หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 การหมักแอลกอฮอล์ (Alcoholic fermentation)

การหมักแอลกอฮอล์ จัดเป็นอุตสาหกรรมเก่าแก่ ซึ่งแต่ก่อนใช้ในการเก็บรักษาน้ำผลไม้ ต่อมามีการดัดแปลงให้ใช้ผลผลิตอย่างอื่นมาเป็นวัตถุดิบ เช่น ธัญพืช วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เป็นต้น กระบวนการผลิตแอลกอฮอล์หรือเอทานอล สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 การใช้กระบวนการทางเคมีในการสังเคราะห์เอทานอล โดยใช้เอทิลีน เป็นวัตถุดิบ เรียกว่า "เอทานอลสังเคราะห์"(synthetic ethanol) วิธีที่ 2 คือ ใช้วิธีการทางชีวเคมี โดยใช้ผลผลิตและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร รวมทั้งทุกส่วนของพืชที่มีองค์ประกอบประเภท แป้ง น้ำตาล หรือเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบ เรียกว่า "ไบโอเอทานอล" (bio-ethanol) เทคโนโลยีที่นำมาใช้ผลิตจะมีความแตกต่างกันไปตามประเภทของวัตถุดิบ และให้ผลผลิตเอทานอลที่แตกต่างกัน สามารถนำไปใช้ผลิตสารเคมีหลายประเภท ในช่วงหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 การผลิตแอลกอฮอล์สำหรับอุตสาหกรรมเคมีจะใช้วิธีสังเคราะห์ทางเคมี แต่ปัจจุบันวิกฤตการณ์น้ำมันทำให้คนหันมาสนใจแอลกอฮอล์จากการหมักมากขึ้น ดังนั้นการผลิตเอทานอลจากการหมัก จึงจัดเป็นอุตสาหกรรมที่มีขนาดใหญ่มากอย่างหนึ่ง (คณะกรรมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)

กระบวนการหมักแอลกอฮอล์แบ่งเป็น 3 ส่วนคือ

1. การเตรียมวัตถุดิบ

วัตถุดิบจะเป็นตัวกำหนดรายละเอียดของกระบวนการผลิต วัตถุดิบที่ใช้ผลิตแอลกอฮอล์เป็นสารพวกคาร์โบไฮเดรต สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1. Saccharine materials เช่น น้ำตาล น้ำอ้อย กากน้ำตาล น้ำผลไม้ ซึ่งยีสต์สามารถใช้และเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ได้ทันที

กลุ่มที่ 2. Starchy materials เป็นผลผลิตทางการเกษตรพวกธัญพืชที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบอยู่สูง และสามารถถูกย่อยให้เป็นน้ำตาลซึ่งยีสต์จะนำไปใช้ได้ การย่อยให้โมเลกุลเล็กลงนี้อาจจะใช้กรดหรือเอนไซม์ก็ได้ วัตถุดิบพวกนี้ได้แก่ ธัญพืช (ข้าวโพด,ข้าวสาลี,ข้าวบาร์เล่ย์, ข้าวฟ่าง, ข้าวเจ้า, ข้าวเหนียว) และพืชที่เก็บแป้งไว้ในหัวและราก (มันสำปะหลัง, มันฝรั่ง)

กลุ่มที่ 3. Cellulosic materials ผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น ซึ่งในการใช้วัตถุดิบพวกนี้ต้องย่อย cellulose ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กที่ยีสต์จะสามารถใช้ได้เสียก่อน ซึ่งอาจทำได้โดยการใช้กรดหรือเอนไซม์

สำหรับในการผลิตแอลกอฮอล์ในเครื่องดื่มนั้นวัตถุดิบที่ใช้จะอยู่ในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากวัตถุดิบกลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไวน์ ไวน์ผลไม้ ส่วนผลิตภัณฑ์จากวัตถุดิบกลุ่มที่ 2 ได้แก่ รัม สาเก สาโท วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตที่นิยมใช้ในทางอุตสาหกรรมคือ กากน้ำตาล ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล การใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์มีข้อดีคือ เป็นวัตถุดิบประเภทน้ำตาลจึงไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมัก เช่นเดียวกับการใช้วัตถุดิบประเภทอื่น เพียงแต่เจือจางกากน้ำตาลด้วยน้ำให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมก็สามารถนำไปใช้หมักได้ รวมทั้งกรรมวิธีในการผลิตไม่ยุ่งยากซับซ้อน ใช้เชื้อยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ ทำให้ต้นทุนในการผลิตต่ำ แต่มีข้อเสีย โดยในขั้นตอนการกลั่นแอลกอฮอล์ กากน้ำตาลที่ใช้เป็นวัตถุดิบจะทำให้เกิดตะกรันในหอกลั่น และน้ำกากส่าที่เหลือทิ้งยังมีสีน้ำตาลเข้ม ทำให้ยากแก่การกำจัดสีในขั้นตอนของการบำบัดน้ำเสีย และก่อให้เกิดปัญหาเมื่อระบายน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำ (คงพัฒน์ พงศ์ไพบูลย์ และไพเราะ ทิพย์ทัศน์, 2523)

2. การเตรียมหัวเชื้อ

ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่แข็งแรงและมีปริมาณมากเพียงพอ สำหรับใช้ในการหมัก โดยต้องเลือกยีสต์สายพันธุ์ดี เช่น ทนแอลกอฮอล์สูง ทนต่อสารต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการหมัก ให้กลิ่นรสดี รวมทั้งต้องปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ และใช้กล้าเชื้อในปริมาณที่เหมาะสมรวมทั้งอายุของเชื้อต้องสมบูรณ์เต็มที่ เมื่อเตรียมหัวเชื้อเรียบร้อยจึงถ่ายลงในถังหมักผสมกับวัตถุดิบ จากนั้นทำการปรับและควบคุมภาวะของการหมัก เช่น อัตราการให้อากาศ (aeration rate) อัตราการกวน (agitation rate) ค่าพีเอช (pH) และอุณหภูมิระหว่างการหมัก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของการหมัก ชนิดของผลิตภัณฑ์ และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ ยีสต์ที่ผลิตแอลกอฮอล์ เช่น ไวน์ เบียร์ เป็นต้น เรียกว่า brewer's yeast, wine yeast ส่วนยีสต์ที่ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์จำพวกขนมปังต่าง ๆ เรียกว่า baker's yeast นอกจากนี้ยังมียีสต์ที่ใช้เป็นอาหาร เรียกว่า food yeast หรือ torula yeast (คณะกรรมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)

3. การหมักแอลกอฮอล์

เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการทำงานของเชื้อยีสต์ ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส ภายใต้สภาพที่ปราศจากออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยทั่วไปการหมักจะใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน เพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8 - 12 โดยปริมาตร ตามทฤษฎียีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 51.1 และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 48.9 โดยน้ำหนัก และมีความร้อนเกิดขึ้น ตามสมการเคมีดังนี้

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

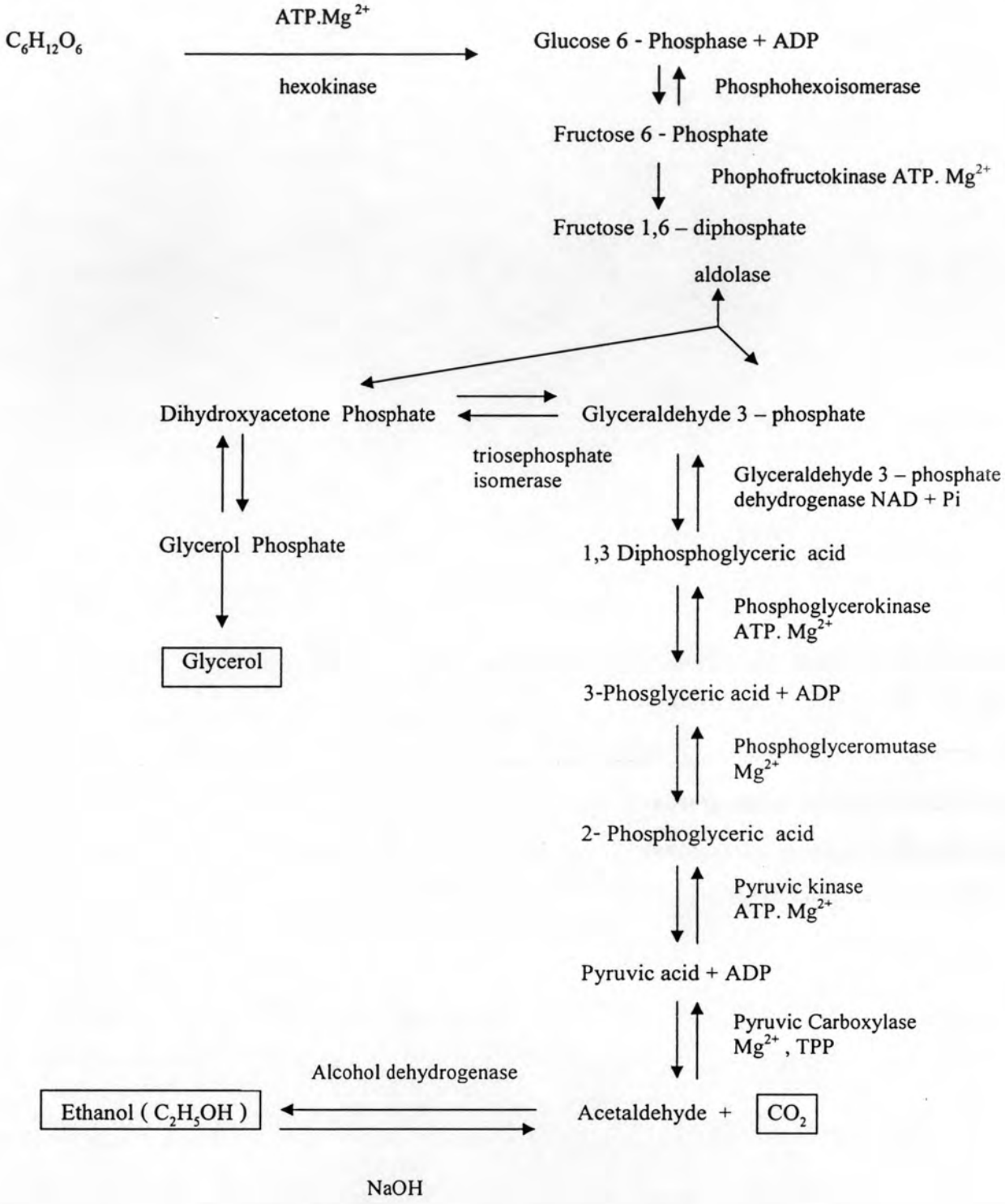
$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

สมการเคมีแสดงการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นแอลกอฮอล์

ในการหมักแอลกอฮอล์ น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 95 เท่านั้นจะเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ และเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่น ๆ ได้แก่ ethanol 48.4%, carbondioxide 46.5%, acetic acid 0.05 - 0.25%, acetaldehyde 0 - 0.03%, glycerol 2.5 - 3.6%, lactic acid 0 - 0.2%, succinic acid 0.5 – 0.77%, fusel oil 0.25 – 0.5% และ furfural trace

ในทางปฏิบัติปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จะต่ำกว่านี้ เนื่องจากน้ำตาลส่วนหนึ่งจะถูกยีสต์นำไปใช้ในการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ บางส่วนถูกนำไปใช้สังเคราะห์ผลิตผลอื่น ๆ เช่น glycerol, esters, aldehyde, amyl alcohol, isoamyl alcohol, isobutyl alcohol, fusel oil และกรดต่าง ๆ ในกากน้ำตาลประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่เชื้อยีสต์จำพวก *Saccharomyces cerevisiae* สามารถหมักได้อยู่ในรูปของน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส ซูโครส มอลโตส กาแลคโตส ราฟฟิโนส และน้ำตาลชนิดอื่น ส่วนน้ำตาลชนิดที่หมักเป็นแอลกอฮอล์ไม่ได้ เช่น น้ำตาลไซโลส ดังนั้นในการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล เมื่อวิเคราะห์ปริมาณรีดิวซิ่งชูการ์ (reducing sugar) พบว่ามีน้ำตาลเหลือ 1 – 2% หลังสิ้นสุดการหมัก (อรพิน ภูมิภมร, 2526)

กระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดไพรูวิค และเปลี่ยนต่อไปเป็นกรดแลคติกหรือแอลกอฮอล์ และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นกระบวนการเมตาบอลิซึมที่ไม่ต้องการอากาศเข้ามาเกี่ยวข้อง เมื่อเติมเซลล์ยีสต์ลงไปในสารละลายน้ำตาล น้ำตาลจะเข้าสู่เซลล์โดยผ่านระบบการนำส่ง (transport system) เช่น กลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอมจะผ่านผนังเซลล์ยีสต์และเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิค โดยการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่อยู่ในเซลล์ของยีสต์ Embden-Meyerhof ได้อธิบายถึงขบวนการของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ไว้ซึ่งเรียกว่า Embden- Meyerhof – Parnas Pathway (ดังแสดงในรูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 **Embden – Meyerhof Pathway**

ที่มา : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2541)

การหมักแอลกอฮอล์ให้ได้ผลดี ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญเกี่ยวกับการเจริญของเซลล์ยีสต์ (สำนักงานควบคุมการผลิตสุรา ฝ่ายเทคนิคและการผลิต กลุ่มบริษัทสุราทิพย์, 2540) ซึ่งได้แก่

1. ธาตุอาหาร เกลือแร่และวิตามิน โดยเกลือแร่ที่สำคัญ คือ แอมโมเนียมซัลเฟต เกลือฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต การหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลมักจะเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05-0.1% ส่วนเกลือฟอสเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟต มีอยู่เพียงพอแล้วในกากน้ำตาล ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของกากน้ำตาล ส่วนวิตามิน ยีสต์ต้องการไบโอติน และกรดแพนโทเทนิค

