

การผลิตปีตากูแคนจากยีสต์ดำ *Aureobasidium thailandense*
และการประยุกต์เป็นส่วนผสมของเยลลี่พรีไบโอติก



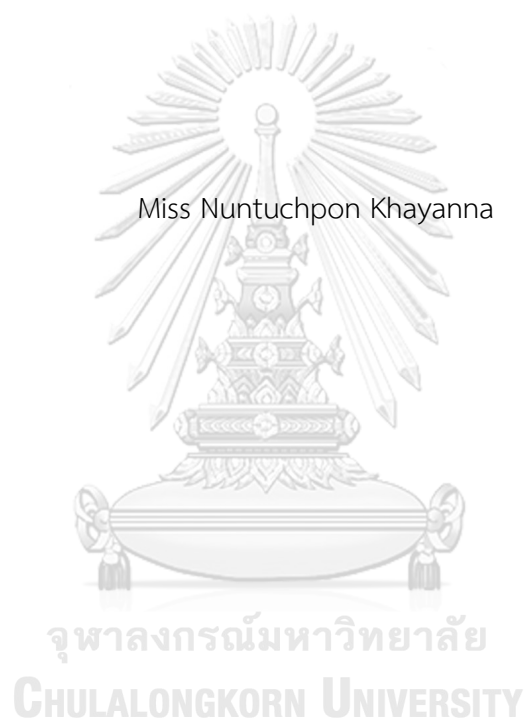
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF β -GLUCAN FROM BLACK YEAST
Aureobasidium thailandense AND ITS APPLICATION AS INGREDIENT
IN PREBIOTIC JELLY

Miss Nuntuchpon Khayanna



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

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตบีตาไกลูแคนจากยีสต์ดำ <i>Aureobasidium thailandense</i>
	และการประยุกต์เป็นส่วนผสมของเยลลี่ฟรียูโอติก
โดย	นางสาวนันทัชพร กำหย่นนะ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร เปรมจิต)

นันทชัยพร ก่าหยั่นนะ : การผลิตบีตาไกลูแคนจากยีสต์ดำ *Aureobasidium thailandense* และการประยุกต์เป็นส่วนผสมของเยลลี่พรีไบโอติก (PRODUCTION OF β -GLUCAN FROM BLACK YEAST *Aureobasidium thailandense* AND ITS APPLICATION AS INGREDIENT IN PREBIOTIC JELLY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.สีหนาท ประสงค์สุข, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์, 86 หน้า.

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบีตาไกลูแคนจาก *Aureobasidium thailandense* NRRL 58543 และศึกษาผลกระทบของน้ำหนักรวมของบีตาไกลูแคนต่อคุณสมบัติพรีไบโอติก และประยุกต์ใช้ในการผลิตเยลลี่ ปริมาณการผลิตบีตาไกลูแคนสูงสุด (37.73 ± 0.15 กรัมต่อลิตร) กับความขาวที่ยอมรับได้ (ดัชนีความขาว ≥ 48) ได้รับหลังจากที่เลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหารสูตร production medium โดยมีโซเดียมไนเตรท ร้อยละ 0.06 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน เสริมด้วยน้ำมันดอกทานตะวันร้อยละ 8.17 (โดยปริมาตรต่อปริมาตร) มีค่า pH เริ่มต้น 6.5 ภายใต้สภาวะการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน บีตาไกลูแคนที่ได้ถูกนำมาย่อยด้วยเอนไซม์บีตาไกลูแคนเนสทางการค้า ได้เป็นบีตาไกลูแคนไฮโดรไลเซตซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและโอลิโกแซ็กคาไรด์ มีน้ำหนักรวมเฉลี่ย 77,720 ดาลตัน ผลได้ของการย่อยบีตาไกลูแคนไฮโดรไลเซตด้วยน้ำย่อยเทียมเป็นเวลา 4 ชั่วโมงคือร้อยละ 26.51 ขณะที่บีตาไกลูแคนดั้งเดิมทนต่อการย่อยได้ นอกจากนี้ยังพบว่าบีตาไกลูแคนดั้งเดิมที่ 2 มิลลิกรัม คาร์บอน/มิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการเติบโตของ *Lactobacillus casei* และ *L. brevis* ได้มากกว่า 1.8 เท่า เมื่อเทียบกับบีตาไกลูแคนไฮโดรไลเซต ภายหลังจากที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง บีตาไกลูแคนดั้งเดิมถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมสำหรับการผลิตเยลลี่ เมื่อนำบีตาไกลูแคนดั้งเดิมที่ความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 0.5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ผสมร่วมกับเยลลี่ พบว่าเป็นที่ยอมรับทางประสาทสัมผัสที่ประกอบด้วย สี ความยืดหยุ่น ความเหนียว และความชอบโดยรวม จากผู้บริโภคจำนวน 30 คน เยลลี่พรีไบโอติกที่ผลิตได้นี้สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้นาน 7 วัน

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5772262023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: AUREOBASIDIUM / β -GLUCAN / PREBIOTIC / JELLY

NUNTUCHPON KHAYANNA: PRODUCTION OF β -GLUCAN FROM BLACK YEAST *Aureobasidium thailandense* AND ITS APPLICATION AS INGREDIENT IN PREBIOTIC JELLY. ADVISOR: ASSOC. PROF. SEHANAT PRASONGSUK, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. INTHAWOOT SUPPAVORASATIT, Ph.D., 86 pp.

The aims of this research were to optimize the β -glucan production from *Aureobasidium thailandense* NRRL 58543 and investigate the effect of β -glucan molecular weight on prebiotic property and its application in jelly production. The maximum yield of β -glucan production (37.73 ± 0.15 g/l) with accepted whiteness (≥ 48 whiteness index) was obtained after cultivation of *A. thailandense* NRRL 58543 in the production medium with 0.06% (w/v) sodium nitrate as nitrogen source supplemented with 8.17% (v/v) sunflower oil with initial pH 6.5 under the condition of shaking at 150 rpm, 25 °C for 4 days. The obtained β -glucan was partially hydrolyzed by commercial β -glucanase and product was comprised of glucose and oligosaccharide in averaged molecular weight of 77,720 Dalton. The hydrolysis yield of partial hydrolyzed β -glucan was 26.51% after incubation in artificial digestive juice for 4 h, while native β -glucan was strongly stable (0%). In addition, native β -glucan at 2 mg carbon/mL was found to enhance the growth of *Lactobacillus casei* and *L. brevis* up to 1.8-fold comparing with partial hydrolyzed β -glucan after incubated for 48 h. The native β -glucan was used to be an ingredient for jelly production. The highest concentration of native β -glucan, at 0.5% (w/v) incorporated with jelly, was accepted for the sensory factors including color, springiness chewiness and overall liking by 30 consumers. The produced prebiotic jelly could be preserved at room temperature for 7 days.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2017

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอกราบ
ขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง
ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์และถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพพรสถิตย์ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และตรวจแก้ต้นฉบับให้ถูกต้องครบถ้วน

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาล หัวหน้าภาควิชาพฤกษศาสตร์
ที่กรุณาเป็นประธานการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล ที่กรุณาเป็นกรรมการ
ในการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร เปรมจิต ที่กรุณาเป็นกรรมการ
(ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก) ในการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่
สนับสนุนงบประมาณในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ และหน่วยปฏิบัติการ
วิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ สมาชิกในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช บุคลากรใน
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ผู้วางรากฐานให้โอกาส
ทางการ ศึกษา และญาติพี่น้องผู้มีอุปการคุณทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ
ที่ดีตลอดมา ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

