บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตกลูแคนจากกากยีสต์หมักแอลกอฮอล์ที่ได้จากการเลี้ยงโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยในขั้นตอนแรกจะมีการแยกเซลล์ยีสต์ออกจากน้ำหมักแอลกอฮอล์ ล้างเซลล์ ศึกษาการรอดชีวิตของยีสต์ระหว่างการเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน ศึกษาภาวะในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ เพื่อแยกส่วนของผนังเซลล์มาสกัดโปรตีนโดยการใช้น้ำร้อนและเอนไซม์ จากนั้นนำผนังเซลล์ที่สกัดโปรตีนแล้ว มาสกัดไขมันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ วิเคราะห์ปริมาณกลูแคนที่ได้ในแต่ละขั้นตอนและศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดที่ได้เปรียบเทียบกับเบต้ากลูแคนจากยีสต์ที่จำหน่ายเชิงการค้า

4.1 การแยกเซลล์ยีสต์จากน้ำหมักแอลกอฮอล์

ยีสต์จากการหมักแอลกอฮอล์ (*Saccharomyces cerevisiae* , SC 90) เป็นผลพลอยได้ (by-product) จากวิธีการหมักแอลกอฮอล์ อยู่ในรูปของ yeast cream หรือ slurry ที่มีปริมาณของแข็งแขวนลอยประมาณ 15-20% ในการหมักแอลกอฮอล์จะมีเซลล์ยีสต์ตกตะกอนอยู่บริเวณก้นถังหมัก ซึ่งจัดเป็นของเหลือทิ้ง(waste) จากการหมักแอลกอฮอล์ เซลล์ยีสต์จะมีสีน้ำตาลเนื่องจากบริเวณผิวเซลล์ของยีสต์จะดูดซับสีของกากน้ำตาลไว้

ในงานวิจัยใช้น้ำหมักแอลกอฮอล์ (น้ำหมักส่า) จำนวน 60 ลิตร ซึ่งเตรียมโดยการหมักแบบ batch ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักมากรองด้วยผ้ากรองขนาด 125 ไมครอน เพื่อแยกส่วนของแข็งขนาดใหญ่ที่ไม่ต้องการออก เช่น เศษดินหรือเศษหินที่ติดมากับกากน้ำตาล เป็นต้น และนำส่วนที่ผ่านการกรองมาแยกเซลล์ยีสต์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 xg อุณหภูมิ 4 ^{0}C เป็นเวลา 15 นาที

หลังจากที่ปั่นแยก ได้เซลล์ยีสต์ 736.36 กรัม (wet weight) จากนั้นนำเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น จำนวน 3 รอบ โดยใช้อัตราส่วนของเซลล์ยีสต์ต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:3 (w/v) น้ำกลั่นที่ใช้ล้างเซลล์มีค่า pH เท่ากับ 6.08 ± 0.12 โดย pH ของน้ำกลั่นควรมีค่าเป็นกลาง เพื่อรักษาการมีชีวิตรอดของเซลล์ ในการล้างแต่ละรอบจะมีการกวนให้เซลล์ยีสต์กระจายตัวอยู่ในน้ำกลั่นนานประมาณ 15 นาที เพื่อให้น้ำไปชะกากน้ำตาลที่ติดอยู่บริเวณผิวเซลล์ออกให้หมด นอกจากนี้ในการล้างเซลล์ยีสต์ยังช่วยกำจัดแอลกอฮอล์ที่เกิดจากการหมัก โดยพบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำล้างครั้งที่ 1 มีค่า 8.50 ± 0.17% (v/v) และปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำล้างครั้งที่ 3 มีค่าเท่ากับ 0.21±0.12% (v/v) จะเห็นได้ว่าแอลกอฮอล์ในน้ำล้างมีค่าลดลง และหลังจากล้างครบ 3 รอบ

นำเซลล์ยีสต์ซึ่งมีสีน้ำตาลอ่อนมาชั่งน้ำหนัก ได้ปริมาณเซลล์ยีสต์ 671.63 กรัม (wet weight) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C โดยในการล้างเซลล์ยีสต์เพื่อให้ปริมาณน้ำตาลและแอลกอฮอล์ลดน้อยลงจะมีการสูญเสียยีสต์ในระหว่างการล้าง ทั้งนี้เนื่องจากในการล้างยีสต์จะใช้น้ำกลั่น ซึ่งอาจทำให้เซลล์เกิด plasmolysis โดยเมื่อเซลล์อยู่ภายใต้สภาพความเข้มข้นของสารละลายที่ต่างกัน จะมีผลต่อแรงดันออสโมติกของเซลล์ ทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลน้ำในเซลล์ ในภาวะนี้พลาสมาเมมเบรนของยีสต์จะหดตัวลง เกิดความเสียหายและเกิดการรั่วไหลขององค์ประกอบภายในเซลล์ออกมา (Reed และ Nagodawithana, 1991) และในระหว่างการล้างนั้นยีสต์จะมีการย่อยสลายตัวเองบางส่วน จากการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ยีสต์หรือมีปัจจัยที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในเซลล์ยีสต์ให้ย่อยสลายตัวเอง (Pyke, 1985) โดยคาดว่าส่วนที่สูญเสียไปอาจจะเป็นโปรตีนที่ละลายในน้ำ ของเหลวภายในเซลล์ยีสต์ ปริมาณน้ำตาลและแอลกอฮอล์ที่ติดอยู่ที่เซลล์ จึงทำให้น้ำหนักของยีสต์ลดลงไป ในงานวิจัยนี้ล้างยีสต์ทั้งหมด 3 รอบ แต่ละรอบมีการสูญเสียยีสต์ โดยคำนวณจากน้ำหนักของยีสต์ที่หายไปเท่ากับ 4.67, 2.34 และ 2.27% ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ปริมาณเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (SC 90) ที่แยกได้จากน้ำหมักแอลกอฮอล์จำนวน 60 ลิตร และล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 รอบ

	จำนวนรอบของการล้าง		
	1	2	3
ปริมาตรน้ำกลั่น (mL) : ปริมาณเซลล์ (g) (wet basis)	2209:736.36	2110:703.53	2060:686.87
น้ำหนักเซลล์ที่ได้หลังจากล้าง (g) (wb)	703.53±1.34	686.87±1.41	671.63±1.32
เปอร์เซ็นต์การสูญเสียยีสต์ (%)	4.67±0.03	2.43±0.01	2.27±0.02

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (SC 90) จากน้ำหมักแอลกอฮอล์

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ พบว่ายีสต์ที่แยกได้ มีปริมาณความชื้น 74.56% และมีองค์ประกอบทางเคมี ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ส่วนค่า pH ของยีสต์ประมาณ 5.1

ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (SC 90) จากน้ำหมักแอลกอฮอล์

องค์ประกอบทางเคมี	% w/w (dry basis)
โปรตีน	39.61 ± 0.59
ไขมัน	4.87 ± 0.45
เถ้า	6.98 ± 0.12
คาร์โบไฮเดรต	54.27 ± 0.65
กลูแคน	21.39 ± 0.13

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (SC 90) พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 54.27% โดยน้ำหนักแห้ง โปรตีน 39.61% โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งทั้งคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนจัดเป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์และพบในปริมาณสูง คาร์โบไฮเดรตที่พบในปริมาณมากสามารถบ่งบอกถึงปริมาณของกลูแคนในส่วนของผนังเซลล์ ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส (Thammakiti และคณะ, 2002) จากการวิเคราะห์พบปริมาณกลูแคนใน *Saccharomyces cerevisiae* (SC 90) 21.39% โดยน้ำหนักแห้ง และจากงานวิจัยของ Liu และคณะ (2006) ศึกษาการสกัดกลูแคนจาก Spent brewer's yeast *(Saccharomyces cerevisiae)* ซึ่งเป็นยีสต์ชนิดเดียวกับที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่ายีสต์มีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน 59.67% คาร์โบไฮเดรต(กลูโคส) 35.09% ไขมัน 4.90% และเถ้า 7.07% ในปริมาณที่แตกต่างกัน ส่วนกลูแคนพบ 20.58% โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ ทั้งนี้เนื่องจากภาวะการเลี้ยงที่มีความแตกต่างกัน จะส่งผลต่อปริมาณองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ที่แตกต่างกันได้ วัตถุดิบที่ใช้เลี้ยงแม้จะเป็นวัตถุดิบประเภทเดียวกัน แต่ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบแตกต่างกัน ก็ส่งผลต่อกระบวนการชีวเคมีของยีสต์ในการผลิตสารต่างๆ เพื่อใช้ในการเจริญแตกต่างกัน (Reed และ Nagodawithana,1991) นอกจากนี้ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ปริมาณออกซิเจน ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น ส่วนปริมาณไขมันในเซลล์ยีสต์ (SC 90) พบว่ามีปริมาณต่ำ 4.87% โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งเป็นผลดีที่ทำให้การย่อยสลายโปรตีนออกจากเซลล์ยีสต์เกิดได้ง่ายขึ้น เพราะถ้ายีสต์มีปริมาณไขมันสูงจะทำให้การย่อยสลายโปรตีนเกิดได้ยาก เนื่องจากไขมันสามารถรวมตัวกับโปรตีน และขัดขวางการย่อยสลายโปรตีน (Roach และ Gehrke, 1970 ; วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2535) จากงานวิจัยของ ซอราฮูดีน มามะและคณะ (2546),

งานวิจัยของ ธัญญารัตน์ ตรีวงศ์และหทัยรัตน์ พระเดชกิ่ง (2547) ได้ศึกษาการสกัดกลูแคนจากยีสต์ *S. uvarum* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ได้จากการผลิตเบียร์ของบริษัทเบียร์ช้าง (1991) จำกัด จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีภายในเซลล์ พบว่ามีคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 33.00 และ 62.80% (w/w) ตามลำดับ และจากงานวิจัยของ Thammakiti และคณะ (2002) และ Suphanthalika และคณะ (2002) ได้ศึกษาการสกัดเบต้ากลูแคนจากยีสต์ *S. uvarum* ที่ได้จากการผลิตเบียร์ของบริษัทบุญรอดบริวเวอรี่ จำกัด และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีภายในเซลล์พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 59.61 และ 55.20% (w/w) ตามลำดับ จากงานวิจัยต่าง ๆ ที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของยีสต์มีความแตกต่างกัน ถึงแม้ว่าจะเป็นยีสต์ที่ใช้ผลิตเบียร์เหมือนกัน แต่ความแตกต่างขององค์ประกอบภายในเซลล์ที่เกิดขึ้น เกิดจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเบียร์ (ข้าวบาร์เล่ย์) แม้วัตถุดิบมาจากแหล่งเพาะปลูกแหล่งเดียวกัน แต่แตกต่างกันของฤดูกาลที่ใช้ในการเพาะปลูก หรือฤดูกาลในการเก็บเกี่ยว ก็จะทำให้วัตถุดิบมีองค์ประกอบทางเคมีจำพวกคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่แตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลต่อปริมาณองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ เนื่องจากวัตถุดิบเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนและไนโตรเจนที่ยีสต์ใช้ในการสร้างเซลล์ และการที่วัตถุดิบมีการเปลี่ยนแปลงจะเหนี่ยวนำ ให้ยีสต์เกิดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาชีวเคมีต่าง ๆ ภายในเซลล์เพื่อความอยู่รอด (Santos และคณะ, 2003)

ในงานวิจัยนี้เมื่อผ่านกระบวนการแยกเซลล์ยีสต์ออกจากน้ำหมักแอลกอฮอล์แล้ว มีความจำเป็นต้องเก็บยีสต์สดไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลาหนึ่ง เนื่องจากมีข้อจำกัดในด้านอุปกรณ์ที่ไม่สามารถดำเนินงานวิจัยต่อเนื่องได้ จึงได้ทำการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์สดระหว่างการเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน

4.3 ผลของการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ระหว่างการเก็บแช่เย็น

จากการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์สดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยวิธี Methylene blue technique พบว่าเมื่อเก็บเซลล์ยีสต์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 5 นั้นจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมีปริมาณค่อนข้างคงที่ โดยมีจำนวนเซลล์อยู่ในช่วง 9.68 - 9.93 ($x10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร) แต่หลังจากวันที่ 5 จำนวนเซลล์ยีสต์ที่รอดชีวิตมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จนถึงวันที่ 7 จำนวนเซลล์มีปริมาณเท่ากับ 8.52 ($x10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร) และเมื่อคำนวณร้อยละการรอดชีวิตของยีสต์ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 5 พบว่าร้อยละการรอดชีวิตของยีสต์มีค่าคงที่ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 95.54% และหลังจากวันที่ 5 ร้อยละการรอดชีวิตของยีสต์มีค่าลดลง เท่ากับ 93.99 และ 91.90% ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 4.3) ดังนั้นยีสต์สดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C นานเกินกว่า 5 วัน เซลล์ยีสต์จะเริ่มตายและเกิดการย่อยสลายตัวเอง (ออโตไลซิส) โดยเอนไซม์ภายในเซลล์จะเป็นอิสระและย่อยสับสเตรท

ต่าง ๆ ซึ่งจะมีผลทำให้ผนังเซลล์มีลักษณะบางลงและสูญเสียสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่าน (semi-permeable membrane) เซลล์ยีสต์จะย่อยสลายตัวเองไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งเซลล์แตกออกทำให้ของเหลวภายในเซลล์ เช่น โพรโทพลาซึม ไขมัน โปรตีน และสารเกลือแร่ เป็นต้น ถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (Daniel, 1973) และในการเก็บรักษาเซลล์ยีสต์สดไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ก็เป็นภาวะที่หน่วงต่อการแตกหน่อ รวมทั้งป้องกันการเจริญของยีสต์ได้ ซึ่งส่งผลให้ปริมาณองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Hsu, Hoseney และ Seib, 1979)

ตารางที่ 4.3 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของยีสต์จากน้ำหมักสา *Saccharomyces cerevisiae* (SC 90) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน

วันที่	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (x 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร)	ร้อยละการรอดชีวิต (%)
1	9.93 ±0.02[a]	94.75±1.31[a]
2	9.89 ±0.12[a]	94.67±1.12[a]
3	9.74 ±0.05[a]	94.61±1.24[a]
4	9.71± 0.10[a]	94.58±1.31[a]
5	9.68± 0.12[ab]	94.51±1.32[a]
6	8.73±0.11[b]	93.74±1.14[b]
7	8.52±0.09[c]	92.14±1.02[c]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ, , ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
a,b,c ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

การตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในระหว่างการเก็บ เป็นการบอกถึงคุณภาพของยีสต์และทำให้ทราบจำนวนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตเริ่มต้น ก่อนที่จะนำเซลล์ยีสต์มาทำการย่อยสลายผนังเซลล์ในขั้นตอนการวิจัยขั้นต่อไป และการเลือกใช้วิธีในการนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของยีสต์ก็มีความสำคัญ จากงานวิจัยของจิราภรณ์ พันธุ์ชัย (2540) ศึกษาการอบแห้งยีสต์ขนมปังเพื่อผลิตยีสต์ผง ได้ทดลองหาความสัมพันธ์ของวิธีการนับจำนวนเซลล์รอดชีวิตระหว่างวิธี Methylene blue technique และ Plate count method พบว่า ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient) R = 0.9790 ซึ่งแสดงว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นอย่างดียิ่งระหว่างวิธีการนับจำนวนเซลล์ทั้งสองวิธีโดยประมาณ 96% ของการแปรผันของจำนวนเซลล์ที่นับได้จากวิธี Plate count

method เป็นผลเนื่องมาจากการมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับจำนวนเซลล์ที่นับได้จากวิธี Methylene blue technique ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธีทั้งสองมีความสอดคล้องกัน และในงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นเลือกใช้วิธี Methylene blue technique แทนที่วิธี Plate count method เพราะวิธี Methylene blue technique จะทำให้สามารถทราบจำนวนเซลล์ทั้งหมด คือ ทราบทั้งจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและจำนวนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตในเวลาเดียวกันได้ โดยอาศัยการติดสี methylene blue ของเซลล์ยีสต์ เซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์ซึ่งสามารถเปลี่ยนสาร methylene blue จากสีน้ำเงินเป็นไม่มีสี (reduced) เมื่อ methylene blue ดูดซึมผ่านเข้าเซลล์ ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวจะไม่พบในเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้ว และวิธีนี้เป็นวิธีที่ทราบผลรวดเร็ว มีขั้นตอนการปฏิบัติไม่ยุ่งยาก ใช้วัสดุอุปกรณ์น้อยกว่าใช้ Plate count method (สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์, 2532)

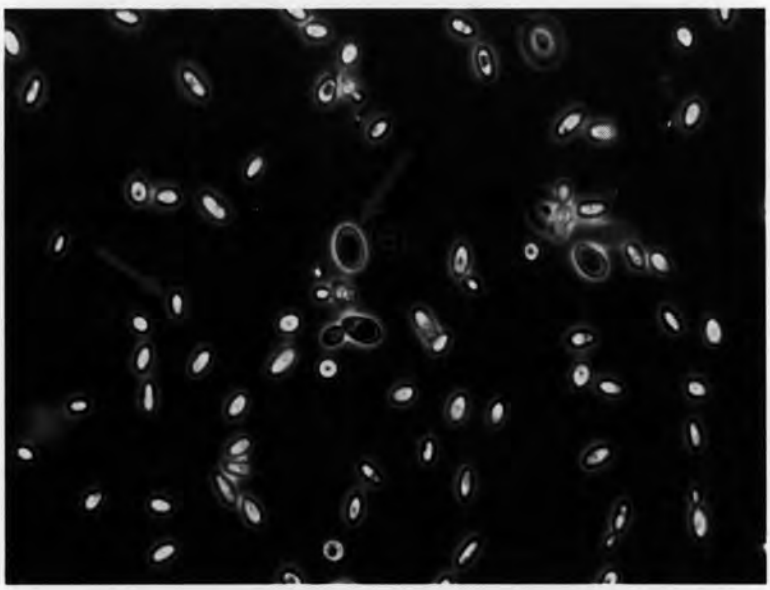
4.4 ผลการศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

ในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ โดยไม่มีการเติมสารเร่งการย่อยสลาย เริ่มจากเตรียมสารแขวนลอยยีสต์ ให้มีปริมาณของแข็งประมาณ 15%(w/v) แปรค่าอุณหภูมิในการย่อยสลาย 3 ระดับ คือ 45, 50 และ 60 °C และแปรค่าระยะเวลา 3 ระดับ คือ 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรดด่างกำหนดที่ 5.0 ควบคุมภาวะต่าง ๆ ให้เกิดการย่อยสลายและเขย่าตลอดเวลาที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่เกิดการย่อยสลายตัวเอง (เซลล์ที่แตก) ปริมาณโปรตีนและปริมาณคาร์โบไฮเดรตในออโตไลเสท และวิเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ภายในผนังเซลล์ จากการทดลองพบว่า ปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ระยะเวลา และอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลา มีผลต่อจำนวนเซลล์ที่เกิดการย่อยสลายตัวเอง ปริมาณโปรตีนและปริมาณคาร์โบไฮเดรตในออโตไลเสทอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังนั้น จึงพิจารณาผลของอิทธิพลร่วมโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่เกิดการย่อยสลายตัวเอง ปริมาณโปรตีนและปริมาณคาร์โบไฮเดรตในออโตไลเสทจากการย่อยสลายตัวเองที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ

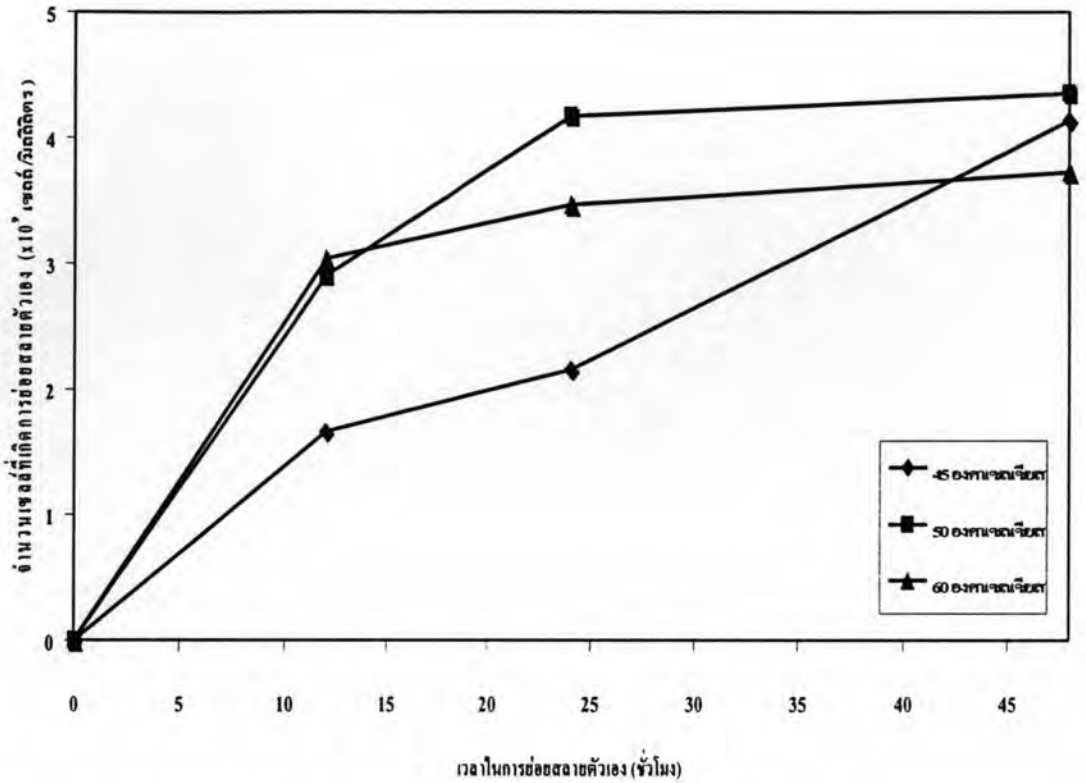
4.4.1 จำนวนเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* (SC 90) ที่เกิดการย่อยสลายตัวเองเมื่อใช้อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ

ลักษณะเซลล์ที่เกิดการย่อยสลายตัวเองหรือเซลล์ที่แตก ภายใต้ Phase contrast microscope กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์ที่แตกจะมีสีเข้มมืดทึบ ส่วนเซลล์ที่ไม่แตกจะสว่าง (ดังแสดงในรูปที่ 4.1) และเมื่อพิจารณาภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์ พบว่า อุณหภูมิ ระยะเวลา และอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลามีผลต่อจำนวนเซลล์ที่เกิดการย่อยสลายตัวเอง (ดังแสดงในรูปที่ 4.2) ในการทดลองแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลายตัวเอง

3 ระดับ ได้แก่ 45, 50 และ 60 °C และแปรเวลา 3 ระดับ ได้แก่ 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์ที่เกิดการย่อยสลายตัวเองเริ่มต้นเท่ากับ 4.57 (x 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร) จากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 45 และ 60 °C เมื่อเวลาในการย่อยสลายมากขึ้นจำนวนเซลล์ที่เกิดการย่อยสลายตัวเอง มีค่ามากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.05) และภาวะที่อุณหภูมิ 50 °C เวลาในการย่อยสลายตัวเอง 24 – 48 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 45 °C เวลา 48 ชั่วโมง เป็นภาวะที่มีจำนวนเซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเองมากที่สุดและมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) โดยจำนวนเซลล์ที่เกิดการย่อยสลายตัวเองมีค่าอยู่ในช่วง 4.14-4.35 (x10^9 เซลล์/มิลลิลิตร) จากจำนวนเซลล์ทั้งหมด 4.43 (x10^9 เซลล์/มิลลิลิตร) การใช้อุณหภูมิที่สูงและเวลาในการย่อยสลายที่มากขึ้น คือ การย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่อุณหภูมิ 50 และ 60 °C จะมีจำนวนเซลล์ที่เกิดการย่อยสลายตัวเองมากกว่าที่อุณหภูมิ 45 °C อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.05) ดังนั้น ภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ คือ การเลือกใช้อุณหภูมิที่ 50 °C ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะพบจำนวนเซลล์ที่เกิดการย่อยสลายตัวเองมากที่สุด และคิดเป็น 94.13%ของจำนวนเซลล์ทั้งหมดและในการเลือกใช้ภาวะดังกล่าวนี้ เนื่องจากใช้เวลาในการย่อยสลายตัวเองสั้นที่สุด