2. อุณหภูมิในการหมัก มีผลต่อการเจริญและการหมักของยีสต์ ระดับอุณหภูมิที่ยีสต์สามารถหมักแอลกอฮอล์ได้ดีอยู่ในช่วง 30–35 °C และจะทนไปได้ถึง 37 °C ถ้าสูงขึ้นไปถึง 40 °C ส่วนใหญ่จะชะงักการเจริญ แม้ว่าการหมักจะดำเนินไปได้ ถ้ามีปริมาณยีสต์มากพอแล้ว ดังนั้นควรควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 37 °C ตลอดการหมัก

3. pH ยีสต์เจริญได้ดีในสภาพที่เป็นกรด คือ pH 3.8 – 5.5 ถ้า pH ต่ำกว่า 3.5 การเจริญจะลดลง ถ้า pH ต่ำถึง 3 หรือต่ำกว่านั้นก็จะไม่เจริญ ดังนั้นจึงนิยมปรับให้มี pH ในช่วง 4.0 – 4.5 ทั้งนี้นอกจากยีสต์จะเจริญได้ดีที่ระดับ pH ดังกล่าวแล้วยังช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วย

4. ความเข้มข้นของกากน้ำตาล การใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการหมักแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสูงจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์

5. ออกซิเจน ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเลคตรอนขั้นสุดท้ายในลูกโซ่การหายใจ และยังทำหน้าที่เป็น growth factor ของยีสต์ โดยเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดไขมันที่มีพันธะคู่ รวมทั้งกรดโอเลอิก และลิโนเลอิก ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญภายใต้ภาวะที่ปราศจากออกซิเจนแล้ว ยังเพิ่มความทนต่อแอลกอฮอล์ของยีสต์ด้วย หรือเซลล์ยีสต์ยอมให้มีการขนถ่ายแอลกอฮอล์ออกไปจากเซลล์ได้ดีขึ้น ทำให้การหมักได้ผลผลิตแอลกอฮอล์สูงขึ้นด้วย

6. คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ในสภาพที่ความดันสูงกว่าบรรยากาศ คาร์บอนไดออกไซด์จะยับยั้งการเจริญ และการหมักรุนแรงมาก ซึ่งพบว่ามีผลต่อปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชัน และมีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบางอย่างของกิจกรรมของเอนไซม์

7. แบคทีเรีย แบคทีเรียที่ปนเปื้อนและพบมากเป็นพวกแบคทีเรียแลคติค แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน ไม่พบการสร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์ สามารถทนอุณหภูมิสูง 45-50 °C และยังทนต่อแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 8-10% แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญรวดเร็วในระยะแรก และสร้างกรดจนกระทั่ง pH ลดลงต่ำกว่า 3.5 ก็จะทำให้ยีสต์หยุดการเจริญและหมักแอลกอฮอล์ได้น้อย

2.2 ยีสต์ (Yeasts)

ยีสต์ คือ จุลินทรีย์ในกลุ่มของราที่ส่วนใหญ่มีการดำรงชีวิตเป็นแบบเซลล์เดี่ยว อยู่ในชั้นแอสโคไมซีส (Class Ascomycetes) ไม่มีคลอโรฟิลล์ มีนิวเคลียส เคลื่อนไหวไม่ได้ มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม ทรงรี สามเหลี่ยม รูปร่างคล้ายผลมะนาวแถบประเทศตะวันตก หรือรูปร่างยาว เป็นต้น มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย คือ ยาวประมาณ 20 ไมครอน ยีสต์บางชนิดมีการสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) บางชนิดสร้างเส้นใยแท้ (true mycelium) ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการแตกหน่อ (budding) เซลล์ยีสต์ที่อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะแตกหน่อเป็นสองเซลล์ได้ภายใน 1-2 ชั่วโมง หรือแบบอาศัยเพศ โดยวิธีสร้างสปอร์ชนิดแอสโคสปอร์ (ascospore) หรือแบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) โดยทั่วไปเซลล์ยีสต์ต้องการอุณหภูมิในช่วง 25 – 40 ^{0}C ทนสภาพความเป็นกรดได้สูง คือ pH 3.5 ยีสต์เป็นพวกที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพมีอากาศและไม่มีอากาศ ซึ่งเป็นขบวนการทางชีวเคมีที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมัก (Campbell และ Duffus, 1988)

2.2.1 การจำแนกประเภทของยีสต์ (Yeast Classification)

การใช้ประโยชน์จากเซลล์ยีสต์เชิงการค้าในระดับอุตสาหกรรม สามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มหลัก ๆ 2 ประเภท คือ เบเกอร์ยีสต์ (Baker's yeast) และบริวเวอร์ยีสต์ (Brewer's yeast)

<u>เบเกอร์ยีสต์</u>

เบเกอร์ยีสต์ หรือยีสต์ที่ใช้ทำขนมปัง เป็นยีสต์ที่มีความคงทนทางด้านสรีรวิทยา นำไปใช้ในกระบวนการผลิตขนมปังเพื่อให้ขนมปังขึ้นฟู โดยเบเกอร์ยีสต์จะทำให้ขนมปังมีปริมาตรเพิ่มขึ้นจากการเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างการหมักคาร์โบไฮเดรตหรือแป้ง ทำให้ได้ขนมปังที่มีลักษณะนุ่มฟู ตลอดจนมีคุณสมบัติเฉพาะต่างๆ เช่น มีรูพรุนที่เกิดจากฟองอากาศ มีความยืดหยุ่น และมีความอ่อนนุ่ม เป็นต้น อีกทั้งยังให้กลิ่นรสเฉพาะของขนมปังและยังช่วยเพิ่มคุณค่าอาหารของขนมปังด้วย

<u>บริวเวอร์ยีสต์</u>

บริวเวอร์ยีสต์ เป็นยีสต์ที่เจริญในแหล่งของอาหารพวกธัญพืชต่าง ๆ เช่น ข้าวมอลต์ ซึ่งมักใช้ในการผลิตเบียร์ โดยปกติบริวเวอร์ยีสต์เป็นผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเบียร์ ปัจจุบันได้มีการเพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการหมักเพื่อให้เป็นผลิตภัณฑ์เฉพาะ สำหรับใช้เป็นแหล่งของอาหารเสริมที่ได้รับการยกย่องว่ามีคุณค่าทางโภชนาการสูง บริวเวอร์ยีสต์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมาย เนื่องจากเซลล์ของยีสต์ที่ผ่านการบ่มเพาะเลี้ยง

ภายใต้ภาวะการหมัก จะอุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์มากมาย ได้แก่ กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย เกลือแร่ และวิตามิน นอกจากนี้ยังจัดเป็นแหล่งของวิตามินบีรวม ประกอบด้วย วิตามินบี 1 (thiamine) วิตามินบี 2 (riboflavin) วิตามินบี 3 (niacin) วิตามินบี 5 (pantothenic acid) วิตามินบี 6 (pyridoxine) วิตามินบี 9 (folic acid) และไบโอติน (biotin)

ชนิดของยีสต์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมหมักนั้นอยู่ใน Class Ascomycetes โดยจีนัสที่สำคัญคือ

1. จีนัส *Saccharomyces* ยีสต์ในจีนัสนี้มีความสามารถในการหมัก น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมนโนส และน้ำตาลชนิดอื่น ๆ อีก ยีสต์ที่สำคัญได้แก่

S. cerevisiae เป็นสายพันธุ์ที่เรียกว่า top yeast ใช้ในการหมักเบียร์ และทำขนมปัง เนื่องจากสามารถผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้ด้วย ยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถใช้น้ำตาลอื่น ๆ เช่น กาแลคโตส แซคคาโรส มอลโตส ส่วนน้ำตาลราฟฟิโนสจะใช้ได้เพียง 1/3 เท่านั้น

S. cerevisiae var. ellipsoideus ใช้หมักไวน์ พบในองุ่นหรือดินในสวนองุ่น

S. carlbergensis ยีสต์สายพันธุ์นี้จัดเป็น bottom yeast ใช้ในการหมักเบียร์ ยีสต์ชนิดนี้แตกต่างไปจาก *S. cerevisiae* คือ สามารถที่จะใช้น้ำตาลราฟฟิโรสได้สมบูรณ์

S. pastorians เป็นยีสต์ที่รู้จักกันดีที่ทำให้รส กลิ่นของเบียร์ผิดแปลกออกไป

S. fragilis สามารถใช้น้ำตาลแลคโตส และใช้เตรียมผลิตภัณฑ์หมักจากน้ำนม

S. rouxii และ *S. mellis* บางทีเรียกว่า osmophilic yeasts สามารถเจริญและใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง โดยที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญไม่ได้ ยีสต์ทั้งสองแตกต่างในด้านการหมักน้ำตาล คือ *S. mellis* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แมนโนส ส่วน *S. rouxii* สามารถใช้น้ำตาลมอลโตสเพิ่มขึ้นอีก ยีสต์เหล่านี้มักจะทำให้น้ำผึ้งหรือแยมเสื่อมเสีย

2. จีนัส *Pichia* และ *Hansenula* ยีสต์ในสองจีนัสนี้เป็นที่รู้จักกันว่าทำให้ alcoholic liquors เสื่อมเสีย จะเห็นเจริญอยู่บนพื้นผิวของสารละลายแอลกอฮอล์ และเมตาบอลิซึมของน้ำตาล โดยยีสต์เหล่านี้จะเกิดทางด้าน oxidative มากกว่า fermentative ทำให้เกิดเอสเทอร์ในกระบวนการหมักแทนที่จะเกิดการผลิตแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้แอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้อีกด้วย

3. จีนัส *Candida* ยีสต์ที่สำคัญต่อการหมักคือ *Candida utilis* เป็นที่รู้จักกันว่าเป็น food yeast เป็นยีสต์ที่มีส่วนประกอบโปรตีน และวิตามินบีสูง มีความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคส แซคคาโรส ราฟฟิโนส และยังใช้ไนเตรท *C. lipolytica* เป็นยีสต์ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล แต่สามารถใช้เจลลาตินได้รวดเร็วและสมบูรณ์ สามารถย่อยสลายและเจริญบนไขมันได้ จึงมักพบยีสต์นี้บนเนย จุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับผลิตแอลกอฮอล์ในระดับอุตสาหกรรม คือ ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักในน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

และทนสภาพแวดล้อมอื่น ๆ ได้ดีอีกด้วย (อรพิน ภูมิภมร, 2526) ลักษณะสำคัญของยีสต์นี้ คือ ให้ผลผลิตแอลกอฮอล์ในวัตถุดิบกากน้ำตาลได้สูง มีอัตราการหมักแอลกอฮอล์ได้สูงถึง 10-12 ดีกรี ทนต่อแอลกอฮอล์ ทนต่ออุณหภูมิได้สูง 35-37 ^{0}C ทนต่อ pH ต่ำหรือทนต่อกรดที่ pH 4.5-5.0 ทนต่อแรงดันออสโมซิสของอาหารที่ใช้หมักได้สูง มีพันธุกรรมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย แม้จะนำกลับมาใช้ใหม่ ธาตุอาหารเกลือแร่ที่ต้องการ เพื่อใช้สังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม เป็นต้น ก็ต้องการในปริมาณน้อย

การใช้ประโยชน์จากบริวเวอร์ยีสต์ที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการหมัก ก่อให้เกิดประโยชน์ในอุตสาหกรรมที่หลากหลาย ไม่ว่าจะใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร หรือสารปรุงรสอาหาร การผลิตสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ซึ่งจะให้คุณลักษณะของกลิ่นรสที่พิเศษ เพิ่มความอร่อยให้กับอาหาร และองค์ประกอบของสารอาหารที่อยู่ในเซลล์สามารถนำมาใช้ประโยชน์กับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ คือ ใช้เป็นแหล่งโปรตีนที่เรียกว่า โปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) และใช้เพื่อช่วยเสริมสุขภาพของสัตว์หรือเรียกว่า โปรไบโอติค (probiotic) ให้กับสัตว์เลี้ยง โดยใช้เป็นสารที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ (Reed และ Nagodawithana,1991) ช่วยให้สัตว์มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง และมีภูมิต้านทานโรคสูงขึ้น (Rengpipat และคณะ, 2000) นอกจากนี้ บริวเวอร์ยีสต์ยังมีวิตามินบีรวม และสังกะสีในปริมาณที่สูง ซึ่งสารอาหารเหล่านี้ช่วยบำรุงเส้นผม ทำให้ผมมีสุขภาพดี ลดการหลุดร่วงของเส้นผม บำรุงให้เส้นผมเงางามไม่เปราะหักง่ายและช่วยลดปัญหาผมหงอกก่อนวัยได้ ช่วยบำรุงระบบประสาท ทำให้สามารถทนต่อความเครียด ความอ่อนล้าจากการใช้สมอง และใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นสารเคมีและผลิตภัณฑ์เชื้อเพลิง (Stanbury, Whitaker และ Hall,1995) ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากยีสต์จะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้