หน้า

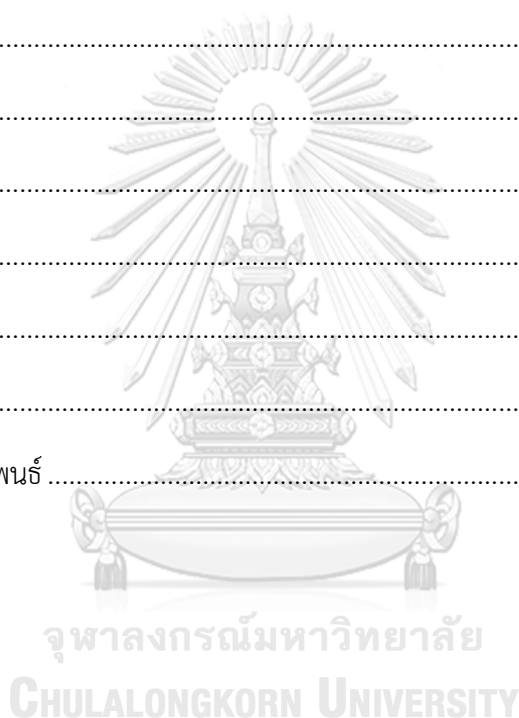
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 <i>Aureobasidium</i> spp.....	4
2.2 การคัดแยก <i>Aureobasidium</i> ในประเทศไทย.....	5
2.3 แหล่งที่อยู่อาศัยของ <i>Aureobasidium</i>	5
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก <i>Aureobasidium</i>	6
2.5 การปนเปื้อนเมลานิน (melanin).....	10
2.6 ปีตากลูแคน.....	10
2.6.1 ปีตากลูแคนจาก <i>A. thailandense</i> NRRL 58543.....	10
2.7 ประโยชน์ของปืตากลูแคน.....	12
2.8 พรไบโอติก (prebiotic).....	13
2.9 โพรไบโอติก (probiotic).....	14
2.10 เยลลี่ (jelly).....	14
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....	16
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยปืตากลูแคน.....	16
3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยเยลลี่.....	16

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยปีตากุลูแคน	17
3.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยเยลลี่.....	18
3.5 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	18
3.6 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	18
3.6.1 เตรียมหัวเชื้อ <i>A. thailandense</i> NRRL 58543.....	18
3.6.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตปีตากุลูแคน	19
3.6.2.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตปีตากุลูแคน	19
3.6.2.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม.....	19
3.6.2.3 ศึกษาแหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสม	20
3.6.2.4 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสม	20
3.6.2.5 ศึกษาผลของ pH เริ่มต้นที่เหมาะสม	21
3.6.2.6 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม	21
3.6.4 ตรวจสอบผลจากการลดขนาดโมเลกุลของปีตากุลูแคน.....	22
3.6.4.1 วิเคราะห์โครงสร้างของปีตากุลูแคนโดยใช้เทคนิค Fourier Transform-Infrared (FT-IR) spectroscopy	22
3.6.4.2 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของปีตากุลูแคนโดยวิธีเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี (gel permeation chromatography, GPC).....	22
3.6.4.3 วัดค่าความหนืด	22
3.6.4.4 ตรวจสอบโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เกิดขึ้น	23
3.6.5 ศึกษาสมบัติฟิสิกส์ของปีตากุลูแคนไฮโดรไลเซท	23
3.6.5.1 ทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส.....	23
3.6.5.2 ทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยกรดในกระเพาะอาหาร.....	24
3.6.5.3 ทดสอบการกระตุ้นการเติบโตของ <i>L. casei</i> และ <i>L. brevis</i>	24

3.6.6	ศึกษาผลของปริมาณปีตากูแคนต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์เยลลี่ฟรีไปโอติก.....	24
3.6.6.1	ศึกษาคุณภาพทางกายภาพ	25
3.6.6.2	ศึกษาคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์	25
3.6.6.3	ศึกษาคุณภาพทางประสาทสัมผัส	25
3.6.7	ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์เยลลี่ฟรีไปโอติก	26
3.6.8	วิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	26
บทที่ 4	ผลการทดลอง.....	27
4.1	ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตปีตากูแคน.....	27
4.1.1	ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตปีตากูแคน	27
4.1.2	แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตปีตากูแคน	28
4.1.3	แหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสมในการผลิตปีตากูแคน.....	29
4.1.4	ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งอาหารเสริมที่ เหมาะสม	30
4.1.5	ค่า pH เริ่มต้นในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตปีตากูแคน	34
4.1.6	อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตปีตากูแคน	35
4.2	การตรวจสอบผลจากการลดขนาดโมเลกุลของปีตากูแคน	36
4.2.1	การวิเคราะห์โครงสร้างของปีตากูแคนโดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy.....	36
4.2.4	การตรวจสอบโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เกิดขึ้น	39
4.3	การศึกษาสมบัติฟรีไปโอติกของปีตากูแคนไฮโดรไลเซท	40
4.3.1	การทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในสภาวะจำลองของระบบทางเดิน อาหาร.....	40
4.3.2	การทดสอบการกระตุ้นการเติบโตของ <i>L. casei</i> และ <i>L. brevis</i>	42

4.4 ผลของปริมาณปีตากลูแคนต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์เยลลี่พรีไบโอติก	44
4.4.1 คุณภาพทางกายภาพ.....	44
4.4.2 คุณภาพทางประสาทสัมผัส.....	45
4.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาของ ผลิตภัณฑ์เยลลี่พรีไบโอติก.....	46
4.5.1 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ.....	46
4.5.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์.....	47
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	49
5.1 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตปีตากลูแคนจาก <i>A. thailandense</i> NRRL 58543	49
5.1.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตปีตากลูแคน	49
5.1.3 แหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสมในการผลิตปีตากลูแคน.....	51
5.1.4 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งอาหารเสริมที่ เหมาะสม	52
5.1.5 ค่า pH เริ่มต้นในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตปีตากลูแคน	52
5.1.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตปีตากลูแคน.....	54
5.2 การลดขนาดโมเลกุลของปีตากลูแคนโดยใช้เอนไซม์.....	54
5.3 การทดสอบสมบัติพรีไบโอติกของปีตากลูแคนไฮโดรไลเซท	55
5.3.1 การทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในสภาวะจำลองของระบบทางเดิน อาหาร.....	55
5.3.2 ทดสอบการกระตุ้นการเติบโตของ <i>L. casei</i> และ <i>L. brevis</i>	56
5.4 ผลของปริมาณปีตากลูแคนต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์เยลลี่พรีไบโอติก	57
5.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์เยลลี่พรีไบโอติก.....	57
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	59

6.1 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตปีตากลูแคนจาก <i>A. thailandense</i> NRRL 58543	59
6.2 ผลของการลดขนาดโมเลกุลของปีตากลูแคนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อประสิทธิภาพในการเป็นพรีไบโอติก	59
6.3 ผลของปริมาณปีตากลูแคนต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์เยลลี่พรีไบโอติก	60
6.4 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์เยลลี่พรีไบโอติก	60
6.6 ข้อเสนอแนะ	60
รายการอ้างอิง	61
ภาคผนวก ก	75
ภาคผนวก ข	80
ภาคผนวก ค	82
ภาคผนวก ง	83
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	86



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 การกำหนดระดับปัจจัย.....	21
ตารางที่ 4.1 ปริมาณปีตากุลแคนและค่าดัชนีความขาวของปีตากุลแคนที่ได้จากการเลี้ยง <i>A. thailandense</i> NRRL 58543 ในอาหารที่แปรผันแหล่งไนโตรเจน	28
ตารางที่ 4.2 ปริมาณปีตากุลแคนและค่าดัชนีความขาวของปีตากุลแคนที่ผลิตโดย <i>A. thailandense</i> NRRL 58543 ที่ใช้แหล่งอาหารเสริมชนิดต่างๆ	30
ตารางที่ 4.3 แผนการทดลองแบบ Box and Behnken Design (BBD) และผลการตอบสนอง (ปริมาณปีตากุลแคน) ต่อปัจจัยที่ศึกษา สำหรับการศึกษความเข้มข้นของแหล่ง คาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสมต่อการผลิต ปีตากุลแคนจาก <i>A. thailandense</i> NRRL 58543.....	32
ตารางที่ 4.4 ปริมาณปีตากุลแคนและค่าดัชนีความขาวของปีตากุลแคนที่ผลิตจาก <i>A. thailandense</i> NRRL 58543 โดยแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	35
ตารางที่ 4.5 ปริมาณปีตากุลแคนและค่าดัชนีความขาวของปีตากุลแคนที่ผลิตจาก <i>A. thailandense</i> NRRL 58543 โดยแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง	36
ตารางที่ 4.6 ตำแหน่งพีคของหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ซึ่งได้จาก FT-IR สเปกตรัมของปีตากุลแคนดั้งเดิม และปีตากุลแคนไฮโดรไลเซต	37
ตารางที่ 4.7 การเติบโตของแบคทีเรีย <i>L. brevis</i> โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ.....	43
ตารางที่ 4.8 การเติบโตของแบคทีเรีย <i>L. casei</i> โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ	43
ตารางที่ 4.9 คุณภาพทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เยลลี่สูตรที่มีปีตากุลแคนร้อยละ 0.25 และ 0.5 และสูตรควบคุมที่ไม่เติมปีตากุลแคน.....	45
ตารางที่ 4.10 คุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เยลลี่สูตรที่มีปีตากุลแคนร้อยละ 0.25 และ 0.5 และสูตรควบคุมที่ไม่เติมปีตากุลแคน	46
ตารางที่ 4.11 คุณภาพทางกายภาพของเยลลี่ฟรีไปโอดีทในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน	47
ตารางที่ 4.12 คุณภาพทางจุลินทรีย์ของเยลลี่ฟรีไปโอดีทในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน	48

