2 บรรจุลงถุงซิปล็อกใส จำนวน 1 เม็ด ต่อ 1 ถุง และบรรจุแบบสุญญากาศในถุงอลูมิเนียม เก็บที่อุณหภูมิห้อง ตรวจนับเซลล์ที่รอดชีวิตทุก 15 วัน เป็นเวลา 60 วัน (ทุกวันที่ 0 15 30 45 และ 60)

#### 3.2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

จลนพลศาสตร์การเจริญของยีสต์ในแต่ละ Plant based media รายงานในรูปแบบอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ ( $\mu/h$ ) =  $dX/(X \cdot dt)$  โดย X คือ จำนวนเซลล์ (log CFU/mL) และ t คือ เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง, h)

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Tests ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS statistics version 22

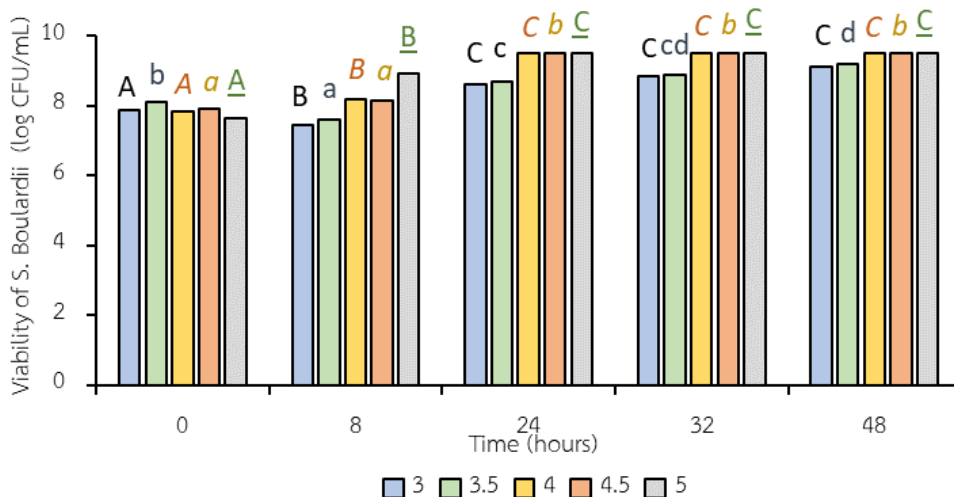


## บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 4.1 การประเมินสถานะน้ำสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์

การศึกษานี้ประเมินสถานะของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก Plant based medium เพื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ มีรายงานว่า โดยปกติแล้ว *S. Boulardii* เจริญในความเป็นกรด (pH) ที่เหมาะสมในช่วง 4.5 ถึง 6.5 (Czerucka et al., 2007) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงยีสต์ใน Plant based medium โดยเฉพาบน้ำผลไม้ส่วนมากที่มี pH อยู่ในช่วง pH 2.0 ถึง 4.5 จึงต้องประเมินค่า pH ที่เหมาะสมที่ยีสต์เจริญได้ในน้ำผลไม้ และในการทดลองนี้เลือกใช้น้ำองุ่นเป็นตัวแทนของ Plant based medium ซึ่งส่วนใหญ่คือน้ำตาลที่น้ำองุ่นมีน้ำตาลโดยธรรมชาติ วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TSS) 12 องศาบริกซ์ ซึ่งส่วนใหญ่คือน้ำตาลที่ยีสต์สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ และน้ำองุ่นมี pH อยู่ในช่วง 3.0 ถึง 3.5 จึงต้องประเมิน pH ที่ยีสต์สามารถเจริญได้ จึงปรับสถานะในการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่มี pH ในช่วง 3.0 ถึง 5.0 จากผลการประเมิน พบว่า ที่ pH 4.0 เป็น pH ที่ต่ำที่สุด ที่ทำให้ยีสต์สามารถเจริญได้ดี โดยยีสต์ที่ pH 3.0 และ 3.5 พบว่า การเจริญของยีสต์ลดลงใน 8 ชั่วโมงแรกของการหมัก อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) และเจริญอย่างช้าๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงที่สถานะ pH 4.5 และ 5.0 ภายใต้สถานะที่ pH 4.0 ยีสต์สามารถเจริญได้ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $p \geq 0.05$ ) ซึ่งมีรายงานว่า สถานะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ คือที่สถานะ pH 4.0 ถึง 6.0 เป็นสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญ

ของยีสต์ (Pena et al., 2015) จึงเลือกใช้สภาวะที่มี pH 4.0 ในการปรับสภาวะอาหารเพาะเลี้ยง *S. Boulardii* ที่เป็น Plant based medium ในการทดลองต่อไป (ดังแสดงในภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 การเจริญของ *S. Boulardii* ในน้ำองุ่น

ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่มี pH ต่างกัน (log CFU/mL) ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ A-C, a-d, A-C, a,b และ A-C แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

#### 4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์จาก Plant based medium เป็นสับสเตรท

ศึกษาการเจริญของยีสต์ใน Plant base media ที่แตกต่างกัน ได้แก่ น้ำองุ่นแดง น้ำใบบัวบก และน้ำกระเจี๊ยบ) โดยปรับ pH เป็น 4.0 ตามผลการประเมินที่ได้จากข้อ 4.1 และปรับค่า TSS เป็น 12 องศาบริกซ์ ด้วยน้ำตาลซูโครสให้มีค่าใกล้เคียงกับน้ำองุ่นแดง เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน (YMB)

##### 4.2.1 การเจริญของยีสต์ใน Plant based media ที่แตกต่างกัน

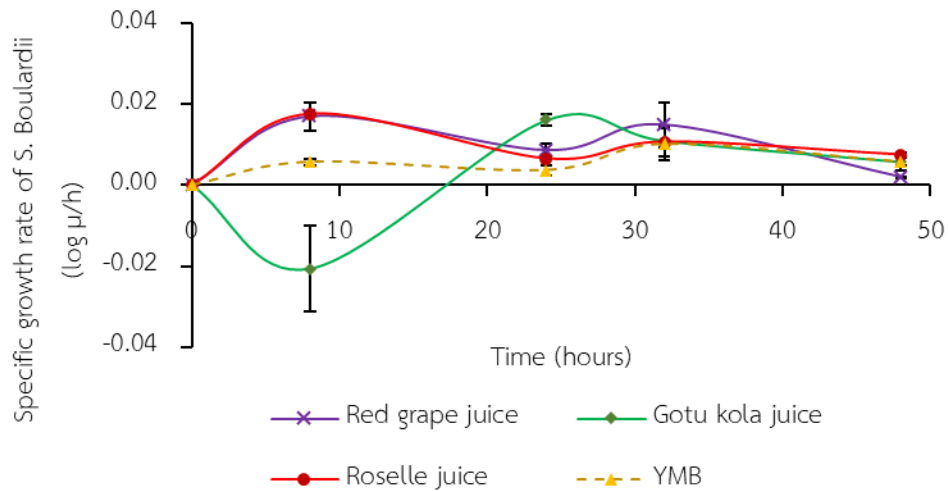
เตรียมยีสต์ที่เตรียมไว้ (จากข้อ 3.2.1.1) ที่มีจำนวนเริ่มต้น 7 log CFU/mL ลงใน Plant based media ทั้ง 3 ชนิด และ YMB พบว่า การเจริญของยีสต์ในน้ำองุ่นและน้ำกระเจี๊ยบมีรูปแบบและอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน โดยที่ชั่วโมงที่ 8 ของการหมัก ยีสต์ในน้ำกระเจี๊ยบและน้ำองุ่นมีอัตราการเจริญสูงสุด ที่  $0.018 \pm 0.008$  และ  $0.017 \pm 0.004$  log  $\mu$ /h จากนั้นมีอัตราการ

เจริญลดลง ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงจาก YMB มีรูปแบบการเจริญที่คล้ายกับ Plant based medium ทั้งสองชนิด กล่าวคือ เจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 8 หลังจากนั้นลดลง แต่อัตราการเจริญจะมีค่าต่ำกว่าน้ำกระเจี๊ยบและน้ำองุ่น อัตราการเจริญสูงสุดของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน YMB อยู่ที่ชั่วโมงที่ 32 ของการหมัก ที่  $0.010 \pm 0.004 \log \mu/h$  ในขณะที่น้ำใบบัวบกมีรูปแบบการเจริญที่แตกต่างจากอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสามแบบแรก โดยพบว่า ชั่วโมงที่ 8 ของการหมัก ยีสต์มีจำนวนลดลง ที่  $-0.021 \pm 0.011 \log \mu/h$  หลังจากนั้นยีสต์มีอัตราสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยมีอัตราการเจริญสูงสุด ที่  $0.016 \pm 0.002 \log \mu/h$  ในชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก (ดังแสดงในภาพที่ 4.2)

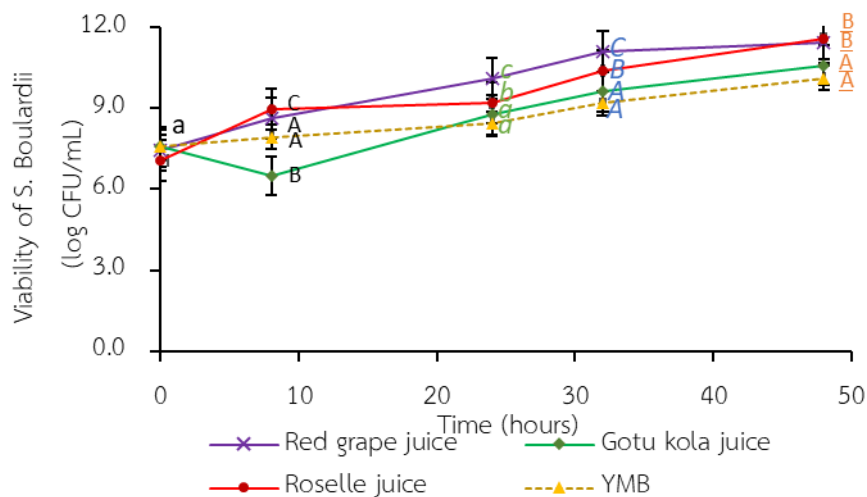
จากการตรวจสอบจำนวนยีสต์ พบว่า ยีสต์มีจำนวนเริ่มต้นที่  $7 \log CFU/mL$  ในชั่วโมงที่ 0 ของการหมัก เมื่อหมักผ่านไป 8 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์มีจำนวนเพิ่มขึ้น โดยจำนวนยีสต์ในน้ำกระเจี๊ยบและน้ำองุ่นมีจำนวนใกล้เคียงกัน จาก  $7.065 \pm 0.516$  และ  $7.423 \pm 0.172 \log CFU/mL$  เพิ่มเป็น  $8.945 \pm 0.035$  และ  $8.638 \pm 0.410 \log CFU/mL$  ตามลำดับ โดยน้ำกระเจี๊ยบแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YMB มีการเจริญเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน จาก  $7.560 \pm 0.042 \log CFU/mL$  ที่ 0 ชั่วโมง เพิ่มเป็น  $7.925 \pm 0.092 \log CFU/mL$  ที่ 8 ชั่วโมง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำใบบัวบกมีจำนวนลดลงจากชั่วโมงที่ 0 มีจำนวนยีสต์เริ่มต้น  $7.565 \pm 0.213 \log CFU/mL$  ลดเหลือ  $6.500 \pm 0.281 \log CFU/mL$  ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบหลังหมัก 8 ชั่วโมง พบว่า จำนวนยีสต์ในน้ำใบบัวบกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนกระทั่ง 48 ชั่วโมงของการหมัก พบว่ายีสต์ในน้ำกระเจี๊ยบและน้ำองุ่นมีจำนวนใกล้เคียงกันที่  $11.580 \pm 0.212 \log CFU/mL$  และ  $11.442 \pm 0.644 \log CFU/mL$  ตามลำดับ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) น้ำใบบัวบกมีจำนวนยีสต์ที่  $10.595 \pm 0.163 \log CFU/mL$  ในขณะที่ปริมาณยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน (YMB) มีจำนวนยีสต์ต่ำที่สุด คือ  $10.105 \pm 0.636 \log CFU/mL$  ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (ดังแสดงในภาพที่ 4.3)

จากงานวิจัยของ Yang et al., 2019 มีรายงานว่า *S. Boulardii* เป็น Glucophilic yeast ซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้น ในน้ำองุ่นที่มี TSS สูงถึง 12 องศาบริกซ์ และน้ำกระเจี๊ยบ และน้ำใบบัวบก ที่ถูกปรับ TSS ได้เป็น 12 องศาบริกซ์ จากเติมน้ำตาลซูโครส ส่งผลให้มีแหล่งคาร์บอนสูงกว่า YMB ที่มีปริมาณกลูโคสเพียง 1% นอกจากนี้แล้ว ในน้ำผัก-ผลไม้ยังมีแร่ธาตุและวิตามิน

ที่ส่งเสริมการเจริญของยีสต์อีกด้วย (Chin et al., 2015) จึงทำให้การเจริญของยีสต์ใน Plant based media มีจำนวนสูงกว่ายีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน YMB



ภาพที่ 4.2 อัตราการเจริญของ *S. Boulardii* ที่เวลาต่างๆ ใน Plant based media 3 ชนิด ได้แก่ น้ำองุ่น น้ำใบบัวบก และน้ำกระเจี๊ยบ เปรียบเทียบกับ YMB เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (log CFU/mL) และ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 4.3 การเจริญของ *S. Boulardii* ที่เวลาต่างๆ ใน Plant based media 3 ชนิด

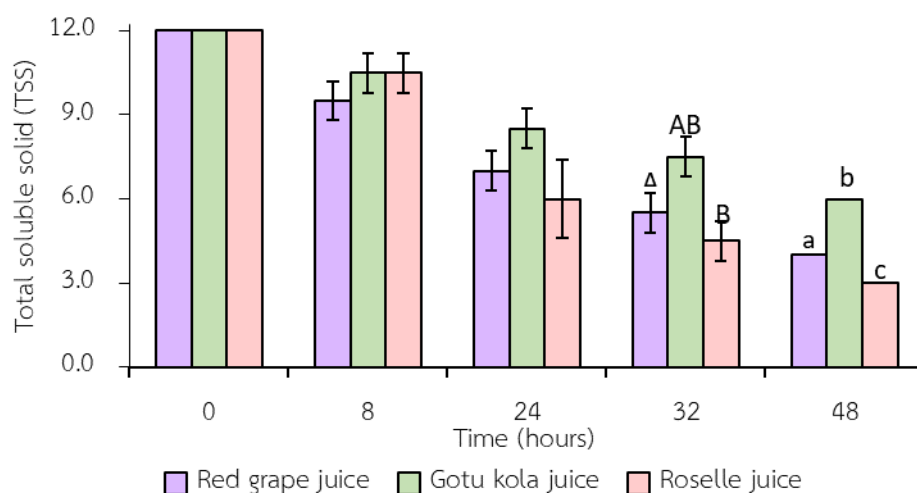
ได้แก่ น้ำอุ่น น้ำใบบัวบก และน้ำกระเจี๊ยบ เปรียบเทียบกับ YMB เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (log CFU/mL) ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ a, A-C, a-c, A-C และ A-B แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.2.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพ (Physicochemical properties) ของ Plant based media

ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์โพรไบโอติกทางเลือกด้วย Plant based medium เพื่อนำเซลล์ที่ได้พร้อมกับน้ำผัก ผลไม้ หลังเพาะเลี้ยงที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกิดจากกิจกรรมการหมักของยีสต์ ไปใช้ในการผลิตเม็ดฟู ดังนั้นจึงได้ประเมินสมบัติของน้ำผัก-ผลไม้เพื่อเป็นเกณฑ์หนึ่งในการเลือกใช้น้ำผัก ผลไม้สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ต่อไป