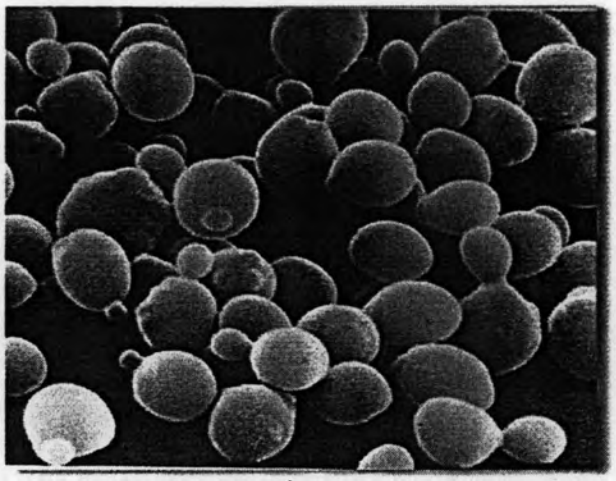
ยีสต์สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ ส่วนต่าง ๆ ของพืช หรือแม้กระทั่งในอากาศ เป็นต้น ยีสต์บางชนิดจะรวมอยู่กับแมลง หรือในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แต่แหล่งที่พบยีสต์เจริญอยู่บ่อย ๆ คือ แหล่งที่มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลสูง ๆ เช่น น้ำผลไม้ น้ำผึ้ง และผลไม้ที่มีรสหวาน เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถพบยีสต์เจริญได้ในเมล็ดธัญพืช หญ้าฟาง หรือแม้กระทั่งอาหารสัตว์ การปนเปื้อนของเชื้อยีสต์ในอาหาร อาจทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย อย่างไรก็ตาม มียีสต์หลายสายพันธุ์ที่ได้พิสูจน์และศึกษาค้นคว้าวิจัยว่ามีประโยชน์ต่อมนุษย์ แต่ยีสต์ที่นำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมการหมักนั้นจะมีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น ตัวอย่างสายพันธุ์ที่เป็นที่รู้จักและมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย คือ *Saccharomyces cerevisiae* จัดอยู่ใน Phylum Eumycetes, Class Acetomycetes, Order Saccharomyces, Family Saccharomycetaceae Sub-family Saccharomycetoidae, Genus Saccharomyces, Species cerevisiae ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์ และแอลกอฮอล์

2.2.2 โครงสร้างและองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์

จากการศึกษาคุณลักษณะของเซลล์ยีสต์ ทำให้สามารถใช้องค์ประกอบจากส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ไปประยุกต์ให้เข้ากับอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เป็นต้น นอกจากนี้จากการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาของเซลล์ยีสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) หรือการศึกษาด้วยเครื่องมือที่มีกำลังขยายสูงโดยอาศัยเทคนิคของลำแสงอิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscope; SEM) และการศึกษาลักษณะของพื้นผิวเซลล์ที่ระดับนาโนเมตร ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอะตอมมิกฟอร์ซ (Atomic Force Microscope; ATM) เพื่อศึกษาภาพของอะตอมหรือโมเลกุลของตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงรายละเอียดต่าง ๆ และรูปร่างของเซลล์ยีสต์ได้เป็นอย่างดี

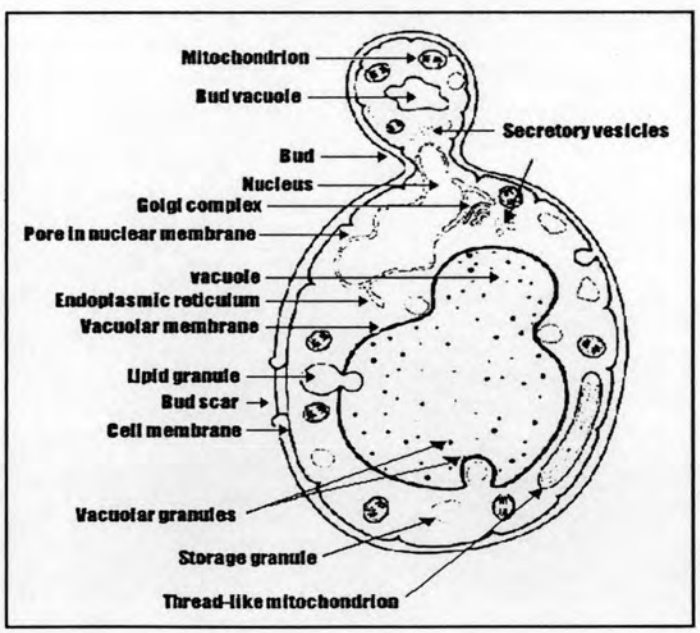
เซลล์ยีสต์มีลักษณะเป็นเซลล์เดียว มีรูปร่างเป็นรูปไข่ค่อนข้างกลม ไม่มีสี หากอายุของเซลล์ยีสต์ยังไม่มากจะพบเซลล์ที่กำลังแตกหน่อ (ดังแสดงในรูปที่ 2.2) โดยมีความกว้างของเซลล์ประมาณ 2.5-10.5 ไมครอน และมีความยาวประมาณ 4.5-21 ไมครอน เซลล์ยีสต์ 1 เซลล์ จะมีปริมาตรประมาณ 40 ลูกบาศก์ไมครอน และมีน้ำหนักแห้งประมาณ 1×10^{-10} กรัมโดยเฉลี่ย อย่างไรก็ตาม ขนาดของเซลล์ยีสต์ขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโต เซลล์ยีสต์มีความชื้นประมาณ 68 - 83% ภายในเซลล์ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตอยู่ในรูปกลูแคนและแมนแนน มีไนโตรเจนเฉลี่ยประมาณ 7-9% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ โปรตีน (64-76% ของไนโตรเจนทั้งหมด) โดยโปรตีนจะเชื่อมกับแมนแนน พิวรีน ไพริมิดีน กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ ไขมัน วิตามินและสารอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น ฟอสเฟต เป็นต้น

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.2 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ยีสต์
ที่มา : www.universe-review.ca

โดยทั่วไปสามารถแบ่งส่วนประกอบของเซลล์ยีสต์ออกได้เป็นสองส่วนหลัก ๆ ได้แก่ ส่วนของผนังเซลล์ที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มและเป็นโครงสร้างของเซลล์ กับส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ คือ นิวเคลียสและไซโตพลาสซึมที่ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน วิตามิน แร่ธาตุชนิดต่าง ๆ และกรดนิวคลีอิกเป็นองค์ประกอบ (ดังแสดงในรูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 องค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ยีสต์
ที่มา : www.ilri.cgiar.org

2.2.2.1 **ผนังเซลล์ยีสต์** (Yeast cell wall)

ผนังเซลล์ของยีสต์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วนหลัก ๆ ได้แก่ ผนังเซลล์ และเซลล์เมมเบรน โดยยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน (ดังแสดงในตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์แต่ละสายพันธุ์

Source of wall	Glucan	Mannan	Protein	Lipid	Chitin
Saccharomyces cerevisiae	29	31	13	8.5	-
Schizosaccharomyces pombe	74-82	8-14	-	-	-
Paracoccidioides brasiliensis	-	-	-	-	-
Yeast form	36-47	-	7-14	5-10	37-48
Mould form	36-47	Trace	24-41	5-10	7-18
Trigonopsis variabilis	-	-	-	-	-
Ellipsoidal form	91[a]	-	-	0.6[d]	2[e]
Triangular form	81[b]	-	-	1.4[d]	2[e]

ที่มา : Reed และ Nagodawithna (1991)

[a]An extensive tabulation of wall component is to be found in Bartnicki-Garcia and Lippman (1982).

[b]Measured as total carbohydrate

[c]Measured as galactomannan.

[d]Measured as phospholipids.

[e]Measured as hexamine

ยีสต์มีผนังเซลล์เป็นองค์ประกอบ 20-30% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง มีความหนาประมาณ 70 นาโนเมตร ผนังเซลล์ทำหน้าที่เสริมให้เซลล์แข็งแรงและคงรูปร่างอยู่ได้ โครงสร้างมีลักษณะเป็นโครงร่างตาข่าย (sieve like structure) ของสารพวกพอลิแซคคาไรด์ ได้แก่ เบต้ากลูแคน (β-glucan) พบประมาณ 55-65% ของน้ำหนักผนังเซลล์ทั้งหมด (Klis และคณะ, 2002) ซึ่งเบต้ากลูแคนเป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อความแข็งแรงและความยืดหยุ่นของผนังเซลล์ เบต้ากลูแคนเป็นสารประกอบพวกโฮโมพอลิแซคคาไรด์ มีน้ำตาลกลูโคสเป็นโมโนเมอร์ โครงสร้างส่วนใหญ่เป็นเส้นตรง เกิดจากกลูโคสเชื่อมกันด้วย β-1,3-glycosidic linkage ประมาณ 85% ของเบต้ากลูแคนทั้งหมด และส่วนที่เป็นแขนงเกิดจาก β-1,6-glycosidic linkage ประมาณ 3-4% ของเบต้ากลูแคนทั้งหมด (ดังแสดงในตารางที่ 2.2) นอกจากนี้บริเวณของผนังเซลล์ยังพบ แมนแนน (mannan) ไคติน (chitin) ฟอสเฟต (phosphate) และอาจพบสารพวกพอลิแซคคาไรด์จับอยู่กับสารประกอบอื่น ๆ เช่น ไขมัน และโปรตีน เป็นต้น ซึ่งอยู่ในรูปของสารประกอบ ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) และไลโปพอลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งสารประกอบเบต้ากลูแคนและแมนแนนที่จับกับโปรตีนมีปริมาณสูง 80-90% ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ (Manners และ Massos, 1973) (ดังแสดงในรูปที่ 2.4)

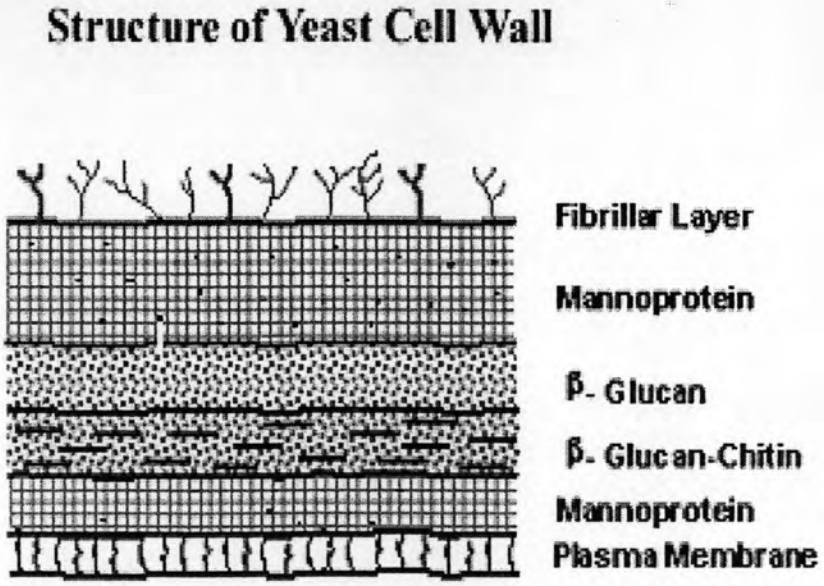
ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบและลักษณะโครงสร้างผนังเซลล์ของยีสต์

Macromolecule	wall dry wt.(%)	monomer	branching
Mannoprotein	35-40	200	Highly branching
β-1,6-glucan	5-10	140	Highly branching
β-1,3-glucan	50-55	1500	Moderately branching
chitin	1-2	190	linear

ที่มา : www.product-search.co.uk/labasia.net

เบต้ากลูแคนพบอยู่บริเวณชั้นในของผนังเซลล์โดยจะรวมอยู่กับไคติน พบประมาณ 50-60% ของน้ำหนักผนังเซลล์ทั้งหมด ส่วนผนังชั้นนอกประกอบไปด้วย glycosylate mannoprotein ประมาณ 40% (Magnelli, Cipollo และ Abijon, 2002) จะอยู่บนผิวชั้นนอกของผนังเซลล์เกี่ยวข้องกับ cell recognition ของยีสต์ ในโครงสร้างของ glycosylate mannoprotein จะประกอบด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์มากมาย ส่งผลให้พื้นผิวของเซลล์มีประจุลบ (Jigami และ Odani,1999) ซึ่งมีผลทำให้ผนังเซลล์ของยีสต์มีสมบัติไม่ละลายในน้ำ สมบัตินี้อาจเกี่ยวข้องกับการกักเก็บน้ำในสภาพแห้งแล้ง สำหรับองค์ประกอบต่าง ๆ ของผนังชั้นนอกนี้มีประมาณ 1 ใน 3

ของน้ำหนักเซลล์แห้งของผนังเซลล์ แมนโนโปรตีนที่ผนังเซลล์จับอยู่กับ β-1,3-glucan-chitin network ด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยจับกับ β-1,6-glucan ซึ่งเป็นส่วนของแขนงก่อน แล้วแมนโน-โปรตีนดังกล่าวอาจจะไปจับกับโปรตีนที่ผนังเซลล์อื่น ๆ ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Jigami และ Odani, 1999 ; Orlean, 1999)



รูปที่ 2.4 ลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์
ที่มา : www.celltech.com

นอกจากนี้ ยังสามารถพบเบต้ากลูแคนในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น แบคทีเรีย รา ธัญพืช (ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เล่ย์) เป็นต้น ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดเบต้ากลูแคนที่ได้จะมีลักษณะโครงสร้างที่แตกต่างกัน (ดังแสดงในตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 ลักษณะโครงสร้างเบต้ากลูแคนของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

ชนิดของเบต้ากลูแคน	โครงสร้าง	ลักษณะ
	แบคทีเรีย	linear β-1,3-glucan (Curdlan)
	รา	short β-1,6-branched, β-1,3-glucan (i.e. Shizophyllan)
	ยีสต์	long β-1,6-branched, β-1,3-glucan (WGP β-glucan, β-fectin™)
	ธัญพืช	linear β-1,3/1,4-glucan (i.e.oats , barley , rye)

 linear β-1,3-glucan

long β-1,6-glucan

 short β-1,6-glucan

 β-1,4-glucan

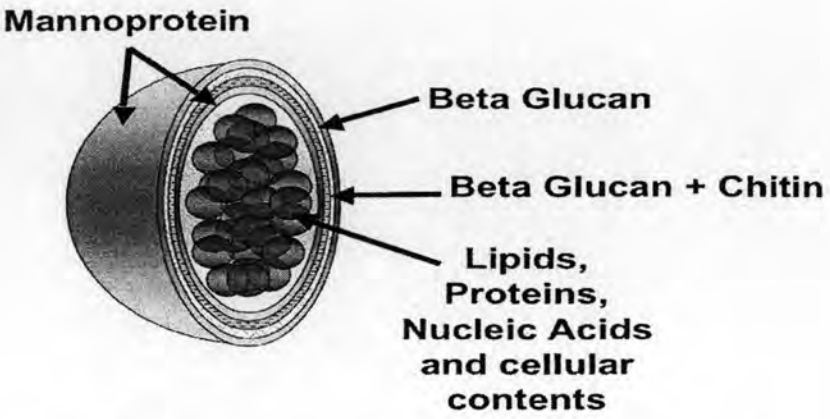
ที่มา : www.product-search.co.uk/labasia.net