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ ก) ออบาซิแดน ข) ปีตากลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543.....11

รูปที่ 4.1 ปริมาณปีตากลูแคนและเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหาร production medium (PM) แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน.....27

รูปที่ 4.2 ปีตากลูแคนที่ผลิตจาก *A. thailandense* NRRL 58543 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิด ก) เปปโตน ข) โซเดียมไนเตรท ค) โพแทสเซียมไนเตรท ง) แอมโมเนียมซัลเฟต จ) แอมโมเนียมออกซาลेट.....29

รูปที่ 4.3 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซูโครสและโซเดียมไนเตรทต่อปริมาณปีตากลูแคน.....33

รูปที่ 4.4 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซูโครสและน้ำมันดอกทานตะวันต่อปริมาณปีตากลูแคน33

รูปที่ 4.5 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทและน้ำมันดอกทานตะวันต่อปริมาณปีตากลูแคน34

รูปที่ 4.6 ปีตากลูแคนที่ผลิตโดย *A. thailandense* NRRL 58543 ที่อุณหภูมิ ก) 25 ข) 28 และ ค) 30 องศาเซลเซียส.....36

รูปที่ 4.7 FT-IR สเปกตรัมของ ก) ปีตากลูแคนดั้งเดิม และ ข) ปีตากลูแคนไฮโดรไลเซท37

รูปที่ 4.8 GPC chromatogram ของปีตากลูแคนไฮโดรไลเซท38

รูปที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงความหนืดของปีตากลูแคนที่ความเข้มข้นที่ต่าง ๆ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน39

รูปที่ 4.10 โครมาโตกราฟี (TLC) ของปีตากลูแคน ซ้ายไปขวา สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (G) สารมาตรฐานน้ำตาลแมนโนส (M) สารมาตรฐานน้ำตาลเซลโลไบโอส (C) ปีตากลูแคนดั้งเดิม (B₀) และปีตากลูแคนไฮโดรไลเซท (B₁)40

- รูปที่ 4.11 ร้อยละการย่อยของบีตากลูแคน เมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส
ภายใต้สภาวะจำลองการย่อยในปาก ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ
บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน41
- รูปที่ 4.12 ร้อยละการย่อยของบีตากลูแคน เมื่อผ่านการย่อยด้วย HCl buffer pH 2.0 ภายใต้
การจำลองสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ
บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน42



บทที่ 1

บทนำ

บีตากลูแคน (β -glucan) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,3-ไกลโคซิดิก พบได้ในธรรมชาติ เช่น ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์ และในจุลินทรีย์จำพวกยีสต์และรา บีตากลูแคนมีบทบาทในการส่งเสริมสุขภาพ จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์และเภสัชกรรม โดยใช้เป็นสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ในด้านความงามใช้เป็นสารลดเลือนริ้วรอย ป้องกันรังสียูวี และให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว ด้านอาหาร ใช้เป็นสารให้ความข้นหนืด สารทดแทนไขมันในอาหารแคลอรีต่ำ สารเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมัน นอกจากนี้บีตากลูแคนยังจัดเป็นพรีไบโอติกชนิดหนึ่ง และถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ (functional food and drink) (Ahmad และคณะ, 2012; Lam และ Chi, 2013; Sarteshnizi และคณะ, 2015) อย่างไรก็ตามความสามารถในการเป็นพรีไบโอติกจะขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล (Gibson, 2004) ซึ่งมีงานวิจัยที่ปรับปรุงประสิทธิภาพของบีตากลูแคนด้วยวิธีลดขนาดพอลิเมอร์ (depolymerization) โดยวิธีต่าง ๆ เช่น การลดขนาดอนุภาคและบดผสมสารด้วยแรงดันสูง (high pressure homogenization) (Laakso และ Lehtinen, 2005) การใช้คลื่นความถี่สูง (sonication) (Tabata และคณะ, 1981; Vårum และคณะ, 1992) การเติมกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) (Kivelä และคณะ, 2009) การย่อยด้วยเอนไซม์ (Jaskari และคณะ, 1998; Shimokawa และคณะ, 1996) และการใช้รังสีแกมมา (Sung และคณะ, 2009) โดยการใช้เอนไซม์จะลดขนาดโมเลกุลของบีตากลูแคนได้อย่างจำเพาะกว่าวิธีอื่น ๆ และเป็นวิธีที่สะดวก เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในอาหารและการแพทย์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วิธีการลดขนาดโมเลกุลของบีตากลูแคนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์

ปัจจุบันการผลิตบีตากลูแคนในระดับอุตสาหกรรมนิยมสกัดจากผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เนื่องจากมีบีตากลูแคนปริมาณมาก เจริญเติบโตเร็ว ใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำ และสามารถควบคุมให้อยู่ในภาวะที่ต้องการได้ โดยการสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์ต้องทำให้เซลล์แตก แล้วสกัดบีตากลูแคนซ้ำหลาย ๆ รอบ ซึ่งการสกัดสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสกัดด้วยกรดและด่าง เป็นวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม โดยมีข้อดีคือเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ใช้เวลาในการสกัดสั้น มีต้นทุนในการผลิตต่ำ แต่มีข้อเสียคือต้องใช้สารเคมีจำนวนมาก มีน้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดปริมาณมาก บีตากลูแคนที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำและโครงสร้างของบีตากลูแคนอาจถูกทำลายบางส่วน ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของบีตากลูแคน นอกจากการใช้กรดและด่างยังมีการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ซึ่งข้อดีของวิธีนี้คือได้ปริมาณผลผลิตสูงกว่าการสกัดด้วยกรดและด่าง แต่ข้อเสียคือใช้เวลานานในการ

สกัด และโครงสร้างของบีตาไกลูแคนบางส่วนถูกทำลาย เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาเหล่านี้จึงมีการคิดค้นวิธีสกัดด้วยน้ำร้อน ซึ่งถือว่าเป็นวิธีสกัดที่ไม่รุนแรง อย่างไรก็ตามพบว่ามิชอบจำกัดในด้านปริมาณผลผลิตที่ได้

Aureobasidium spp. เป็นราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) ที่สามารถผลิตบีตาไกลูแคนได้ด้วยการหลั่งออกมาภายนอกเซลล์แล้วผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแยกบีตาไกลูแคนออกมาได้ง่ายโดยตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ บีตาไกลูแคนที่ได้จึงไม่ปนเปื้อนโปรตีนจากผนังเซลล์ของยีสต์ เนื่องจากไม่ต้องทำให้เซลล์แตกเหมือนวิธีการสกัดบีตาไกลูแคนทั่วไป (Muramatsu และคณะ, 2012) ซึ่งการปนเปื้อนของโปรตีนจากยีสต์มักเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการแพ้ (Van Den Bogaerde และคณะ, 2002)