รูปที่ 4.1 ลักษณะของเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (SC 90) ที่เกิดการย่อยสลายผนังเซลล์
(A) เซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต (B) เซลล์ยีสต์ที่เกิดการย่อยสลายผนังเซลล์

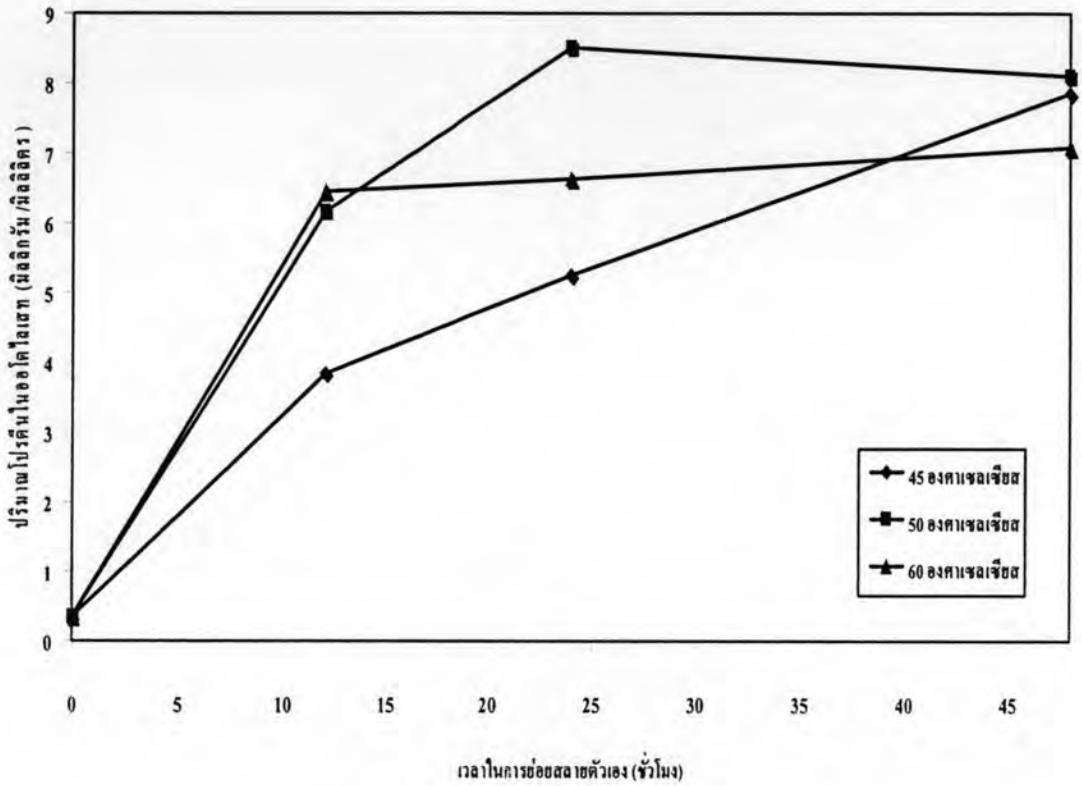


รูปที่ 4.2 จำนวนเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (SC 90) ที่เกิดการย่อยสลายตัวเองเมื่อใช้อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ

4.4.2 ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสทหลังการย่อยสลายตัวเองของยีสต์แต่ละภาวะ

เมื่อพิจารณาภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการย่อยสลายตัวเองพบว่า อุณหภูมิ ระยะเวลาและอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลามีผลต่อปริมาณโปรตีนในออโตไลเสท จากการทดลอง พบว่าปริมาณโปรตีนในออโตไลเสทที่ 0 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 0.34 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเวลาในการย่อยสลายตัวเองมากขึ้น ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสทมีค่ามากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) การย่อยที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และการย่อยที่อุณหภูมิ 45 °C เวลา 48 ชั่วโมง จะมีค่าปริมาณโปรตีนในออโตไลเสทมากที่สุดและมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยปริมาณโปรตีนในออโตไลเสทมีค่าอยู่ในช่วง 7.86-8.52 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร การใช้อุณหภูมิสูงและเวลาในการย่อยสลายที่มากขึ้น คือ การย่อยสลายตัวเองของยีสต์ ที่อุณหภูมิ 50 และ 60 °C จะมีปริมาณโปรตีนในออโตไลเสทมากกว่าการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่อุณหภูมิ 45 °C อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ดังแสดงในรูปที่ 4.3) ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายตัวเองที่ให้ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสทมากที่สุด คือ การใช้อุณหภูมิ 50 °C เวลา 24 ชั่วโมง

เนื่องจากสามารถกำจัดโปรตีนบางส่วนออกจากเซลล์ได้มากที่สุด โดยพบปริมาณโปรตีนที่เหลือในผนังเซลล์เท่ากับ 35.62% (w/w) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับภาวะที่ให้จำนวนเซลล์ที่แตกมากที่สุด

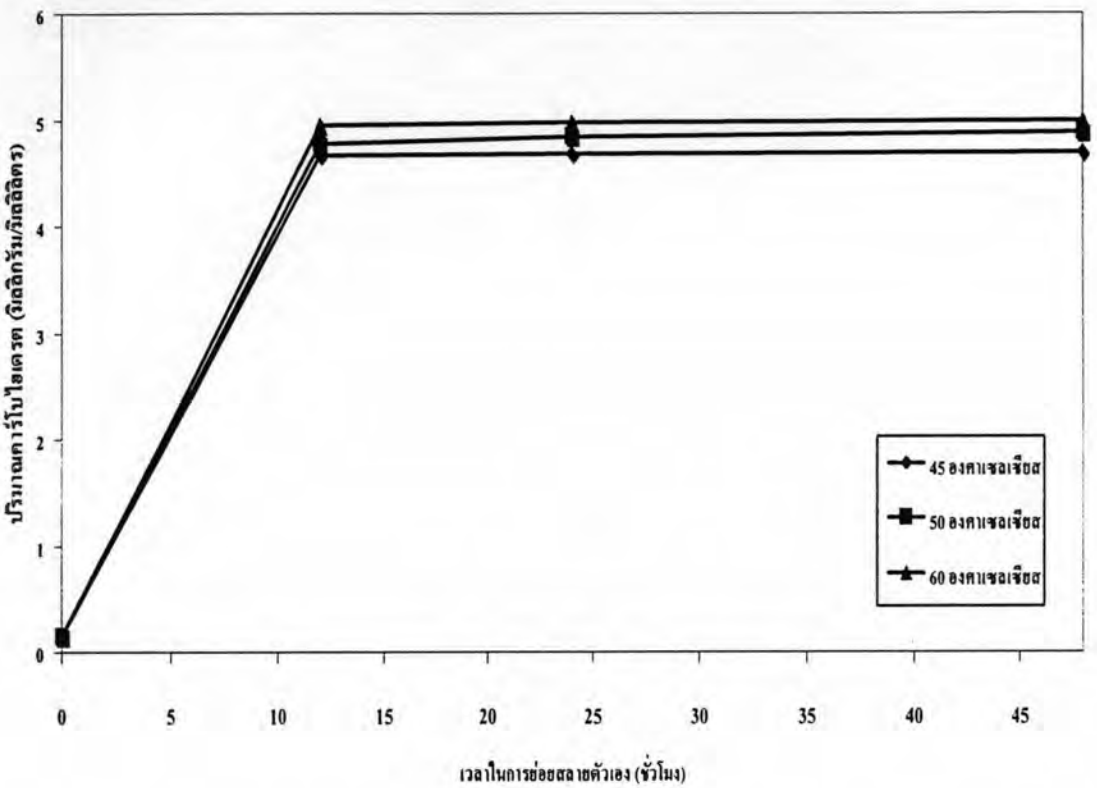


รูปที่ 4.3 ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสทหลังการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ

4.4.3 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในออโตไลเสทหลังการย่อยสลายตัวเองของยีสต์แต่ละภาวะ

เมื่อพิจารณาภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการย่อยสลายตัวเอง พบว่า อุณหภูมิ และระยะเวลา มีผลต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตในออโตไลเสท การย่อยสลายตัวเองในทุกช่วงของอุณหภูมิ และระยะเวลาที่นานขึ้นมีผลทำให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในออโตไลเสทมีค่าเพิ่มขึ้น (ดังแสดงในรูปที่ 4.4) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในออโตไลเสทเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในการย่อยสลายตัวเองที่อุณหภูมิ 45, 50 และ 60 °C ย่อยสลายตั้งแต่เวลา 0 ชั่วโมงถึง 12 ชั่วโมง ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในออโตไลเสทมีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับ 4.66, 4.79 และ 4.91 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อย่อยสลายเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 45 °C ปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีค่าคงที่และมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) มีค่าเท่ากับ

4.68-4.69 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่อุณหภูมิ 50 และ60 °C เวลาในการย่อยสลาย 24-48 ชั่วโมง ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในออโตไลเสทมีค่ามากที่สุดและมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยมีค่าในช่วง 4.85-4.97 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิ 45 และ 50°C เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ภายในเซลล์ยีสต์ และมีส่วนสำคัญต่อเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีนเพื่อให้คาร์โบไฮเดรตมีความบริสุทธิ์มากขึ้น (Roach และ Gehrke, 1970)



รูปที่ 4.4 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในออโตไลเสทหลังการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ

โดยปกติการย่อยสลายตัวเองของยีสต์สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยเซลล์จะเริ่มตายเมื่อขาดอาหาร มีผลทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์ทำงานผิดปกติ (Reed และ Peppler,1973) กระบวนการย่อยสลายตัวเองสามารถเร่งให้เกิดได้เร็วขึ้นโดยการควบคุมภาวะต่าง ๆ ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของสารละลายยีสต์ให้เหมาะสม ดังนั้นในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ปัจจัยแรกที่ต้องคำนึงถึงคือ ความเข้มข้นของสารละลายยีสต์และค่าความเป็นกรดด่าง จากงานวิจัยของวิวัฒน์ หวังเจริญ (2535) ศึกษาผลของปริมาณของแข็งและ

ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ โดยแปรความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-7.0 และปริมาณของแข็งในช่วง 5-25% (w/w) พบว่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 และการใช้สารแขวนลอยยีสต์ที่มีปริมาณของแข็ง 15% (w/w) เหมาะสมในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ ซึ่งให้ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสทสูงกว่าช่วงอื่นที่ใช้ในการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ($p\leq0.05$) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยของ วรรณกร เลื่องชัยเชวง (2546), Thammakiti และคณะ (2002) และ Liu และคณะ (2006) ได้ศึกษาการย่อยสลายตัวเองของยีสต์พบว่าที่ความเข้มข้นของสารแขวนยีสต์ (15%w/w) และความเป็นกรดด่างที่ 5.0 เป็นภาวะที่เหมาะสมในการเร่งการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เช่นเดียวกัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารแขวนลอยยีสต์และความเป็นกรดด่างดังกล่าว ซึ่งภายใต้ภาวะที่เหมาะสมแก่การย่อยสลายตัวเองของยีสต์ เซลล์ยีสต์จะเกิดการย่อยสลายตัวเองอย่างช้า ๆ พร้อมทั้งปล่อยเอนไซม์ภายในแวคิวโอล (vacuole) ออกมาทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีนและเปปไทด์อย่างไม่เจาะจงในไซโตพลาสซึม โดยเอนไซม์ภายในเซลล์ยีสต์ที่สำคัญมี 2 กลุ่มคือ β(1-3)glucanase และโปรติเอส (protease) โดยมี β(1-6) glucanase และ mannanase ทำงานร่วมกันในการย่อยสลายผนังเซลล์ เอนไซม์กลูคาเนสมีหน้าที่ในการย่อยสลายชั้นกลูแคนของผนังเซลล์ยีสต์ ส่วนเอนไซม์โปรติเอสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่สำคัญมีอยู่ 4 ชนิด คือ Proteinase ysc A, Proteinase ysc B, Carboxypeptidase ysc Y และ Carboxypeptidase ysc S โดยปกติเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งไม่เหมาะสมต่อการทำงาน เมื่อยีสต์อยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการมีชีวิต เอนไซม์ Proteinase ysc A จะถูกปล่อยออกมาเพื่อหยุดการทำงานของสารยับยั้งการทำงานของ Proteinase ysc B และ Carboxypeptidase ysc Y ทำให้เอนไซม์ทั้งสองกลับมาทำงานได้ ซึ่งเป็นการทำงานอย่างต่อเนื่องและร่วมกันในการย่อยสลายตัวเอง (Reed และ Nagodawithana, 1991) จากรายงานการวิจัยของ สุพจน์ บุญแรง (2541) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ขนมปังที่อุณหภูมิ 45 °C ความเป็นกรดด่างที่ 5.2 และระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์โปรติเนสและกลูคาเนสมีกิจกรรมสูงสุดที่ช่วงเวลาใกล้เคียงกันในชั่วโมงที่ 4-8 และพบว่าเอนไซม์คาร์บอกซีเปปทิเดสมีค่ากิจกรรมสูงสุดภายหลังชั่วโมงที่ 12 นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ นิวคลีเอสภายในเซลล์จะทำการย่อยสลายอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอให้เป็นสารพอลินิวคลีโอไทด์ โมโนนิวคลีโอไทด์ และนิวคลีโอไทด์ ให้เป็นโมเลกุลเล็ก ๆ ละลายน้ำออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (Reed และ Nagodawithana, 1991) ดังนั้นจากผลการทดลองที่ศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ พบว่าที่อุณหภูมิ 50°C และเวลา 24 ชั่วโมง เป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ ซึ่งมีผลทำให้โครงสร้างผนังเซลล์ถูกทำลายและองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ยีสต์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ได้ โดยพิจารณาจากปริมาณโปรตีนในออโตไลเสทและจำนวนเซลล์ที่เกิดการย่อยสลายตัวเอง ซึ่งมีค่า

มากกว่าภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในผนังเซลล์มีการสูญเสียน้อยกว่าภาวะอื่นที่ใช้ในการทดลอง โดยปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่สูญเสียไปเกี่ยวข้องกับเอนไซม์คาร์โบไฮเดรส (carbohydrase) ซึ่งเร่งการไฮโดรไลซ์คาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้การเลือกใช้อุณหภูมิ 50°C ยังช่วยลดการเจริญของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในระหว่างการย่อยสลาย (Reed และ Peppler, 1973) และการปรับความเป็นกรดด่างที่ 5.0 ยังช่วยทำให้ยีสต์ไม่เกิดการเน่าเสีย จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสอดคล้องกับช่วงอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม สำหรับการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญต่อกระบวนการย่อยสลายตัวเองของ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ Hough และ Maddox (1970) รายงานไว้ และอยู่ในช่วงที่ Reed และ Nagodawithana (1991) และ Chao และคณะ (1980) เสนอไว้

นอกจากนี้ในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ เมื่อทำการแยกผนังเซลล์ออกมาแล้ว ส่วนที่เหลือคือยีสต์ออโตไลเสท ซึ่งเมื่อนำมาให้ความร้อนเพื่อทำให้เข้มข้นและอบแห้ง พบว่าทำให้เกิดสารประกอบระเหยได้ซึ่งให้กลิ่นรสจำนวนมากเป็นผลพลอยได้ (Ames และ Mac Leoad, 1985) เช่น กลิ่นรสเนยแข็ง (cheesy), กลิ่นรสเนื้อ (meaty) หรือกลิ่นรสอาหารคาว (savory) เป็นต้น สารที่มีกลิ่นรสเหล่านี้เกิดจากสารประกอบจากการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ในเซลล์ และการรวมตัวของสารต่าง ๆ ภายในเซลล์ยีสต์ขณะผ่านกระบวนการย่อยสลายตัวเอง (Nagodawithana, 1995) สารเหล่านี้สามารถใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นในอาหารและกลิ่นรสที่ได้จะแตกต่างกันออกไปตามภาวะที่ใช้ในการย่อยสลาย ระดับการย่อยสลาย และชนิดของยีสต์ที่ใช้ (จตุพร เหมสุวรรณ์, 2531; ธีรวุฒิ ฤทธิเดชา, 2544; Dziezak, 1987) และจากงานวิจัยของวิวัฒน์ หวังเจริญ (2535) ได้ศึกษาผลของการเขย่าขณะย่อยสลาย โดยเปรียบเทียบการเขย่าและไม่เขย่า พบว่ายีสต์ที่เขย่าขณะย่อยสลาย มีอัตราส่วนของปริมาณโปรตีนมากกว่ายีสต์ที่ผ่านการย่อยสลายแต่ไม่เขย่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นการเขย่าขณะย่อยสลายมีผลต่อการย่อยสลายตัวเองของยีสต์อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากการเขย่าช่วยให้การย่อยสลายดีขึ้นและทำให้องค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ยีสต์สามารถออกมาภายนอกเซลล์ได้มากกว่าเมื่อไม่เขย่า

4.4.4 องค์ประกอบทางเคมีภายในผนังเซลล์ยีสต์หลังออโตไลซิสที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ

จากผลการทดลองแต่ละภาวะของการย่อยสลายตัวเอง มีผลทำให้ปริมาณองค์ประกอบต่าง ๆ ในส่วนของผนังเซลล์มีปริมาณลดลง การเลือกใช้ภาวะในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่อุณหภูมิ 50 °C เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณองค์ประกอบต่าง ๆ ในส่วนของผนังเซลล์มีปริมาณที่แตกต่างกัน และที่ภาวะดังกล่าวโปรตีนในส่วนของผนังเซลล์มีปริมาณน้อยที่สุด คือ 35.62% (w/w) ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีการสูญเสียไม่แตกต่างจากภาวะที่ใช้อุณหภูมิ 45 °C เวลาในช่วง 12-24 ชั่วโมง มีค่าอยู่ในช่วง 57.65-57.86% (w/w) ปริมาณไขมันและเถ้ามีค่าเท่ากับ

3.83 และ 3.90% (w/w) ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณที่ลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ยีสต์ก่อนนำมาทำการย่อยสลาย เนื่องจากในการย่อยสลายตัวเองมีผลให้โครงสร้างผนังเซลล์ถูกทำลาย จึงทำให้เกิดการสูญเสียองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ยีสต์ (ดังแสดงในตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ยีสต์ภายหลังการย่อยสลายตัวเองที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ

ภาวะ	โปรตีน (%w/w)(db)	คาร์โบไฮเดรต (กลูโคส) (%w/w)(db)	ไขมัน (%w/w)(db)	เถ้า (%w/w)(db)
45 ^{0}C , 12 hr.	41.20 ± 0.31^a	57.85 ± 0.60^a	4.46 ± 0.10^a	4.80 ± 0.37^a
45 ^{0}C , 24 hr	39.16 ± 0.51^b	57.73 ± 0.60^a	4.28 ± 0.09^{ab}	4.70 ± 0.35^a
45 ^{0}C , 48 hr	37.33 ± 0.26^c	56.94 ± 0.85^b	4.07 ± 0.16^{bc}	4.63 ± 0.38^a
50 ^{0}C , 12 hr	37.21 ± 0.64^c	57.80 ± 0.48^a	4.33 ± 0.08^{ab}	3.55 ± 0.19^b
50 ^{0}C , 24 hr	35.62 ± 0.54^f	57.65 ± 0.59^a	3.83 ± 0.19^{cd}	3.90 ± 0.17^b
50 ^{0}C , 48 hr	35.97 ± 0.46^e	56.86 ± 0.79^b	3.58 ± 0.11^{de}	3.54 ± 0.18^d
60 ^{0}C , 12 hr	37.37 ± 0.63^c	56.63 ± 0.80^{bc}	3.53 ± 0.13^{de}	3.46 ± 0.18^b
60 ^{0}C , 24 hr	36.81 ± 0.87^d	56.24 ± 0.52^{cd}	3.37 ± 0.18^{ef}	3.54 ± 0.15^b
60 ^{0}C , 48 hr	35.31 ± 0.24^{ef}	55.77 ± 0.71^d	3.39 ± 0.08^{ef}	3.24 ± 0.10^{bc}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

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

ส่วนปริมาณเบต้ากลูแคนในส่วนผนังเซลล์ภายหลังการย่อยสลาย ที่ภาวะอุณหภูมิ 50^{0}C เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีปริมาณเบต้ากลูแคนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) และพบว่ามีปริมาณมากที่สุด คือ 35.72 และ 36.59% (w/w) ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ยีสต์ถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ ทำให้เบต้ากลูแคนมีความบริสุทธิ์มากขึ้น (ดังแสดงในตารางที่ 4.5) การทดลองขั้นต่อไปจะเป็นการสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำในผนังเซลล์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเองโดยการสกัดด้วยน้ำร้อน ซึ่งเป็นภาวะในการสกัดที่ไม่รุนแรง

ตารางที่ 4.5 ปริมาณเบต้ากลูแคนที่พบในผนังเซลล์ภายหลังการย่อยสลายตัวเองที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ

ภาวะ	กลูแคนทั้งหมด (% w/w) (db)	เบต้ากลูแคน (% w/w) (db)	แอลฟากลูแคน (% w/w) (db)
45 °C , 12 hr.	30.68±0.11^{d}	29.64±0.24^{d}	1.04±0.02^{a}
45 °C , 24 hr	31.08±0.21^{cd}	30.34±0.28^{cd}	0.74±0.01^{cd}
45 °C , 48 hr	33.24±0.14^{c}	32.63±0.11^{c}	0.61±0.02^{d}
50 °C , 12 hr	34.03±0.16^{bc}	33.31±1.03^{bc}	0.72±0.03^{c}
50 °C , 24 hr	36.81±0.12^{a}	35.72±0.28^{a}	1.09±0.01^{a}
50 °C , 48 hr	37.34±0.22^{a}	36.59±0.19^{a}	0.75±0.04^{c}
60 °C , 12 hr	32.41±0.13^{cd}	31.65±0.13^{cd}	0.76±0.02^{c}
60 °C , 24 hr	34.00±0.15^{bc}	32.96±0.15^{bc}	1.05±0.02^{a}
60 °C , 48 hr	33.42±0.12^{c}	32.58±0.17^{c}	0.84±0.03^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

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

4.5 การสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำจากผนังเซลล์ยีสต์ด้วยน้ำร้อน

ขั้นตอนต่อมาได้ทดลองแปรเวลาในการสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำด้วยน้ำร้อน ใช้เวลาสกัด 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง โดยเตรียมสารแขวนลอยของผนังเซลล์ยีสต์ (10% w/v) ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ด้วย 0.1 M NaOH นำมาให้ความร้อนภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 45 °C แยกส่วนผนังเซลล์โดยนำไปปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 8,000 xg เป็นเวลา 15 นาทีและนำส่วนผนังเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

จากผลการทดลองสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำจากผนังเซลล์ โดยการสกัดด้วยน้ำร้อน (ดังแสดงในตารางที่ 4.6) พบว่า เวลาที่ใช้ในการสกัดทั้งหมด 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 121 °C มีผลทำให้โปรตีนในผนังเซลล์มีปริมาณลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1-4 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 30.76, 24.11, 19.48 และ 17.54% (w/w) ตามลำดับ และในชั่วโมงที่ 5 ปริมาณโปรตีนมีค่าไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 4 ($p>0.5$) คือมีค่าเท่ากับ 17.03% (w/w) ในการสกัดโปรตีนมีผลทำให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีค่าเพิ่มขึ้น โดยในชั่วโมงที่ 1-4 คาร์โบไฮเดรตมีปริมาณเท่ากับ 59.43, 64.45, 66.67 และ 74.95% (w/w) ตามลำดับ และในชั่วโมงที่ 5 คาร์โบไฮเดรตมีปริมาณไม่

แตกต่างกับชั่วโมงที่ 4 ($p>0.5$) มีค่าเท่ากับ 74.21% (w/w) ส่วนปริมาณไขมันและปริมาณเถ้า พบว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนในชั่วโมงที่1-5 มีผลทำให้ไขมันและเถ้ามีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) คือ ปริมาณไขมันมีค่าอยู่ในช่วง 3.49-3.80% (w/w) และปริมาณเถ้ามีค่าอยู่ในช่วง 4.09-4.67% (w/w)

ตารางที่ 4.6 องค์ประกอบทางเคมีภายในผนังเซลล์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเองและหลังจากสกัดด้วยน้ำร้อนที่ระยะเวลาที่ต่างกัน

เวลา (ชม.)	โปรตีน (%w/w) (db)	คาร์โบไฮเดรต (กลูโคส) (%w/w) (db)	ไขมัน (%w/w) (db)	เถ้า (%w/w)(db)
1	30.67±0.11^{a}	59.43±0.19^{c}	3.80±0.11^{a}	4.67±0.19^{c}
2	24.11±0.16^{b}	64.45±0.28^{bc}	3.78±0.16^{b}	4.45±0.28^{bc}
3	19.48±0.21^{c}	66.67±0.20^{b}	3.65±0.21^{c}	4.41±0.20^{b}
4	17.54±0.13^{d}	74.95±1.53^{a}	3.52±0.12^{d}	4.11±0.20^{a}
5	17.03±0.15^{d}	74.21±0.08^{a}	3.49±0.15^{d}	4.09±0.08^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
a,b,c,...ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ส่วนปริมาณเบต้ากลูแคนในผนังเซลล์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเอง และผ่านการสกัดโปรตีนด้วยน้ำร้อน พบว่าในการสกัดโปรตีนด้วยน้ำร้อนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1-4 มีผลทำให้ปริมาณเบต้ากลูแคนมีค่าเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกับปริมาณคาร์โบไฮเดรต คือเท่ากับ 43.12, 44.45, 46.67 และ 49.92% (w/w) และในชั่วโมงที่ 5 ปริมาณเบต้ากลูแคนมีค่าไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 4 ($p>0.5$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 50.21% (w/w) (ดังแสดงในตารางที่ 4.7)

ตารางที่4.7 ปริมาณเบต้ากลูแคนภายในผนังเซลล์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเองและหลังจากสกัดโปรตีนด้วยน้ำร้อนในระยะเวลาที่ต่างกัน

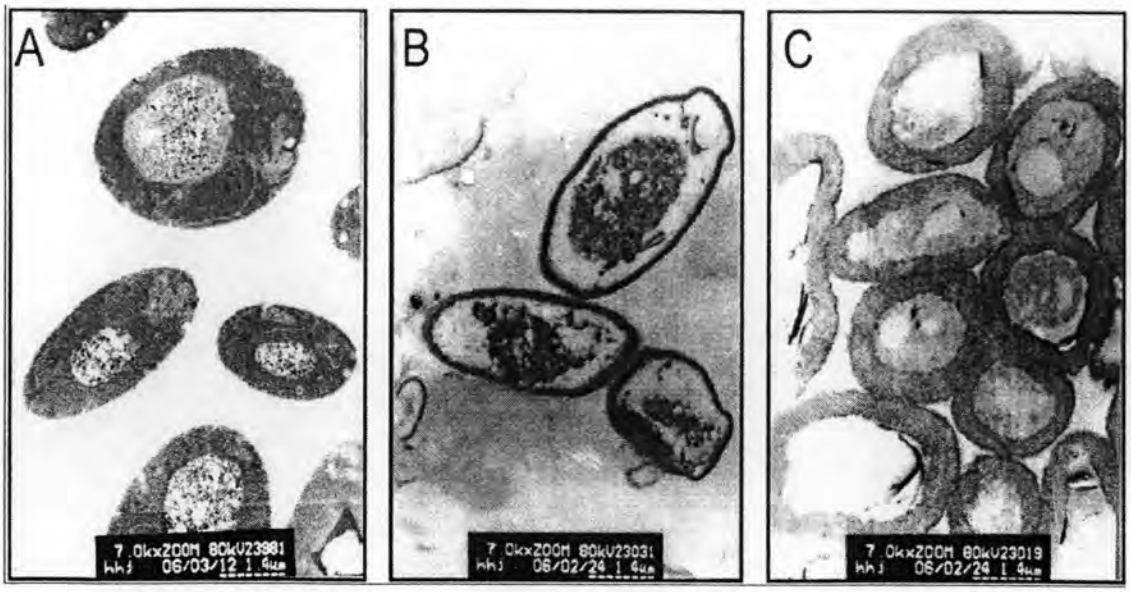
เวลา (ชม.)	กลูแคนทั้งหมด (%w/w)(db)	เบต้ากลูแคน (%w/w)(db)	แอลฟากลูแคน (%w/w)(db)
1	43.89±1.02^{c}	43.12±0.19^{c}	0.77±0.04^{a}
2	45.18±1.10^{bc}	44.45±0.28^{bc}	0.73±0.01^{a}
3	47.30±0.69^{b}	46.67±0.20^{b}	0.63±0.03^{b}
4	50.53±0.54^{a}	49.92±0.13^{a}	0.61±0.04^{b}
5	50.75±0.36^{a}	50.21±0.08^{a}	0.54±0.01^{c}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

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

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ในการสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำโดยใช้น้ำร้อนใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมงก็เพียงพอในการแยกโปรตีนออกจากผนังเซลล์ การสกัดด้วยน้ำร้อนจะทำให้โครงสร้างของผนังเซลล์บางส่วนถูกทำลาย และทำให้น้ำสามารถเข้าไปละลายองค์ประกอบอื่น ๆ ที่แทรกตัวอยู่ในผนังเซลล์ โปรตีนที่สกัดได้เป็นส่วนของแมนโนโปรตีน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผิวรอบนอกของผนังเซลล์ยีสต์ มีสมบัติในการปกป้องเซลล์ โดยพบประมาณ 40% (Jigami และ Odani,1999) แมนโนโปรตีนมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลแมนโนส เชื่อมกันด้วยพันธะ 1-2, 1-3 และ 1-6 linked α-D-mannopyrannosyl โดยหลังจากสกัดด้วยน้ำร้อนจะมีการปั่นแยกตะกอนเซลล์(ผนังเซลล์) แมนโนโปรตีนจะละลายอยู่ในส่วนสารละลายใส (supernatant) สามารถตกตะกอนด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 70% (w/w) เพื่อแยกส่วนของแมนโนโปรตีนและนำมาใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (Cameron, Cooper และ Neufeld, 1988) Freimund และคณะ (2003) ศึกษาการสกัดกลูแคนจาก Baker's yeast, *S.cerevisiae* โดยการใช้น้ำร้อนสกัดองค์ประกอบที่สามารถละลายน้ำได้ของผนังเซลล์ยีสต์ พบว่าที่อุณหภูมิ 125 °C เวลาในการสกัด 5 ชั่วโมง เป็นภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนโดยสามารถสกัดโปรตีนได้ 80% ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด และ 60% ของโปรตีนที่สกัดออกมาทั้งหมดเป็นส่วนของแมนโนโปรตีน และจากงานวิจัยของ Liu และคณะ (2006) ศึกษาการสกัดกลูแคนจาก Spent brewer's yeast, *S. cerevisiae* ใช้วิธีการสกัดแยกองค์ประกอบที่ละลายน้ำโดยการสกัดด้วยน้ำร้อน พบว่าที่อุณหภูมิ 121°C เวลาในการ

สกัด 4 ชั่วโมง สามารถสกัดแยกแมนโนโปรตีนออกมาได้ 89% ของปริมาณแมนโนโปรตีนทั้งหมด นอกจากนี้การสกัดแมนโนโปรตีน และโปรตีนอื่นที่ละลายน้ำด้วยน้ำร้อน ยังทำให้เกิดการสูญเสียพอลิแซคคาไรด์อื่น ๆ ด้วย จากงานวิจัยของ Liu และคณะ (2006) ยังพบว่าเมื่อนำส่วนผนังเซลล์มาตรวจด้วย transmission electron microscope พบว่าผนังเซลล์มีความหนาเพิ่มขึ้นจากเดิม 3-4 เท่าเมื่อเทียบกับผนังเซลล์ก่อนนำมาสกัดด้วยน้ำร้อน (ดังแสดงในรูปที่ 4.5) ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อแมนโนโปรตีนถูกสกัดออกไปมีผลทำให้เบต้ากลูแคนที่อยู่ชั้นในสุดมีความสามารถในการดูดซับน้ำมากขึ้น และมีผลทำให้เซลล์มีการพองตัวเพิ่มขึ้น และจากงานวิจัยของ ธัญญารัตน์ ตรีวงศ์และหทัยรัตน์ พระเดชกิ่ง (2547) ศึกษาการสกัดเบต้ากลูแคนด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนร่วมกับการใช้เอนไซม์โปรติเอส เปรียบเทียบวิธีการสกัดเบต้ากลูแคนโดยให้ความร้อนภายใต้ความดันที่ 121 °C เวลา 15 นาที และการต้มสกัดที่ 100 °C เวลา 1 ชั่วโมง พบว่าการให้ความร้อนภายใต้ความดันที่ 121 °C เวลา 15 นาที ที่อัตราส่วนระหว่างเซลล์ยีสต์ต่อน้ำเท่ากับ 1:7 โดยน้ำหนัก ให้ผลการสกัดโปรตีนออกมามากที่สุด และพบว่าในส่วนผนังเซลล์ภายหลังจากการสกัดมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 76.42% และโปรตีนเท่ากับ 23.58% ซึ่งสามารถสกัดโปรตีนออกมาได้มากกว่าการต้มสกัดที่อัตราส่วนระหว่างเซลล์ยีสต์ต่อน้ำเท่ากับ 1:15 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ดีที่สุดสำหรับการต้ม โดยหลังจากต้มสกัดพบคาร์โบไฮเดรตในส่วนผนังเซลล์เท่ากับ 73.27% และโปรตีนเท่ากับ 26.73% จากผลการทดลองเห็นได้ว่าการสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำจากผนังเซลล์ด้วยน้ำร้อนโดยวิธีการให้ความร้อนภายใต้ความดัน ให้ผลผลิตที่มีคุณภาพสูงกว่าการสกัดโดยวิธีการต้ม โดยเหลือโปรตีนในส่วนผนังเซลล์ในปริมาณที่ต่ำกว่า และในการสกัดทั้ง 2 วิธี มีการใช้อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน การสกัดโดยวิธีให้ความร้อนภายใต้ความดันที่ 121 °C เวลา 15 นาที เป็นระบบที่มีการใช้ความดันในการสกัด ซึ่งจะทำให้องค์ประกอบต่าง ๆ ภายในผนังเซลล์ยีสต์สามารถแยกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นภาวะการสกัดที่มีผลทำให้โครงสร้างของสายเบต้ากลูแคนถูกทำลายน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยสารละลายกรดและด่าง (Freimund และคณะ, 2003) อีกทั้งยังช่วยหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายหรือลดการปนเปื้อนของสารเคมี เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร และการสกัดด้วยน้ำยังเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการล้างสารเคมีเมื่อใช้กรดและด่างสกัด (Magnelli และคณะ, 2002)