##### 4.2.2.1 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TSS) ใน Plant based media ทั้ง 3 ชนิด

ค่า TSS สามารถใช้บ่งชี้ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในน้ำหมักได้ ผลการทดลอง จึงติดตามค่า TSS เพื่อศึกษาและติดตามการใช้น้ำตาลของยีสต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.4 หลังจากปรับปริมาณ TSS ของน้ำผักและผลไม้ด้วยน้ำตาล ให้มีค่าเริ่มต้นที่ 12 องศาบริกซ์ พบว่า น้ำอุ่นที่ผ่านการบ่มด้วยยีสต์นาน 8 ชั่วโมง มีปริมาณ TSS ลดลงมากที่สุด โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $p \geq 0.05$ ) ในขณะที่น้ำใบบัวบกและน้ำกระเจี๊ยบมีปริมาณ TSS เท่ากันที่ 10.5 องศาบริกซ์ หลังจากนั้น TSS ของน้ำอุ่นและใบบัวบกลดลงอย่างช้าๆ ในขณะที่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมักเป็นต้นไป น้ำกระเจี๊ยบมีปริมาณ TSS ลดลงอย่างรวดเร็ว และชั่วโมงการหมักที่ 48 พบว่าปริมาณ TSS ของน้ำอุ่นและน้ำใบบัวบก เหลือ 4 และ 6 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ในขณะที่น้ำกระเจี๊ยบมีปริมาณ TSS เหลือเพียง 3 องศาบริกซ์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การลดลงของ TSS ใน Plant based media เกี่ยวข้องกับการเจริญของยีสต์ในน้ำผัก-ผลไม้ โดย TSS ของน้ำกระเจี๊ยบลดลงมากที่สุด เนื่องจากของแข็งที่ละลายได้ในน้ำถูกยีสต์นำไปใช้ในการเจริญ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณยีสต์ที่สูงที่สุด และ TSS ของน้ำใบบัวบกที่เหลือมากที่สุดแสดงให้เห็นว่า ของแข็งที่ละลายในน้ำถูกนำไปใช้น้อยที่สุดสอดคล้องกับจำนวนยีสต์ที่ต่ำที่สุดในน้ำผัก-ผลไม้จากผลการทดลองที่ 4.2.1 และจากรายงานพบว่า ยีสต์จะสามารถใช้น้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ได้โดยการไฮโดรไลซ์น้ำตาลซูโครส โดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส ให้แตกตัวเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคส และ ฟรุคโตส เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน (Marques et al., 2016)



**ภาพที่ 4.4** การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ใน Plant based media 3 ชนิด ได้แก่ น้ำองุ่น น้ำใบบัวบก และน้ำกระเจี๊ยบ หลังเพาะเลี้ยง *S. Boulardii* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (องศาบริกซ์) และ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ A-B และ a-c แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.2.2.2 ความเป็นกรด (pH) และปริมาณกรดทั้งหมด (TTA) ของ Plant based media ทั้ง 3 ชนิด

เมื่อศึกษากรดของ Plant based media เนื่องจากน้ำแต่ละชนิดมีกรดที่แตกต่างกัน โดยกรดหลักในน้ำองุ่นและน้ำกระเจี๊ยบ ได้แก่ กรดซิตริก กรดทาร์ทาริก และกรดมาลิก (กลุ่มวิจัยอาหารเพื่อโภชนาการ สำนักโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, 2018) และตรวจไม่พบกรดอินทรีย์ในน้ำใบบัวบก (Mohd Zainol et al., 2009) และมีรายงานว่ายีสต์สามารถผลิตกรดแลคติกได้ในระหว่างกระบวนการหมัก จึงทำการศึกษาโดยปรับค่าความเป็นกรด (pH) ของ Plant based media ทั้ง 3 ชนิด ให้มีค่า pH เริ่มต้นที่ 4.0 และวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด (TTA) ของน้ำทั้ง 3 ชนิด โดยเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังหมัก และคำนวณโดยอ้างอิงจากน้ำหนักโมเลกุลของกรดซิตริกและกรดแลคติก

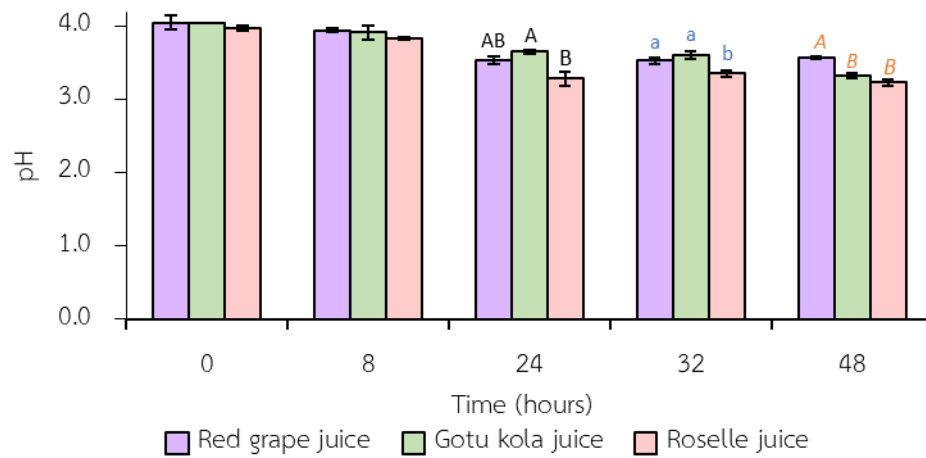
จากผลการทดลอง พบว่า ในช่วงแรกของการหมัก pH ลดลงอย่างช้าๆ โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \geq 0.05$ ) จนกระทั่งหลังการหมัก 24 ชั่วโมง พบว่า pH ของน้ำผัก-ผลไม้ทั้ง 3 ชนิด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) โดยน้ำกระเจี๊ยบมีค่า pH 3.29 ในขณะที่น้ำองุ่นและใบบัวบกมีค่า pH 3.54 และ 3.66 ตามลำดับ หลังจากนั้น pH มีค่าค่อนข้างคงที่ และชั่วโมงที่ 48



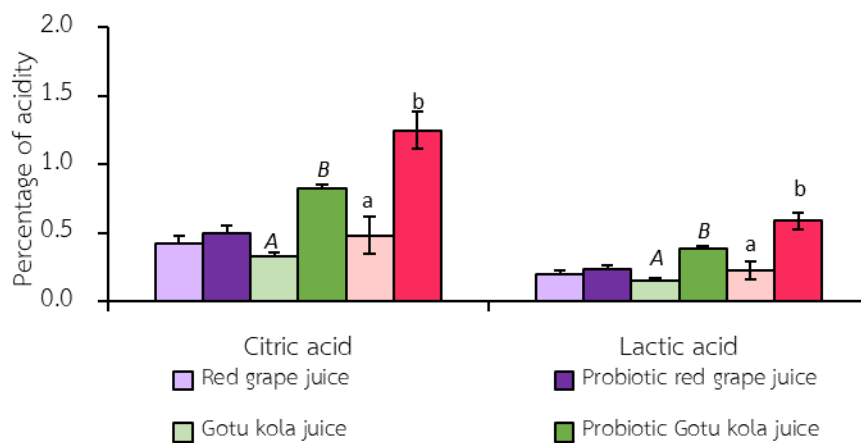
ของการหมัก ค่า pH ของน้ำกระเจียบและน้ำใบบัวบก คือ 3.23 และ 3.33 ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \geq 0.05$ ) ในขณะที่น้ำอุ่น มี pH 3.58 ซึ่งแตกต่างจากน้ำกระเจียบและน้ำใบบัวบกอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) จากภาพที่ 4.5

และเมื่อตรวจสอบ TTA ของน้ำทั้ง 3 ชนิด พบว่า มี TTA เพิ่มขึ้น โดยน้ำกระเจียบก่อนหมักมีปริมาณ  $0.48 \pm 0.14$  % กรดซิตริก หลังหมัก 48 ชั่วโมง พบว่า TTA เพิ่มขึ้นเป็น  $1.25 \pm 0.14$  % กรดซิตริก อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) และกรดแลคติกก่อนหมัก พบว่ามี TTA อยู่ที่  $0.23 \pm 0.06$  % กรดแลคติก หลังจากหมักแล้ว TTA เพิ่มขึ้นเป็น  $2.59 \pm 0.06$  % โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \geq 0.05$ ) น้ำใบบัวบกก่อนหมักมีปริมาณ TTA ที่  $0.33 \pm 0.03$  % กรดซิตริก และ  $0.15 \pm 0.01$  % กรดแลคติก หลังจากหมักแล้ว TTA เพิ่มขึ้น  $0.50 \pm 0.03$  % กรดซิตริก แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) และ  $0.23 \pm 0.01$  % กรดแลคติก ในขณะที่น้ำอุ่นมีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นน้อยที่สุด โดยก่อนหมักมี  $0.42 \pm 0.05$  % กรดซิตริก และ  $0.20 \pm 0.03$  % กรดแลคติก หลังจากหมักมี TTA เพิ่มขึ้นเพียง 0.08 % กรดซิตริก 0.04 % กรดแลคติก ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \geq 0.05$ )

การลดลงของ pH ของ Plant based media ระหว่างการเพาะเลี้ยงยีสต์ เกิดจากกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ในสถานะที่มีออกซิเจนเพียงพอ ยีสต์จะเกิดการย่อยสลายสารอาหาร และได้ผลิตภัณฑ์คือ น้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ส่วนหนึ่งจะรวมตัวกับน้ำและเกิดกรดคาร์บอนิก ส่งผลให้ค่า pH ของน้ำหลังการหมักลดลง (Pena et al., 2015) นอกจากนี้มีรายงานว่า น้ำหมักที่มี pH ลดลง เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักและเมตาไลต์จากยีสต์ ได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดซัคซินิก จึงส่งผลให้ pH ของน้ำหมักในระหว่างการหมักลดลงและปริมาณกรดทั้งหมดหลังการหมักเพิ่มขึ้น (อรอง จันทรประสาสุข, 2015) ดังนั้น น้ำหมักที่มีจำนวนยีสต์สูง สารอาหารในน้ำหมักถูกย่อยสลายและเกิดกรดต่างๆในปริมาณที่มากกว่า ส่งผลให้การลดลงของ TSS และ pH และการเพิ่มขึ้นของ TTA จึงมีความสอดคล้องกัน ดังนั้น น้ำกระเจียบที่มีจำนวนยีสต์สูงที่สุด หลังการหมัก ค่า TSS และ pH จึงลดลง และ TTA เพิ่มขึ้นมากที่สุด (Udeagha et al., 2020)



**ภาพที่ 4.5** การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง ใน Plant based media 3 ชนิด ได้แก่ น้ำองุ่น น้ำใบบัวบก และน้ำกระเจี๊ยบ หลังเพาะเลี้ยง *S. Boulardii* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ A-B, a-b และ A,B แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )



**ภาพที่ 4.6** การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดทั้งหมดของ Plant based media ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำองุ่น น้ำใบบัวบก และน้ำกระเจี๊ยบ ก่อน-หลังเพาะเลี้ยง *S. Boulardii* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยอ้างอิงจากน้ำหนักโมเลกุลของซิตริกและแลคติก (% acidity) ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ a-b และ A-B แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

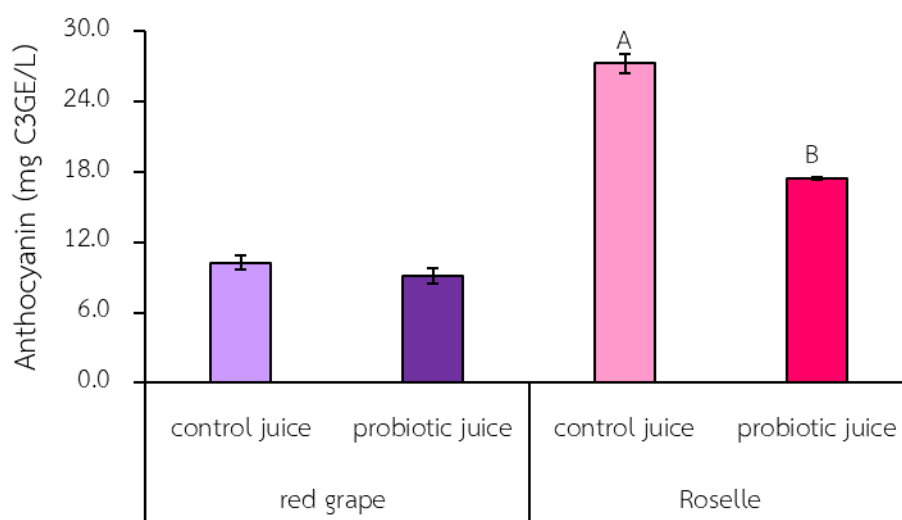
#### 4.2.3 การเปลี่ยนแปลงของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ของ Plant based media

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นสารธรรมชาติซึ่งพบมากในผัก-ผลไม้ แต่ละชนิดจะมีสารประกอบและหน้าที่แตกต่างกันไป จากงานวิจัยของ (Cozme et al., 2018 และ Wong et al., 2002) พบว่า ในน้ำอ่องุ่นและน้ำกระเจี๊ยบมีสารประกอบฟีนอลิกและแอนโทไซยานินสูง และมีรายงานว่าในน้ำใบบัวบกมีสารประกอบฟีนอลิกสูงเช่นเดียวกัน (Mohd Zainol et al., 2009) โดยสารทั้งสองชนิดนี้มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งปริมาณของสารจะเปลี่ยนแปลงตามค่า pH โครงสร้างของสาร อุณหภูมิ และอื่นๆ (Khoo et al., 2017) จากผลการทดลอง 4.2 พบว่าการเจริญและเมตาบอลิซึมของยีสต์ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ TSS, pH และ TTA ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้อาจส่งผลต่อปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน Plant based media โดยเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าของสารดังกล่าวระหว่างก่อนและหลังการหมัก ผลการทดลองดังจะกล่าวใน

##### 4.2.3.1 วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน (Anthocyanin)

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุของพืชที่ทำให้มีสีแตกต่างกันไป เช่น สีน้ำเงิน ม่วง และแดง พบมากในน้ำอ่องุ่น และน้ำกระเจี๊ยบ และสีนั้นจะเปลี่ยนแปลงตามสภาวะความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก ดังนั้น ในน้ำอ่องุ่นและน้ำกระเจี๊ยบมีสารแอนโทไซยานินสูง โดยแอนโทไซยานินหลักในน้ำอ่องุ่น คือ ไซยานิดิน (cyanidin) และ มัลวิดิดิน (malvidin) (Sabra et al., 2021) ในขณะที่น้ำกระเจี๊ยบมีแอนโทไซยานินหลักเป็น เดลฟินิดิน (Delphinidin) และ ไซยานิดิน (cyanidin) (Wong et al., 2002) จึงวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี pH differential โดยใช้โพแทสเซียมคลอไรด์ ที่ pH 1.0 แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปฟลาวิลเลียมแคทไอออน (flavylium cation) ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุด และ โซเดียมอะซิเตท ที่ pH 4.5 แอนโทไซยานินจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปคาร์บินอล เบส (carbinol base) ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำที่สุด ที่ความยาวคลื่นเดียวกัน ดังนั้นปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดสามารถคำนวณได้จากความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงเดียวกันที่ pH ต่างกันได้ และสารประกอบอื่นๆนอกเหนือจากแอนโทไซยานินจะถูกหักล้างไป จากการทดลองพบว่า ค่าแอนโทไซยานินในน้ำอ่องุ่นก่อนหมักมีค่า  $10.27 \pm 0.59$  mg C3GE/L หลังจากผ่านการบ่ม 48 ชั่วโมง พบว่า ค่าแอนโทไซยานินลดลงเหลือ  $9.14 \pm 0.65$  mg C3GE/L ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ในขณะที่แอนโทไซยานินในน้ำกระเจี๊ยบก่อนหมักมีปริมาณ  $27.27 \pm 0.35$  mg C3GE/L หลังจากหมักแล้วพบว่าแอนโทไซยานินลดลงเหลือ  $17.45 \pm 0.24$  mg C3GE/L แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (ดังแสดงในภาพที่ 4.7)

การลดลงของปริมาณแอนโทไซยานินสามารถเกิดได้จากหลายปัจจัย ได้แก่ pH อุณหภูมิ แสง เอนไซม์ ออกซิเจน และน้ำตาล โดยจะส่งผลต่อสีและโครงสร้างของแอนโทไซยานิน ทำให้สารแอนโทไซยานินเกิดการไม่เสถียรและสลายตัว และ/หรือเปลี่ยนโครงสร้างไป นอกจากนี้ การที่ยีสต์ผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยเฉพาะเอนไซม์ ไกลโคซิเดส (glycosidases) จะทำลายพันธะโคเวเลนต์ระหว่าง glycosyl และ aglycone ของสารแอนโทไซยานิน ทำให้สารแอนโทไซยานินสูญเสียน้ำตาล และเปลี่ยนรูปเป็นแอนโทไซยานิดิน จึงส่งผลให้สารแอนโทไซยานินมีความเสถียรลดลง ดังนั้น ปริมาณและโครงสร้างแอนโทไซยานินหลักในน้ำองุ่นและน้ำกระเจี๊ยบที่มีความแตกต่างกัน โดยมีความแตกต่างที่โครงสร้างและหมู่ไฮดรอกซิล ทำให้มีความเสถียรต่างกัน ส่งผลให้ปริมาณแอนโทไซยานินลดลงไม่เท่ากัน (Gonzales et al., 2016) นอกจากนี้การลดลงของ pH ที่แตกต่างกัน จากผลการทดสอบ pH ในข้อ 4.2.2.2 พบว่า pH ของน้ำกระเจี๊ยบหลังหมักลดลงมากกว่าน้ำองุ่น ปริมาณแอนโทไซยานินของน้ำกระเจี๊ยบจึงมีการลดลงมากกว่า และถึงแม้ว่าปริมาณแอนโทไซยานินในน้ำกระเจี๊ยบจะลดลงมากกว่า แต่ยังคงมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าในน้ำองุ่น