ในประเทศไทย Manitchotpisit และคณะ (2009) ได้คัดแยก *Aureobasidium* spp. สายพันธุ์เขตร้อนที่ผลิตพุลลูแลนจำนวน 45 สายพันธุ์ และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *Aureobasidium* spp. เหล่านี้ โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS IGS *EF-1* แอลฟา *BT2* และ *RPB2* ร่วมกับการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า 2 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ NRRL 58539 และ NRRL 58543 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์อื่น ๆ อย่างมาก และผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดที่ไม่ใช่พุลลูแลน ภายหลังจากพบว่าเป็นบีตาไกลูแคนที่มีโครงสร้างคล้ายกับออบาซิแดน (aubasidan-like β -glucan) (Lotrakul และคณะ, 2013) สองสายพันธุ์นี้จึงถูกจัดเป็น *A. thailandense* สายพันธุ์ใหม่ (Peterson และคณะ, 2013) Lotrakul และคณะ (2013) ยังศึกษาความสามารถในการผลิตบีตาไกลูแคนจากสองสายพันธุ์นี้ พบว่าสายพันธุ์ NRRL 58543 ผลิตบีตาไกลูแคนได้ดีที่สุดในวันที่ 9 ของการเลี้ยง ได้ปริมาณบีตาไกลูแคน 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งค่อนข้างมีปริมาณน้อย และบีตาไกลูแคนที่ได้มีสีดำเนื่องจากปนเปื้อนกับเม็ดสีเมลานิน (melanin pigment) ที่เชื้อผลิตขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ (Tarabasz และ Galas, 1993) ทำให้บีตาไกลูแคนมีคุณภาพต่ำ ไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ทางการแพทย์และทางอาหาร

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบีตาไกลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 เพื่อให้ได้ผลผลิตบีตาไกลูแคนในปริมาณสูงและลดการปนเปื้อนเมลานิน และศึกษาผลการลดขนาดโมเลกุลของบีตาไกลูแคนโดยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์ ต่อประสิทธิภาพการเป็นพรีไบโอติก รวมถึงศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้บีตาไกลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เยลลี่พรีไบโอติก เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากบีตาไกลูแคนรูปแบบใหม่

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

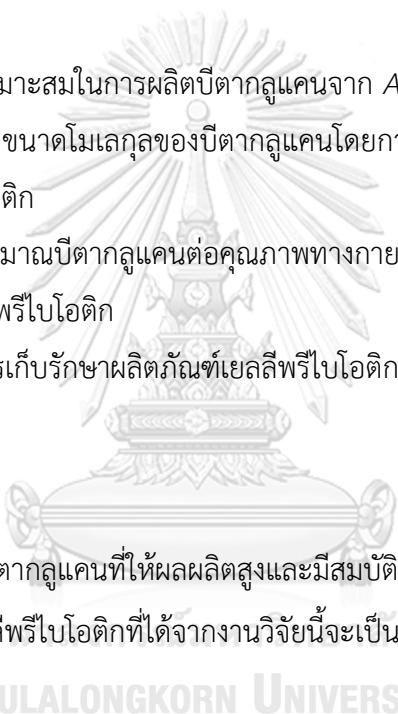
1. เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตปีตากลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL58543
2. เพื่อศึกษาผลการลดขนาดโมเลกุลของปีตากลูแคนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ ต่อประสิทธิภาพการเป็นพรีไบโอติก
3. เพื่อศึกษาผลของการเสริมปีตากลูแคนที่มีต่อคุณภาพทางกายภาพ ทางจุลินทรีย์ และทางประสาทสัมผัสของเยลลี่พรีไบโอติก

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตปีตากลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543
2. ศึกษาผลการลดขนาดโมเลกุลของปีตากลูแคนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ ต่อประสิทธิภาพการเป็นพรีไบโอติก
3. ศึกษาผลของปริมาณปีตากลูแคนต่อคุณภาพทางกายภาพ ทางจุลินทรีย์ และทางประสาทสัมผัสของเยลลี่พรีไบโอติก
4. ประเมินอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เยลลี่พรีไบโอติก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้แหล่งผลิตปีตากลูแคนที่ให้ผลผลิตสูงและมีสมบัติพรีไบโอติก
2. ผลิตภัณฑ์เยลลี่พรีไบโอติกที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพ



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 *Aureobasidium* spp.

แอสโคไมยซีตัสยีสต์สกุล *Aureobasidium* เป็นราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) ที่มีชื่อสามัญว่า ยีสต์ดำ เนื่องจากสามารถผลิตเม็ดสีเมลานิน (melanin pigment) ทำให้โคโลนีมีสีดำ *Aureobasidium* ถูกจัดอยู่ใน Family Aureobasidiaceae ภายใน Class Dothideomycetes (Thambugala และคณะ, 2014; Wijayawardene และคณะ, 2014; Humphries และคณะ, 2017) การจัดจำแนก *Aureobasidium* แต่เดิมนั้นใช้วิธีประกอบกันทั้งทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา เช่น ลักษณะของโคโลนี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (Hermanides-Nijhof, 1977; Zalar และคณะ, 2008) ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ร่วมในการจัดจำแนก โดย Gostinčar และคณะ (2014) จัดจำแนกได้จำนวน 4 ชนิด (species) ได้แก่ *A. pullulans*, *A. melanogenum*, *A. subglaciale* และ *A. namibia* นอกจากนี้ ยังพบชนิดใหม่ที่ถูกจัดจำแนก โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) ได้แก่ *A. leucospermi*, *A. proteae* (Crous และคณะ, 2011), *A. iranimum* (Arzanlou และ Khodaei, 2012) และ *A. thailandense* (Peterson และคณะ, 2013)

A. pullulans เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายและถูกนำมาศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีความสำคัญในอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถผลิตสารหลายชนิด เช่น สารควบคุมทางชีวภาพที่ใช้ในผักและผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว (Zhang และคณะ, 2010; Wachowska และคณะ, 2016) สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและรา (Lotrakul และคณะ, 2009) เป็นแหล่งของโปรตีนเซลล์เดียว (Gao และคณะ, 2007) และมีหลายสายพันธุ์ (strains) ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่สำคัญทางอุตสาหกรรม เช่น เอนไซม์แลคเคส อะไมเลส เซลลูเลส โปรติเอส ไฮดรอลาส และไลเปส เป็นต้น (Kudanga และ Mwenje, 2005; Xiumei และคณะ, 2008; Manitchotpisit และคณะ, 2009; Manitchotpisit และคณะ, 2011; Leathers และคณะ, 2013; Rich และคณะ, 2013) และสามารถผลิตพอลิเมอร์ที่มีชื่อว่าพอลลูแลน ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท (Cheng และคณะ, 2011) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตพอลิมาลิกแอซิด (poly malic acid) (Zou และคณะ, 2013), เฮฟวี่ออยล์ (heavy oil) (Manitchotpisit และคณะ, 2014), ซิเดอโรฟอรั (siderophore) (Wang และคณะ, 2009) และบีตากลูแคน (β -glucan) (Hirabayashi และคณะ, 2016) ได้อีกด้วย

2.2 การคัดแยก *Aureobasidium* ในประเทศไทย

สำหรับในประเทศไทยมีการรายงานการคัดแยก *Aureobasidium* สายพันธุ์เขตร้อนหลายสายพันธุ์จากแหล่งอาศัยที่แตกต่างกัน โดยคัดแยกจากเขตป่าสนเขา (Tokumasu และคณะ, 1997) อากาศ (Punnapayak และคณะ, 2003) ฝิวใบไม้ ผนังทาสีและผนังห้องน้ำ (Lotrakul และคณะ, 2009; Manitchotpsit และคณะ, 2009; Prasongsuk และคณะ, 2005) ซึ่งบางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์เซลเลสและเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดพุลลูแลนได้ในปริมาณมาก (Manitchotpsit และคณะ, 2009)