รูปที่ 4.5 Transmission electron micrograph of obtained materials during induced autolysis and hot water treatment with magnification of 7000x
ที่มา : Liu และคณะ (2006)

4.6 ภาวะที่เหมาะสมของการสกัดโปรตีนจากผนังเซลล์ยีสต์ด้วยเอนไซม์โปรติเอส

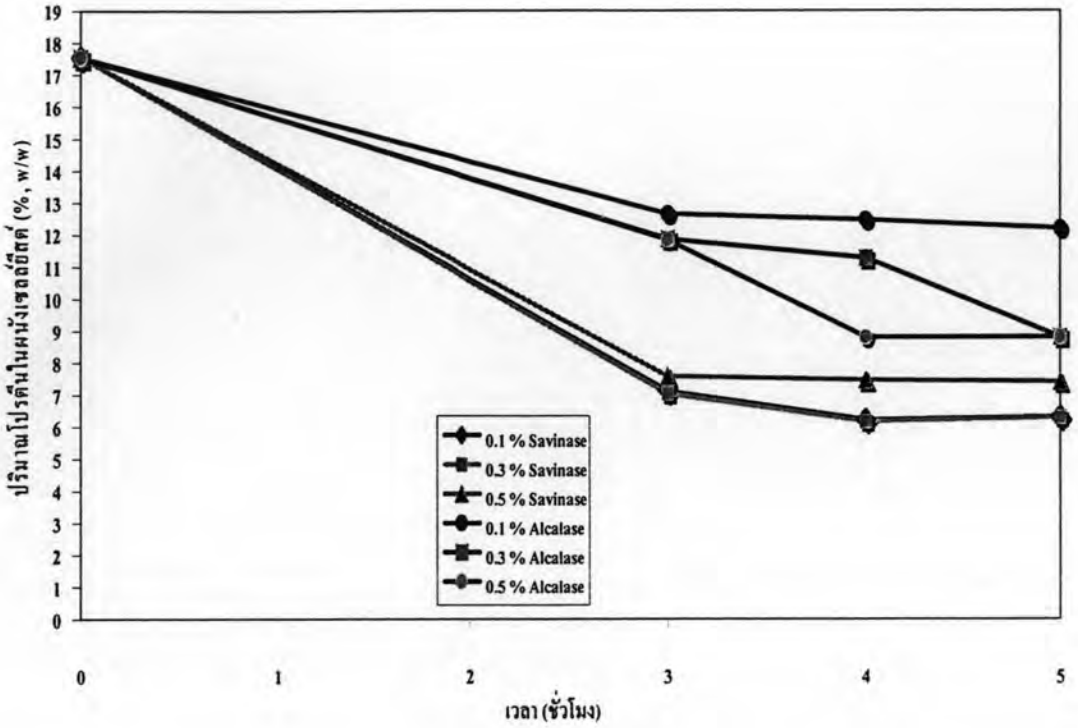
ในขั้นตอนนี้จะทำให้เบต้ากลูแคนมีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยสกัดโปรตีนที่เหลือจากการสกัดด้วยน้ำร้อน ทดลองหาชนิดของเอนไซม์ ปริมาณของเอนไซม์ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน โดยแปรชนิดของเอนไซม์ที่เติมลงในสารแขวนลอยของผนังเซลล์ยีสต์ ดังนี้ คือ Savinase® 16L type EX และ Alcalase® 2.4L โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด เป็นเอนไซม์ที่มีสภาวะในการเร่งปฏิกิริยาที่เหมือนกัน คือ Alkaline protease ชนิด serine protease เนื่องจากมีหมู่ของกรดอะมิโนเซรีน อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site) โดยมีลักษณะการตัดสายยาวของพอลิเปปไทด์ เป็นแบบเอนโดเปปติเดส (endopeptidases) คือ เป็นโปรติเอสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์อย่างสุ่ม (randomly) ภายในสายโปรตีน และมีช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ค่อนข้างกว้างอยู่ระหว่าง 7-11 แปรปริมาณเอนไซม์ที่ใช้อยู่ในระดับ 0.1, 0.3 และ 0.5% (w/v) และเวลาในการสกัด 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ควบคุมให้เกิดการย่อยสลายโปรตีน โดยการควบคุมภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด จากการทดลองพบว่า ชนิดของเอนไซม์ ปริมาณของเอนไซม์ และระยะเวลาที่ใช้ มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่ย่อยสลายออกมาอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.6.1 การสกัดโปรตีนในผนังเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเอง และผ่านการสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำด้วยน้ำร้อนและสกัดโปรตีนส่วนที่เหลือด้วยเอนไซม์ Savinase®

เมื่อพิจารณาภาวะในการสกัดโปรตีนในผนังเซลล์ยีสต์ด้วยเอนไซม์ Savinase® พบว่า ปริมาณเอนไซม์ และระยะเวลาที่ใช้ มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่ย่อยสลายออกมาอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ดังแสดงในรูปที่4.6) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนจากการย่อยสลาย พบว่าเอนไซม์ Savinase® ที่ระดับความเข้มข้น 0.1% (w/v) เวลาในการสกัด 4 และ 5 ชั่วโมง และที่ระดับความเข้มข้น 0.3% (w/v) เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมงและ 5 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนในผนังเซลล์มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) คือ มีค่าอยู่ในช่วง 6.18 - 6.31% (w/w) และเป็นช่วงที่พบปริมาณโปรตีนในผนังเซลล์น้อยที่สุด และที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.5% (w/v) เวลาในการสกัด 3 ชั่วโมง พบปริมาณโปรตีนมีค่าสูงที่สุด คือ 7.59%(w/w) และที่เวลา 4 และ 5 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) คือมีค่าเท่ากับ 7.48 และ 7.42% (w/w) ตามลำดับ ดังนั้น ภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ Savinase® ควรใช้ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.3% (w/w) ที่เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง แต่ทั้งนี้ในการเลือกระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ต้องพิจารณาปริมาณเบต้ากลูแคนที่ได้ด้วย

4.6.2 การสกัดโปรตีนในผนังเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเอง และผ่านการสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำด้วยน้ำร้อนและสกัดโปรตีนส่วนที่เหลือด้วยเอนไซม์ Alcalase®

เมื่อพิจารณาภาวะในการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ เวลาในการสกัด และอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการสกัด มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่ย่อยสลายออกมาอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ดังแสดงในรูปที่ 4.6) จากการทดลอง พบว่าเอนไซม์ Alcalase® ที่ระดับความเข้มข้น 0.3% (w/v) เวลาในการสกัด 5 ชั่วโมง และที่ระดับความเข้มข้น 0.5% (w/v) เวลาในการสกัด 4 และ 5 ชั่วโมง พบปริมาณโปรตีนในผนังเซลล์มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 8.81% (w/w) และพบว่าปริมาณโปรตีนในผนังเซลล์มีค่าน้อยที่สุด หลังจากการสกัดในชั่วโมงที่ 4 เอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.3% (w/v) ปริมาณโปรตีนในผนังเซลล์มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ต่ำจะทำให้โปรตีนถูกสกัดออกมาได้น้อย หรือพบโปรตีนในผนังเซลล์มีปริมาณสูง คือ ที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.1% (w/v) จะพบโปรตีนในส่วนผนังเซลล์มีปริมาณมากกว่าเมื่อใช้เอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้น 0.3% (w/v)



รูปที่ 4.6 ปริมาณโปรตีนในผนังเซลล์ยีสต์หลังจากการย่อยสลายตัวเอง ผ่านการสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำด้วยน้ำร้อน และหลังจากสกัดโปรตีนส่วนที่เหลือด้วยเอนไซม์ Savinase® และ Alcalase® ที่เวลาต่าง ๆ

ในกระบวนการสกัดเบต้ากลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์ วิธีที่นิยมใช้คือ การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในการกำจัดโปรตีนและพอลิแซคคาไรด์ ที่ละลายในสารละลายด่าง แต่มีข้อเสียคือ สารละลายด่างและกรดจะมีผลต่อโครงสร้างของเบต้ากลูแคน ต่อมาจึงได้มีการดัดแปลงการย่อยสลายโปรตีนด้วยการใช้เอนไซม์ต่าง ๆ เช่น เอนไซม์โปรติเอส ซึ่งเอนไซม์จะทำหน้าที่สกัดโปรตีนส่วนที่ไม่สามารถสกัดออกมาได้ด้วยน้ำร้อน เนื่องจากเอนไซม์มีสมบัติที่สามารถย่อยสลายองค์ประกอบต่าง ๆ ที่เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ๆ ภายในเซลล์ยีสต์ให้อยู่ในรูปโมเลกุลเล็ก ๆ สามารถละลายน้ำได้ และเอนไซม์ที่เลือกใช้สกัดโปรตีนในงานวิจัยนี้ต้องการที่จะทำให้เบต้ากลูแคนในผนังเซลล์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยไม่ได้คำนึงถึงลักษณะของโปรตีนที่ถูกสกัดออกมา จึงเลือกใช้เอนไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส หลังจากการสกัดโปรตีนในผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ Savinase® พบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 2 ระดับคือ 0.1 และ 0.3% (w/v) เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง พบปริมาณโปรตีนในผนังเซลล์มีค่าน้อยที่สุด (ดังแสดงในตารางที่ 4.8) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคนในผนังเซลล์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.1 และ

0.3% (w/v) มีปริมาณที่แตกต่างกัน โดยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.1% (w/v) เบต้ากลูแคนมีปริมาณ 81.45% (w/w) และที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.3% (w/v) เบต้ากลูแคนมีปริมาณ 82.44% (w/w) ซึ่งความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.1% (w/v) มีปริมาณเบต้ากลูแคนน้อยกว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.3% (w/v) (แสดงดังตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.8 ปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในผนังเซลล์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเอง ผ่านการสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำด้วยน้ำร้อน และผ่านการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสแต่ละชนิด ที่เวลาต่าง ๆ

ภาวะ	โปรตีน (%w/w)(db)	คาร์โบไฮเดรต (กลูโคส) (%w/w)(db)
0.1 % Savinase®, 4 hr	6.23±0.01^{b}	89.43±0.19^{a}
0.3 % Savinase®, 4 hr	6.18±0.01^{b}	87.45±0.28^{b}
0.3 % Alcalase®, 5 hr	8.81±0.01^{a}	84.67±0.20^{c}
0.5 % Alcalase®, 4 hr	8.81±0.02^{a}	84.95±1.03^{c}
0.5 % Alcalase®, 5 hr	8.81±0.03^{a}	84.37±0.24^{c}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ, , ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

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

ตารางที่ 4.9 ปริมาณสารสกัดเบต้ากลูแคนในผนังเซลล์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเอง ผ่านการสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำด้วยน้ำร้อน และผ่านการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ Savinase® ที่เวลาต่าง ๆ