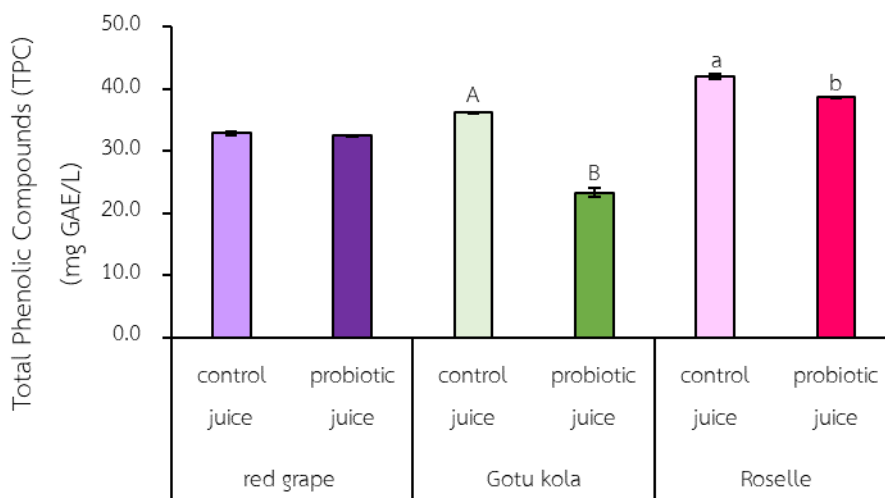


ภาพที่ 4.7 ปริมาณแอนโทไซยานินของน้ำองุ่นและกระเจี๊ยบ ก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (mg C3GE/L) ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ A-B แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

#### 4.2.3.2 วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds, TPC)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบที่พบในธรรมชาติทั้งผักและผลไม้ สามารถพบได้ทั้งในน้ำอุ่น น้ำกระเจี๊ยบ และน้ำใบบัวบก จึงวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

ซึ่งอาศัยหลักการของปฏิกิริยารีดักชันและออกซิเดชัน โดยใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu ที่มีส่วนประกอบเป็นโมลิบดีนัม-ทังสเตน มีเลขออกซิเดชัน +6 และมีสีเหลือง เมื่อรับอิเล็กตรอนจากสารประกอบฟีนอลิกในน้ำหมัก จะเปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงินและมีเลขออกซิเดชัน +5 ดังนั้น สารประกอบเชิงซ้อนมีสีเข้มจึงแสดงถึงน้ำหมักมีสารประกอบฟีนอลิกมาก ผลการทดลองพบว่า น้ำอุ่นก่อนหมักมีปริมาณ TPC อยู่ที่  $32.84 \pm 0.27$  mg GAE/L หลังหมัก 48 ชั่วโมงแล้วพบว่า มี TPC ลดลงเล็กน้อย โดยมีปริมาณอยู่ที่  $32.50 \pm 0.12$  mg GAE/L โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $p \geq 0.05$ ) ในขณะที่ TPC ของน้ำใบบัวบกและน้ำกระเจี๊ยบมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) โดยก่อนหมักน้ำใบบัวบกและน้ำกระเจี๊ยบมีปริมาณ TPC อยู่ที่  $36.16 \pm 0.13$  และ  $42.02 \pm 0.38$  mg GAE/L แต่หลังจากหมักแล้ว มีปริมาณลดลงเหลือเพียง  $23.35 \pm 0.08$  และ  $38.64 \pm 0.09$  mg GAE/L (ดังแสดงในภาพที่ 4.8) จะเห็นได้ว่า TPC ของน้ำกระเจี๊ยบที่ลดลงหลังหมัก มีความสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณแอนโทไซยานินในน้ำกระเจี๊ยบหลังหมัก เนื่องจากแอนโทไซยานินถูกจัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก นอกจากนี้การลดลงของสารประกอบฟีนอลิกที่ต่างกันขึ้นกับโครงสร้างของสาร น้ำอุ่นและน้ำกระเจี๊ยบมีสารประกอบหลักคือ ควอเซอติน (quercetin) (Izquierdo-Vega et al., 2020) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอล (flavonols) ในขณะที่น้ำใบบัวบกมีสารประกอบฟีนอลิกหลักคือ นารินจิน (naringin) ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม ฟลาวาโนน (flavanones) (Mohd, Z.M.K., 2009) ซึ่งความแตกต่างของโครงสร้างของสารเป็นสาเหตุหลักที่ส่งผลให้ TPC ของน้ำหมักลดลงต่างกัน (Gonzales et al., 2016) รวมถึงจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลที่เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox active hydroxyl group) ซึ่งวงแหวนที่ตำแหน่ง B และ C ของควอเซอตินสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน ส่งผลให้มีความเสถียรและคงตัวมากขึ้น ในขณะที่โครงสร้างของนารินจินมีวงแหวนอยู่ห่างกัน ทำให้ไม่สามารถเกิดพันธะต่อกันได้ จึงมีความเสถียรและคงตัวน้อยกว่า ส่งผลให้สารประกอบฟีนอลิกในน้ำใบบัวบกมีปริมาณลดลงมากกว่าน้ำหมักอื่นๆ (Baranowska et al., 2021)

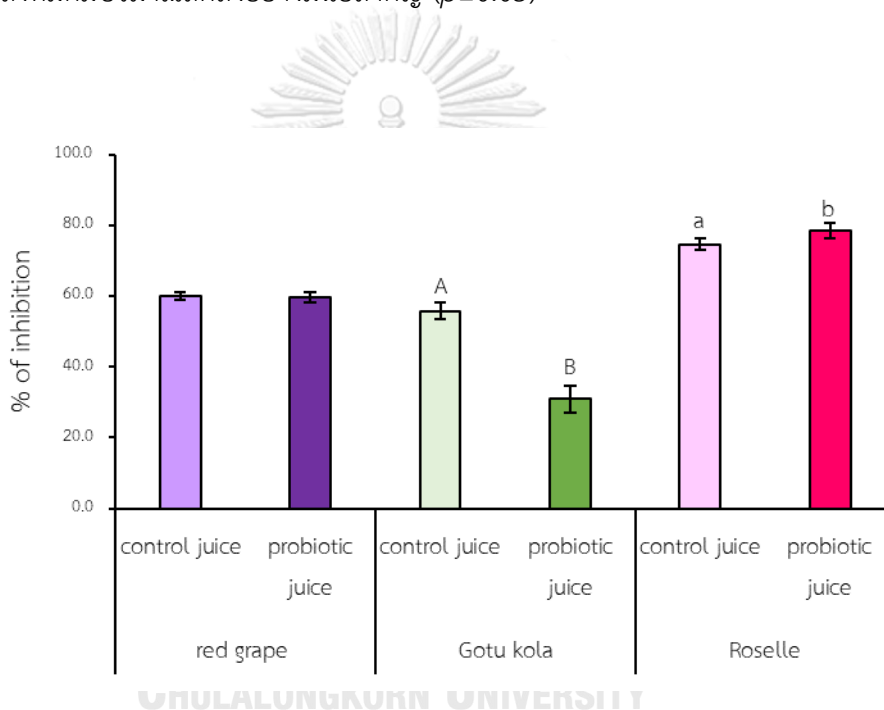


ภาพที่ 4.8 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของ Plant based media ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำองุ่น น้ำใบบัวบก และ น้ำกระเจี๊ยบ ก่อนและหลังการเพาะเลี้ยง ยีสต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (mg GAE/L) ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ A-B และ a-b แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.2.3.3 วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าสารประกอบใน Plant based media หลังหมักบางชนิดมีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ จากการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นการวัดการจับอนุมูลอิสระ โดย DPPH<sup>•</sup> หรือ radical species (R<sup>•</sup>) จะเกิดปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (AH) เมื่อ DPPH เปลี่ยนเป็นอนุมูลที่มีความเสถียร สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งดูดกลืนได้ดีที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ดังนั้นหากตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูง สารละลายจะมีความเข้มลดลง (Phekal et al., 2015) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำหมักทั้ง 3 ชนิด ก่อนและหลังการหมัก จากการทดลองพบว่า น้ำองุ่นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงจาก  $60.15 \pm 0.11$  % เป็น  $59.83 \pm 1.43$  % โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $p \geq 0.05$ ) และน้ำใบบัวบกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงจาก  $55.77 \pm 2.39$  % เป็น  $30.89 \pm 3.92$  % ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำกระเจี๊ยบหลังหมักเพิ่มขึ้นจาก  $74.65 \pm 1.58$  % เป็น  $78.52 \pm 2.03$  % ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (ภาพที่ 4.9) มีรายงานว่า เมื่อความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น

จาก 4.2.4.2 พบว่า น้ำกระเจี๊ยบภายหลังหมักด้วยยีสต์ มีกรดอะซิติกเพิ่มขึ้น 2.32 g/L ซึ่งเป็นกรดที่สามารถละลายน้ำได้บางส่วน และเมื่อเกิดการแตกตัวจะเกิดปฏิกิริยากับ DPPH (Pekal et al., 2015) ส่งผลให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำกระเจี๊ยบเพิ่มขึ้น ในขณะที่สารยับยั้งอนุมูลอิสระในน้ำองุ่นหลังหมักไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \geq 0.05$ ) เนื่องจากแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลิกในองุ่นหลังหมักไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม สารประกอบฟีนอลิกของน้ำใบบัวบก ซึ่งเป็นสารที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงภายหลังการหมักอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) เนื่องจากโครงสร้างไม่เสถียร จึงส่งผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำใบบัวบกหลังหมักมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )



ภาพที่ 4.9 การต้านสารอนุมูลอิสระของ Plant based media ทั้ง 3 ชนิด

ได้แก่ น้ำองุ่น น้ำใบบัวบก และน้ำกระเจี๊ยบ ก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ A-B และ a-b แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

จากผลทดลอง พบว่า การเจริญของยีสต์ในน้ำกระเจี๊ยบในข้อ 4.2.1 มีปริมาณสูงที่สุด และเมื่อพิจารณาสมบัติด้านการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำหลังหมัก พบว่า มีปริมาณสูงกว่าน้ำผัก ผลไม้ชนิดอื่นๆ จึงได้คัดเลือกน้ำกระเจี๊ยบเพื่อใช้ในขั้นตอนถัดไป

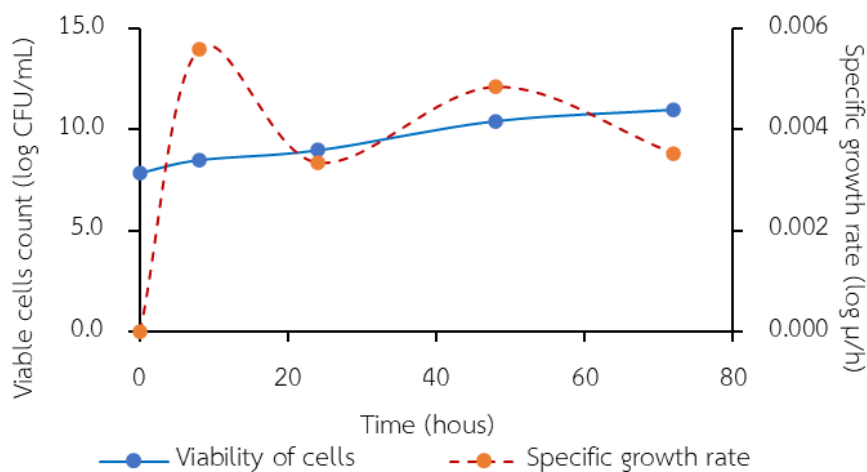
#### 4.2.4 การเตรียมเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ในการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ และการผลิตโพรไบโอติกอัดเม็ดแบบฟองฟู

การศึกษาในขั้นตอนนี้ ประเมินการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงยีสต์ในถังหมัก ศึกษาสมบัติการเจริญ โดยการติดตามจำนวนการประชากร และการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำหมัก ด้วยการวัดน้ำตาล กรดอินทรีย์ ในเชิงปริมาณและคุณภาพรวมถึงสมบัติของรูปร่างและผนังเซลล์ การสืบพันธุ์ และการเปลี่ยนแปลงสมบัติการเป็นโพรไบโอติก เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารมาตรฐาน

##### 4.2.4.1 การเจริญของยีสต์และการเปลี่ยนแปลงของกรดอินทรีย์ในน้ำกระเจี๊ยบ

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์จากน้ำกระเจี๊ยบปริมาตร 1.5 L ในถังปฏิกรณ์การหมักขนาด 5 L โดยมีอัตราการให้อากาศ 100-120 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ยีสต์มีการเจริญช้ากว่าการเพาะเลี้ยงยีสต์ปริมาตร 200 mL ในขวดปริมาตรทรงกรวย (conical flask) ความจุขนาด 250 mL โดยใช้เครื่องเขย่า (shaker) ที่ 150 rpm เมื่อศึกษาการเจริญของเซลล์ในถังปฏิกรณ์ พบว่า ยีสต์มีรูปแบบการเจริญคล้ายกับข้อ 4.2.1 โดยมีอัตราการเจริญสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 8 แต่มีจำนวนเซลล์ต่ำกว่าข้อ 4.2.1 จากนั้นจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งที่ 48 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์มีจำนวนเพียง 10.42 log CFU/mL จึงต้องเพิ่มเวลาเพาะเลี้ยงให้นานขึ้น และที่ 72 ชั่วโมงของการหมัก ยีสต์มีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 10.98 log CFU/mL (ดังแสดงในภาพที่ 4.10) ซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhibiao และคณะ (2014) ได้ศึกษาวิธีการขยายการเพาะเลี้ยงยีสต์จาก 10 L เป็นถังหมักขนาด 10,000 L เพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรม พบว่า เซลล์ยีสต์ในถังหมักขนาด 10,000 L มีจำนวนเซลล์ที่น้อยกว่า 10 L อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) และพบว่า สารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการให้ออกซิเจน เป็นปัจจัยสำคัญในการขยายระดับการเพาะเลี้ยง ซึ่งส่งผลต่อสรีรวิทยา (physiological) และเมตาบอลิซึมของยีสต์ (metabolic behavior)

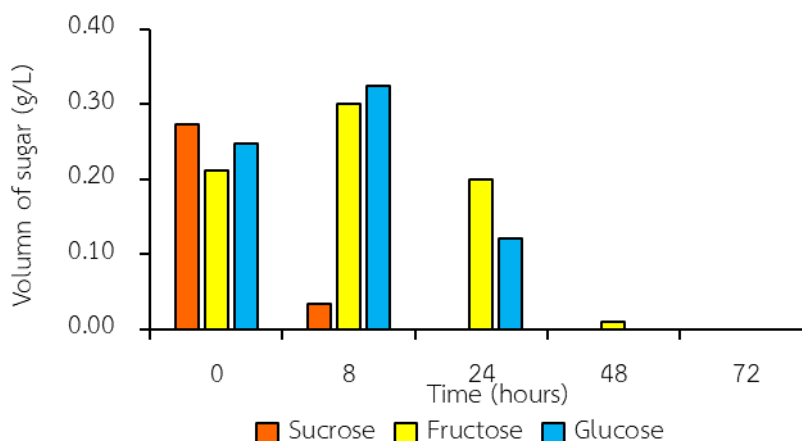




**ภาพที่ 4.10** การติดตามจำนวนและอัตราการเจริญของ *S. Boulardii* ระหว่างการเพาะเลี้ยง  
ในน้ำกระเจียบ โดยใช้ถังปฏิกรณ์การหมัก  
ขนาด 5 L อัตราการให้อากาศ 100-120 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง  
(log CFU/mL)