Manitchotpsit และคณะ (2009) คัดแยก *Aureobasidium* จากแหล่งและสถานที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 45 สายพันธุ์ และศึกษาความสามารถในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ร่วมกับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร production medium (PM) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสายพันธุ์เหล่านี้ สามารถคัดแยกได้เป็น 12 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 12 ซึ่งประกอบด้วยสายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากกลุ่มอื่น ๆ มาก เมื่อตรวจสอบโครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่สายพันธุ์นี้ผลิตด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR) พบว่ามีโครงสร้างที่แตกต่างกับพุลลูแลนมาตรฐาน เนื่องจากไม่พบพันธะแอลฟา-1,4 และพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิก จึงรายงานว่าเป็นเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดที่ไม่ใช่พุลลูแลน (non pullulan) และสรุปว่าสายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 อาจไม่ใช่ชนิด *A. pullulans* จึงมีการศึกษาเพิ่มเติมจาก Lotrakul และคณะ (2013) จึงพบว่าสายพันธุ์นี้ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดปีตาไกลูแคนที่มีโครงสร้างคล้ายกับออบาซิแดน (aubasidan-like β -glucan) โดยศึกษาด้วย Fourier Transform- Infrared (FT-IR) spectroscopy พบความถี่ของพันธะปีตา-ไกลโคซิดิก ที่ตำแหน่ง 887.49 และ 887.61 เซนติเมตร⁻¹ ตามลำดับ ซึ่งคล้ายกับออบาซิแดนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* var. *aubasidani* (Yurlova และ De Hoog, 1997) ต่อมา Peterson และคณะ (2013) รายงานว่าสายพันธุ์นี้คือ *A. thailandense* สายพันธุ์ใหม่

2.3 แหล่งที่อยู่อาศัยของ *Aureobasidium*

ราชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยเฉพาะบริเวณผิวของใบพืช (phyllosphere) ซึ่งเป็นเชื้อที่อาจก่อโรคในพืช นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในบริเวณอื่น ๆ อีก เช่น ในดิน บริเวณปากแม่น้ำ น้ำทะเล ตะกอนในมหาสมุทร หินปูน หญ้าแห้ง หน่อไม้ หิน เศษฟาง หรือบริเวณที่มีความชื้นสูง เช่น ผนังห้องน้ำ ม่านห้องน้ำ ห้องครัว ขอบหน้าต่าง เป็นต้น (Deshpande และคณะ, 1992) และพบ

ได้ในแถบประเทศเขตอบอุ่น เช่น อังกฤษ อลาสกา แอนตาร์กติกา เดนมาร์ก เยอรมนี เนเธอร์แลนด์ โปแลนด์ ออสเตรีย รัสเซีย และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น บริเวณแถบประเทศในเขตทะเลเมดิเตอร์เรเนียนและเขตแห้งแล้ง เช่น อิตาลี ฝรั่งเศส อียิปต์ อิรัก ปากีสถาน และ อัฟริกาใต้ เป็นต้น หรือในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน เช่น บราซิล อินเดีย จีน ไทย มาเลเซีย และจาไมกา เป็นต้น รวมทั้งในเขตขั้วโลกเหนือ เช่น นอร์เวย์ (Gaur และคณะ, 2010; Zalar และคณะ, 2008).

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium*

พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในผนังเซลล์ของ *Aureobasidium* เช่น พูลูลูแลนและปีตากลูแคน ซึ่งถูกผลิตเมื่อเซลล์ยีสต์มีการแตกหน่อใหม่ และหากต้องการให้มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณมาก จึงต้องเพิ่มการเจริญของเซลล์ให้มีปริมาณมาก ๆ ซึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญของ *Aureobasidium* แบ่งได้เป็น 6 ปัจจัยหลัก ดังนี้

1.) แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium* จากงานวิจัยได้มีการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เช่น กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส แรมโนส กาแลคโตส แลคโตส เซลโลไบโอส และมอลโตส เป็นต้น ซึ่งพบว่าน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium* ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส จากการศึกษาดังต่อไปนี้

Punnapayak และคณะ (2003) ได้ศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* ที่คัดแยกได้จากอากาศในเขตกรุงเทพมหานคร พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดคือกลูโคส เช่นเดียวกับรายงานของ Duan และคณะ (2008) พบว่าน้ำตาลที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* Y68 คือกลูโคส เมื่อเทียบกับน้ำตาลอื่น ๆ ได้แก่ ซูโครส ฟรุคโตส ไฮโลส มอลโตส และเดกซ์ทริน และรายงานของ Ravella และคณะ (2010) เปรียบเทียบผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแหล่งคาร์บอน 5 แหล่ง ได้แก่ ซูโครส กลูโคส ไฮโลส ฟรุคโตส และเซลโลไบโอส พบว่า ซูโครสให้ผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 50.9 กรัมต่อลิตร และ Prasongsuk และคณะ (2007) ศึกษาลักษณะการผลิตพูลูลูแลนจาก *A. pullulans* ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRM2 ให้ผลผลิตพูลูลูแลนสูงสุด 25.2 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจน เช่นเดียวกับ Lotrakul และคณะ (2013) ที่ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนของ *A. thailandense* NRRL 58539 และ NRRL 58543 พบว่าสามารถผลิตปีตากลูแคนได้ปริมาณสูงสุด 0.85 ± 0.00 และ 3.21 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

2.) แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตและผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* ก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน ดังในรายงานของ Ravella และคณะ (2010) พบว่าการใช้ โซเดียมไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถเพิ่มการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับ corn steep liquor ยูเรีย และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยผลิตได้สูงถึง 54.7 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังมีแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ที่เหมาะสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ดังงานวิจัยของ Gaur และ Singh (2010) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยเปรียบเทียบจาก 5 แหล่ง ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัด โซเดียมไนเตรท โซเดียมไนไตรท์ และฮีสทิดีน ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 0.5 ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด ได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 37.1 ± 0.8 กรัมต่อลิตร และ Yurlova และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดที่มีโครงสร้างคล้ายกับออบาซิแดน (aubasidan-like exopolysaccharide) จาก *A. pullulans* var. *aubasidani* รายงานว่าสามารถใช้โซเดียมไนเตรทในการผลิตได้ดีที่สุดในขณะที่ *A. pullulans* var. *pullulans* จะสามารถใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตพุลลูแลนได้ดีที่สุด คล้ายกับงานวิจัยของ Lotrakul และคณะ (2013) ที่รายงานว่ *A. thailandense* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 สามารถใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีที่สุดสำหรับผลิตปีตากลูแคน นอกจากนี้ชนิดของแหล่งไนโตรเจน ระดับของไนโตรเจนก็มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium* โดยพบว่าถ้ามีปริมาณไนโตรเจนที่จำกัดจะช่วยส่งเสริมการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เนื่องจากเชื้อจะใช้แหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แทนการใช้สำหรับเจริญเติบโต (Bulmer และคณะ, 1987; Seo และคณะ, 2004)

3.) ค่า pH

pH ที่เหมาะสมมีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* โดยระหว่างการเลี้ยงเชื้อ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลง เนื่องจากการผลิตกรดอินทรีย์ในระหว่างการเจริญเติบโต ซึ่งระดับ pH เริ่มต้น 2.5 พบว่ามีผลยับยั้งการผลิตพุลลูแลน แต่มีผลไปกระตุ้นการผลิตปีตากลูแคน (Prasongsuk และคณะ, 2007; Wu และคณะ, 2009; Gaur และ Singh, 2010; Shingel, 2004) Cheng และคณะ (2011) ศึกษาผลกระทบของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* โดยระยะแรกปรับระดับ pH เริ่มต้นที่ 2 และเปลี่ยนเป็น 5 ในวันที่ 3 พบว่าระยะแรกที่มี pH เป็น 2 มีการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณน้อยมาก แต่จะมีการสะสมชีวมวลแทน (biomass) และเมื่อเปลี่ยน pH เป็น 5 เชื้อจะมีการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากขึ้น ดังนั้นเป็นไปได้ว่าเชื้อจะมีการสะสมชีวมวลที่ระดับ pH ต่ำ ๆ และ

ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อระดับ pH ที่สูงขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ Sugumaran และคณะ (2013) รายงานผลของ pH ต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ คือ 6.5 ได้ปริมาณสูงสุด 16.39 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ pH ยังมีผลต่อรูปร่างของ *A. pullulans* โดยระดับ pH ที่ต่ำ ๆ เชื้อจะอยู่ในรูปของเส้นใย แต่เมื่อ pH สูงขึ้นจะอยู่ในรูปเซลล์ (McNeil และคณะ, 1989) ดังรายงานของ Wu และคณะ (2009) ได้แสดงว่า ระดับ pH ที่ต่ำกว่า 3 เชื้อจะอยู่ในรูปของเส้นใย และเมื่อระดับ pH มากกว่า 5 เชื้อจะอยู่ในรูปของเซลล์เดี่ยวเป็นส่วนใหญ่ เชื้อที่อยู่ในรูปของเซลล์ฟอง บลาสต์สปอร์ และคลาไมโดสปอร์ พบว่ามีการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Sugumaran และคณะ, 2013) และมีบางงานวิจัยรายงานว่าเส้นใยและเซลล์จะพบการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เกิดขึ้นเช่นเดียวกัน (Cheng และคณะ, 2011)

4.) อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (McNeil และ Kristiansen, 1990) ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Chi และ Zhao, 2003) พันธกานต์ อุณหภพฐิติกุล (2555) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตปีตากลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตปีตากลูแคนปริมาณสูงสุด รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ Wu และคณะ (2010) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* พบว่าที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 27.4 กรัมต่อลิตร Punnapayak และคณะ (2003) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* จำนวน 3 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากอากาศในเขตกรุงเทพมหานคร พบว่ามีสองสายพันธุ์ที่ผลิตได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนอีกสายพันธุ์สามารถผลิตได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส Cheng และคณะ (2011) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* ในช่วง 25-32 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณสูงสุด 10.1 กรัมต่อลิตร

5.) แหล่งอาหารเสริมและวิตามิน

วิตามินเป็นสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์จำเป็นต้องสำหรับการเจริญเติบโตแต่ต้องการในปริมาณน้อย โดยวิตามินทำหน้าที่เป็น coenzyme หรือเป็นส่วนประกอบใน coenzyme ที่ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ และมีสารอินทรีย์หลายชนิดที่ร่างกายต้องการในปริมาณน้อยแต่มีความเข้มข้นมากกว่าวิตามิน ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของราชนิดต่าง ๆ แตกต่างกันได้แก่ สารที่เป็น growth

factor เช่น กรดอะมิโน กรดไขมัน กรดซัคซินิก สเตอรอล (sterols) อินอซิทอล (inositol) พิวรีน (purine) ไพริมิดีน (pyrimidine) และโคลีน (choline)

น้ำมันพืช เป็นแหล่งของวิตามินอี (vitamin E) ซึ่งอยู่ในรูปของโทโคเฟอรอล (tocopherols) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวหรือกรดไขมันที่จำเป็น (essential fatty acid) เช่น กรดไลโนเลอิก กรดแอลฟา-ไลโนเลอิก กรดโอเลอิก โดยน้ำมันพืชแต่ละชนิดจะมีสัดส่วนของกรดไขมันที่แตกต่างกัน นอกจากนี้น้ำมันยังเป็นแหล่งของบีตาแคโรทีนในรูปของโปรวิตามินเอ (pro-vitamin A) (Gunstone, 2011) มีงานวิจัยที่ศึกษาการเพิ่มผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยการใช้ น้ำมันพืชเป็นแหล่งอาหารเสริม ดังนี้

Lazaridou และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ non-pigmented โดยมีกากน้ำตาลปืเป็นแหล่งอาหาร และศึกษาการเติมแหล่งอาหารเสริมได้แก่ น้ำมันมะกอก และ tween 80 จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอก 2.5 ร้อยละโดยปริมาตรต่อปริมาตร และ tween 80 0.5 ร้อยละโดยปริมาตรต่อปริมาตร สามารถเพิ่มผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงที่สุด และ Roukas (1999) ศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* โดยใช้ของเสียจากโรงงานเบียร์เป็นแหล่งอาหารหลัก และเติมแหล่งอาหารเสริมชนิดต่างๆ พบว่าเมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งอาหารเสริม (ร้อยละ 2.5 ปริมาตรโดยปริมาตร) สามารถเพิ่มผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากสูตรพื้นฐานได้ถึงร้อยละ 41.66 และ Silva และคณะ (2007) ศึกษาผลกระทบของน้ำมันถั่วเหลืองและ Tween 80 ในการผลิต botryosphaeran จาก *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 โดยศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่ร้อยละ 0-10 มิลลิลิตร และ Tween 80 ที่ร้อยละ 0-5 กรัม โดยเพาะเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากผลการศึกษาพบว่า การเสริมน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร และ Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4.5 โดยน้ำหนัก ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุด และ Sena และคณะ (2006) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตพอลูลูแลนโดยเชื้อ *A. pullulans* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ NRRL Y-2311-1 และ NRRL Y-6220 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร complex nitrogen broth (Pollock และคณะ, 1992) ซึ่งใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นอาหารเสริมที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 และเวลาในการบ่ม 96 ชั่วโมง ให้ผลผลิตพอลูลูแลนในปริมาณสูงสุดคือ 29.58 และ 27.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีการศึกษาการใช้ไขมันดอกทานตะวันเป็นแหล่งอาหารเสริมพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* ATCC 42023 และพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Leuconostoc mesenteroides* และ *Rhizobium leguminosarum* UBF 11 ได้ดีที่ (El-Tayeb และ Khodair, 2006)

2.5 การปนเปื้อนเมลานิน (melanin)

เมลานินเป็นเม็ดสีที่พบทั่วไปในสิ่งมีชีวิต เมลานินมีสีแดง น้ำตาลเข้ม และดำ มีโมเลกุลสูง สังเคราะห์ขึ้นโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล ที่มีกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) เป็นสารตั้งต้น (Jiang และคณะ, 2017) เมลานินก่อให้เกิดปัญหาในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium* โดยพบว่าหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการบ่ม จะมีเมลานินปนเปื้อนอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ละลายอยู่ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีเข้มจนถึงดำ เมื่อตกตะกอนเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์แล้วพบว่ายังมีเมลานินปนเปื้อนมาด้วย ทำให้เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มีคุณภาพต่ำ การสังเคราะห์เมลานินมีขึ้นทั้งภายในและภายนอกของเซลล์ในระยะสุดท้ายของการเจริญเมื่อเซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์บวม (swollen cell) ไปเป็นคลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) (Siehr, 1981) มีรายงานว่าอายุของกล้าเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิในการบ่ม และค่า pH มีผลต่อปริมาณการผลิตเมลานิน (Lei และ Chang-hai, 2010)

2.6 บีตากุลแคน

บีตากุลแคนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคส (glucose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตาไกลโคซิดิก (β -glycosidic bonds) ซึ่งบีตากุลแคนที่พบในธรรมชาติมีหลายกลุ่มด้วยกัน โดยมีลักษณะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีและโครงสร้างสามมิติของบีตากุลแคนชนิดนั้นๆ บีตากุลแคนพบได้ในข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต สาหร่ายทะเล ผงเซลล์ของยีสต์ รา และพบในแบคทีเรียบางชนิด ซึ่งปัจจุบันได้มีการสกัดบีตากุลแคนจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น ผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพ เป็นแหล่งไฟเบอร์ เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง และเป็นสารเพิ่มผิวสัมผัสในอาหาร