องค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์

<u>เบต้า1,3 กลูแคน</u> (β-1,3-glucan)

กลูแคนหรือเบต้ากลูแคน เป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ของยีสต์ เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสมาเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก โดยสูญเสียน้ำ 1 โมเลกุล ต่อการสร้างพันธะไกลโคซิดิก 1 พันธะ ระหว่างน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล เบต้ากลูแคนจะมีทั้งโมเลกุลที่เป็นเส้นตรง (linear beta-glucan) และโมเลกุลที่เป็นกิ่งก้าน (branched beta-glucan) ซึ่งคล้ายกับโมเลกุลของไกลโคเจน หรือโมเลกุลของอะมิโลส และอะมิโลเพคตินที่เป็นส่วนประกอบของเม็ดแป้ง (starch granule) ที่สะสมในส่วนต่าง ๆ ของพืช (Thitipraphunkul และคณะ, 2003) โมเลกุลที่เป็นเส้นตรงมีลักษณะเป็นพอลิเมอร์สายตรงเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,3-glucan (β-1,3 glycosidic) ส่วนโมเลกุลที่เป็นกิ่งก้านจะมีส่วนที่สายหลักเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง ประกอบด้วยน้ำตาลแอนไฮโดรกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,3-glucan ส่วนบริเวณที่เป็นกิ่งจะต่อกันด้วยพันธะ β-1,6-glucan (β-1,6-glucan glycosidic)

(ดังแสดงในรูปที่ 2.6) กลูแคนที่เป็นกิ่งก้านจะรวมเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่เกี่ยวพันกันเป็นร่างแห ที่มีไคตินปนอยู่ด้วย และเป็นส่วนแรกที่อยู่ติดกับเซลล์เมมเบรน (ดังแสดงในรูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 ลักษณะของเบต้ากลูแคนที่พบในส่วนผนังเซลล์
ที่มา : www. sigmaaldrich.com

มีรายงานการวิจัยกล่าวว่าเบต้ากลูแคนจากผนังเซลล์ของยีสต์และรา มีความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ในสิ่งมีชีวิตพวกไม่มีกระดูกสันหลัง (Francisco, Flor และ Gloria,1997) นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็น immunoadjuvant, antitumor และ radioprotective agent ได้ (Sandula และคณะ, 1999)

<u>เบต้า1,6 กลูแคน</u> (β-1,6-glucan)

β-1,6-glucan พบประมาณ 5 % ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ ซึ่งจะพบอยู่รวมกับ β-1,3-glucan ในเซลล์ยีสต์ที่เจริญเต็มที่แล้ว (Kapteyn, Van Den Ende และ Klis,1999) ประกอบด้วยกลูโคส 140 โมเลกุล ลักษณะโครงสร้างเป็นแขนง มีบทบาทในการเชื่อมต่อระหว่าง GPI-dependent cell wall protein กับ β-1,3-glucan network โดยเชื่อมตรงส่วนปลายของ β-1,3-glucan ด้วยพันธะโควาเลนต์ นอกจากนี้ยังมีหน้าที่เป็น acceptor site สำหรับไคติน

<u>ไคติน</u>

ไคตินเป็นองค์ประกอบอยู่ในส่วนผนังชั้นในเซลล์ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ ไคตินจะรวมอยู่กับ β-1,3–glucan พบประมาณ 1-2% ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ (Kapteyn และคณะ,1999) ลักษณะโมเลกุลเป็นเส้นตรงพบกระจายอยู่ทั่วเซลล์ พบมากบริเวณที่มีการแตกหน่อ สารไคตินเป็นพอลิเมอร์ของ N-acetyl-D-glucosamine ที่เชื่อมต่อกันด้วย β-1,4 glycosidic โมเลกุลของ

ไคตินจะเชื่อมต่อตรงส่วนปลายของ β-1,3-glucan ด้วยพันธะโควาเลนต์ (ดังแสดงในรูปที่ 2.6) ทำให้เบต้ากลูแคนมีสมบัติไม่ละลายในเบส (Kollar, Sturdik และ Sajbidor, 1992)

แมนแนน

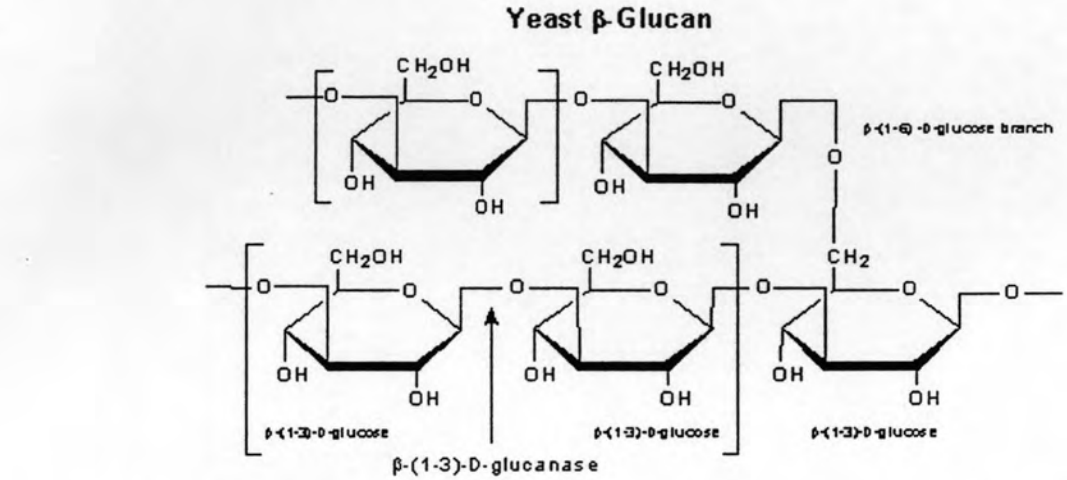
แมนแนน จัดเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลแมนโนส เกิดจากการเรียงตัวต่อกันของน้ำตาลแมนโนสด้วยพันธะไกลโคซิดิก โดยสูญเสียน้ำ 1 โมเลกุล ต่อการสร้างพันธะไกลโคซิดิก 1 พันธะ ระหว่างน้ำตาลแมนโนส 2 โมเลกุล ทั้งนี้โมเลกุลของน้ำตาลแมนโนสในสายโมเลกุลหลักจะเชื่อมต่อกันด้วย α -1,4 glycosidic linkage ของคาร์บอนอะตอมในโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนส ในขณะที่สายรอง (side chain) จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่ง α -1,2 และ 1,3 (α -1,2 และ α -1,3 glycosidic linkage) สายโมเลกุลหลักของแมนแนนจะเชื่อมต่อกับโปรตีนด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่าง N-acetylglucosamine กับแอสพาราจีน (asparagine) แต่สำหรับโมเลกุลแมนแนนสายสั้น ๆ จะเชื่อมต่อกับสายของโปรตีนที่ตำแหน่งของ ซีรีน หรือทรีโอนีน ทั้งนี้ยังพบว่ามีสารกลุ่มฟอสเฟตเชื่อมต่อกับโมเลกุลของแมนแนน โดยผ่านกระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) แมนแนนสามารถพบได้ที่ผิวชั้นบนของผนังเซลล์

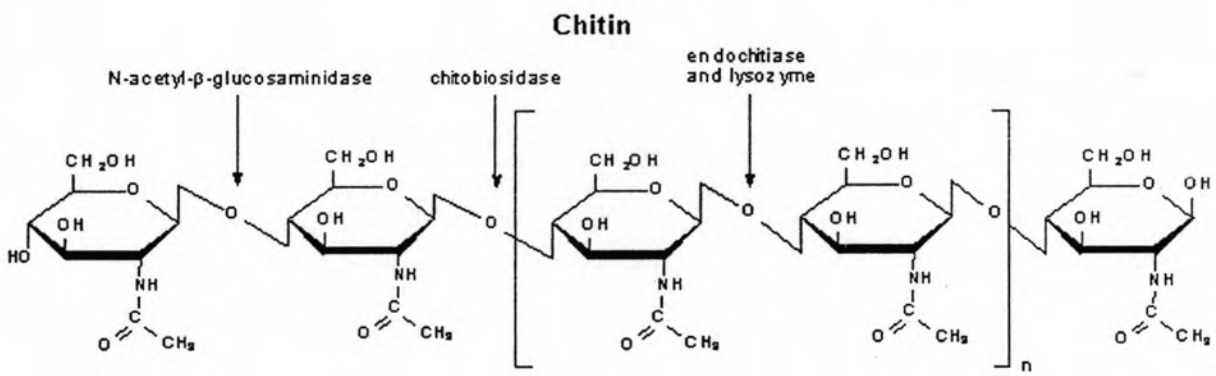
แมนแนนสามารถละลายได้ในสารละลายด่าง เช่น สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2% ที่อุณหภูมิ 100 °C หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 6% ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นต้น นอกจากนี้แมนแนนยังสามารถตกตะกอนในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนของคอปเปอร์ได้

ฟอสเฟต

ฟอสเฟต ที่พบในผนังเซลล์ของยีสต์ มักจะจับอยู่กับแมนแนนและไกลโคโปรตีนด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ที่ตำแหน่ง 1,3 และ 1,6 ทั้งนี้ปริมาณฟอสเฟตที่อยู่ในส่วนของแมนแนนจะขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเป็นหลัก

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 2.6 โครงสร้างของเบต้ากลูแคนและไคตินในเซลล์ยีสต์

ที่มา : www. sigmaaldrich.com

โปรตีน

ผนังเซลล์ของยีสต์มีโปรตีนประมาณร้อยละ 13 ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ โดยมักพบโปรตีนจับกับสารพอลิแซคคาไรด์เป็นสารประกอบเชิงซ้อน ที่เรียกว่า polysaccharide and protein complex เช่น กลูแคนโปรตีน กลูโคแมนแนนโปรตีน เป็นต้น ที่บริเวณส่วนของผนังเซลล์ชั้นนอก โดยสารประกอบโปรตีนที่ผนังเซลล์ส่วนใหญ่จะมีความเป็นกรดสูงเนื่องจากมีกรดอะมิโนหลายชนิด ในส่วนของกลูโคแมนแนนโปรตีน I และกลูโคแมนแนนโปรตีน II ทั้งนี้ปริมาณสารประกอบโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในผนังเซลล์มีอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกัน (ดังแสดงในตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 ชนิดและปริมาณสารประกอบโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในผนังเซลล์ยีสต์

ชนิดของสารประกอบโปรตีน	ปริมาณ (ร้อยละของน้ำหนักแห้งของโปรตีน)
กลูแคนโปรตีน	42.0
กลูโคแมนแนนโปรตีน I	14.0
กลูโคแมนแนนโปรตีน II	35.0

ที่มา : Kapteyn และคณะ (1999)

Cell wall protein (CWPs)/ Mannoprotein

ที่ผนังเซลล์ชั้นนอกเป็นส่วนของ cell wall protein พบประมาณ 30-50% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แมนโนโปรตีนประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตอยู่ประมาณ 90% ซึ่งเป็นส่วนที่มีกิ่งก้านมากมาย โดยมีส่วนของกรดอะมิโนซีรีน และทรีโอนีน ที่เชื่อมต่อกับ short oligomannosyl chain ด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ระหว่าง N- และ O-link oligomannosyl side chain ส่งผลให้ผิวของเซลล์ยีสต์มีประจุลบ (Jigami และ Odani, 1999) มีรายงานว่า ไกลโคโปรตีนที่ผนังเซลล์ของยีสต์ มีความต้านทานต่อการสกัดด้วยสารละลายด่างที่ร้อน นอกจากนี้ยังสามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ β-1,3-glucanase และถูกย่อยได้บางส่วน โดย β-1,6-glucanase แสดงให้เห็นว่า CWPs เชื่อมต่อกับเบต้ากลูแคนด้วยพันธะโควาเลนต์ CWPs ที่มีการค้นพบมี 2 ชนิด คือ

1. GPI (glycosyl phophatidylinositol) - dependent cell wall protein (GPI-CWPs) โมเลกุลของ GPI-CWPs เชื่อมต่ออยู่กับส่วนปลายของ β-1,3-glucan โดยผ่าน β-1,6-glucan ด้วยพันธะโควาเลนต์ นอกจากนี้ยังพบว่าภายในโครงสร้างจะประกอบด้วยกรดอะมิโนซีรีน และทรีโอนีน ที่จัดเรียงตัวซ้ำ ๆ กัน

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. Pir (Protein with internal repeat) protein (Pir-CWPs) เชื่อมต่ออยู่กับส่วนปลายของ β-1,3-glucan ด้วยพันธะ O-linked side chain ซึ่งเป็นพันธะที่ถูกทำลายได้ง่ายด้วยเบสอ่อน

นอกจากนี้ในส่วนของแมนโนโปรตีนยังมีสมบัติที่สามารถจับกับแบคทีเรีย ที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ เช่น *E. coli* และ *Salmonella spp.* ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในสัตว์ โดยแมนโนโปรตีนจะทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโต และไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ (สำนักนวัตกรรมแห่งชาติ, 2549)