#### 4.2.4.2 องค์ประกอบของน้ำกระเจียบหลังหมัก

เมื่อติดตามการใช้น้ำตาลของยีสต์ด้วยการตรวจวัดน้ำตาลเชิงปริมาณและคุณภาพใน  
น้ำกระเจียบระหว่างการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยวิธี โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high  
performance liquid chromatography, HPLC) จากผลการตรวจ ที่ชั่วโมงที่ 0 พบว่า มีปริมาณ  
น้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส เป็น 0.274, 0.247 และ 0.211 g/L เมื่อผ่านไป 8 ชั่วโมง พบว่า  
น้ำตาลซูโครส ลดลงอย่างรวดเร็ว เหลือปริมาณเพียง 0.034 g/L ในขณะที่น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส  
เพิ่มขึ้นเป็น 0.324 และ 0.301 g/L ตามลำดับ เนื่องจาก โดยยีสต์ใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)  
ในการสลายตัวของซูโครส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ น้ำตาลกลูโคสและ  
น้ำตาลฟรุกโตส (Marques et al., 2016) ส่งผลให้น้ำตาลซูโครสลดลง และน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโต  
สมปริมาณที่เพิ่มขึ้น ที่ชั่วโมงที่ 24 ตรวจไม่พบซูโครส และน้ำตาลกลูโคสลดลงเหลือเพียง 0.122 g/L  
ในขณะที่น้ำตาลฟรุกโตสเหลือ 0.200 g/L ที่ 48 ชั่วโมง พบว่า เหลือเพียงน้ำตาลฟรุกโตส 0.010 g/L  
และตรวจไม่พบน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้เป็น Glucophilic yeast จึงเลือกใช้น้ำตาล  
กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานก่อนการใช้น้ำตาลฟรุกโตส (Marques et al., 2016) และชั่วโมงที่ 72 ของ  
การหมัก ตรวจไม่พบน้ำตาลทั้งสามชนิดในระบบน้ำหมัก (ดังแสดงในภาพที่ 4.11)



**ภาพที่ 4.11** การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลซูโครส ฟรุคโตส และกลูโคส ระหว่างการเจริญของยีสต์ในน้ำกระเจียบ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

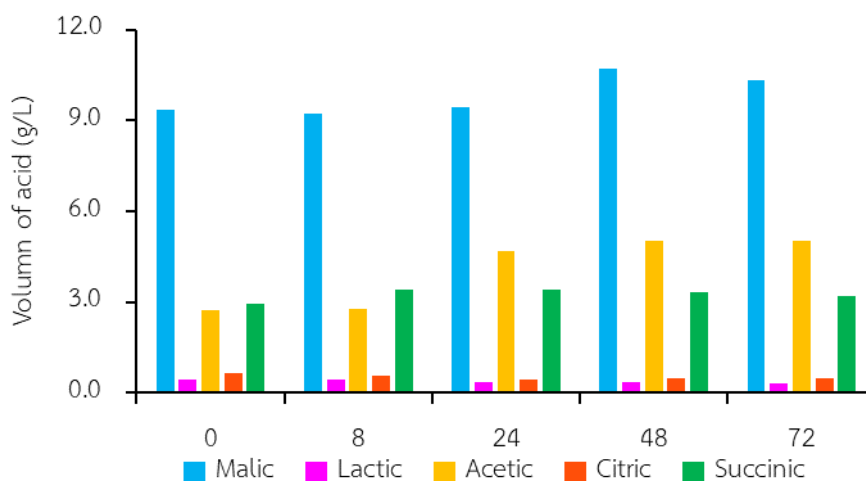
และเมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของกรดอินทรีย์ในน้ำกระเจียบระหว่างการหมัก ด้วยยีสต์ โดยตรวจวัดกรดอินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ กรดมาลิก กรดซิตริก กรดซัคซินิก กรดอะซิติก และ กรดแลคติก พบว่า กรดมาลิก กรดซัคซินิก และ กรดอะซิติก มีปริมาณเพิ่มขึ้น 0.98, 0.25 และ 2.32 g/L

คิดเป็น 9.46, 7.84 และ 46.12 % ตามลำดับ ในขณะที่ กรดแลคติกและซิตริก มีปริมาณลดลง 0.13 และ 0.14 g/L คิดเป็น 29.25 และ 21.90 % ตามลำดับ (ดังแสดงในภาพที่ 4.12)

โดยปริมาณของกรดอะซิติกที่เพิ่มขึ้น เกิดจากแอลกอฮอล์รวมตัวกับออกซิเจน จึงส่งผลให้กรดอะซิติกเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก (Gunther, 1995) โดยปกติยีสต์สามารถสร้าง กรดอะซิติกได้ในปริมาณที่น้อย และหากมีปริมาณสูงเกิน 0.7 g/L จะสามารถส่งผลต่อกลิ่น-รสของ น้ำหมักได้ การเพิ่มขึ้นของกรดซัคซินิกนั้น เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการกระบวนการหมักด้วยยีสต์ ซึ่ง กรดชนิดนี้จะส่งผลต่อรสชาติของน้ำหมักเช่นเดียวกัน โดยทำให้เกิดรสชาติเค็มและขม (อรอง จันทรประสาสุข, 2015)

ในขณะที่กรดมาลิกและกรดซิตริกนั้น สามารถถูกดึงกลับเพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ เช่น การเกิดวัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle) และยังไม่มีรายงานว่ายีสต์สร้าง กรดมาลิกในระหว่างกระบวนการหมัก จากผลการตรวจปริมาณกรดมาลิกที่เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 48 และ 72 ของการหมัก อาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนของเครื่องมือและโปรแกรมที่ใช้ในการตรวจวัด และ

ถึงแม้จะมีรายงานว่าจะสามารถผลิตกรดแลคติกได้ แต่การผลิตกรดแลคติกนั้น ยีสต์จะต้องอยู่ในสภาวะที่ไม่มี หรือ มีออกซิเจนต่ำ จึงสามารถผลิตกรดแลคติกได้ (Songa et al., 2006)



ภาพที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดมาลิก แลคติก อะซิติก ซิตริก และซัคซินิก ระหว่างการเจริญของยีสต์ในน้ำกระเจียบ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

#### 4.3 สมบัติของเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกระเจียบ

สมบัติเบื้องต้นของยีสต์ที่พัฒนาเป็นโพรไบโอติก (1) การทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร (resistance to gastric acidity) (2) การทนต่อเกลือน้ำดี (bile salt resistance) (3) ความสามารถในการเกาะติดกับเยื่อบุเซลล์ผิว และ (4) ฤทธิ์ของเอนไซม์ไฮโดรเลสในการย่อยเกลือน้ำดี (bile salt hydrolase activity) ดังนั้น ศึกษานี้จึงประเมินความสามารถของยีสต์ในการทนต่อกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดีในลำไส้ รวมถึงความสามารถในการยึดเกาะบนผิวเยื่อในระบบทางเดินอาหาร โดยเปรียบเทียบระหว่างยีสต์ที่เพาะเลี้ยงจากน้ำกระเจียบและ YMB

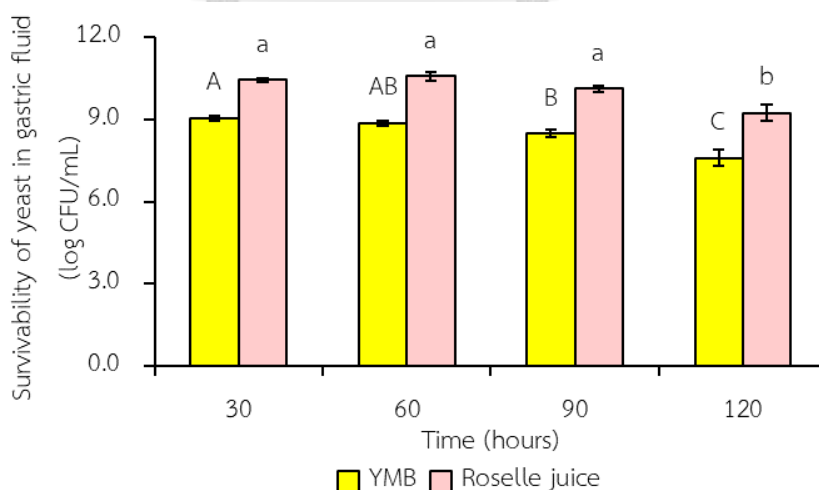
##### 4.3.1 การทนต่อสภาวะเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดี

เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์จะมีน้ำย่อยกระเพาะอาหารมีสภาวะความเป็นกรด หรือ pH ต่ำ และมีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีประมาณ 0.15 ถึง 0.30 % ซึ่งเป็นสภาวะที่ส่งผลต่อการรอดของเซลล์ยีสต์ โดยจำนวนเซลล์ยีสต์ที่รอดชีวิตต้องไม่ต่ำกว่า 6 log CFU/mL ซึ่งเป็นปริมาณที่ยีสต์โพรไบโอติกเพียงพอที่จะเกิดผลดีต่อสุขภาพ จึงทดสอบความสามารถของยีสต์ที่ถูก

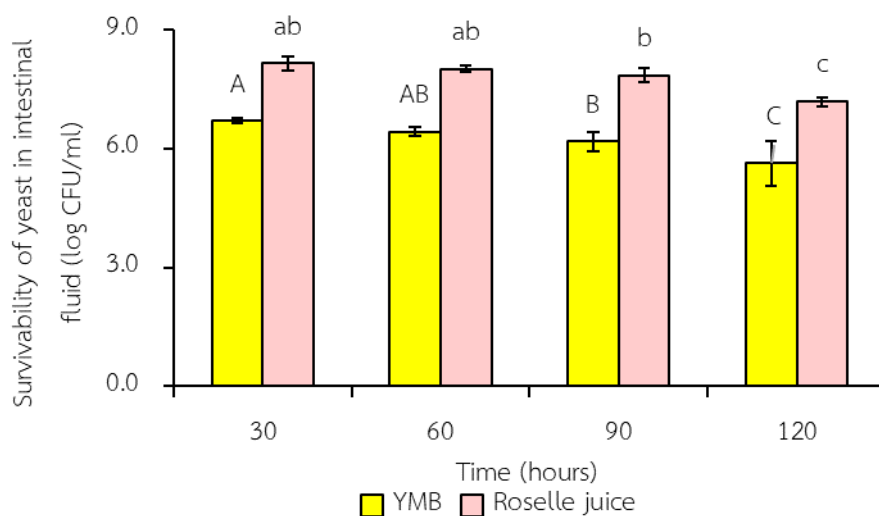
เพาะเลี้ยงในน้ำกระเจี๊ยบ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YMB ในการทนต่อสภาวะเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 2.0 เป็นเวลา 120 นาที และ สภาวะเลียนแบบเกลื่อน้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ pH 6.8 โดยมีเกลื่อน้ำดี 0.6 % เป็นเวลา 150 นาที

จากผลการทดลอง พบว่า ยีสต์ที่ผ่านการบ่มในสภาวะเลียนแบบน้ำย่อยกระเพาะอาหาร เมื่อบ่มเป็นเวลา 120 นาที จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตจาก YMB ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) โดยยีสต์ที่มีชีวิตลดเหลือเพียง 7.65 log CFU/mL จากจำนวนยีสต์เริ่มต้น 9.15 log CFU/mL จำนวนยีสต์ที่รอดชีวิตจากน้ำย่อยกระเพาะอาหารคิดเป็น 82.79% ในขณะที่ยีสต์จากน้ำกระเจี๊ยบมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดถึง 9.24 log CFU/mL จากจำนวนยีสต์เริ่มต้น 10.52 log CFU/mL (ดังแสดงในภาพที่ 4.13) จำนวนยีสต์ที่รอดชีวิตคิดเป็น 87.83%

เมื่อศึกษาความสามารถยีสต์ต่อในสภาวะเลียนแบบเกลื่อน้ำดี พบว่า ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YMB จากจำนวนยีสต์เริ่มต้น 6.78 log CFU/mL มีปริมาณยีสต์ที่รอดชีวิตเพียง 5.43 log CFU/mL คิดเป็น 80.09% ซึ่งปริมาณยีสต์ที่เหลือรอดมีจำนวนต่ำกว่า 6 log CFU/mL เป็นปริมาณไม่เพียงพอต่อร่างกายของมนุษย์ ในขณะที่ปริมาณยีสต์จากการเพาะเลี้ยงในน้ำกระเจี๊ยบเริ่มต้น 8.21 log CFU/mL หลังบ่มพบว่ามียีสต์ที่รอดชีวิต 7.19 log CFU/mL คิดเป็น 87.57 % (ดังแสดงในภาพที่ 4.14)



ภาพที่ 4.13 จำนวนการรอดชีวิตของยีสต์ในสภาวะเลียนแบบน้ำย่อยจำลองในกระเพาะอาหาร ระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที (log CFU/mL) ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ A-C และ a,b แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )



**ภาพที่ 4.14** จำนวนการรอดของยีสต์ในสภาวะเลียนแบบเกลือน้ำดี ระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที (log CFU/mL) ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ A-C และ a-c แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.3.2 ความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ของยีสต์

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร เนื่องจากเชื้อก่อโรคเข้าไปยึดเกาะกับผนังของลำไส้ ดังนั้น หากยีสต์โพรไบโอติกมีความสามารถในการยึดเกาะสูง ส่งผลให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้และก่อให้เกิดโรค โดยทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับผนังลำไส้ ของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกระเจี๊ยบเปรียบเทียบกับ YMB จากการใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ ไซลีน (xylene) เป็นสารไม่มีขั้ว เพื่อทดสอบการยึดเกาะด้วยปฏิสัมพันธ์แบบไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) พบว่า ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกระเจี๊ยบมีความสามารถยึดเกาะได้สูงกว่า YMB 13.7% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) โดยพื้นผิวของผนังลำไส้ส่วนใหญ่ไม่มีขั้ว และ/หรือมีความไม่ชอบน้ำสูง ดังนั้น เซลล์ที่มีความไม่ชอบน้ำสูงจึงสามารถยึดเกาะกับพื้นผิวของผนังลำไส้ได้ดี ด้วยแรงวาลเดอวาลส์ (Martin et al., 2009) และเมื่อความไม่มีขั้วอยู่ใกล้กัน ส่งผลให้เกิดความเป็นขั้วชั่วคราว จึงเกิดการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างผิวเซลล์และผนังเยื่อ คลอโรฟอร์ม (chloroform) มีความเป็นกรด ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอน และ เอซิล อะซิเตท (ethyl acetate) มีความเป็นด่าง ซึ่งเป็นตัวจ่ายอิเล็กตรอน ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิด เป็นสารมีขั้ว เพื่อทดสอบการยึดเกาะด้วยการแลกเปลี่ยนประจุ (Bellon-Fontaine et al., 1996) จากการทดสอบในคลอโรฟอร์ม พบว่า ยีสต์

ที่เพาะเลี้ยงจากน้ำกระเจี๊ยบมีการยึดเกาะที่ 86.69% ซึ่งสูงกว่า YMB ถึง 11.90% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) และในเอธิล อะซิเตทมีการยึดเกาะที่ต่ำกว่าคลอโรฟอร์ม เนื่องจากเกิดการผลักรันของประจุ ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกระเจี๊ยบมีความสามารถในการยึดเกาะ 63.04% ซึ่งสูงกว่า YMB อยู่ 1.63% ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \geq 0.05$ ) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีสต์มีการยึดเกาะในสภาวะที่มีข้าวได้ดี (ดังแสดงในภาพที่ 4.15)

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hossain และคณะ (2020) ที่ทำการทดสอบความสามารถในการยึดเกาะของยีสต์ *S. Boulardii* โดยใช้ คลอโรฟอร์ม (chloroform) และ เฮกซาคีเคน (n-hexadecane) พบว่า ยีสต์มีความสามารถในการยึดเกาะในสารละลายที่เป็นกรดสูงกว่าสารละลายที่มีความเป็นด่างเช่นเดียวกัน



**ภาพที่ 4.15** ความสามารถในการยึดเกาะของยีสต์ ที่บ่มในคลอโรฟอร์มและเอธิล อะซิเตท ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (% hydrophobicity) ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ A-B และ a-b แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