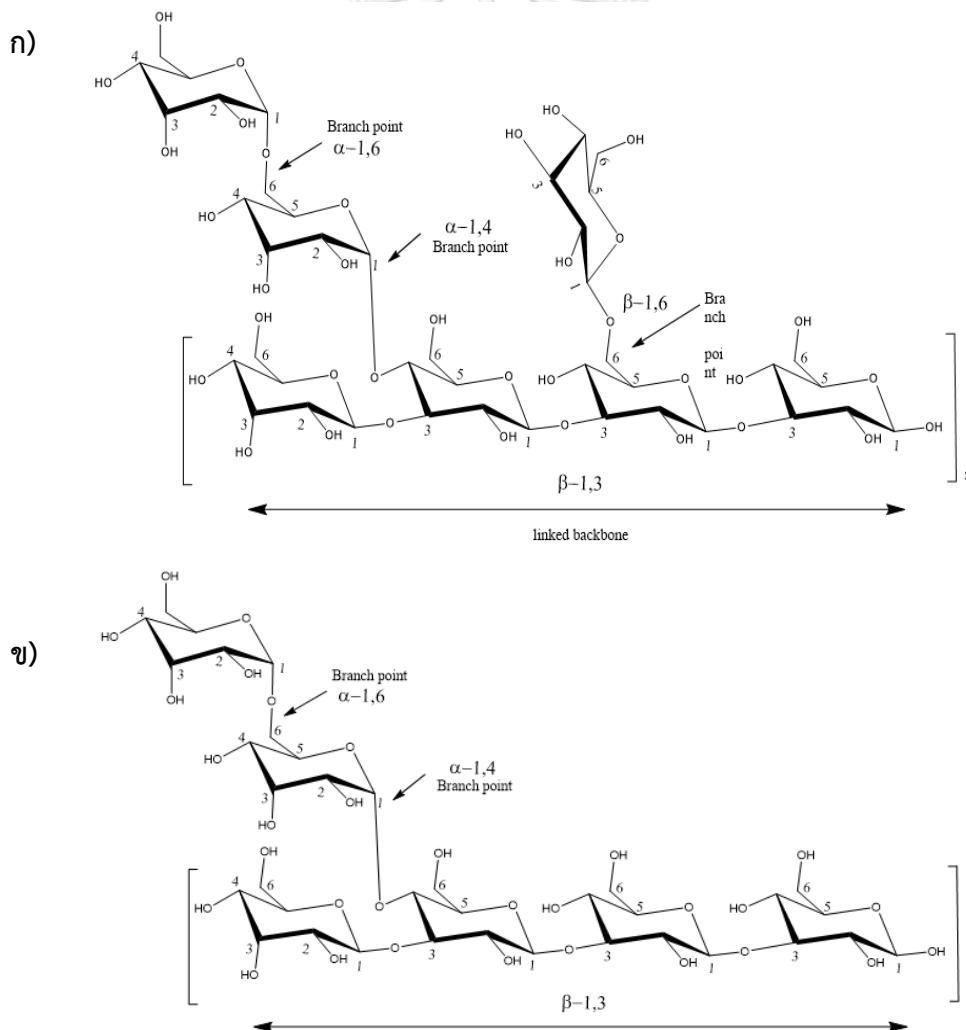
2.6.1 บีตากุลแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543

บีตากุลแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 มีโครงสร้างคล้ายกับออบาซิเดน จึงมีรายงานว่า เป็นบีตากุลแคนชนิด aubasidan-like β -glucan (Lotrakul และคณะ, 2013) หน่วยย่อยของบีตากุลแคนประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ซึ่งแต่ละโมเลกุลของกลูโคสเชื่อมกันด้วยพันธะบีตา-1,3-ไกลโคซิดิก (β -1,3-glycosidic) และมีสายกิ่งเชื่อมกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4-ไกลโคซิดิก (α -1,4-glycosidic) และพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิก (α -1,6-glycosidic) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล (2555) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบีตากุลแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 พบว่าสามารถผลิตได้ดีที่สุดในอาหารที่มีซูโครสร้อยละ 6 โดย

น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทร้อยละ 0.06 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน pH 7.5 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน โดยมีผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 14.72 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นจากสูตรที่ไม่ผ่านการปรับองค์ประกอบถึง 6.06 เท่า อย่างไรก็ตาม งานวิจัยดังกล่าวได้รายงานว่ามีสีดำจากการปนเปื้อนของเมลานิน ซึ่งไม่เหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และทางอาหาร

มีงานวิจัยที่นำเอาปีตากุลแคนที่ผลิตจาก *A. thailandense* NRRL 58543 ไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านมสายพันธุ์ BT 474, เซลล์มะเร็งปอดสายพันธุ์ ChaGo k1 และเซลล์มะเร็งปากมดลูกสายพันธุ์ HeLa (ภูษิตา ขวัญยืน, 2557) พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด เซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์มะเร็งปากมดลูก เท่ากับร้อยละ 48.34, 36.79 และ 20.08 ตามลำดับ และมีแนวโน้มยับยั้งได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของปีตากุลแคน



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ ก) ออบาซิแดน ข) ปีตากุลแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 (ที่มา: Prasongsuk และคณะ, 2018)

2.7 ประโยชน์ของบีตากลูแคน

บีตากลูแคนมีประสิทธิภาพในการเสริมสร้างการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์และสัตว์ มีการวิจัยจำนวนมากสนับสนุนว่าบีตากลูแคนมีผลในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ได้ เช่น Pelizon และคณะ (2005) ศึกษาการให้บีตากลูแคนที่ผลิตจาก *S. cerevisiae* 100 มิลลิกรัม ในหนูทดลอง พบว่าเซลล์ของหนูมีการผลิต IL-12p40, IL-12p70 และ TNF- α ได้สูงขึ้น และเมื่อทำการกระตุ้นด้วย *Streptococcus aureus* พบว่าหนูที่ได้รับบีตากลูแคนมีกิจกรรมของ NK cell ที่สูงกว่าหนูที่ไม่ได้รับบีตากลูแคน นอกจากนี้หนูที่ได้รับบีตากลูแคนมีการยับยั้งการเจริญของ *Paracoccidioides brasiliensis* ได้ดีกว่าหนูที่ไม่ได้รับบีตากลูแคน และ Robertsen และคณะ (1990) ทดลองฉีดบีตากลูแคนให้ปลาแซลมอน พบว่าปลาแซลมอนที่ทำการทดลองมีภูมิคุ้มกันต้านเชื้อ *Yersinia ruckeri* เชื้อ *Vibrio anguillarum* และเชื้อ *Vibrio salmonicida* สูงขึ้น ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุของโรค red mouth โรค vibriosis และโรค hitra ตามลำดับ โดยปลาที่ทำการทดลองจะมีภูมิคุ้มกันต้านต่อเชื้อเหล่านี้สูงสุดเมื่อฉีดกลูแคนเข้าไปเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และการศึกษาถัดมาของ Engstad และคณะ (1992) จากระยะเวลาที่ผ่านไป 3 สัปดาห์ หลังจากฉีดบีตากลูแคนเข้าไป พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ในปลาแซลมอนสูงขึ้น รวมไปถึงกิจกรรมของคอมพลีเมนต์ (complement) ที่สูงขึ้นเช่นเดียวกันเมื่อเวลาผ่านไป 2-4 สัปดาห์ และการทดลองของ Williams และคณะ (1996) พบว่าบีตากลูแคนสามารถช่วยยับยั้งการเกิดเนื้องอก การบวม และการทำงานของสารก่อมะเร็งได้ และพบว่าบีตากลูแคนสามารถช่วยยืดระยะเวลาการมีชีวิตในสัตว์ที่ผ่านการปลูกถ่ายเซลล์เมลาโนมา (melanoma) เซลล์อะดีโนคาซิโนมา (adenocarcinoma) เซลล์แมมมาเรียคาซิโนมา (mammary carcinoma) และเซลล์ลิมโฟไซติกลูคีเมีย (lymphocytic leukemia) นอกจากนี้ประโยชน์ทางการแพทย์แล้ว ยังมีคุณสมบัติด้านอื่นๆของบีตากลูแคน ซึ่งทำให้มีการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น คุณสมบัติของบีตากลูแคนที่ไม่ละลายน้ำที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถอุ้มน้ำและทำให้เกิดความหนืดกับสารละลาย รวมถึงความสามารถในการดูดซับน้ำมัน จึงทำให้มีการนำบีตากลูแคนมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดความคงตัวในระบบอิมัลชัน (emulsion stability) ซึ่งช่วยในการลดแรงตึงผิวระหว่างอนุภาคน้ำกับน้ำมัน ตลอดจนใช้เป็นสารให้ความหนืด เป็นต้น ตัวอย่างการนำไปใช้ เช่น การนำบีตากลูแคนไปใช้ในผลิตภัณฑ์มายองเนสเพื่อทดแทนไขมัน (Worrasinchai และคณะ, 2006) และบีตากลูแคนยังมีสมบัติพรีไบโอติก (prebiotic) อีกด้วย (Gardiner และคณะ, 2002; Snart และคณะ, 2006; Mitsou และคณะ, 2010) นอกจากนี้ บีตากลูแคนถูกใช้เป็นสารป้องกันรังสี จึงนิยมใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางจำพวกครีมกันแดด (Hofer, 1996) ซึ่งแสงแดดเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การทำงานของเม็ดสีผิดปกติ เกิดเป็นกระฝ้า รอยต่างด้า และก่อให้เกิดการชราของผิวหนังเร็วกว่าปกติ (photoageing) และยังพบว่าแสงแดด