ไกลโคเจน

ยีสต์มีการสะสมคาร์โบไฮเดรตอยู่ภายในเซลล์ เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและสารตั้งต้นในกระบวนการต่าง ๆ เช่น การสร้างสปอร์ การงอก และการแตกหน่อ ซึ่งคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่สะสมอยู่ในรูปไกลโคเจนและทรีฮาโลส โครงสร้างของไกลโคเจนมีลักษณะเป็นแขนงพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมกันด้วยพันธะ β-1,4/1,6-glycoside ซึ่งถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ amyloglucosidase (Schulze, Larsen และ Villadsen, 1995) โดยเอนไซม์สามารถละลายไกลโคเจนได้ 97% ของปริมาณไกลโคเจนทั้งหมด (Manners และ Massos, 1973; Keppler และ Decker,1984) การวิเคราะห์ปริมาณไกลโคเจนต้องทำให้เซลล์แตกก่อนโดยวิธีทางเคมีหรือทางกล เนื่องจากไกลโคเจนไม่สามารถละลายออกมาจากเซลล์ได้ วิธีการทางเคมีทำได้โดยนำเซลล์ยีสต์ต้มสกัดด้วยสารละลายเบส จากนั้นบ่มด้วยเอนไซม์ amyloglucosidase เพื่อเปลี่ยนไกลโคเจนให้อยู่ในรูปของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นเทียบได้เป็นปริมาณไกลโคเจนทั้งหมดที่อยู่ในเซลล์ เอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อ β-1,4/1,6- glycoside bond ของไกลโคเจน

2.2.2.2 เซลล์เมมเบรน (Cell Membrane)

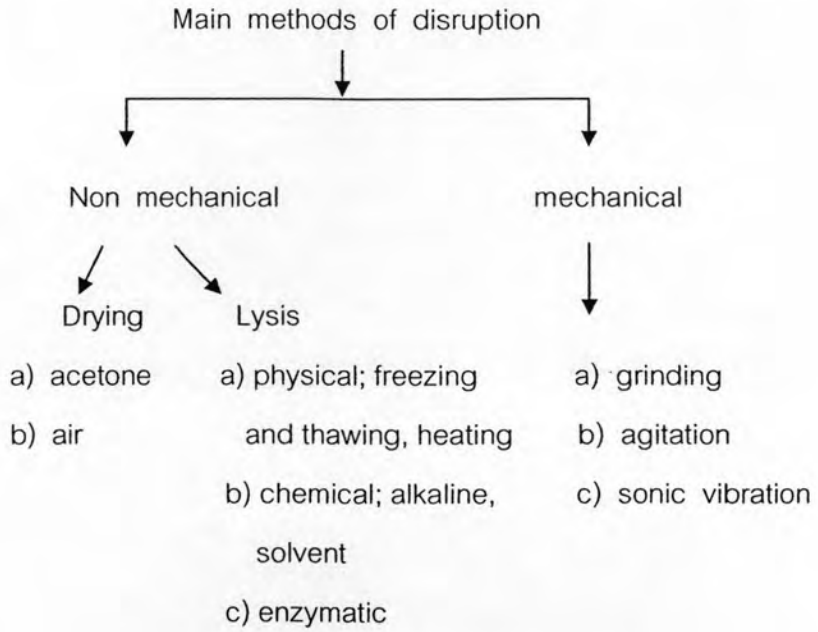
เซลล์เมมเบรนของยีสต์เรียกอีกอย่างว่า พลาสมาเลมมา (plasmalemma) หรือ พลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) หรือ ไซโตพลาสมิกเมมเบรน (cytoplasmic membrane) เซลล์เมมเบรนเป็นส่วนที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ยีสต์โดยอยู่ถัดจากผนังเซลล์ชั้นนอกเข้ามา มีหน้าที่หลักคือ ช่วยในการรักษาสมดุลของเซลล์ยีสต์ และยังทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน (semi-permeable membrane) รวมทั้งป้องกันผิวหน้าของเซลล์

โครงสร้างของเซลล์เมมเบรนของยีสต์มีลักษณะเป็น double track structure เนื่องจากโครงสร้างมีลักษณะเป็นส่วนที่หนาทึบขนาบอยู่ทั้งด้านบนและด้านล่าง และมีส่วนโปร่งใสอยู่ตรงกลางเมมเบรน เซลล์เมมเบรนประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ ฟอสโฟลิปิด โปรตีน

และพอลิแซคคาไรด์ ทั้งนี้โมเลกุลของฟอสโฟลิปิดประกอบด้วย กลุ่มมีขั้ว และกลุ่มไม่มีขั้ว ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของเมมเบรน โดยที่มีการจัดเรียงตัวในลักษณะเป็น double layer คือ เป็นชั้นของฟอสโฟไลปิด 2 ชั้นเรียงตัวขนานกัน โดยส่วนที่ไม่มีขั้วมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะหันเข้าหากันและส่วนมีขั้วมีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) จะหันเข้าหาสิ่งแวดล้อมภายในและภายนอกเซลล์

2.3 การสกัดเบต้ากลูแคน

ในการสกัดเบต้ากลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์นั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น alkali-acid hydrolysis, enzyme digestion และ ultrasound (Sandula และคณะ, 1999) เบต้ากลูแคนที่ได้จากการสกัดแต่ละวิธีจะมีความบริสุทธิ์แตกต่างกัน โดยมีปริมาณสารที่เป็น intracellular molecule ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณแตกต่างกัน ในขั้นแรกของการสกัดต้องมีการทำให้เซลล์แตกและแยกส่วนของผนังเซลล์ออกมา วิธีการทำให้เซลล์แตกมีอยู่หลายวิธี (ดังแสดงในรูปที่ 2.7) ดังนี้



รูปที่ 2.7 แผนภาพแสดงการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการต่าง ๆ

2.3.1 วิธีการทำให้เซลล์แตก

2.3.1.1 โดยวิธีทางกายภาพหรือทางกล

วิธีนี้อาศัยหลักการในการทำให้เซลล์แตกและเก็บเกี่ยวผลผลิตที่อยู่ภายในเซลล์ แล้วจึงนำผลผลิตที่ต้องการมาสกัดต่อในภายหลัง ผนังเซลล์ของยีสต์มีความแข็งแรง จึงต้องใช้วิธีทางกลหรือใช้สารเคมีเพื่อทำให้เซลล์แตก อย่างไรก็ตามควรเลือกใช้วิธีที่ป้องกันการทำให้สารที่ต้องการเสียสภาพไปและถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ภายในเซลล์

ในการสกัดแยกผนังเซลล์ อาจใช้วิธีในการทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตกด้วยวิธีทางกล โดยใช้เครื่องโฮโมจีไนซ์หรือลูกแก้ว (glass beads, ball mill) เครื่องโฮโมจีไนซ์ที่ใช้มีความดันสูงถึง 20,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทั้งชนิด French Press, Eaton Press และ Gualin Homogenizer โดย Gualin Homogenizer จะออกแบบให้มีขนาดและใช้ปริมาตรของเหลวในปริมาณน้อย ๆ ได้จำนวนครั้งที่ผ่านเครื่องสามารถปรับได้ตามความต้องการที่จะทำให้เซลล์แตก ตัวเครื่องประกอบด้วยปั๊มผลักดันแทนที่ (positive displacement pump) เป็นส่วนดันให้ของเหลวข้นของยีสต์ผ่านช่องเล็ก ๆ เกิดแรงเฉือนทำให้เซลล์แตกหรือฉีกขาด สารต่าง ๆ ภายในเซลล์จะถูกปลดปล่อยออกมา ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นส่วนผสมของโปรตีน กรดนิวคลีอิก และชิ้นส่วนของผนังเซลล์ (Jazwinski,1990) การทำลายเซลล์โดยวิธีนี้ มีข้อเสียเนื่องจากเซลล์ถูกทำลายค่อนข้างสมบูรณ์ ทำให้การแยกชิ้นส่วนของเซลล์ออกจากของเหลวทำได้ยาก กรดนิวคลีอิกที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะมีผลทำให้ความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้น รวมทั้งชิ้นส่วนของผนังเซลล์ที่อยู่ในสารละลาย มีผลต่อการทำให้ใสในส่วนของสารสกัดยีสต์ (Asenjo และ Andrews, 1990)

1. เทคนิคที่ใช้ Homogenizer

เทคนิคนี้นิยมใช้ในอุตสาหกรรมนม ต่อมามีการนำไปประยุกต์เพื่อทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตก โดยมีวิธีการคือ ผ่าน cell suspension เข้าไปในเครื่อง homogenizer แล้วเพิ่มแรงดันเพื่ออัดให้ cell suspension ไหลผ่านช่องทางแคบ ๆ ระหว่างวาล์วและวงแหวนประกับ เมื่อ cell suspension ถึงปลายทางออกทำให้แรงดันลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งส่งผลทำให้ผนังเซลล์ฉีกขาดได้ หรือเรียกว่า เกิดจากแรงเฉือน (liquid shear) ซึ่งประสิทธิภาพในการทำให้เซลล์แตกขึ้นอยู่กับความแตกต่างของแรงดันที่ใช้ จากงานวิจัยของ Hunter และ Asenjo, (1988) ได้ศึกษาการใช้ homogenizer โดยใช้ cell suspension ที่มีเซลล์ยีสต์ 60% ที่แรงดัน 550 kg/cm^3 ผลคือสามารถทำให้เซลล์ยีสต์แตกได้ 90% และนอกจากนี้ยังทดลองใช้กับเชื้อชนิดอื่น เช่น แบคทีเรีย รา เป็นต้น เพื่อสกัดเอนไซม์ภายในเซลล์แต่มีความจำเป็นต้องทำ cell suspension ที่อุณหภูมิ 0-4 ^{0}C ก่อนผ่านเข้าเครื่อง homogenizer เพื่อลดการสูญเสียความสามารถของเอนไซม์จากความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการ

2. เทคนิค French Press

เป็นเทคนิคสำหรับการทำให้เซลล์หรือผนังเซลล์แตก เช่น chloroplast material เซลล์เม็ดเลือด เซลล์จุลินทรีย์ เซลล์เนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ รวมทั้ง biological particles เป็นต้น หลักการทำให้เซลล์หรือผนังเซลล์แตกด้วยเทคนิค French Press เกิดจากการเพิ่มแรงดันภายหลังบรรจุ cell suspension ลงใน motor-driven piston ทำให้แรงดันภายใน motor-driven piston สูงขึ้นตามระดับที่ต้องการ (ดังแสดงในตารางที่ 2.5) หลังจากนั้น cell suspension จะถูกปล่อยออกทางช่องแคบ ๆ เรียกว่า sample outlet tube ด้วยอัตราเร็วประมาณ 1 ml/min ขณะที่ cell suspension ถูกฉีดออกจาก motor-driven piston แรงดันภายในจะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้เซลล์หรือผนังเซลล์ฉีกขาด เรียกว่า เกิดแรงเฉือน ผลที่เกิดขึ้น โมเลกุลของสารต่าง ๆ จะถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ จากนั้นจึงทำการแยกเก็บผนังเซลล์โดยวิธีการปั่นเหวี่ยงแยก intracellular molecular จากงานวิจัยของ ซอราฮูดีน มามะและคณะ (2546) ศึกษาการผลิตกลูแคนด้วยวิธีการสกัดด้วยเบสและกรดร่วมกับการใช้เทคนิค French Press โดยมุ่งที่จะลดการปนเปื้อนไกลโคเจนลง และหลีกเลี่ยงการใช้ภาวะที่รุนแรงในการสกัดด้วยการใช้เทคนิค French Press เข้ามาช่วยในขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก พบว่าเบต้ากลูแคนที่เตรียมโดยเทคนิคดังกล่าวที่แรงดัน 30 kpsi จำนวน 1 รอบ และปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 4000xg สกัดต่อด้วย 1.0 N NaOH และสกัดด้วย 1.0 N acetic acid เบต้ากลูแคนที่ได้มีไกลโคเจนอยู่ 4.69% (w/w)

ตารางที่ 2.5 แรงดันที่เหมาะสมกับเซลล์ตัวอย่างสำหรับการใช้เทคนิค French Press

ชนิดเซลล์ตัวอย่าง	แรงดันที่เหมาะสม
ยีสต์	20 kpsi
แบคทีเรีย	20 kpsi
เซลลูโลส	40 kpsi

ที่มา : Schulze และคณะ (1995)

2.3.1.2 **โดยวิธีใช้เอนไซม์**

เอนไซม์หลายชนิดสามารถย่อยผนังเซลล์จุลินทรีย์และทำให้เซลล์แตกได้ เช่น ไลโซโซม์ เอนไซม์จากหอยทาก เอนไซม์จากเม็ดเลือดขาว เป็นต้น และเอนไซม์ที่สกัดได้จากจุลินทรีย์ เช่น *Streptomyces spp., Micromonospora spp.* และ *Trichoderma spp.* เป็นต้น แม้ว่าการใช้เอนไซม์เพื่อการทำให้เซลล์แตกจะได้สารสกัดที่มีความบริสุทธิ์สูง แต่ต้นทุนในการผลิตก็สูงตามไปด้วย ดังนั้นจึงไม่นิยมนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม

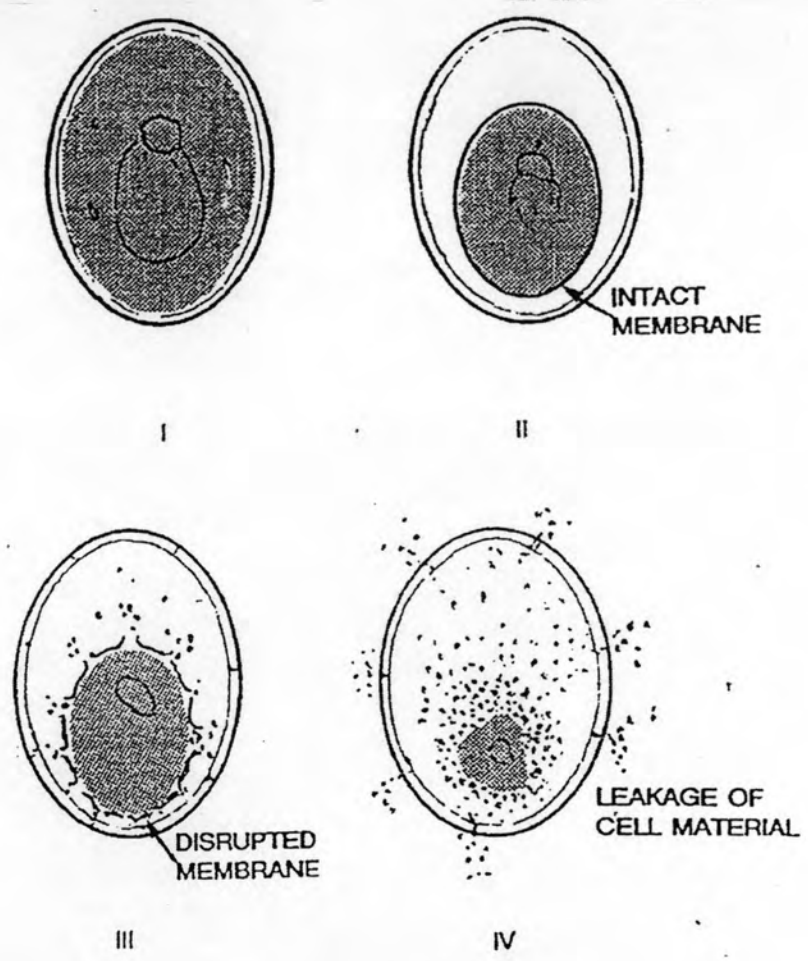
2.3.1.3 **โดยวิธีทางเคมี**

การใช้สารเคมีบางชนิดย่อยสลายยีสต์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการใหญ่ ๆ คือ