### 4.3.3 การศึกษาสมบัติและการสืบพันธุ์ของยีสต์

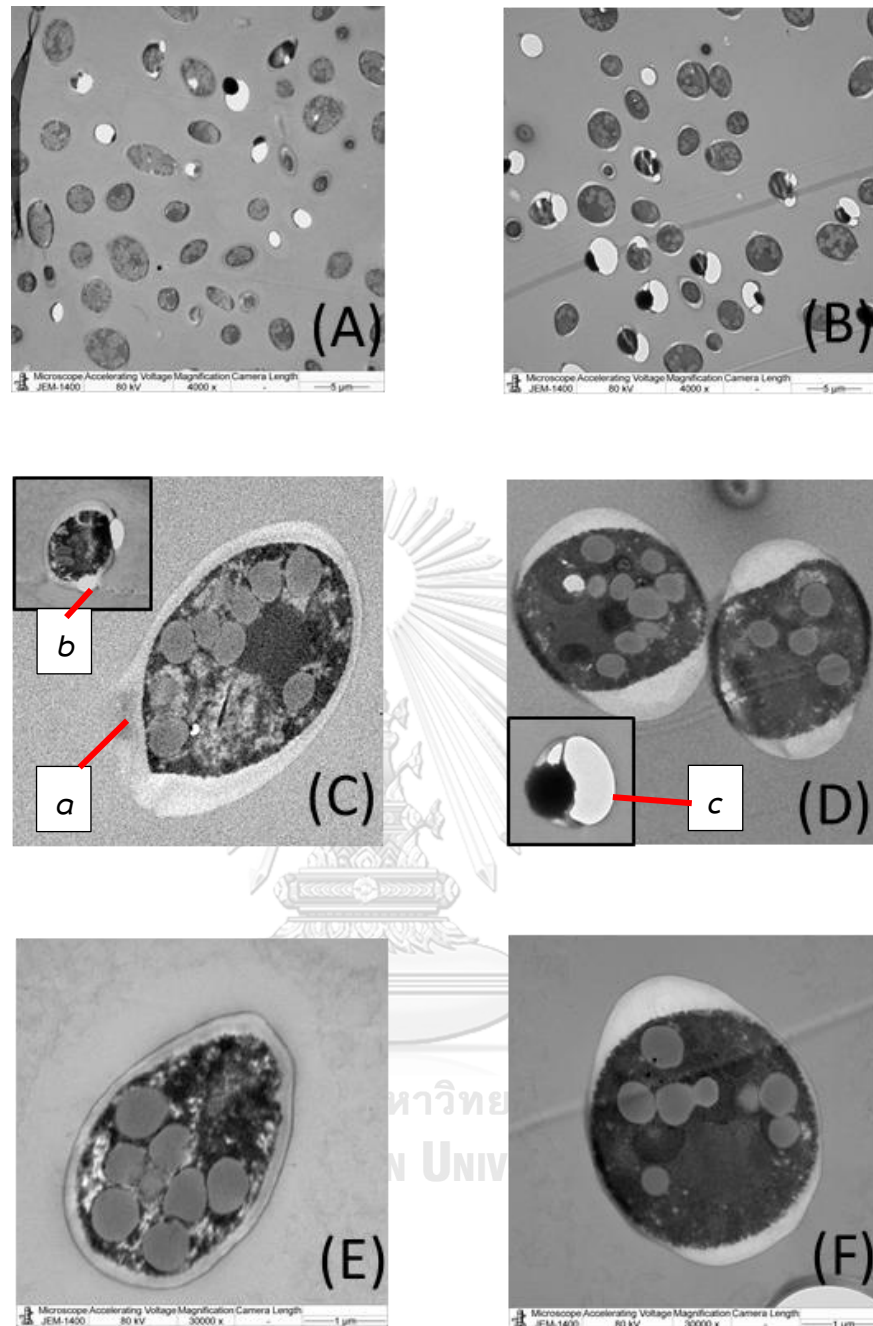
จากการทดสอบข้อ 4.3.1 และ 4.3.2 จะเห็นได้ว่า ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกระเจี๊ยบส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติของเซลล์ในเรื่องความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร เกลื่อน้ำดี และมีความสามารถในการยึดเกาะกับผนังของลำไส้ที่สูงขึ้น การทดลองนี้จึงศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM) อธิบายการเปลี่ยนแปลงสมบัติดังกล่าว ซึ่งเป็นการศึกษาโดยการยิงอิเล็กตรอนผ่านตัวอย่างที่มีความบาง พบว่า เมื่อใช้กำลังขยาย 4,000 เท่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากน้ำกระเจี๊ยบมีสัดส่วนของเซลล์ที่มีสัณฐานวิทยาแบบรี 55 % และมีสัณฐานวิทยาแบบกลม 32% (ดังแสดงในภาพที่ 4.16 (A)) ในขณะที่ยีสต์จาก YMB มีสัณฐานวิทยาแบบกลม 46 % และเซลล์ที่มีสัณฐานวิทยาแบบรี 23 % (ดังแสดงในภาพที่ 4.16 (B)) ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบบกลม หรือ รี ของเซลล์นั้นสามารถบ่งบอกได้ถึงวิธีการสืบพันธุ์และความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมของเซลล์ โดยในสภาวะปกติยีสต์จะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ (budding) เป็นการถ่ายทอดออร์แกเนลล์และนิวเคลียสสู่เซลล์ลูก จากนั้นจึงสร้างผนังกันระหว่างเซลล์ และเมื่อผนังกันสมบูรณ์ เซลล์จะถูกแยกออกจากกัน ซึ่งเซลล์แม่ นั้น จะเกิดรอยแผลจากการแตกหน่อ (bud scar) และสามารถแตกหน่อใหม่ได้ทันที (Yarrow et al., 1998) จากการสืบพันธุ์แบบแตกหน่อ นั้น ส่งผลให้เซลล์ลูกจะมีขนาดเล็กกว่าเซลล์แม่ และมีรูปร่างไม่สมมาตร (asymmetry) โดยเซลล์จะมีสัณฐานวิทยาแบบรี (ellipsoidal) นอกจากนี้ยังสามารถแตกหน่อได้หลายขั้ว (multipolar) โดยสามารถเกิดได้รอบเซลล์ทุกด้าน ส่งผลให้ยีสต์สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้สูง (ดังแสดงในภาพที่ 4.16 (C)) แต่เมื่อเซลล์ตกอยู่ในสภาวะที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญ เช่น สารอาหารไม่เพียงพอ เซลล์จะปรับตัวจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีแตกหน่อเป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยวิธีฟิชชัน (fission) ซึ่งเซลล์ลูกนั้นมีรูปร่างที่สมมาตร (symmetry) ทำให้มีสัณฐานวิทยาแบบกลม และมีขนาดใกล้เคียงกับเซลล์แม่ แต่เนื่องจากต้องใช้เวลาในการแบ่งตัว จึงส่งผลให้ยีสต์เพิ่มจำนวนเซลล์ได้น้อยกว่าการแตกหน่อ (Herskowitz et al., 1988) จึงบ่งชี้ได้ว่า ยีสต์ที่เจริญในน้ำกระเจี๊ยบมีการสืบพันธุ์แบบแตกหน่อจำนวนเซลล์จึงมากกว่ายีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน YMB ซึ่งมีการสืบพันธุ์แบบฟิชชัน จำนวนเซลล์จึงน้อยกว่า (ดังแสดงในภาพที่ 4.16 (D))

และเมื่อพิจารณาความหนาของผนังเซลล์ ประกอบไปด้วย เบต้า1,3 กลูแคน เบต้า1,6-กลูแคน ไคติน และ แมนโนโปรตีน (mannoproteins) ซึ่งมีหลายหน้าที่ เช่น ป้องกันโปรโตพลาสต์ (protoplast) ทำให้เซลล์คงรูปร่าง และเพิ่มความแข็งแรงให้เซลล์ เป็นต้น Aguilar-

Uscanga et al., 2003 จากการศึกษาพบว่า ผนังเซลล์ของยีสต์จากการเพาะเลี้ยงในน้ำกระเจี๊ยบมีความหนามากกว่ายีสต์ที่เพาะเลี้ยงจาก YMB เกิดจากปริมาณเบต้ากลูแคนที่ผนังเซลล์ยีสต์เปลี่ยนไปเนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ความเป็นกรด-ด่าง ทำให้เกิดวิถี high-osmolarity glycerol ซึ่งเป็นกระบวนการควบคุมการตอบสนองและการปรับตัวของยีสต์ที่เกิดจากสภาวะที่ทำให้เซลล์เกิดความเครียด (stress condition) เช่น ความเป็นกรด อุณหภูมิ จึงส่งผลกระทบต่อสัดส่วนขององค์ประกอบของผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ของยีสต์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในน้ำกระเจี๊ยบซึ่งมี pH ต่ำ (ภาพที่ 4.16 (E)) มีความหนามากกว่าผนังเซลล์ของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน YMB (ภาพที่ 4.16 (F)) (Kapteyn et al., 2001 และ Hohmann et al., 2009) ดังนั้น ยีสต์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในน้ำกระเจี๊ยบนั้น จึงมีความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร เกลือน้ำดี และมีความสามารถในการยึดเกาะกับผนังของลำไส้ที่สูงกว่ายีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน YMB







**ภาพที่ 4.16** การศึกษาสัณฐานวิทยาและการสีพันธุของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงจากน้ำกระเจี๊ยบ และ YMB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี transmission electron microscope (TEM) (A) ภาพกำลังขยาย 4000 เท่า เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ในกระเจี๊ยบ (B) ภาพกำลังขยาย 4000 เท่า เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ใน YMB (C) ลักษณะการสีพันธุของยีสต์ในน้ำกระเจี๊ยบรอยแผล (d) และการแตกหน่อ (b) (D) ลักษณะการสีพันธุของยีสต์ใน YMB และการฟิซชัน (c) (E) ความหนาของผนังเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงจากน้ำกระเจี๊ยบ (F) ความหนาของผนังเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงจาก YMB

#### 4.4 การผลิตเซลล์ยีสต์สำหรับกระบวนการทำเม็ดโพรไบโอติกแบบฟองฟู

##### 4.4.1 การเตรียมผงยีสต์น้ำกระเจี๊ยบและการผสมสารอื่นๆ เพื่อผลิตเม็ดโพรไบโอติกแบบฟองฟู

ผลิตยีสต์จากยีสต์หลังจากเพาะเลี้ยงในน้ำกระเจี๊ยบด้วยถังหมัก จาก 4.2.4.1 โดยทำให้เซลล์เข้มข้นด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 4500 rpm เป็นเวลา 15 นาที เซลล์จะตกตะกอน และแบ่งน้ำกระเจี๊ยบส่วนบน (supernatant) ออกครึ่งหนึ่ง จะได้น้ำหมักที่มีปริมาณยีสต์มากกว่า 11 log CFU/mL นำเข้าเครื่องทำแห้ง โดยใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส และนำไปบดเป็นผง จะได้ยีสต์แห้งที่มีชีวิตมากกว่า 10 log CFU/mL จากนั้นวัดค่ากิจกรรมของน้ำ (water activity,  $a_w$ ) ซึ่งค่าที่วัดได้ต้องต่ำกว่า 0.6 พบว่า ผงยีสต์มีค่ากิจกรรมของน้ำ 0.520 เมื่อนำมาประเมินชนิดและปริมาณส่วนผสมพบว่า ได้สูตรที่มีส่วนผสมหลักเป็น ผงยีสต์จากคัลเจอร์น้ำกระเจี๊ยบจากกระเจี๊ยบ 25-30 % ผงกระเจี๊ยบ 25-30 % กรดซิตริกและโซเดียมไบคาร์บอเนต อย่างละ 10-15 % น้ำตาลซูโครส 10-15 %

สารโพลีไวนิลไพโรลิโดน (polyvinyl povidone, PVP) และ โพลีเอธิลีน ไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) อย่างละ 3-5% และ สารยัดเกาะ 3-5 % และหลังผสมแล้วจะต้องได้เซลล์ที่มีชีวิตอยู่รอดมากกว่า 9 log CFU/ mL ก่อนนำไปตอกเม็ด

##### 4.4.2 การผลิตและการทดสอบทางกายภาพของโพรไบโอติกอัดเม็ดแบบฟองฟู

แรงที่ใช้ในการตอกเม็ดมีความสำคัญต่อปริมาณของยีสต์และการผลิตเม็ดฟู เนื่องจากหากใช้แรงในการตอกสูงเกินไป จะส่งผลต่อเซลล์ยีสต์ ทำให้เซลล์แตก จำนวนยีสต์ที่มีชีวิตลดลง และมีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของเม็ดฟู หากใช้แรงในการตอกต่ำเกินไปจะส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของเม็ดฟูเช่นเดียวกัน (Nagashima et al., 2013)

ดังนั้นจึงทดสอบการตอกเม็ดฟูด้วยสากไฟฟ้า โดยเลือกแรงที่ใช้ในการตอกที่ 20 25 30 35 และ 40 นิวตัน จากการทดสอบ พบว่า การใช้แรงตอกที่ 20 นิวตัน ส่งผลให้น้ำหนักเฉลี่ยและค่าความแข็งของเม็ดฟูต่ำกว่าที่กำหนด ความกรอบไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด เนื่องจากแรงที่ใช้ต่ำเกินไป จึงไม่เกาะกันเป็นเม็ด การใช้แรงตอกที่ 25 และ 30 นิวตัน พบว่า ค่าความแข็งและความกรอบไม่ผ่านเกณฑ์ และการใช้แรงที่ 40 นิวตัน พบว่า สำหรับความสามารถในการละลายนั้น เม็ดฟูใช้เวลานานกว่า 5 นาที ในการสลายตัว จึงไม่ผ่านเกณฑ์ ดังนั้นจึงเลือกใช้แรงในการตอกที่ 35 นิวตัน พบว่า ผ่านการทดสอบ (ดังแสดงในตารางที่ 4.1) โดยได้น้ำหนักเม็ดเฉลี่ย  $3.38 \pm 0.02$  กรัม ความแข็ง  $46.88 \pm 1.06$  นิวตัน ความกรอบ 1.07 % และสามารถสลายตัวภายใน 5 นาที จึงเลือกใช้แรงในการ

ตอกเม็ดฟู่ที่ 35 นิวตัน (ดังแสดงในตารางที่ 4.2) ด้วยเครื่องตอกเม็ดแบบไฟฟ้า ที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์ เม็ดฟู่ที่ผ่านการตอกแล้วมีลักษณะกลม (ดังแสดงในภาพที่ 4.17) ขนาดความกว้าง 2 เซนติเมตร และสูง 1 เซนติเมตร (ดังแสดงในภาพที่ 4.18) ถูกบรรจุในถุงซิปล็อคใส 1 เม็ดต่อ 1 ถุง และบรรจุในถุงอลูมิเนียมในสภาวะสุญญากาศ และเมื่อนำไปละลาย จะมีลักษณะเป็นน้ำกระเจี๊ยบสีแดง มีกลิ่นกระเจี๊ยบ รสเปรี้ยวเป็นน้ำกระเจี๊ยบแบบดั้งเดิม ดังภาพที่แสดงใน 4.19 และสามารถรับชมลักษณะการฟู่ของอีสต์โพรไบโอติกอัดเม็ด (ความเร็ว 2 เท่า) ได้ที่ <https://youtu.be/mhcS0nrSQrw>

ตารางที่ 4.1 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ จากการแปรค่าแรงที่ใช้ในการตอกโพรไบโอติกอัดเม็ดแบบฟองฟู

แรงที่ใช้ในการตอกเม็ด (นิวตัน)	น้ำหนักเฉลี่ย (ผ่าน/ไม่ผ่าน)	ค่าความแข็ง (ผ่าน/ไม่ผ่าน)	ค่าความกร่อน (ผ่าน/ไม่ผ่าน)	ความสามารถในการแตกตัว (ผ่าน/ไม่ผ่าน)
20	ไม่ผ่าน	ไม่ผ่าน	ไม่ผ่าน	ผ่าน
25	ผ่าน	ไม่ผ่าน	ไม่ผ่าน	ผ่าน
30	ผ่าน	ไม่ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
35	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน
40	ผ่าน	ผ่าน	ผ่าน	ไม่ผ่าน

ตารางที่ 4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ จากการใช้แรง 35 นิวตัน ในการตอกโพรไบโอติกอัดเม็ดแบบฟองฟู

แรงที่ใช้ในการตอกเม็ด (นิวตัน)	35 นิวตัน
น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	$3.38 \pm 0.02$ กรัม
ค่าความแข็ง (นิวตัน)	$46.88 \pm 0.97$ นิวตัน
ค่าความกร่อน (เปอร์เซ็นต์)	$1.07 \pm 0.86$ %
ความสามารถในการแตกตัว (ภายใน 5 นาที)	แตกตัวใน 4 นาที (ภาพที่ 4.19) หรือ <a href="https://youtu.be/mhcS0nrSQrw">https://youtu.be/mhcS0nrSQrw</a>



ภาพที่ 4.17 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ยีสต์โพรไบโอติกกระเจียบอัดเม็ดแบบฟองฟู  
ที่ได้หลังการตอกที่ 35 นวัตกรรม



ภาพที่ 4.18 ขนาดความกว้างและสูงของยีสต์โพรไบโอติกกระเจียบอัดเม็ดแบบฟองฟู

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพที่ 4.19 ลักษณะการฟูของยีสต์โพรไบโอติกกระเจียบอัดเม็ด

ในน้ำ 100 mL และรับชมลักษณะการฟูของยีสต์โพรไบโอติกอัดเม็ด (ความเร็ว 2 เท่า)