ภาวะ	กลูแคนทั้งหมด (%, w/w)	เบต้ากลูแคน (%, w/w)	แอลฟากลูแคน (%, w/w)
0.1 %, 3 hr	76.93±0.12^{d}	75.87±0.35^{d}	1.06±0.09^{a}
0.1 %, 4 hr	83.31±0.14^{a}	81.45±0.58^{b}	0.86±0.02^{bc}
0.1 %, 5 hr	82.03±0.14^{b}	81.09±1.05^{b}	0.94±0.02^{ab}
0.3 %, 3 hr	76.75±0.16^{d}	76.01±0.75^{d}	0.74±0.02^{cde}
0.3 %, 4 hr	83.06±0.12^{a}	82.44±0.61^{a}	0.62±0.02^{e}
0.3 %, 5 hr	81.84±0.23^{ab}	81.13±1.06^{b}	0.71±0.01^{de}
0.5 %, 3 hr	76.72±0.13^{cd}	75.98±0.25^{d}	0.74±0.05^{cde}
0.5 %, 4 hr	78.61±0.17^{bc}	77.85±0.33^{c}	0.76±0.05^{cd}
0.5 %, 5 hr	77.65±0.12^{c}	76.81±0.17^{cd}	0.84±0.10^{bcd}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
a,b,c,... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณเบต้ากลูแคนในผนังเซลล์ที่สูญเสียไปคาดว่าเป็นส่วนของ pustulan (1,6-ß-D-glucan) (Freimund และคณะ, 2003) จึงมีผลทำให้เบต้ากลูแคนในผนังเซลล์มีปริมาณลดลง ส่วนปริมาณเบต้ากลูแคนในผนังเซลล์ที่ได้จากการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.3% (w/v) เวลาในการสกัด 5 ชั่วโมง และที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.5% (w/v) เวลาในการสกัด 4 และ 5 ชั่วโมง มีปริมาณเบต้ากลูแคนในผนังเซลล์มากที่สุด และอยู่ในช่วง 76.41-76.88% (w/w) (ดังแสดงในตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.10 ปริมาณสารสกัดเบต้ากลูแคนในผนังเซลล์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเอง ผ่านการสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำด้วยน้ำร้อน และผ่านการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่เวลาต่าง ๆ

ภาวะ	กลูแคนทั้งหมด (%, w/w)	เบต้ากลูแคน (%, w/w)	แอลฟากลูแคน (%, w/w)
0.1 %, 3 hr	63.64±0.21^{e}	63.22±0.17^{e}	0.45±0.01^{a}
0.1 %, 4 hr	64.54±0.14^{e}	64.08±0.28^{de}	0.45±0.04^{bcd}
0.1 %, 5 hr	70.24±0.13^{d}	69.40±0.28^{d}	0.84±0.10^{abc}
0.3 %, 3 hr	71.30±0.16^{c}	70.54±0.22^{c}	0.76±0.05^{bc}
0.3 %, 4 hr	73.03±0.17^{b}	72.41±0.29^{b}	0.62±0.02^{d}
0.3 %, 5 hr	77.27±0.20^{a}	76.41±0.26^{a}	0.86±0.03^{ab}
0.5 %, 3 hr	71.56±0.13^{c}	70.85±0.14^{c}	0.71±0.01^{cd}
0.5 %, 4 hr	77.62±0.17^{bc}	76.88±0.19^{a}	0.74±0.05^{bcd}
0.5 %, 5 hr	77.40±0.12^{c}	76.64±0.12^{a}	0.76±0.06^{bc}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

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

จากการวิเคราะห์ปริมาณไขมันในผนังเซลล์หลังจากสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ พบว่าไขมันในส่วนผนังเซลล์มีปริมาณลดลง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณไขมันที่ลดลงระหว่างการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส อาจเกิดจากปฏิกิริยา saponification ภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง (Freimund และคณะ, 2003) เนื่องจากในการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ต้องมีการปรับค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วงที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดี ซึ่งจากการทดลองเป็นช่วงที่มีค่าเป็นด่าง(ดังแสดงในตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.11 ปริมาณไขมันและเถ้าที่เหลืออยู่ในผนังเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเองผ่านการสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำด้วยน้ำร้อน และผ่านการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสแต่ละชนิด ที่เวลาต่าง ๆ

ภาวะ	ไขมัน (%w/w)(db)	เถ้า (%w/w)(db)
0.1 % Savinase®, 4 hr	3.12±0.03[a]	3.78±0.01[b]
0.3 % Savinase®,4 hr	3.08±0.02[b]	3.85±0.03[a]
0.3 % Alcalase®, 5 hr	3.11±0.12[a]	3.81±0.11[a]
0.5 % Alcalase®, 4 hr	3.06±0.01[b]	3.76±0.02[b]
0.5 % Alcalase®, 5 hr	3.04±0.11[b]	3.78±0.04[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
a,b,c,... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

การใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดในการสกัดโปรตีนจากส่วนผนังเซลล์ยีสต์ พบว่าการใช้เอนไซม์ Savinase® มีประสิทธิภาพดีกว่าเอนไซม์ Alcalase® ทั้งในด้านปริมาณโปรตีนที่พบในสารสกัดเบต้ากลูแคนและปริมาณเบต้ากลูแคนที่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Freimund และคณะ (2003) ที่ศึกษาการสกัดเบต้ากลูแคนจาก Baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* โดยการใช้เอนไซม์โปรติเอสหลายชนิดในการสกัดโปรตีน พบว่า เอนไซม์ Savinase® เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสกัด และภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ pH 10.5 อุณหภูมิ 45°C และหลังจากสกัดโปรตีน พบปริมาณโปรตีนเหลืออยู่ในผนังเซลล์ประมาณ 5% (w/w) ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณผลผลิตเบต้ากลูแคนที่ได้มากขึ้นและมีความบริสุทธิ์ที่สูงขึ้น จากงานวิจัยของ Liu และคณะ (2006) ศึกษาการสกัดเบต้ากลูแคนจาก Spent brewer's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* โดยการใช้เอนไซม์โปรติเอสในการสกัดโปรตีน ได้แก่ Protease 1398, neutrase, Protamex และ FM.2.0L พบว่าเอนไซม์ Protamex มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสกัดโปรตีนออกจากผนังเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 °C ที่ pH 7.5 และใช้เวลาในการสกัดโปรตีน 5 ชั่วโมง โดยหลังจากการสกัดพบปริมาณโปรตีนเหลืออยู่ 4.99% (w/w)

4.7 การสกัดไขมันจากส่วนผนังเซลล์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ

นำส่วนตะกอนผนังเซลล์ยีสต์หลังจากสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส มาสกัดไขมันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน:เมทานอล (4:1) เมทานอลบริสุทธิ์ เอทานอลบริสุทธิ์ เอทานอล (95%) และอะซีโตน โดยใช้อัตราส่วนผนังเซลล์ยีสต์ต่อตัวทำละลายอินทรีย์เท่ากับ 1:4 (w/v) ทำการสกัดภายใต้ภาวะ reflux นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรอง และล้างตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด จำนวน 3 รอบ และทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 °C

จากการทดลองพบว่า ปริมาณไขมันในส่วนของผนังเซลล์ยีสต์ ก่อนนำมาสกัดไขมันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีค่าเท่ากับ 3.08% (w/w) และหลังจากสกัดไขมันภายใต้ภาวะดังกล่าวพบว่าตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด สามารถสกัดไขมันในผนังเซลล์ยีสต์ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ เฮกเซน:เมทานอล เมทานอลบริสุทธิ์ เอทานอลบริสุทธิ์ เอทานอล (95%) และอะซีโตน มีค่าเท่ากับ 0.12, 0.15, 0.29, 0.37 และ 0.38% (w/w) ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 4.12) โดยเฮกเซน:เมทานอล และเมทานอลบริสุทธิ์ หลังจากสกัดพบปริมาณไขมันในผนังเซลล์ยีสต์ มีค่าน้อยที่สุด และมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.5$) ส่วนเมื่อนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ เอทานอล (95%) และอะซีโตน พบปริมาณไขมันในผนังเซลล์ยีสต์มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.5$) ดังนั้นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ดีที่สุดที่ใช้ในการสกัดไขมัน คือ เฮกเซน:เมทานอล (4:1) และเมทานอลบริสุทธิ์ ทั้งนี้เนื่องจากไขมันที่พบในผนังเซลล์ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกฟอสโฟลิปิด โดยโมเลกุลของฟอสโฟลิปิด ประกอบด้วย กลุ่มมีขั้ว และกลุ่มไม่มีขั้ว มีการจัดเรียงตัวในลักษณะเป็น double layer คือ เป็นชั้นของฟอสโฟไลปิด 2 ชั้นเรียงตัวขนานกัน ส่วนที่ไม่มีขั้วซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะหันเข้าหากัน และส่วนมีขั้วมีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) จะหันเข้าหาสิ่งแวดล้อมภายในและภายนอกเซลล์ ดังนั้นการเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขั้วที่แตกต่างกันจะทำให้สามารถสกัดไขมันในผนังเซลล์ยีสต์ได้ดี โดยเฮกเซนเป็นไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและเป็นสารที่มีขั้วต่ำ และเมทานอลซึ่งเป็นสารที่มีขั้วสูง ในงานวิจัยนี้เลือกใช้เมทานอลบริสุทธิ์เพียงอย่างเดียวเพราะสะดวกและประหยัดสารเคมีมากกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ผสม และวิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคน (ดังแสดงในตารางที่ 4.13) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Freimund และคณะ (2003) ที่ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด 9 ชนิดที่ใช้ในการสกัดไขมันจากผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า เฮกเซน:เมทานอล (4:1) และเมทานอลบริสุทธิ์ มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการสกัดไขมัน คือ สามารถสกัดไขมันได้ 100% ส่วนเอทานอลบริสุทธิ์ เอทานอล (95%) และอะซีโตน มีประสิทธิรองลงมา คือ สามารถสกัดไขมันได้ 96-98% และจากงานวิจัยของ Liu และคณะ (2006) ศึกษาการสกัดไขมันในผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการสกัดไขมัน

คือ อะซีโตน โดยหลังจากสกัดไขมันพบปริมาณไขมันในผนังเซลล์เพียงเล็กน้อย ดังนั้นจากรายงานการวิจัยต่าง ๆ พบว่าการเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดไขมัน ควรต้องคำนึงถึงวัตถุประสงค์ของการนำสารสกัดไปใช้ การนำสารสกัดเบต้ากลูแคนไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร ถ้าเลือกตัวทำละลายที่เป็นอันตรายมาใช้ในการสกัดไขมัน เช่น เฮกเซน และเมทานอล เป็นต้น และในขั้นตอนของการสกัดไม่สามารถกำจัดสารเหล่านี้ให้หมดไป อาจทำให้สารตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์และเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้

ตารางที่ 4.12 ปริมาณไขมันในผนังเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเอง ผ่านการสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำด้วยน้ำร้อน ผ่านการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ Savinase® และหลังจากการสกัดไขมันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

ชนิดของสารที่สกัดไขมัน	ปริมาณไขมันในผนังเซลล์ยีสต์หลังจากสกัดไขมัน (%,w/w)
เฮกเซน : เมทานอล (4:1)	0.12 ± 0.02^{a}
เมทานอลบริสุทธิ์	0.15 ± 0.04^{a}
เอทานอลบริสุทธิ์	0.29 ± 0.02^{b}
เอทานอล (95%)	0.37 ± 0.10^{b}
อะซีโตน	0.38 ± 0.05^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
a,b,c,... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ในการสกัดเบต้ากลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเอง ผ่านการสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำด้วยน้ำร้อน ผ่านการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ Savinase® และผ่านการสกัดไขมันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จะได้สารสกัดเบต้ากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์ 85.62%(w/w) และมีปริมาณองค์ประกอบทางเคมีอื่น ๆ คือ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต (กลูโคส) ไขมัน และเถ้า มีค่าเท่ากับ 6.07, 89.15, 1.25 และ 3.67% (w/w) ตามลำดับ

จากวิธีการดำเนินงานวิจัยเพื่อสกัดเบต้ากลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์ (SC 90) สามารถสรุปขั้นตอนต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดเบต้ากลูแคน ปริมาณองค์ประกอบทางเคมี และปริมาณผลผลิตที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 องค์ประกอบทางเคมีในแต่ละขั้นตอนของการสกัดเบต้ากลูแคนจากยีสต์ (SC 90)