1. พลาสโมไลซิส (plasmolysis) เป็นวิธีที่ง่ายสำหรับการทำลายเซลล์ยีสต์ โดยการใช้สารพลาสโมไลส์ (plasmolysing agent) ส่วนมากจะเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว เช่น โทลูอีน คลอโรฟอร์ม ไอโซโพรพานอล และอะซีเตทเอสเทอร์ เป็นต้น หรือใช้สารละลายอินทรีย์จำพวกน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง ๆ โดยไม่มีการทำงานของเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง สารที่นิยมใช้คือ โซเดียมคลอไรด์ (Kelly, 1983) โดยเมื่อเซลล์ยีสต์อยู่ภายใต้สภาพความเข้มข้นสูง ๆ ของสารดังกล่าว จะมีผลต่อแรงดันออสโมติก ของเซลล์ยีสต์ทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลน้ำในเซลล์ ในภาวะนี้ พลาสมาเมมเบรนของยีสต์ จะหดตัวลง เกิดความเสียหายและเกิดการรั่วไหลขององค์ประกอบภายในเซลล์ออกมา (ดังแสดงในรูปที่ 2.8) ยีสต์จะตายและเป็นจุดเริ่มต้นของการสลายตัวเองของยีสต์ (Reed และ Nagodawithana, 1991) ทำให้สามารถแยกผนังเซลล์ได้

พลาสโมไลซิส เป็นวิธีที่ง่ายและเร็ว ภาวะที่ใช้อาจใช้เวลา 5-8 ชม. อุณหภูมิ 50-60 ^{0}C ในการทำนิยมใช้โซเดียมคลอไรด์ เป็นสารพลาสโมไลส์ เพราะนอกจากจะทำให้เซลล์แตกแล้วยังช่วยควบคุมการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้ด้วย วิธีทำโดยนำสารแขวนลอยของยีสต์ ที่มีปริมาณของแข็งประมาณ 15-18% (w/w) มาทำการพลาสโมไลซิสด้วยเกลือ แล้วเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเป็น 50-55 ^{0}C ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งได้ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนตามต้องการ หลังจากนั้นพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 80-90 ^{0}C ทำให้เย็นแล้วกรองเก็บแยกส่วนของผนังเซลล์ (Reed และ Peppler, 1973)

2. ไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เป็นการย่อยสลายเซลล์ยีสต์ โดยวิธีการใช้กรดเกลือเข้มข้นร่วมกับความร้อน เพื่อใช้ในการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ภายในเซลล์ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดนิวคลีอิก เป็นต้น ให้อยู่ในรูปสารโมเลกุลเล็กละลายน้ำได้ดีขึ้น วิธีนี้สามารถใช้ได้กับยีสต์ที่ไม่มีชีวิตหรือยีสต์แห้งและใช้เวลาสั้น (ประมาณ 6-8 ชั่วโมง) ทำการควบคุมภาวะให้มีความเหมาะสม โดยควบคุมอุณหภูมิให้สูงหรืออาจใช้ความดันเข้ามาเกี่ยวข้องในสภาวะกรด วิธีการผลิตเริ่มจาก เตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของยีสต์ในรูปของแข็ง 65-85% (w/w) เติมกรดเกลือเข้มข้น แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 ^{0}C ปล่อยให้เกิดการไฮโดรไลซิสจนได้ปริมาณกรดอะมิโนตามต้องการ หรือเวลาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดเกลือ ซึ่งโดยปกติจะย่อยสลายจนกระทั่ง 2 ใน 3 ของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดถูกเปลี่ยนเป็นแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน หลังจากนั้นปรับสภาพให้เป็นกลางที่ pH 5.0-6.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโซเดียมคาร์บอเนต แล้วจึงกรองแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า ยีสต์ไฮโดรไลเสต ซึ่งประกอบด้วยเกลือ 40% ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 13% และปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน 8% (โดยน้ำหนัก) ส่วนผลพลอยได้ที่เหลือคือ ส่วนของผนังเซลล์ (Reed และ Nagodawithana, 1991)



รูปที่ 2.8 การพลาสโมไลซิสเซลล์ยีสต์

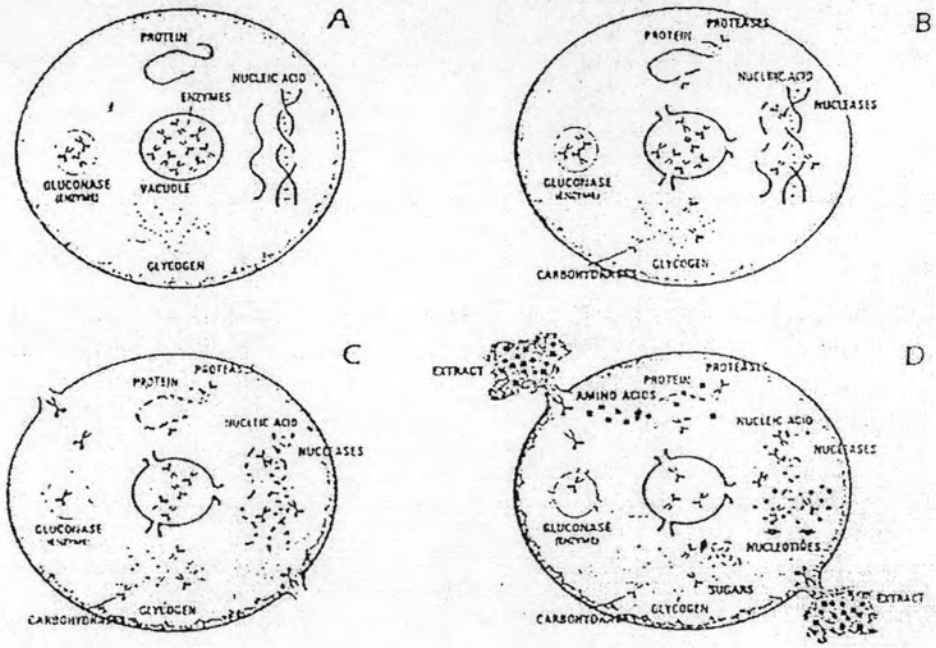
ที่มา : Nagodawithana (1994,a)

2.3.1.4 **โดยเอนไซม์ภายในเซลล์** (Yeast Autolysis)

การย่อยสลายตัวเองของยีสต์ (self digestion หรือ autolysis) สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ แต่สามารถกระตุ้นให้เกิดเร็วขึ้นได้โดยควบคุมภาวะต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง เวลา และความเข้มข้นให้เหมาะสม ซึ่งภายใต้ภาวะที่เหมาะสมแก่การย่อยสลายตัวเองของยีสต์ ระบบเอนไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมเมตาบอลิซึมปกติของยีสต์ จะทำงานผิดไป ส่งผลให้เซลล์ยีสต์เริ่มตายและเกิดการย่อยสลายตัวเองของเซลล์อย่างช้า ๆ พร้อมทั้งปล่อยเอนไซม์ภายในแวคิวโอล (vacuole) ออกมาทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก เป็นต้น ไปเป็นสารโมเลกุลเล็กที่สามารถละลายได้ ผนังเซลล์จะสูญเสียสภาพที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน และปล่อยให้สารประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ออกมาภายนอกเซลล์ได้ (Reed และ Nagodawithana, 1991) การย่อยสลายตัวเองของยีสต์ เริ่มจากการทำงานของเอนไซม์ β(1-3) glucanase และ protease โดยมี β(1-6) glucanase และ mannanase ร่วมในการย่อยผนังเซลล์ด้วย ซึ่งในภาวะปกติ glucanase และ mannanase เป็นเอนไซม์ที่ยีสต์ใช้ย่อยผนังเซลล์ในกระบวนการแตกหน่อส่วนเอนไซม์ protease มีหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนที่เซลล์ไม่ต้องการเป็นกรดอะมิโนเพื่อใช้สังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ต่อไป (ดังแสดงในรูปที่ 2.9) เอนไซม์นิวคลีเอสภายในเซลล์จะทำการย่อยสลายอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอให้เป็นสารโพลีนิวคลีโอไทด์ โมโนนิวคลีโอไทด์ และนิวคลีโอไทด์ ละลายน้ำออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (Hough และ Maddox, 1970; Reed และ Nagodawithana,1991) กลไกของเอนไซม์ภายในเซลล์ยีสต์เริ่มจาก ขั้นแรก เนื้อเยื่อแมนโนโปรตีนด้านนอกถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรติเอส และปลดปล่อยโปรตีนออกมาก่อน (Asenjo และ Andrews,1990) ขั้นที่สองเอนไซม์กลุ่มกลูคาเนส จับกับสายโซ่ของเบต้ากลูแคนที่ด้านในผนังเซลล์ ทำการย่อยกลูแคนให้มีขนาดเล็กลง และละลายได้ เมื่อโปรติเอสกับกลูคาเนสทำงานร่วมกันเท่ากับเป็นการเปิดเอาผนังเซลล์ออกเหลือเฉพาะส่วนของพลาสมาเมมเบรน ขั้นที่สามพลาสมาเมมเบรน จะแตกและปลดปล่อยองค์ประกอบภายในเซลล์ออกมาซึ่งจะถูกย่อยในขั้นตอนที่สี่ขณะเดียวกันชิ้นส่วนของผนังเซลล์ คาร์โบไฮเดรทส่วนที่ละลายจากผนังเซลล์ถูกย่อยต่อไปโดยกลูคาเนส และไคติเนส เป็นขั้นตอนที่ห้า โปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์และขั้นตอนหกถึงแปด โปรตีนจะถูกย่อยซ้ำอีกครั้งโดยโปรติเอส (protease) ได้โปรตีนที่มีขนาดเล็กและละลายน้ำได้ (Hunter และ Asenjo, 1988) (ดังแสดงในรูปที่ 2.10)

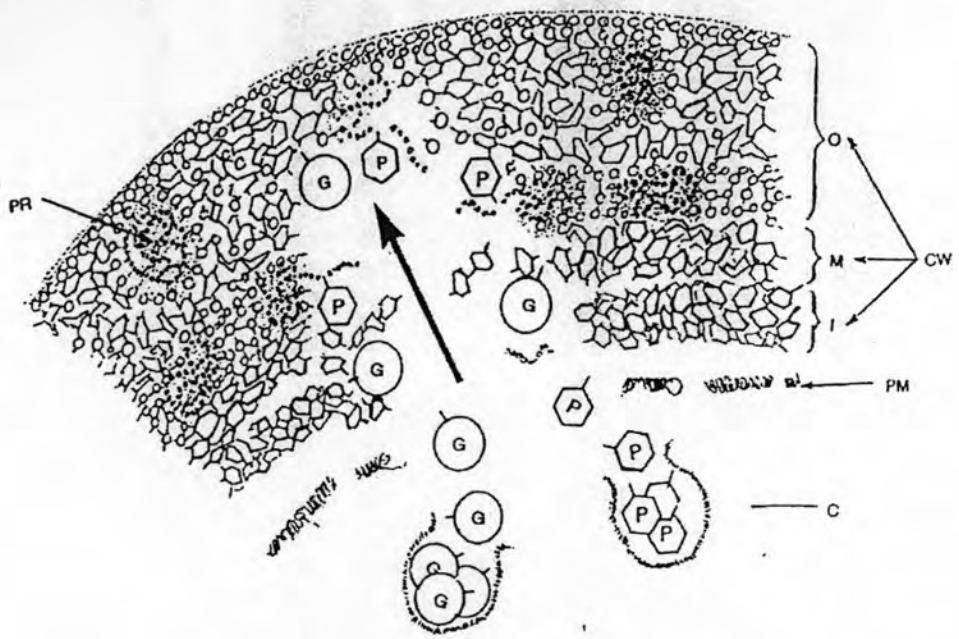
วิธีการทำให้ยีสต์มีการย่อยสลายตัวเอง มีดังนี้ นำสารแขวนลอยยีสต์ซึ่งมีชีวิตที่มีปริมาณของแข็ง 15% (w/w) ปรับ pH ประมาณ 5.5 แล้วให้ความร้อนที่ 45-50 ^{0}C เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง (Reed และ Nagodawithna, 1991) หรือจนกระทั่งปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดถูกเปลี่ยนไปเป็นแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนประมาณ 50% หรือใช้อุณหภูมิ 55 ^{0}C ปรับ pH ประมาณ 5.5 ย่อยสลายเป็นเวลา 20 ชั่วโมง (Kelly, 1983) จากนั้นพาสเจอร์ไรส์เซลล์ยีสต์เพื่อหยุดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่