ได้ที่ <https://youtu.be/mhcS0nrSOrw>

#### 4.4.3 อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

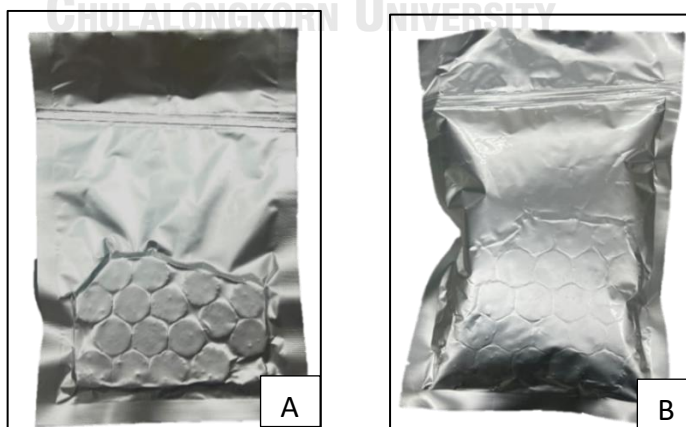
ในการผลิตยีสต์โพรไบโอติกอัดเม็ดนั้นจะต้องคำนึงถึงปริมาณของยีสต์โพรไบโอติก สำหรับประเทศไทยกำหนดให้มีปริมาณโพรไบโอติกที่มีชีวิตอยู่ของแต่ละชนิดต้องคงเหลืออยู่ไม่น้อยกว่า 6 log CFU/กรัม อาหาร ตลอดอายุการเก็บรักษา

เมื่อตรวจนับจำนวนยีสต์ ทุกๆ 15 วันเป็นเวลา 60 วัน พบว่า วันที่ 0 และ 15 จำนวนยีสต์คงอยู่ที่ 10 log CFU/เม็ด ตรวจสอบค่ากิจกรรมของน้ำ (water activity,  $a_w$ ) คงที่ที่  $0.525 \pm 0.01$  และมีสมบัติการแตกตัวคงเดิม (ดังแสดงในภาพที่ 4.20) แต่เมื่อตรวจนับจำนวนยีสต์วันที่ 30 เป็นต้นไป พบว่า ถูที่ใช้บรรจุซอง บวม และจำนวนยีสต์ลดลงเหลือเพียง 4 log CFU/เม็ด ซึ่งเป็นปริมาณที่ไม่เพียงพอตามที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนด และเมื่อตรวจสอบปริมาณน้ำอิสระเพิ่มขึ้น  $0.531 \pm 0.02$  อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) รวมถึงใช้เวลาในการแตกตัวนาน ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ทั้งนี้การพองของถูอาจเกิดจากยีสต์ถูกทำแห้งที่อุณหภูมิที่ต่ำ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถึงแม้ว่าค่ากิจกรรมของน้ำลดเหลือเพียง  $0.525 \pm 0.01$  แต่ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำให้เซลล์ยีสต์สามารถย่อยสลายสารอาหาร เปลี่ยนเป็นพลังงานผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น ไกลโคไลซิส วัฏจักรเครปส์ และ/หรือ เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนได้ผลิตภัณฑ์เป็น พลังงาน น้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ (Goubet et al., 2002) และน้ำที่เกิดยังส่งผลให้ค่ากิจกรรมของน้ำเพิ่มขึ้น แต่กระบวนการเหล่านี้จะเกิดในสภาวะที่มีออกซิเจน จึงอาจเป็นไปได้ว่า บรรจุภัณฑ์หรือวิธีการเก็บรักษาที่ใช้ไม่เหมาะสมต่อบรรจุเพื่อการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ทำให้ออกซิเจนสามารถซึมผ่านได้ และเมื่อเวลาผ่านไป การเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ข้างต้น ส่งผลให้บรรจุภัณฑ์เกิดการพองตัวขึ้น

ตารางที่ 4.3 อายุการเก็บรักษา จำนวนยีสต์ที่มีชีวิต และลักษณะของผลิตภัณฑ์

อายุการเก็บ (วัน)	จำนวนยีสต์ที่มีชีวิต	ค่ากิจกรรมน้ำ (Aw)	ลักษณะของผลิตภัณฑ์
0	10 log CFU/เม็ด	0.520	บรรจุในถุงอลูมิเนียม สภาวะสุญญากาศ สมบัติการแตกตัวคงเดิม
15	10 log CFU/เม็ด	0.525	บรรจุในถุงอลูมิเนียม สภาวะสุญญากาศ สมบัติการแตกตัวคงเดิม
30	4 log CFU/เม็ด	0.532	บรรจุภัณฑ์พอง เกิดอากาศด้านใน ผลิตภัณฑ์ใช้เวลาในการแตกตัวนานขึ้น
45	4 log CFU/เม็ด	0.531	บรรจุภัณฑ์พอง เกิดอากาศด้านใน ผลิตภัณฑ์ใช้เวลาในการแตกตัวนานขึ้น
60	4 log CFU/เม็ด	0.534	บรรจุภัณฑ์พอง เกิดอากาศด้านใน ผลิตภัณฑ์ใช้เวลาในการแตกตัวนานขึ้น และไม่เกิดฟองฟู



ภาพที่ 4.20 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาในถุงอลูมิเนียม ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะ  
สุญญากาศ

(A) ลักษณะของผลิตภัณฑ์ วันที่ 0 ของการเก็บรักษา และ (B) ลักษณะของผลิตภัณฑ์วันที่ 60 ของการเก็บรักษา

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

การประเมินสภาวะการเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำผักและผลไม้ พบว่า ยีสต์สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มี pH 4.0 การเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำผัก-ผลไม้ ได้เซลล์ยีสต์จำนวนมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YMB โดยน้ำกระเจี๊ยบและน้ำองุ่นมีจำนวนเซลล์ยีสต์ใกล้เคียงกันที่  $11.58 \pm 0.21$  และ  $11.44 \pm 0.64$  log CFU/mL ตามลำดับ และยีสต์ในน้ำใบบัวบก  $10.59 \pm 0.16$  log CFU/mL ในขณะที่ YMB มีจำนวน  $10.11 \pm 0.06$  log CFU/mL ซึ่งการเจริญของยีสต์ในน้ำกระเจี๊ยบมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุด นอกจากนี้ น้ำกระเจี๊ยบหลังหมักมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น 11.82 %

เมื่อศึกษาความสามารถในการทนต่อสภาวะจำลองน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและน้ำดี พบว่า ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกระเจี๊ยบ มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่ายีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน YMB และมีความสามารถในการยึดเกาะกับผิวเยื่อบุลำไส้ได้ดีขึ้น จากการตรวจสอบด้วยวิธี TEM พบว่า ผนังเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกระเจี๊ยบนั้น มีความหนาแน่นมากกว่าเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงจาก YMB นอกจากนี้ เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำกระเจี๊ยบพบว่ามีสัณฐานวิทยาแบบรี สีสันพื้นผิวแบบไม่อาศัยเพศด้วยวิธีการแตกหน่อ เซลล์จาก YMB ที่มีสัณฐานวิทยาแบบกลม สีสันพื้นผิวแบบอาศัยเพศด้วยวิธีการฟิชชัน

ประเมินการผลิตเซลล์ยีสต์ด้วยการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์การหมัก พบว่าจำนวนเซลล์ยีสต์น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดปริมาตร จึงเพิ่มเวลาในการเพาะเลี้ยงจาก 48 เป็น 72 ชั่วโมง เมื่ออบแห้งยีสต์ในน้ำกระเจี๊ยบ และบดเป็นผงแล้ว พบว่า มีปริมาณน้ำอิสระ 0.520 เมื่อประเมินชนิดและปริมาณของสูตรผสม พบว่าได้สูตรผสมในอัตราส่วน ดังนี้ ผงยีสต์จากคัลเจอร์น้ำกระเจี๊ยบจากกระเจี๊ยบ และผงกระเจี๊ยบแห้งบด อย่างละ 25-30% กรดซิตริกและโซเดียมไบคาร์บอเนต อย่างละ 10-15% น้ำตาลซูโครส 10-15%, โพลีไวนิลไพร์โรลิโดน (Polyvinylpyrrolidone, PVP) โพลีเอธิลีนไกลคอล (Polyethylene Glycol, PEG) และ สารยึดเกาะ 3-5% ตามลำดับ ขึ้นรูปเป็นเม็ด 3.35 กรัม ใช้แรงตอกเม็ดที่ 35 นิวตัน พบว่ามีน้ำหนักเฉลี่ย  $3.38 \pm 0.02$  กรัม ความแข็ง  $46.88 \pm 0.97$  นิวตัน ความกรอบน  $1.07 \pm 0.86\%$  จะได้เม็ดฟูที่สลายตัวในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใน 5

นาที่ มีเซลล์ที่มีชีวิต  $10 \log \text{CFU/เมตร}$  ที่แขวนลอยในน้ำที่มีกลิ่น-รสของน้ำกระเจี๊ยบ เก็บรักษาในช่องอคูมิเนียมภายใต้สภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิห้องได้เป็นเวลา 15 วัน

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาระดับห้องปฏิบัติการ หากต้องการนำไปศึกษาต่อในระดับอุตสาหกรรม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น ปริมาณสารอาหาร อัตราการให้อากาศ และขนาดถังปฏิกรณ์การหมัก เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ อีกทั้งการเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้งและบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสม จะช่วยให้สามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้น







จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

### รายการอ้างอิงภาษาไทย

กลุ่มวิจัยอาหารเพื่อโภชนาการ สำนักโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. (2018). บัวบก, ใบ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : [Thai Nutrition Search \(moph.go.th\)](http://Thai.Nutrition.Search(moph.go.th)) [14 มิถุนายน 2565]

กลุ่มวิจัยอาหารเพื่อโภชนาการ สำนักโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. (2018). กระจับปี่. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : [Thai Nutrition Search \(moph.go.th\)](http://Thai.Nutrition.Search(moph.go.th)) [14 มิถุนายน 2565]

ประมวล ทราทอง. (2560). โพรไบโอติกยีสต์ Probiotic yeast. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, 297-301.

พร ศักดิ์ ศรี อมร ศักดิ์. (2004). แนวทาง การ ตั้ง ตำรับ ยา รูป แบบ ฟอง ฟู่. Thai Bulletin of Pharmaceutical Sciences, 1(1), 32-42.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2555). หลักเกณฑ์และแนวทางปฏิบัติการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : [http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ\\_fda/61\\_Probiotic\\_Bacteria.pdf](http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_fda/61_Probiotic_Bacteria.pdf) [14 มิถุนายน 2565]

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. (2555). ยีสต์โพรไบโอติก. วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้, 3(1), 66-73.

อรอง จันทรประสาทสุข. (2558). สารประกอบที่ให้กลิ่นรสในไวน์. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, 43(2), 190-204.

## รายการอ้างอิงภาษาอังกฤษ

- A Level Revision. (2015). Yeast population over time. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : <https://tbrann.weebly.com> [20 มิถุนายน 2565]
- Abid, R., Waseem, H., Ali, J., Ghazanfar, S., Muhammad Ali, G., Elsbali, A. M., and Alharethi, S. H. (2022). Probiotic yeast *Saccharomyces*: Back to Nature to Improve Human Health. *Journal of Fungi*, 8(5), 444.
- Aguilar-Uscanga, B., & Francois, 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(3), 268-274.
- Aksit, A. (2012). Molecular Characterization of ethanol resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. Master of Science. Advanced Technology. Istanbul technical University. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/325158165>
- Alsuhaim, H., Vojisavljevic, V., and Pirogova, E. (2013). Effects of non-thermal microwave exposures on the proliferation rate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Medical Physics and Biomedical Engineering*, 26, 48-51.
- Baranowska, M., Koziara, Z., Suliborska, K., Chrzanowski, W., Wormstone, M., Namiesnik, J., and Bartoszek, A. (2021). Interactions between polyphenolic antioxidants quercetin and naringenin dictate the distinctive redox-related chemical and biological behaviour of their mixtures. *Scientific Reports*, 11(1), 1-18.
- Bzducha-Wróbel, A., Błażej, S., Kieliszek, M., Pobiega, K., Falana, K., and Janowicz, M. (2018). Modification of the cell wall structure of *Saccharomyces cerevisiae* strains during cultivation on waste potato juice water and glycerol towards biosynthesis of functional polysaccharides. *Journal of Biotechnology*, 281, 1-10.

- Camacho-Ruiz, L., Perez-Guerra, N., and Roses, R. P. (2003). Factors affecting the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture and in solid state fermentation. *Electron J Environ Agric Food Chem*, 2(5), 531-542.
- Chelliah, R., Kim, E. J., Daliri, E. B. M., Antony, U., and Oh, D. H. (2021). In Vitro Probiotic Evaluation of *Saccharomyces boulardii* with Antimicrobial Spectrum in a *Caenorhabditis elegans* Model. *Foods*, 10(6), 1428.
- Chidi, B. S., Bauer, F. F., and Rossouw, D. (2018). Organic acid metabolism and the impact of fermentation practices on wine acidity: A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 39(2), 1-15.
- Chin, T. S., Othman, N. Z., Malek, R. A., Elmarzugli, N., Leng, O., Ramli, S., Musa, N. F. and El Enshasy, H. (2015). Bioprocess optimization for biomass production of probiotics yeast *Saccharomyces boulardii* in semi-industrial scale. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(3), 122-132.
- Chumsri, P., Sirichote, A., and Itharat, A. (2008). Studies on the optimum conditions for the extraction and concentration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30, 133-139.
- Cortez, R., Luna-Vital, D. A., Margulis, D., and Gonzalez de Mejia, E. (2017). Natural pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 180-198.
- Cosme, F., Pinto, T., and Vilela, A. (2018). Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: A chemical and sensory view. *Beverages*, 4(1), 22.
- Czerucka, D., Piche, T. and Rampal, P. (2007). Yeast as probiotics *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 26, 767-778.
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., Berenjian, A., and Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, 8(3), 92.

- Dinleyici, E. C., Eren, M., Ozem, M., Abidin, Z. and Vandenplas, Y. (2012) Effectiveness and safety of *Saccharomyces boulardii* for acute infectious diarrhea. *Journal of Expert Opinion on Biological Therapy*: 395-410.
- European Patent Office. European publication server. [online]. Retrieved from: <https://data.epo.org/publication-server/document?iDocId=6610724&iFormat=0> [20 June 2022]
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., and Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12), 8813-8826.
- Gonzales, G. B., Smaghe, G., Wittevrongel, J., Huynh, N. T., Van Camp, J., and Raes, K. (2016). Metabolism of quercetin and naringenin by food-grade fungal inoculum, *Rhizopus azygosporus* Yuan et Jong (ATCC 48108). *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(49), 9263-9267.
- Goubet, I., Maugard, T., Lamare, S., & Legoy, M. D. (2002). Role of water activity and temperature on activity and stability of dried whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* in a continuous solid-gas bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(4), 425-430.
- Guowei, S. H. U., Xin, Y. A. N. G., Zhangteng, L. E. I., and Huang, D. (2018). Effects of carbohydrates, prebiotics and salts on survival of *Saccharomyces boulardii* during freeze-drying. *Acta Universitatis Cibinensis, Series E: Food Technology*, 22(2), 59-66.
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 52(4), 536-553.
- Hohmann, S. (2009). Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 583(24), 4025-4029.

- Hossain, M. N., Afrin, S., Humayun, S., Ahmed, M. M., and Saha, B. K. (2020). Identification and growth characterization of a novel strain of *Saccharomyces boulardii* isolated from soya paste. *Frontiers in Nutrition*, 7, 27.
- Ipci, K., Öktemer, T., Birdane, L., Altintoprak, N., Muluk, N. B., Passali, D., Lopatin, A., Bellussi, L., Mladina, R., and Cingi, C. (2016). Effervescent tablets: a safe and practical delivery system for drug administration. *ENT Updates*, 6(1), 46.
- Izquierdo-Vega, J. A., Arteaga-Badillo, D. A., Sánchez-Gutiérrez, M., Morales-González, J. A., Vargas-Mendoza, N., Gómez-Aldapa, C. A., Castro-Rosas, J., Delgado-Olivares, L., Madrigal-Bujaidar, E. and Madrigal-Santillán, E. (2020). Organic acids from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)—A brief review of its pharmacological effects. *Biomedicines*, 8(5), 100.
- Jahangeer, M., Zahed Mahmood, A. M., Mehmood, R., Munir, N., Tahir, I. M., Hussain, S., Fatima, G., and Akram, M. (2019). Yeast cells secondary metabolites and their industrial applications; a review. *Pak J Med Biol Sci*, 2(1), 62-67.
- Kapteyn, J. C., Ter Riet, B., Vink, E., Blad, S., De Nobel, H., Van Den Ende, H., & Klis, F. M. (2001). Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Molecular Microbiology*, 39(2), 469-480.
- Khan, S. A., Zhang, M., Liu, L., Dong, L., Ma, Y., Wei, Z., Chi, J. and Zhang, R. (2020). Co-culture submerged fermentation by lactobacillus and yeast more effectively improved the profiles and bioaccessibility of phenolics in extruded brown rice than single-culture fermentation. *Food Chemistry*, 326, 126985.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food and Nutrition Research*, 61(1), 1361779.