Sample	Crude Protein %,(w/w)	Carbohydrate (glucose) %,(w/w)	Glucan %,(w/w)	Fat %,(w/w)	Ash %,(w/w)	Solid* yield
SC	39.61±0.59^{a}	54.27±1.62^{f}	21.39±0.13^{f}	4.90±0.45^{a}	6.98±0.12^{a}	100.00
AC	35.62±0.54^{b}	57.65±1.59^{e}	35.72±0.28^{e}	3.83±0.19^{b}	2.90±0.17^{e}	49.32
HWC	17.54±0.13^{c}	74.95±1.53^{d}	49.92±0.13^{d}	3.52±0.12^{b}	4.11±0.20^{b}	27.29
PC	6.18±0.03^{d}	86.86±1.85^{c}	82.44±1.61^{c}	3.04±0.38^{b}	3.92±0.16^{c}	15.13
DCW	6.07±0.20^{d}	89.15±1.52^{b}	85.62±1.85^{b}	1.25±0.18^{c}	3.67±0.11^{d}	13.21
G	5.52±0.12^{e}	90.81±1.45^{a}	88.94±1.68^{a}	0.12±0.07^{d}	3.65±0.13^{d}	-

หมายเหตุ SC = spent yeast cells, AC = autolyzed yeast cell walls, HWC = autolyzed and hot water treated yeast cell walls, PC= autolyzed , hot water treated and protease treated yeast cell wals, DCW = autolyzed, hot water treated, protease treated and defatted yeast cell walls, G = beta-glucan commercial product (Innovacan®)

a,b,c,...ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) รายงานผลเป็น dry basis, ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ,
ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ * เปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์

4.8 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดเบต้ากลูแคน

สมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดเบต้ากลูแคนจากยีสต์หมักแอลกอฮอล์เปรียบเทียบกับสารสกัดเบต้ากลูแคนจากยีสต์ที่มีจำหน่ายเชิงการค้า (ดังแสดงในตารางที่ 4.14) โดยศึกษาความสามารถในการดูดซับน้ำ (Water holding capacity) ความสามารถในการดูดซับน้ำมัน (Oil holding capacity) และความสามารถในการทำให้ระบบอิมัลชันมีความคงตัว (Emulsion stability)

4.8.1 ความสามารถในการดูดซับน้ำและความสามารถในการดูดซับน้ำมัน

จากผลการทดลองพบว่าความสามารถในการดูดซับน้ำของ ผนังเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการออโตไลซิส (AC) ผนังเซลล์ที่ผ่านการออโตไลซิสและผ่านสกัดด้วยน้ำร้อน (HWC) ผนังเซลล์ที่ผ่านการออโตไลซิส ผ่านการสกัดด้วยน้ำร้อนและผ่านการสกัดด้วยเอนไซม์ (PC) และสารสกัดเบต้ากลูแคนที่ได้จากงานวิจัยนี้ (ผนังเซลล์ที่ผ่านการออโตไลซิส ผ่านการสกัดด้วยน้ำร้อน ผ่านการสกัดด้วยเอนไซม์และผ่านการสกัดไขมัน) (DWC) พบว่า ความสามารถในการดูดซับน้ำมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) คือมีค่าเท่ากับ 3.72, 5.18, 6.03 และ 7.61 (g water / g dry sample) ตามลำดับ ส่วนเบต้ากลูแคนที่จำหน่ายเชิงการค้า (G,Innovacan®) มีความสามารถในการดูดซับน้ำไม่แตกต่างกับเบต้ากลูแคนที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.5$) คือมีค่าเท่ากับ 7.63 (g water / g dry sample) (แสดงดังตารางที่ 4.14) และความสามารถในการดูดซับน้ำมันของ AC, HWC, PC และ DCW พบว่ามีความสามารถในการดูดซับน้ำมันเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) คือมีค่าเท่ากับ 4.31, 6.74, 8.12 และ 9.34 (g oil / g dry sample) ตามลำดับ ส่วนเบต้ากลูแคนที่จำหน่ายเชิงการค้า พบว่ามีความสามารถในการดูดซับน้ำมันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.5$) คือมีค่าเท่ากับ 9.38 (g oil / g dry sample)

4.8.2 ความสามารถทำให้อิมัลชันมีความคงตัว

จากการทดลองในการทำให้เกิดอิมัลชัน โดยผสมตัวอย่างผนังเซลล์ที่ได้จากแต่ละขั้นตอนและสารสกัดเบต้ากลูแคนที่สกัดได้และเบต้ากลูแคนจากยีสต์ที่จำหน่ายเชิงการค้า กับน้ำและเติมน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ whey protein powder เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ กวนผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำไปให้ความร้อน และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง วิเคราะห์ค่าความสามารถในการทำให้ระบบอิมัลชันมีความคงตัว จากผลทดลอง พบว่า ความสามารถทำให้อิมัลชันคงตัวแปรตามความบริสุทธิ์ของเบต้ากลูแคน AC, HWC, PC และ DCW มีค่าความสามารถทำให้อิมัลชันคงตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) คือมีค่าเท่ากับ 63.07, 69.16, 72.84 และ 74.94% (v/v) ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบเบต้ากลูแคนที่ได้จากงานวิจัยกับเบต้ากลูแคนจากยีสต์ที่จำหน่ายเชิงการค้าพบว่า ความคงตัวของอิมัลชันของเบต้ากลูแคนที่ได้จากงานวิจัยมีค่าใกล้เคียงกับเบต้ากลูแคนจากยีสต์ที่จำหน่ายเชิงการค้าอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ดังแสดงในตารางที่ 4.14)

ตารางที่ 4.14 ความสามารถในการดูดซับน้ำ ความสามารถในการดูดซับน้ำมัน และค่าความคงตัวของอิมัลชันของผนังเซลล์ที่ได้จากแต่ละขั้นตอนและสารสกัดเบต้ากลูแคนที่ได้จากงานวิจัยเทียบกับเบต้ากลูแคนจากยีสต์ที่จำหน่ายเชิงการค้า

ตัวอย่าง	สมบัติเชิงหน้าที่		
	ความสามารถในการดูดซับน้ำ (g water / g dry sample)	ความสามารถในการดูดซับน้ำมัน (g oil / g dry sample)	ค่าความคงตัวของอิมัลชัน (%)
AC	3.72±0.08[d]	4.31±0.01[d]	63.07±1.43[e]
HWC	5.18±0.11[c]	6.74±0.05[c]	69.16±1.68[d]
PC	6.03±0.05[b]	8.12±0.02[b]	72.84±1.87[c]
DCW	7.61±0.06[a]	9.34±0.04[a]	74.94±1.73[b]
G	7.63±0.04[a]	9.38±0.01[a]	76.13±1.54[a]

หมายเหตุ AC = autolyzed yeast cell walls, HWC = autolyzed and hot water treated yeast cell walls, PC= autolyzed , hot water treated and protease treated yeast cell walls, DCW = autolyzed, hot water treated, protease treated and defatted yeast cell walls G = beta-glucan commercial product (Innovacan®)
ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยนเบนมาตรฐาน
a,b,c,...ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ในการแยกส่วนผนังเซลล์ยีสต์ด้วยวิธีการย่อยสลายตัวเอง วิธีการสกัดแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ที่ไม่ต้องการจะส่งผลให้เบต้ากลูแคนในผนังเซลล์ยีสต์ที่ได้แต่ละขั้นตอนมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น จึงมีผลทำให้เบต้ากลูแคนมีความสามารถในการดูดซับน้ำและน้ำมันได้ดีขึ้น และจากการทดลอง พบว่าความสามารถในการดูดซับน้ำของเบต้ากลูแคนที่สกัดได้ มีค่าเท่ากับเบต้ากลูแคนที่จำหน่ายเชิงการค้าทั้ง ๆ ที่มีปริมาณเบต้ากลูแคนไม่เท่ากัน ทั้งนี้เพราะความสามารถในการดูดซับน้ำไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณของเบต้ากลูแคนอย่างเดียว แต่ยังขึ้นอยู่กับโครงสร้างของโมเลกุล ขนาด และองค์ประกอบทางเคมีของเบต้ากลูแคนที่มาจากยีสต์ต่างชนิดกัน (Freimund และคณะ, 2003) จากงานวิจัยของ Thammakiti และคณะ (2002) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดเบต้ากลูแคนจากยีสต์ *S. uvarum* ที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเบียร์ ใช้วิธีการแยกผนัง

เซลล์ โดยการย่อยสลายตัวเองร่วมกับการโฮโมจีไนซ์ และเลือกใช้สารละลายด่างและกรดในการสกัดเบต้ากลูแคน ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการดูดซับน้ำของตัวอย่างผนังเซลล์ที่ผ่านการโฮโมจีไนซ์ และไม่ผ่านการโฮโมจีไนซ์ พบว่าผนังเซลล์ที่ผ่านการโฮโมจีไนซ์มีความสามารถในการดูดซับน้ำมากกว่าผนังเซลล์ที่ไม่ผ่านการโฮโมจีไนซ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และเบต้ากลูแคนที่ได้จากผนังเซลล์ที่ผ่านการโฮโมจีไนซ์มีค่าการดูดซับน้ำมากกว่า เบต้ากลูแคนที่ได้จากผนังเซลล์ที่ไม่ผ่านการโฮโมจีไนซ์ และเบต้ากลูแคนที่มีจำหน่ายเชิงการค้า ดังนั้นเทคนิคในการทำให้เซลล์แตกเพื่อแยกส่วนผนังเซลล์มีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัด ส่วนความสามารถในการดูดซับน้ำมัน พบว่าสารสกัดเบต้ากลูแคนที่ผ่านและไม่ผ่านโฮโมจีไนซ์ มีค่าการดูดซับน้ำมันไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.5$) และมีค่าใกล้เคียงกับเบต้ากลูแคนที่จำหน่ายเชิงการค้า โดยสารสกัดที่มีความสามารถในการดูดซับน้ำมันที่สูงประกอบด้วยส่วนที่ไม่มีขั้ว (nonpolar side chain) จับกับสายของไขมัน (Lin และ Humbert, 1974) จากงานวิจัยของ Thammakiti และคณะ (2002) ศึกษาความคงตัวของมายองเนสสูตรแทนที่ไขมันด้วยสารสกัดเบต้ากลูแคน พบว่า การใช้สารสกัดเบต้ากลูแคนแทนที่ไขมันในสูตรมายองเนสมีผลทำให้มายองเนส มีค่าความคงตัวเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดเบต้ากลูแคนทำหน้าที่เป็น stabilizer ในระบบอิมัลชัน และเพิ่มความหนืดให้กับอิมัลชัน โดยมายองเนสมีการแยกชั้นน้อยกว่ามายองเนสสูตรไขมันเต็ม เนื่องมาจากสารสกัดเบต้ากลูแคนมีผลทำให้ความหนืดของเฟสต่อเนื่องเพิ่มขึ้น ดังนั้น อนุภาคของเม็ดน้ำมันถูกขัดขวางโดยอนุภาคเบต้ากลูแคนจึงมีผลทำให้เม็ดน้ำมันมีขนาดเล็ก และเกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มของเม็ดน้ำมัน (Coalescence) น้อยกว่าสูตรไขมันเต็ม และจากงานวิจัย Worrasinchai และคณะ (2005) ศึกษาการแทนที่ไขมันในมายองเนสด้วยเบต้ากลูแคนจากยีสต์ที่ได้จากการหมักเบียร์ที่ระดับ 25, 50 และ 70 พบว่าขนาดเม็ดน้ำมันในมายองเนสสูตรไขมันเต็มมีขนาด 10 ไมครอน ส่วนสูตรทดแทนไขมันที่ระดับ 25, 50 และ 70 เม็ดน้ำมันมีขนาดประมาณ 2-4 ไมครอน ขนาดของเม็ดน้ำมันเล็กลง เนื่องจากอนุภาคเบต้ากลูแคนทำให้ความหนืดของเฟสต่อเนื่องเพิ่มขึ้นและขัดขวางการรวมตัวของเม็ดน้ำมัน สอดคล้องกับ Thammakiti และคณะ (2004) ในการสร้างระบบอิมัลชันเมื่อนำน้ำผสมกับน้ำมันและเติมอิมัลซิไฟเออร์ ถ้าอิมัลชันไม่มีการคงรูปคือมีการแยกชั้น การเติมสารเพิ่มความคงตัว (stabilizer) จะช่วยทำให้ความเสถียรของอิมัลชันดีขึ้น (Burkus และ Temelli, 2000)