อุณหภูมิ 80-90 °C และทำให้เย็นลง แยกผนังเซลล์โดยการกรองหรือเหวี่ยงแยก ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านการแยกเอาผนังเซลล์ออก เรียกว่า ออโตไลส์ยีสต์ (autolyzed yeast) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผนังเซลล์ประมาณ 50% ของปริมาณของแข็งทั้งหมด ส่วนผลิตภัณฑ์ที่แยกผนังเซลล์ออกแล้ว เรียกว่า ยีสต์ออโตไลเสต (yeast autolysate) (Peppler, 1970) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยส่วนประกอบภายในเซลล์ ได้แก่ กรดอะมิโน โปรตีน นิวคลีโอไทด์ โพลีเปปไทด์ ไกลโคเจน น้ำตาล วิตามินบี ทรีฮาโลส และสารให้กลิ่นรส และจากการศึกษาชนิดของเอนไซม์ protease ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์พบว่ามีเอนไซม์ protease ที่เกี่ยวข้องมากกว่า 40 ชนิด แต่มีเพียง 4 ชนิด ที่เป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการดังกล่าว (ดังแสดงในตารางที่ 2.6) คือ Proteinase ysc A, Proteinase ysc B, Carboxypeptidase ysc Y และ Carboxypeptidase ysc S ซึ่งเป็นพวกไกลโคโปรตีน มีกลูโคส และแมนโนส เป็นองค์ประกอบในอัตราส่วนแตกต่างกัน (Reed และ Nagodawithana, 1991) โดยมี Proteinase ysc A อยู่ในปริมาณมากที่สุดและทำหน้าที่ย่อยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,000 ดาลตัน ที่ได้จากการย่อยโปรตีนโมเลกุลใหญ่ของเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ เป็นกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ ภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดจะแตกต่างกันออกไปในยีสต์ต่างสายพันธุ์กัน หรือแม้กระทั่งยีสต์สายพันธุ์เดียวกันแต่ภาวะในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน (Hough และ Maddox, 1970)



รูปที่ 2.9 ลักษณะของเซลล์ยีสต์เมื่อเกิดการออโตไลซิสในช่วงต่าง ๆ

ที่มา : Nagodawithana (1995)



รูปที่ 2.10 ลักษณะของการย่อยสลายผนังเซลล์ยีสต์ เมื่อ C= cytoplasm, CW = cell wall, I = inner alkaline insoluble glucan, M = middle alkaline soluble glucan layer, O = outer glycoprotein layer, P = protease, G = glucanase, PM = plasma membrane และ PR = protein

ที่มา : Reed และ Nagodawithana (1991)

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.6 สมบัติของเอนไซม์ Proteinase ภายในเซลล์ยีสต์

	Proteinase ysc A	Proteinase ysc B	Carboxypeptidase ysc Y	Carboxypeptidase ysc S
Type	Acid endopeptidase	Serine endopeptidase	Serine exopeptidase	Metalla exopeptidase(Zn^{2+})
Optimum pH	2-6	6-7	4-7	7
Optimum T(°C)*	35-40	45-55	45-55	60
Cell location	Vacuole	Vacuole	Vacuole	Vacuole
Solubility	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Molecular weight	60,000	32,000-44,000	61,000	Not determined
Isoelectric pt.	3.8	5-8	3.6	-
Inhibitors	Protein I^{a}_{3} Pepstatin, etc.	Protein I^{13}_{2} Chymostatin, etc.	Protein I^{e} Hg^{2+}	EDTA
Cellular role	Protein degradation	Protein degradation	Protein degradation	Protein degradation

ที่มา : Reed และ Nagodawithana (1991)

* Hough และ Maddox (1970)

แต่อย่างไรก็ตามการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ เนื่องจากเอนไซม์ภายในเซลล์ของยีสต์เอง ต้องใช้เวลานาน มีงานวิจัยที่ศึกษาการเร่งการย่อยสลายนี้ด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การใช้แรงกล ได้แก่ high pressure homogenization และการบดด้วย colloid mill (Maltz,1981) การใช้สารเคมีที่มีสมบัติ plasmolyzing agents (Peppler,1970 ; Reed และ Nagodawithana,1991) หรือเอนไซม์ (Knorr และคณะ, 1979 ; Chao, McCarthy และ McConaphy, 1980) และการใช้วิธีอื่น ๆ ได้แก่ sonic disintegration, repeated freeze-thaw cycle (Maltz, 1981) และ thermal shock (Cardini และ Zotti, 1976)

2.3.2 การตรวจวิเคราะห์การแตกของเซลล์

การวิเคราะห์การแตกของเซลล์ยีสต์สามารถทำได้หลายวิธีทั้งวิธีทางตรงและทางอ้อม วิธีทางตรง คือ การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทรัสต์ (Phase contrast microscope) ซึ่งเป็นกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดพิเศษที่มีการควบคุมการส่องสว่างของตัวเอง สามารถใช้ศึกษาลักษณะของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ ลักษณะของกล้องประกอบด้วยเลนส์สองชนิดคือ เลนส์ใกล้วัตถุและเลนส์ที่ condenser ซึ่งจะช่วยควบคุมการเรืองแสงของตัวอย่างที่ศึกษา ซึ่งเป็นเลนส์ชนิดพิเศษมาประกอบเข้ากับกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา หลักการของกล้องนี้คือ ควบคุมแสงให้ผ่านเข้าตัวกล้องให้มีความสว่างที่ต้องการ การบังคับแสงในกล้องใช้วิธีเบนแสงให้เปลี่ยนทิศทางในขณะที่แสงผ่านจากวัตถุหนึ่งไปยังอีกวัตถุหนึ่งที่มีความหนาแน่นต่างกัน เป็นผลให้แต่ละส่วนของตัวอย่างที่นำมาศึกษามีความสว่างแตกต่างกันไป ทำให้สามารถมองเห็นวัตถุซึ่งมีความแตกต่างในการเบี่ยงเบนแสงเพียงเล็กน้อยได้โดยไม่จำเป็นต้องย้อมสี เช่น โครงสร้างภายในเซลล์ที่มีดัชนีหักเหแสงใกล้เคียงกันมาก จะไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดา แต่สามารถมองเห็นได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบนี้ โดยเฉพาะการตรวจหาสปอร์ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (ธวิช อินทรพันธุ์, 2548) ในการตรวจวิเคราะห์การแตกของเซลล์จะใช้กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์ที่แตก (cell disruption) มีสีเข้มมืดทึบ (dark) ส่วนเซลล์ปกติ (whole cell) จะสว่าง (bright) อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้คือ การย้อมสีแบบ Gram stain ซึ่งเซลล์ที่แตก จะติดสีชมพูจากสีของ fuchcin ส่วนเซลล์ปกติ จะติดสีน้ำเงิน (Gatesoupe, 1999)

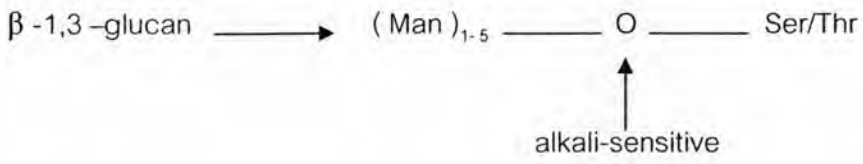
นอกจากนี้ มีการวิเคราะห์การแตกของเซลล์โดยการวัดปริมาณ glucose-6-phosphate dehydrogenase (Gatesoupe, 1999) ซึ่งเป็นวิธีที่เร็วกว่าวิธี viability counts และทราบผลได้ภายใน 10 นาที แต่วิธีนี้ผลที่ได้มีความคลาดเคลื่อนสูง และการวัดการแตกของเซลล์โดยการวัดปริมาณโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมา ซึ่งเป็นวิธีที่ได้ผลน่าเชื่อถือ หลักการคือวัดปริมาณโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากทำให้เซลล์แตกโดยใช้เทคนิค colorimetric method ใช้ folin reagent (Lowry assay) เพื่อทำให้เกิดสี ผลที่ได้จะเกิดสีฟ้าเมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับคอปเปอร์ในสารละลายด่าง (alkaline solution)

2.3.3 วิธีการสกัดกลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์

ในการสกัดเบต้ากลูแคนสามารถทำได้หลายวิธี ทำให้ได้เบต้ากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกัน การนำเบต้ากลูแคนไปใช้ในด้านต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ การเลือกวิธีการสกัดควรต้องคำนึงถึงต้นทุน เช่น การสกัดด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ จะให้เบต้ากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์สูงและมีต้นทุนในการผลิตสูง ไม่สามารถนำไปใช้ได้ทั้งในด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมบางประเภท เพราะต้องใช้สารสกัดในปริมาณมาก (Otero และคณะ, 1996)

2.3.3.1 **การสกัดเบต้ากลูแคนโดยวิธี** alkali-acid hydrolysis

เป็นวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมที่นิยมใช้ และมีการนำไปใช้ประโยชน์เชิงการค้ามากที่สุด เพราะเป็นวิธีที่ใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำและวิธีการไม่ซับซ้อน แต่เบต้ากลูแคนที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำ เนื่องจากเบต้ากลูแคนอยู่บริเวณชั้นในของผนังเซลล์รวมอยู่กับไกลโคโปรตีน และเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ ส่วนของไกลโคโปรตีนหรือ cell wall protein (CWRs) ถูกแบ่งเป็น 2 ชนิด ตามคุณสมบัติการสกัดด้วย hot detergent (Kapteyn และคณะ, 1999) คือ GPI-CWPs ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่สามารถถูกสกัดออกจากผนังเซลล์ด้วย hot detergent สำหรับชนิดที่สองคือ Pir-CWPs สามารถสกัดออกจากผนังเซลล์ได้ด้วย hot detergent มีรายงานว่าการใช้สารละลายเบสอ่อนโดยเบสจะทำลายพันธะระหว่างไกลโคโปรตีนกับ 1,3-glucan ตรงตำแหน่งของพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (ดังแสดงในรูปที่ 2.11)



รูปที่ 2.11 ตำแหน่งของเบสจะทำลายพันธะระหว่างไกลโคโปรตีนกับ β-1,3-glucan
ที่มา : Dallies, Francois และ Paquet (1998)

ในการสกัดด้วยกรดและด่าง เมื่อนำเซลล์ยีสต์มาสกัดด้วย 1 N NaOH ที่อุณหภูมิ 70 ^{0}C เวลา 1 ชั่วโมง สารละลายด่างจะสกัดโปรตีน แมนแนน กลูแคนที่ละลายในด่าง กรดนิวคลีอิก และลิพิดที่มีขั้วออก หลังจากแยกกลูแคนที่ละลายในด่างออกแล้ว จะเหลือกลูแคนที่ไม่ละลายในด่าง ซึ่งประกอบด้วย β-1,3-glucan, β-1,6-glucan, glycoprotein และไกลโคเจน และนำมาสกัดต่อด้วย 1 N acetic acid ที่อุณหภูมิ 90 ^{0}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สารละลายกรดจะไปทำลายพันธะโควาเลนต์ระหว่าง β-1,3-glucan กับ β-1,6-glucan-glycoprotein ที่ยังเหลืออยู่ เบต้ากลูแคนบางส่วนสูญเสียไปโดยเฉพาะในส่วนของแขนง reducing end สำหรับไกลโคเจนโมเลกุลจะมีขนาดเล็กลงจึงสามารถละลายออกมาเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้ ไคติน ไคโตซาน และโปรตีนถูกสกัดออกมาด้วย สารสกัดเบต้ากลูแคนที่ได้มีความบริสุทธิ์ประมาณ 50% (w/w) และยังพบไกลโคเจน ไคติน และโปรตีนปนเปื้อนอยู่ในปริมาณสูง ในการสกัดด้วยวิธีนี้ไม่สามารถสกัดเอาไกลโคเจนที่อยู่ภายในเซลล์ทั้งหมดออกมาได้ ส่วนไกลโคเจนที่สามารถสกัดได้มีโครงสร้างขนาดเล็ก แต่สำหรับไกลโคเจนที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่ยังคงอยู่ภายในผนังเซลล์ (Synowiecki และ Nadia Ali, 2003)

จากงานวิจัยของ Thammakiti และคณะ (2002) ศึกษาการสกัดเบต้ากลูแคนจากยีสต์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการหมักเบียร์ พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยกรดและด่างเพียงอย่างเดียว มีความบริสุทธิ์ประมาณ 55% (w/w) (dry basis) และมีปริมาณผลผลิตเท่ากับ 8.4% (w/w) ของเซลล์ยีสต์หรือประมาณ 13% (w/w) ของผนังเซลล์ยีสต์ แต่หากใช้วิธีทางกายภาพหรือเคมีอื่นร่วมด้วย เช่น ถ้ามีการโฮโมจีไนซ์เซลล์ก่อนการสกัด การใช้การสั่นสะเทือน (ultrasonic) หรือใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นต้น ก็จะช่วยเพิ่มผลผลิตและความบริสุทธิ์ของสารสกัดเบต้ากลูแคนได้ และจากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น ได้มีการเพิ่มขั้นตอนการโฮโมจีไนซ์เซลล์ก่อนการสกัดด้วยด่างและกรด พบว่า สารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มจาก 55 เป็น 59 % (w/w) (dry basis) และปริมาณผลผลิตเท่าเดิม คือ เท่ากับ 8.4% ของเซลล์ยีสต์หรือ 13% ของผนังเซลล์ยีสต์ เมื่อเทียบกับสารสกัดที่สกัดด้วยด่างและกรดเพียงอย่างเดียว

2.3.3.2 **การสกัดด้วยด่างและกรดร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย**