- Lee, Y., and Im, E. (2021). Regulation of miRNAs by natural antioxidants in cardiovascular diseases: Focus on SIRT1 and eNOS. *Antioxidants*, 10(3), 377.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., and Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118.
- Marques, W. L., Raghavendran, V., Stambuk, B. U., and Gombert, A. K. (2016). Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. *FEMS Yeast Research*, 16(1), 1-16.
- Martins, F. S., Silva, A. A., Vieira, A. T., Barbosa, F. H., Arantes, R. M., Teixeira, M. M., and Nicoli, J. R. (2009). Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. *Archives of Microbiology*, 191(8), 623-630.
- Martin-Gómez, J., García-Martínez, T., Varo, M. Á., Mérida, J., and Serratos, M. P. (2021). Phenolic compounds, antioxidant activity and color in the fermentation of mixed blueberry and grape juice with different yeasts. *LWT*, 146, 111661.
- Mohd Zainol, M. K., Abdul-Hamid, A., Abu Bakar, F., and Pak Dek, S. (2009). Effect of different drying methods on the degradation of selected flavonoids in *Centella asiatica*. *International Food Research Journal*, 16(4), 531-537.
- Pais, P., Almeida, V., Yilmaz, M., and Teixeira, M. C. (2020). *Saccharomyces boulardii*: what makes it tick as successful probiotic?. *Journal of Fungi*, 6(2), 78-94.
- Patel, S. G., and Siddaiah, M. (2018). Formulation and evaluation of effervescent tablets: a review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(6), 296-303.
- Peña, A., Sánchez, N. S., Álvarez, H., Calahorra, M., & Ramírez, J. (2015). Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 15(2), 1-12.



- Pekal, A., & Pyrzynska, K. (2015). Effect of pH and metal ions on DPPH radical scavenging activity of tea. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(1), 58-62.
- Sabra, A., Netticadan, T., and Wijekoon, C. (2021). Grape bioactive molecules, and the potential health benefits in reducing the risk of heart diseases. *Food Chemistry*, 12, 100149.
- Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D., and Branduardi, P. (2010). 16 years research on lactic acid production with yeast—ready for the market?. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 27(1), 229-256.
- Shahidi, F. and Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897
- Songa, H. and Lee, SY., (2006) Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microbial Technology*, (39), 352–361.
- Staniszewski, A., and Kordowska-Wiater, M. (2021). Probiotic and potentially probiotic yeasts-characteristics and food application. *Foods*, 10(6), 1306.
- Tanwar, B., and Modgil, R. (2012). Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits. *Spatula Dd*, 2(1), 59-68.
- Tsai, P. J., McIntosh, J., Pearce, P., Camden, B., & Jordan, B. R. (2002). Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International*, 35(4), 351-356.
- Udeagha, E. C., Ishiwu, C.N., Obiora, C. U. and Iwouno, J. O. (2020). Effect of yeast concentration and total soluble solids on the quality of wine produced from pineapple. *Current Journal of Applied Science and Technology*. 39(30): 28-42.

- Valli, M., Sauer, M., Branduardi, P., Borth, N., Porro, D., and Mattanovich, D. (2006). Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by cell sorting for high intracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5492-5499.
- Veshareh, M. J., and Nick, H. M. (2021). A novel relationship for the maximum specific growth rate of a microbial guild. *FEMS Microbiology Letters*, 368(12), 1-6.
- Wu, H. Y., Yang, K. M., & Chiang, P. Y. (2018). Roselle anthocyanins: Antioxidant properties and stability to heat and pH. *Molecules*, 23(6), 1357.
- Wong, P. K., Yusof, S., Ghazali, H. M., & Man, Y. C. (2002). Physicochemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutrition and Food Science*. 32(2): 68-73.
- Yang, X., Shu, G., Lei, Z., Du, G., Liu, Z., and Cao, J. (2019). Effect of Carbon Sources, Nitrogen Sources and Prebiotics on Growth of. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 23(2), 101-108.
- Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), Elsevier, the Netherlands: Amsterdam, 77-100.
- Yasurin, P., Sriariyanun, M., and Phusantisampan, T. (2016). the bioavailability activity of *Centella asiatica*. *Applied Science and Engineering Progress*, 9(1), 1-9.
- Zha, J., & Koffas, M. A. (2017). Production of anthocyanins in metabolically engineered microorganisms: current status and perspectives. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(4), 259-266.
- Zhao, R. Y. (2017). Yeast for virus research. *Microbial Cell*, 4(10), 311.

Zhao, T., Li, X., Zhu, R., Ma, Z., Liu, L., Wang, X., and Hu, X. (2019). Effect of natural fermentation on the structure and physicochemical properties of wheat starch. *Carbohydrate Polymers*, 218, 163-169.



## ภาคผนวก



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

ภาคผนวก ก  
การตรวจวิเคราะห์ทางเคมี

ก.1 การวัด pH

วัดค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยเครื่อง pH meter (LAQUAtwin, Horiba, Japan)

ก.2 การวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid, °brix)

วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดด้วย refractometer

ก.3 การวัดปริมาณกรดทั้งหมดด้วยวิธี Titratable acidity

ตามวิธีของ Khan et al., 2020

วิธีเตรียมสารเคมี

วิธีเตรียม 0.1N NaOH

1N มี NaOH 40 g ดังนั้น 0.1N จะต้องเตรียม NaOH  $40 \times 0.1 = 4$  g/L

หากต้องการเตรียม NaOH ปริมาตร 100 mL จะต้องชั่งสาร  $\frac{4 \times 100}{1000} = 0.4$  g

เพราะฉะนั้น ต้องชั่งสาร NaOH 0.4g แล้วปรับปริมาตรน้ำกลั่น ให้ได้ 100 mL

หาปริมาณรวมของกรด (%กรดซิตริก และ %กรดแลคติก) โดยไทเทรต Plant based medium ปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 4500 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส ปริมาตร 5 mL เจือจางด้วยน้ำกลั่น 20 mL หยด Phenolphthalein 1-2 หยด เพื่อเป็น indicator จากนั้นจึงนำไปไทเทรตกับ 0.1 N NaOH จนถึงจุดยุติที่ปริมาณต่างทำปฏิกิริยาพอดีกับกรด จากนั้นจึงคำนวณ % กรดซิตริก และ % กรดแลคติก ที่มีในตัวอย่าง

จากสูตร  $\% \text{ กรดซิตริก} = \frac{N \text{ ของ } NaOH \times \text{มิลลิลิตรของ } NaOH \text{ ที่ใช้} \times \text{น้ำหนักโมเลกุลของกรดซิตริก} \times 100}{\text{ตัวอย่างที่ใช้ไทเทรต}}$

โดยน้ำหนักโมเลกุลของกรดซิตริก = 192.12 g/mol และน้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก = 90.08 g/mol

**ภาคผนวก ข**  
**การตรวจวัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ**

**ข.1 การวัดปริมาณทั้งหมดของแอนโทไซยานิน โดยวิธี pH-differential method**  
ตามวิธีของ Fratianni et al., 2014

**1. วิธีเตรียม ไฮโดรคลอริก (Hydrochloric, HCl)**

คำนวณโดย

36 % w/v = สารละลาย 100 mL มี HCl 36 g

$$\begin{aligned} \text{HCl } 36 \text{ g} &= X \text{ mol} & \text{ดังนั้น mol} &= \text{ปริมาณสาร} / \text{น้ำหนักโมเลกุล} \\ & & &= 36/36.46 \\ & & &= 0.987 \text{ mol} \end{aligned}$$

ความเข้มข้น 1 Molarity (M) = 1 mol/L

ดังนั้น สารละลาย 100 mL มี HCl 0.987 mol

1000 mL มี HCl 9.87 mol

ดังนั้น ปิเปต HCl 38% มา 1 mL นำมาปรับในขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1L

**2. วิธีเตรียมบัฟเฟอร์**

2.1 เตรียม 0.025 M KCl buffer โดยเตรียมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) pH 1.0 ความเข้มข้น 0.025 M เตรียม 250 mL โดยชั่ง KCl 1.86 g ละลายสารและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 mL ปรับค่า pH เป็น 1.0 ด้วย HCl หรือ NaOH

2.2 เตรียมสารละลาย 0.4 M Sodium acetate buffer ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) โดยชั่ง โซเดียมอะซิเตท 54.43 g ละลายสารและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 mL ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 1000 mL

2.3 เตรียมสารเคมี 2 ชนิด ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 mL โดยแยกกัน ได้แก่ KCl buffer pH 1.0 และ Sodium acetate buffer buffer pH 4.5 โดยใช้ปริมาตรอย่างละ 1.8 mL เติมลงใน Plant based medium ก่อนและหลังการหมักทั้ง 3 ชนิด ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงและแยกตะกอนแล้ว ปริมาตร 0.2 mL ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrometer ที่  $A_{520}$  และ  $A_{700}$  นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่วัดได้

คำนวณตามสมการดังนี้

$$A = (A_{520} - A_{700}) \text{ pH } 1.0 - (A_{520} - A_{700}) \text{ pH } 4.5$$

คำนวณความเข้มข้นของ monomeric anthocyanin pigment ในตัวอย่าง

$$\text{Monomeric anthocyanin} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times l) \quad (\text{mg/L})$$

เมื่อ MW คือ molecular weight, DF คือ อัตราส่วนเจือจางของตัวอย่าง,  $\epsilon$  คือ

**ความสามารถในการดูดซับแสงรังควัตถุ**ของ cyanidin-3-glucoside และ  $l$  คือ ความกว้างของคิวเวท โดยที่ MW ของ cyanidin-3-glucoside = 449.2 และ  $\epsilon$  ของ cyanidin-3-glucoside = 26,900

## ข.2 การวัดปริมาณทั้งหมดของฟีนอลิก (Total phenolic content)

โดยวิธี Folin-ciocalteu colorimetry ดัดแปลงตามวิธีของ Martin-Gomez et al., 2021

### 1. วิธีเตรียมสารละลาย 10% w/v sodium carbonate

ละลาย sodium carbonate 10 g ในน้ำกลั่น 100 mL

### 2. วิธีเตรียมสารละลาย 10% w/v Folin-ciocalteu reagent

ละลาย Folin-ciocalteu reagent 10 mL ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 mL

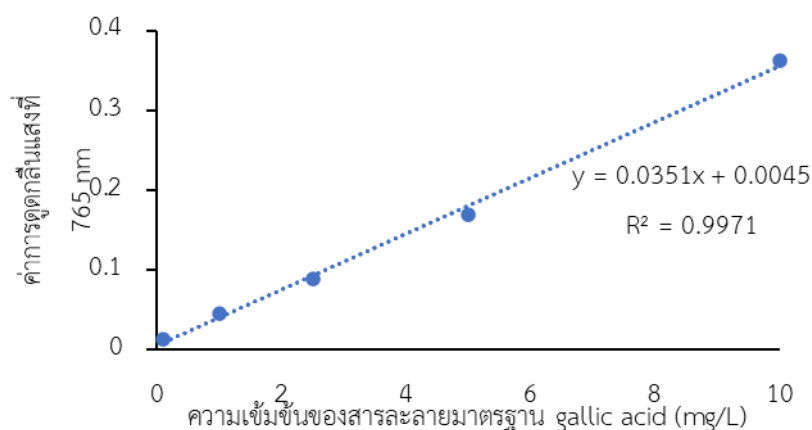
### 3. วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid และการสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ละลาย gallic acid 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 mL (ได้ความเข้มข้น 1000 mg/L)

2. ปิเปตสารละลายข้อ 1 ปริมาตร 0.1, 1.0, 2.5, 5.0 และ 10.0 ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น (ความเข้มข้นของสารละลาย gallic acid 1, 10, 25, 50 และ 100 mg/L)

3. ปิเปตสารละลาย gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.5 mL ผสมน้ำกลั่น ปริมาตร 10 mL และสารละลาย 10% w/v Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 0.5 mL ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที เติม 10% w/v Sodium carbonate ปริมาตร 2 mL ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงด้วย

เครื่อง Spectrometer ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยมีน้ำกลั่นเป็นตัวอ้างอิง (เพื่อปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เท่ากับ 0) และสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย gallic acid (แกน x) และ ค่าการดูดกลืนแสง (แกน y)



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

#### 4. วิธีวิเคราะห์ปริมาณทั้งหมดของฟีนอลิก

ปิเปตตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกแล้ว ปริมาตร 0.5 mL ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 10 mL เติมสารละลาย 10% w/v Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 0.5 mL ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 10% w/v sodium carbonate ปริมาตร 2 mL ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวอ้างอิง (เพื่อปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เป็น 0) คำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐาน



### ข.3 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

ดัดแปลงจากวิธี ดัดแปลงตามวิธีของ Martin-Gomez et al., 2021

#### วิธีวิเคราะห์

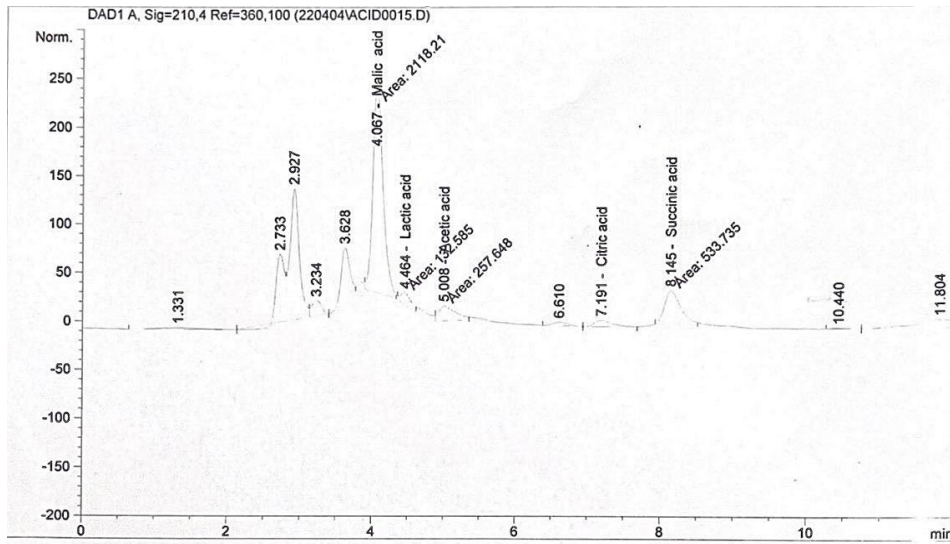
1. เตรียมสารละลาย DPPH โดยชั่ง DPPH 0.004 g ละลายในสารละลายเมทานอล ปรับปริมาตรเป็น 100 mL โดยใช้ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 4.75 mL ผสมกับ เมทานอล ปริมาตร 0.25 mL ผสมให้เข้ากัน ตั้งในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวอ้างอิง (เพื่อปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เป็น 0 และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เป็น  $A_0$ )
2. นำตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกแล้ว ปริมาตร 0.25 mL ผสมกับ DPPH 4.75 mL ตั้งในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เป็น  $A_1$ ) คำนวณหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

จากสูตร  $\% \text{ inhibition} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$

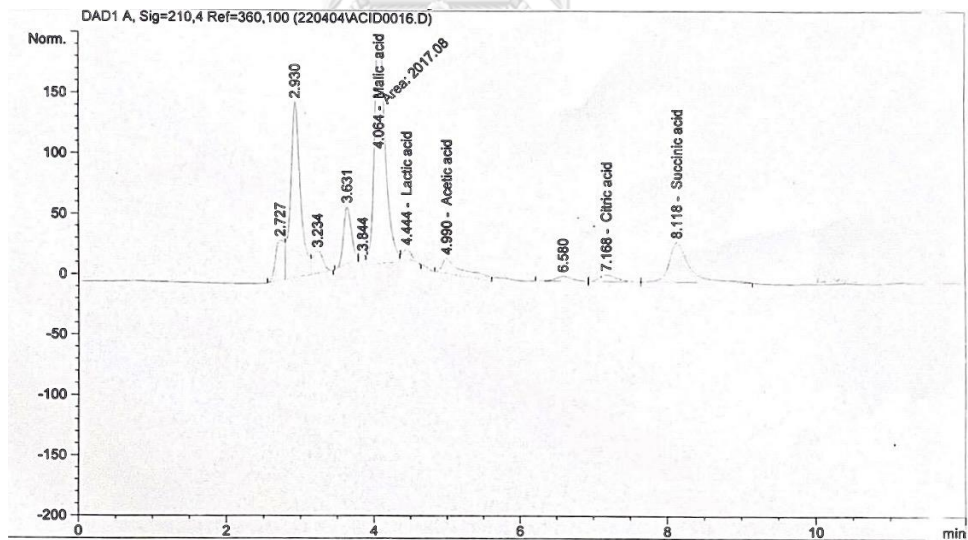
เมื่อ  $A_0$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH และ  $A_1$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

## ภาคผนวก ค

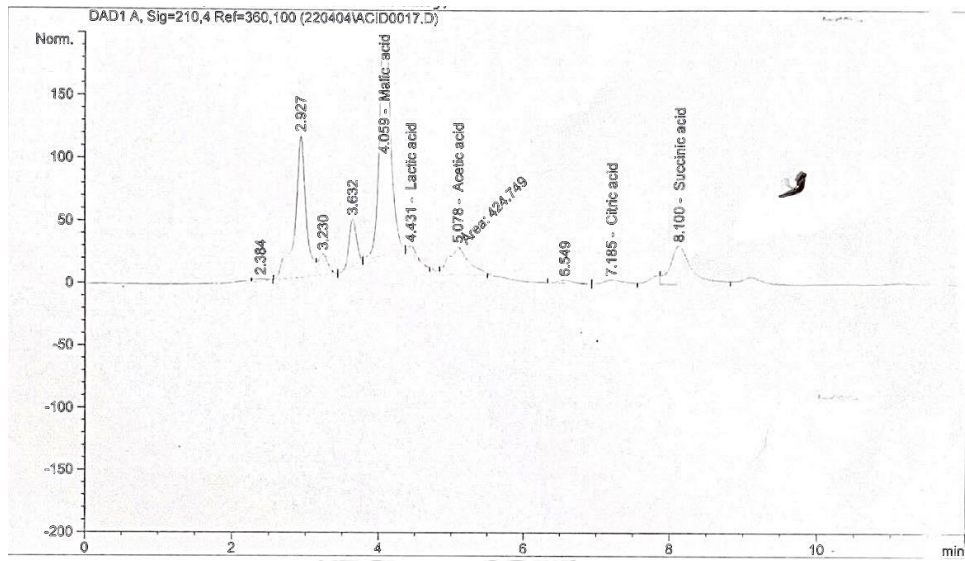
## โครมาโตแกรมของสารอินทรีย์



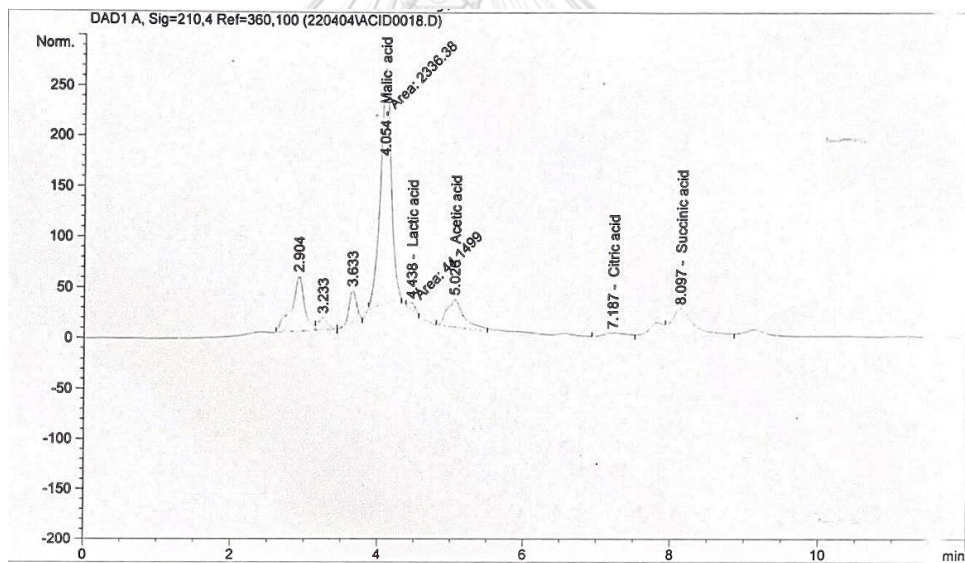
ภาพที่ ค.1 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลียงยีสต์ ชั่วโมงที่ 0



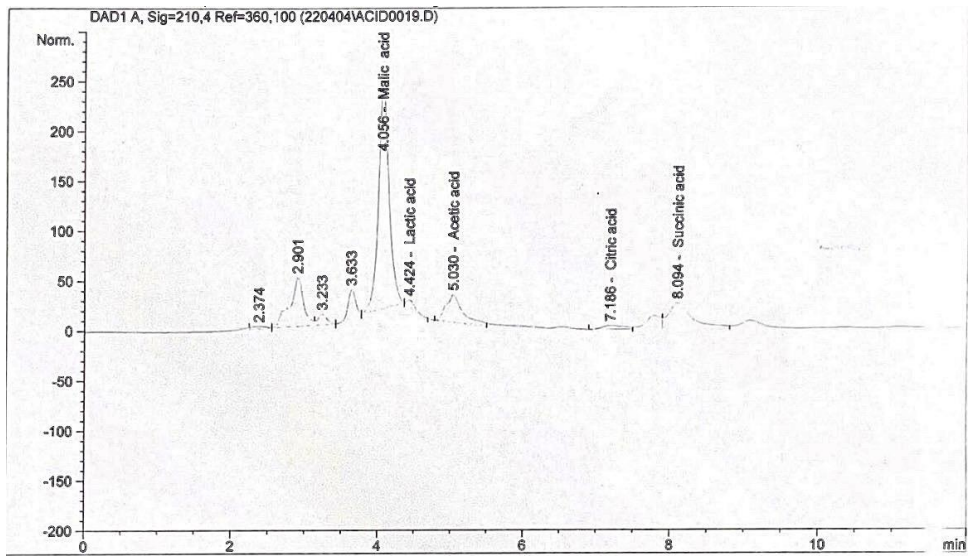
ภาพที่ ค.2 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลียงยีสต์ ชั่วโมงที่ 8



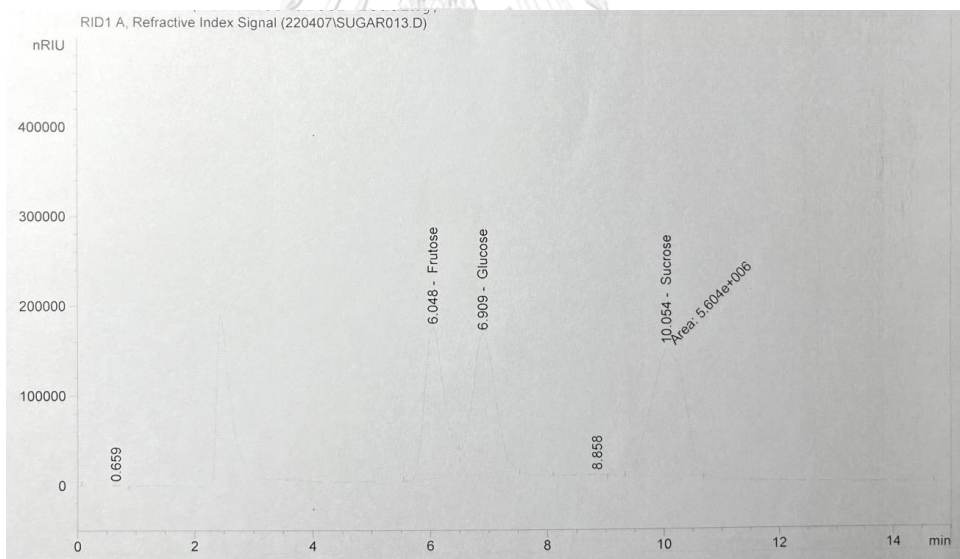
ภาพที่ ค.3 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 24



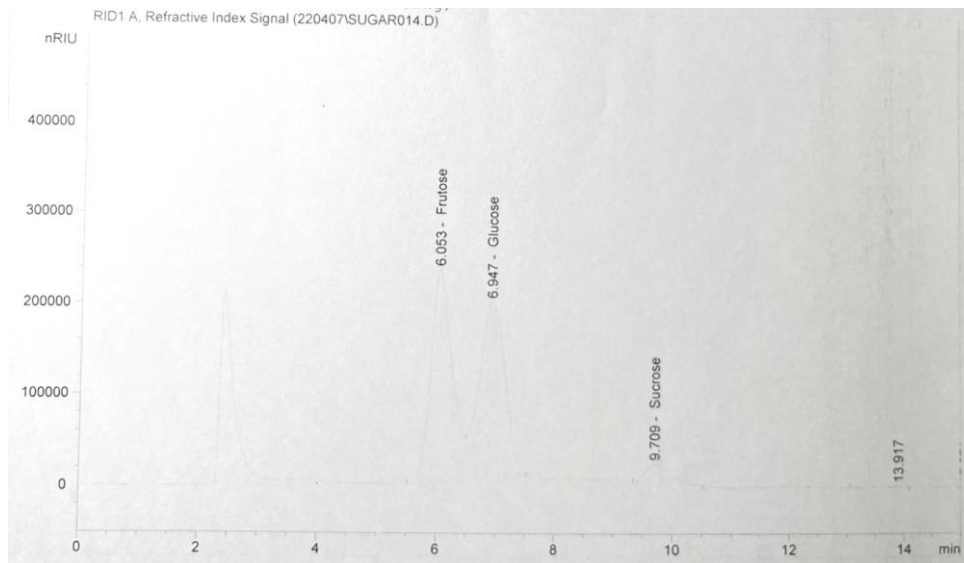
ภาพที่ ค.4 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 48



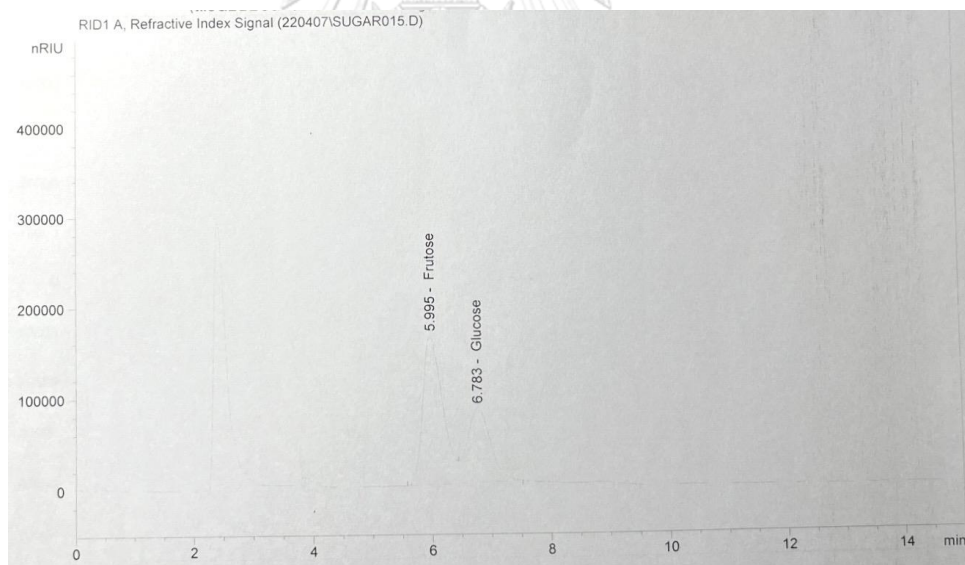
ภาพที่ ค.5 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 72



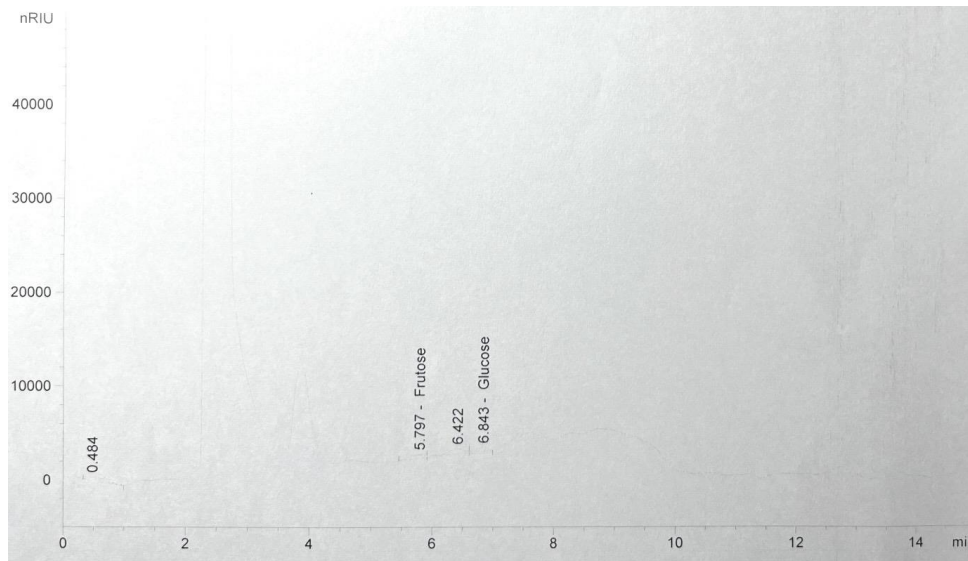
ภาพที่ ค.6 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 0



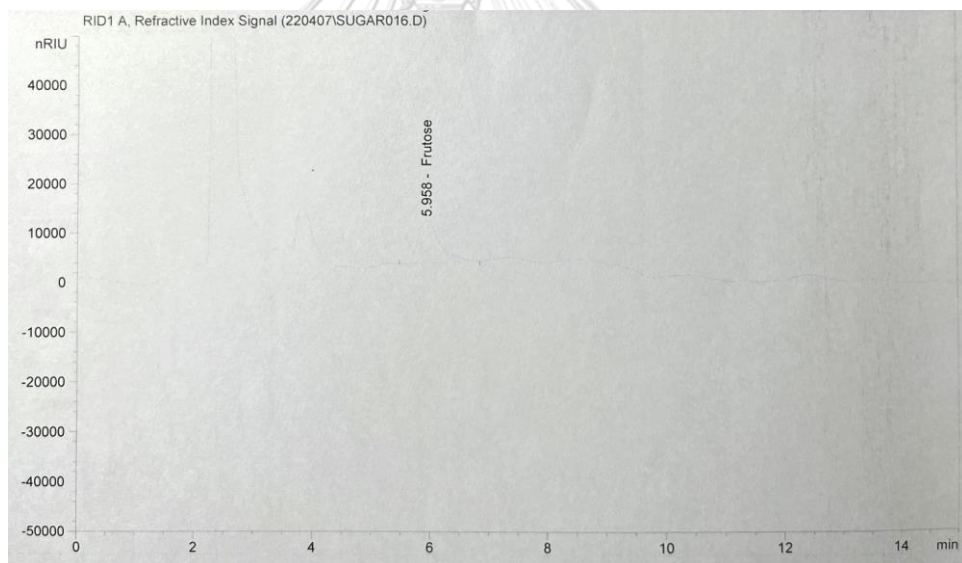
ภาพที่ ค.7 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 8



ภาพที่ ค.8 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 24



ภาพที่ ค.9 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 48



ภาพที่ ค.10 โครมาโตแกรมของน้ำตาลในน้ำกระเจียบหลังการเพาะเลี้ยงยีสต์ ชั่วโมงที่ 72

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว ณิชฐนันท์ บุรณวณิชวงศ์
วัน เดือน ปี เกิด	05 กันยายน 2537
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2559 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2563
ที่อยู่ปัจจุบัน	1/7 หมู่บ้าน ณ นครินทร์ ซอย สุภาพงษ์3แยก8 ถนน ศรีนครินทร์ แขวง หนองบอน เขต ประเวศ กรุงเทพมหานคร 10250
ผลงานตีพิมพ์	ณิชฐนันท์ บุรณวณิชวงศ์ และ ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา. 2022. Growth profiles of probiotic yeast ( <i>Saccharomyces Boulardii</i> ) in different culture media; fruit, vegetable juices, and standard media for development of alternative culture substrate in probiotic cell production. ในงานประชุมระดับนานาชาติ The 24th Food Innovation Asia Conference 2022 (FIAC 2022) Food Innovation and sustainable development of functional ingredients and materials : Benefits, concerns and challenges in human health and well-being ในวันที่ 16-17 มิถุนายน 2565