ในปี ค.ศ. 1991 Jamas, Rha และ Sinskey ได้ศึกษาการสกัดเบต้ากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้การสกัดด้วยด่างและกรดร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า สารสกัดเบต้ากลูแคนที่สกัดด้วยวิธีนี้ มีความบริสุทธิ์สูงถึง 96% (w/w) และมีปริมาณผลผลิตประมาณ 13% (w/w) ของเซลล์ยีสต์ และจากงานวิจัยของ Kollar และคณะ, (1992) ; Williams และ Lunzig (1980) ได้ศึกษาวิเคราะห์โครงสร้างของสารสกัดเบต้ากลูแคนที่สกัดด้วยด่างและกรด พบว่าด่างและกรดที่ใช้ในการสกัดจะสามารถทำลายสายของเบต้ากลูแคน ซึ่งจะส่งผลให้ปริมาณผลผลิตของเบต้ากลูแคนต่ำ ต่อมามีการพัฒนาการสกัดเบต้ากลูแคนโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochorite) ในการออกซิไดซ์เซลล์ยีสต์ที่แตก (autolyzed cell) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การเหนี่ยวนำให้เซลล์ยีสต์แตก (induced autolysis) และการออกซิไดซ์เซลล์ยีสต์ที่แตกด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ เพื่อแยกโปรตีน ไขมัน กรดนิวคลีอิก และแมนแนน จากงานวิจัยของ Wang, Yao และ Wu (2003) ศึกษาการสกัดเบต้ากลูแคนโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ พบว่า สารสกัดที่ได้มีปริมาณผลผลิตสูงถึง 22.9% (w/w) ของเซลล์ยีสต์ แต่เนื่องจากการสกัดเบต้ากลูแคนด้วยด่างและกรดและการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการออกซิไดซ์เซลล์ยีสต์ที่แตก จะทำให้โครงสร้างของเบต้ากลูแคนถูกทำลายบางส่วน ต่อมาจึงมีการพัฒนาการสกัดเบต้ากลูแคนด้วยภาวะในการสกัดที่ไม่รุนแรง ซึ่งเป็นการสกัดที่ไม่ทำลายโครงสร้างของเบต้ากลูแคน

2.3.3.3 **การสกัดโดยการใช้น้ำร้อนร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส**

การสกัดเบต้ากลูแคนโดยการใช้น้ำร้อนร่วมกับเอนไซม์ เป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย และสามารถลดการแตกหักของโครงสร้างของเบต้ากลูแคน เนื่องจากการสกัดโดยวิธีการสกัดด้วยด่างและกรด เป็นการสกัดในภาวะที่รุนแรง จากงานวิจัยของ Freimund และคณะ (2003) ศึกษาการ

สกัดเบต้ากลูแคน เริ่มจากการสกัดด้วยน้ำร้อน เพื่อสกัดองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ละลายน้ำ สกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส และสกัดไขมันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่า สารสกัดเบต้ากลูแคนที่ได้จากการสกัดด้วยภาวะที่ไม่รุนแรง มีความบริสุทธิ์สูงถึง 85% ซึ่งประเมินจากปริมาณกลูโคส และได้ปริมาณผลผลิตสูงถึง 26% (w/w) ของเซลล์ยีสต์ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Liu และคณะ (2006) ศึกษาการสกัดเบต้ากลูแคนด้วยภาวะที่ไม่รุนแรง โดยมีการเพิ่มขั้นตอนทางเคมีและกายภาพ ได้แก่ การทำเซลล์ยีสต์ให้บริสุทธิ์เบื้องต้น (preliminary purification) การเหนี่ยวนำให้เซลล์ยีสต์แตก (induced autolysis) การโฮโมจีไนซ์เซลล์ สกัดโปรตีนด้วยน้ำร้อน สกัดไขมันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส พบว่าสารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์ 93% (w/w) และได้ผลผลิตประมาณ 11% (w/w) ของเซลล์ยีสต์หรือ 21% (w/w) ของผนังเซลล์

2.4 สมบัติเชิงหน้าที่และการประยุกต์ใช้

พอลิแซคคาไรด์ในอาหารมีความแตกต่างกันทั้งในด้านขององค์ประกอบ ขนาดโมเลกุล และโครงสร้างของโมเลกุล การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและกายภาพจะมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของพอลิแซคคาไรด์

1. ความสามารถในการดูดซับน้ำ (Water holding capacities)

น้ำที่อยู่ในโครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์ คือ น้ำที่จับกับโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์ (bound water) หรือเรียกว่า absorbed water และน้ำที่ถูกจับอยู่ในพอลิแซคคาไรด์เมตริกซ์เรียกว่า retained water ซึ่งการจับกันของ absorbed water จะขึ้นอยู่กับสมบัติทางเคมีกายภาพ เมื่อเติมน้ำในเบต้ากลูแคนและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง อนุภาคของเบต้ากลูแคนซึ่งประกอบด้วยหมู่น้ำตาลที่มีปริมาณมากและมีสายยาวจะดึงดูดน้ำและอุ้มน้ำไว้ในโครงร่าง ถ้ามีการเพิ่มอุณหภูมิของสารผสมให้สูงกว่าช่วงอุณหภูมิของการเกิดเจลาติไนซ์ พันธะไฮโดรเจนจะถูกทำลาย โมเลกุลของน้ำจะเข้ามาจับกับหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็นอิสระ เบต้ากลูแคนจะเกิดการพองตัว ทำให้เกิดการละลาย และความหนืดมีค่าเพิ่มขึ้น

2. ความสามารถในการดูดซับน้ำมัน (Oil holding capacities)

ความสามารถในการดูดซับน้ำมัน คือ การจับกันของสายพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ชอบน้ำ (nonpolar side chains) กับไขมัน ซึ่งขึ้นอยู่กับโครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์เมตริกซ์ เช่น pore size ชนิดของไขมัน ขนาดของหยดไขมัน (fat droplet size) และปัจจัยอื่น ๆ เช่น การเติมสาร emulsifying agent เป็นต้น interaction ระหว่างพอลิแซคคาไรด์กับไขมันจะขึ้นกับโครงสร้างของเจล และการกระจายตัวหรือการเกิดอิมัลชันของไขมัน (emulsification)

I23145043

3. ความเสถียรหรือความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion stability)

เป็นค่าที่บอกถึงอิมัลชันที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งความคงตัวของอิมัลชันจะขึ้นกับความแข็งแรง ความเหนียวและความยืดหยุ่นของฟิลม์โปรตีนที่เกิดเป็น adsorbed layer ซึ่งอยู่ระหว่างชั้นของน้ำและน้ำมัน อนุภาคของสารที่มีสมบัติทำให้อิมัลชันมีความคงตัวจะทำหน้าที่ไปขัดขวางการรวมตัวของเม็ดน้ำมันขนาดเล็ก

ปัจจุบันมีการนำสารเบต้ากลูแคนมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน ทั้งในแง่ของการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของอาหาร ทำหน้าที่เป็นสารที่ช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ มีรายงานการวิจัยพบว่าเบต้ากลูแคนเป็นสารสกัดธรรมชาติชนิดหนึ่ง ที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีประสิทธิภาพสูง นอกจากนี้ องค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกาได้อนุญาตให้มีการใช้สารเบต้ากลูแคนเป็นวัตถุเติมแต่งในอาหารได้ อีกทั้งได้มีการประกาศรับรองให้เป็นอาหารที่มีความปลอดภัยและเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไป (GRAS) (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ, 2549)

<u>การใช้เบต้ากลูแคนในผลิตภัณฑ์อาหาร</u>

เบต้ากลูแคน มีคุณสมบัติที่ไม่สามารถละลายน้ำที่อุณหภูมิห้อง แต่มีความสามารถในการอุ้มน้ำและทำให้เกิดความหนืดกับสารละลาย รวมทั้งยังมีประสิทธิภาพในการใช้เป็นสารดูดซับไขมัน ดังนั้น ในปัจจุบันได้มีการนำเบต้ากลูแคนมาใช้ เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดความคงตัวในระบบอิมัลชัน ซึ่งมีทำหน้าที่ช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างอนุภาคของน้ำและน้ำมัน รักษาสมดุลระหว่างส่วนของน้ำกับน้ำมัน จึงทำให้อิมัลชันมีความคงตัว ตลอดจนใช้เป็นสารให้ความหนืด เป็นต้น (Kollar และคณะ, 1992) นอกจากนี้เบต้ากลูแคนยังมีสมบัติที่ไม่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ที่มีอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์จึงมีสมบัติเป็นสารเยื่อใยชนิดหนึ่ง (dietary fiber) จากประโยชน์ดังกล่าวส่งผลให้เบต้ากลูแคนเป็นทางเลือกใหม่ ในการนำไปใช้เป็นสารเติมแต่งอาหารเพื่อให้มีสมบัติเชิงหน้าที่ที่หลากหลาย ทั้งทางด้านการปรับปรุงคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์อาหาร ให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคพร้อมไปกับประโยชน์ทางด้านโภชนาการ สำหรับประเทศไทยพบว่า มีการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเบต้ากลูแคนในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่าง ๆ ทั้งอุตสาหกรรมอาหารของมนุษย์และสัตว์ เช่น มีการศึกษาการนำสารสกัดเบต้ากลูแคนไปใช้ในผลิตภัณฑ์มายองเนส เพื่อทดแทนไขมันในสูตรของผลิตภัณฑ์ (Worrasinchai และคณะ, 2005) ส่วนอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ สามารถใช้เป็นสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ โดยมีการทดลองใช้กับกุ้งกุลาดำ (Suphanthalika และคณะ, 2002) เป็นต้น

<u>การใช้เบต้ากลูแคนด้านอื่น ๆ</u>

มีรายงานถึงการใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในมนุษย์ เพราะเบต้ากลูแคนมีความจำเพาะเจาะจง ในการรวมตัวกับสารประกอบทางชีวภาพหลายชนิด (Hunter, Gault และ

Berner, 2002) โดยเฉพาะตัวรับ (receptor) ที่อยู่บนเซลล์ของเม็ดเลือดขาวในร่างกายมนุษย์ โดยเมื่อร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย เช่น แบคทีเรีย ไวรัส เป็นต้น เบต้ากลูแคนจะทำหน้าที่กระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมีความตื่นตัวอยู่ตลอดเวลา เพื่อให้มีความสามารถในการทำลายเชื้อก่อโรค นอกจากนี้ ผลการกระตุ้นของสารเบต้ากลูแคนจะทำให้ร่างกายสร้างไซโตคายน์ (cytokines) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สร้างจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยไซโตคายน์ที่หลั่งออกมาทำหน้าที่สื่อสัญญาณให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมารวมกันตรงตำแหน่งที่มีสิ่งแปลกปลอมและทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (Hussein และ Brasel, 2001) เบต้ากลูแคนยังช่วยยับยั้งการอักเสบของแผลติดเชื้อ ช่วยระงับการเจริญของเซลล์มะเร็ง ช่วยลดระดับคอเรสเตอรอล ได้มีการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ด้านผลของสารเบต้ากลูแคน ที่สกัดได้จากผนังเซลล์ยีสต์ที่มีต่อปริมาณคอเรสเตอรอลในร่างกายมนุษย์ ผู้ที่ได้รับเบต้ากลูแคนจากยีสต์โดยเฉลี่ย 15 กรัมต่อวัน เป็นประจำอย่างต่อเนื่อง จะมีปริมาณคอเรสเตอรอลทั้งหมดลดลงและในบางรายงานพบว่าจะมีปริมาณคอเรสเตอรอลชนิด HDL เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อบริโภคติดต่อกันเป็นเวลานาน องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกายังได้แนะนำว่า สารสกัดเบต้ากลูแคนยังสามารถช่วยลดความเสี่ยงจากโรคหลอดเลือดหัวใจได้อีกด้วย (Muller และคณะ, 2000) และยังมีส่วนช่วยในการควบคุมการสร้างเซลล์มะเร็ง คือจะช่วยกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาว โดยเบต้ากลูแคนจะเข้าจับที่ผิวของเซลล์เม็ดเลือดขาว และจะทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างเซลล์ NK ซึ่งทำหน้าที่จำเพาะในการกำจัดเซลล์มะเร็ง รวมถึงหมุนเวียนภายในร่างกายไปกับระบบเลือดเมื่อพบเซลล์ผิดปกติก็จะเข้าทำลาย ทั้งนี้การทำงานของระบบดังกล่าว จะเป็นไปอย่างจำเพาะเจาะจงไม่มีผลต่อเซลล์ปกติที่อยู่ใกล้กับเซลล์มะเร็ง (การทำงานของเม็ดเลือดขาวจะช่วยกำจัดเซลล์ที่แบ่งตัวผิดปกติรวมทั้งเซลล์มะเร็งด้วย สำหรับเซลล์ NK นั้นจะมีหน้าที่จำเพาะในการกำจัดเซลล์มะเร็ง) (Di Luzio, Williams และ McNamee, 1979) นอกจากนี้เบต้ากลูแคน ยังใช้ในการฟื้นฟูสภาพจากการฉายรังสีแกมมากับผู้ป่วยโรคมะเร็งหรือผู้ป่วยที่ต้องมีการบำบัดด้วยวิธีฉายรังสี โดยมีสมบัติในการช่วยกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งช่วยป้องกันเม็ดเลือดขาวจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นระหว่างและหลังจากการฉายรังสี และยังทำให้ไขกระดูกสามารถกลับสู่สภาพปกติได้เร็วยิ่งขึ้นอีก (Ross และคณะ, 1999) ส่วนการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เนื่องจากเบต้ากลูแคนเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ แต่เมื่อนำมาเติม carboxymethyl จะได้ carboxymethyl-glucan ที่ละลายน้ำ และเพิ่มประสิทธิภาพทาง cosmetic activity นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์บำรุงรักษาผิวหนัง โดยจะทำให้เกิดฟิลม์ปกป้องบนผิวหนังและไม่รบกวนการหายใจของเซลล์ผิวหนัง เพื่อใช้กับผิวหนังที่โดนแดดจัด เกรียมแดด ปรับสภาพผิวหนังให้อ่อนนุ่มหลังจากโดนรังสีอุลตร้าไวโอเลต กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนให้กับผิวหนัง (Donzis, 1993) และเสริมสร้างระบบป้องกันผิวหนังต่อเชื้อโรค (Zulli และคณะ, 1996 ; Zulli และ Suter, 1998)