เป็นตัวทำลายเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของผิวหนัง คือทำให้เซลล์ Langerhans มีจำนวนลดลง ดังนั้นคนที่ตากแดดนาน ๆ จึงมีโอกาสเกิดมะเร็งผิวหนัง ซึ่งปีตากลุ่มแคนมีประสิทธิภาพในการสร้างคอลลาเจนของเซลล์ผิวหนัง สามารถกระตุ้นให้แผลหายเร็วขึ้น ลดการเกิดอนุมูลอิสระ และกระตุ้นการทำงานของเซลล์ Langerhans ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่นำสิ่งแปลกปลอมไปให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่จะจับสารแปลกปลอมแล้วย่อยเป็นชิ้นเล็ก ๆ และนำไปเก็บไว้ที่ต่อมน้ำเหลือง จากนั้นเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดอื่น เช่นเม็ดเลือดขาว (T-lymphocyte) จะสร้างภูมิคุ้มกัน จากนั้นจะถูกทำลายไปโดยแมคโครเฟจ กระบวนการทั้งหมดเหล่านี้จะมีผลทำให้ผิวพรรณสดใส เปล่งปลั่ง ลดริ้วรอย และชะลอความแก่ของเซลล์ผิวหนังให้ช้าลง (Williams และคณะ, 1996)

2.8 프리ไบโอติก (prebiotic)

프리ไบโอติกคือ สารหรือองค์ประกอบที่ไม่ถูกย่อยและดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบน ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต และหรือขบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร เช่น Bifidobacteria และ Lactobacilli โดยการเป็นแหล่งอาหารให้กับเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว ซึ่งก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน (host) นอกจากนี้ 프리ไบโอติกยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค (pathogenic bacteria) เช่น *Salmonella* และ *Escherichia coli* ได้ (Gibson และ Roberfroid, 1999)

สารที่ถูกจำแนกเป็น프리ไบโอติกจะต้องมีลักษณะอย่างน้อย 3 ประการ คือ สารนั้นจะต้องไม่ถูกย่อยหรือถูกดูดซึมในกระเพาะอาหารหรือลำไส้เล็ก สารนั้นจะต้องจำเพาะกับแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ และผลจากการหมักสารนั้นควรทำให้เกิดการกระตุ้นที่เป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน และยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ก่อโทษได้ โดยสามารถแบ่งประเภทของ프리ไบโอติกได้ เช่น น้ำตาลแอลกอฮอล์ (alcohol sugar), แป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ (resistance starch), พอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง, อินนูลิน (inulin) น้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ เป็นต้น

สำหรับชนิดของสาร프리ไบโอติกที่ได้รับความสนใจและมีการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพ คือกลุ่มน้ำตาลแอลกอฮอล์และโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตสายสั้น มีเพียงส่วนน้อยที่ศึกษาคาร์โบไฮเดรตสายยาวที่มีโครงสร้างซับซ้อน อย่างเช่นปีตากลุ่มแคน แต่มีการยืนยันว่ามีประสิทธิภาพเป็น프리ไบโอติกได้ดีเช่นกัน (Lam และ Chi, 2013)

Jaskari และคณะ (1998) ศึกษาสมบัติ프리ไบโอติกของปีตากลุ่มแคนจากข้าวโอ๊ตที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ไลคาเนส (lichenase) พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อ bifidobacteria และ lactobacilli และรายงานว่ามีปีตา-กลูโคโอลิโกเมอร์ (β -glucooligomers) ซึ่งเป็นปีตากลุ่มแคนที่มี

น้ำหนักร้อยละต่ำ มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกได้ดีเทียบเท่ากับการใช้พรีไบโอติกชนิดราฟฟิโนส (raffinose) และฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructooligosaccharide)

2.9 โพรไบโอติก (probiotic)

โพรไบโอติกมาจากภาษากรีก แปลว่า เพื่อชีวิต (For life) โดยมี Metchnikoff (1908) เป็นผู้ให้คำจำกัดความคำว่าโพรไบโอติกคนแรก จากนั้นมีผู้ให้คำจำกัดความแตกต่างกันดังต่อไปนี้ คำจำกัดความคือ สารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสร้างและขับออกมา ส่งผลช่วยกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งการทำงานของโพรไบโอติกให้ผลตรงข้ามกับการทำงานของสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ที่ทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด (Lilly และ Stillwell, 1965) จุลินทรีย์และสารที่ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร (Parker, 1974) จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เสริมในอาหารและให้ประโยชน์แก่เจ้าบ้าน (host) โดยช่วยเสริมจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์ให้อยู่ในสภาพสมดุล (Frei และคณะ, 2015) แบคทีเรียที่ดีและถูกจัดเป็นโพรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecalis* และ *Streptococcus thermophilus* เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ อาศัยอยู่ในลำไส้เล็กหรือลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ตั้งแต่แรกเกิด ทำหน้าที่ช่วยย่อยอาหารและให้สารอาหารที่มีประโยชน์แก่มนุษย์ ได้แก่ กรดอะมิโน กรดแลคติก พลังงาน วิตามินเค วิตามินบี และสารปฏิชีวนะหลายชนิด ซึ่งจุลินทรีย์โพรไบโอติกควรมีสมบัติทนต่อภาวะความเป็นกรดของน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร ทนต่อน้ำดี และสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ (Gilliland และ Speck, 1977)

ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* ซึ่งเป็นที่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตนมเปรี้ยวและโยเกิร์ต และพบในลำไส้ เช่น *L. brevis* และ *L. casei* (Sultana และคณะ, 2000) โดยแบคทีเรีย *L. casei* จัดอยู่ในกลุ่ม facultatively lactobacilli เป็นพวก facultative anaerobe แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และไม่สร้างสปอร์ เป็นแบคทีเรียทนกรด (acid tolerant) มีกระบวนการหมักแบบ facultatively hetero-fermentative ตัวอย่างพบได้ในผลิตภัณฑ์ นมหมัก นมดิบ ผักผลไม้หมัก ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ มีการผลิตเพื่อเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอุตสาหกรรมนมหมัก (O'Sullivan และคณะ, 2016)

2.10 เยลลี่ (jelly)

กัมมีเยลลี่จัดเป็นผลิตภัณฑ์กลุ่มลูกกวาดชนิดที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบหลัก เป็นลูกกวาดแบบเคี้ยว (chewy confectionary) และยังเป็นลูกกวาดชนิดที่เกิดเจล (สุวรรณา สุภิมาธ, 2543)

ตามพระราชบัญญัติ พ.ศ. 2537 เยลลี่ หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำผลไม้ที่ได้จากการคั้น หรือสกัดจากผลไม้ หรือน้ำผลไม้ที่ผ่านกรรมวิธี หรือทำให้เข้มข้น หรือแช่แข็ง ผสมกับสารที่ให้ความหวานและทำให้มีความเหนียวพอเหมาะ โดยไม่มีเนื้อผลไม้เจือปน น้ำผลไม้หรือน้ำที่สกัดได้จากผลไม้ที่ใช้ต้องผ่านการกรองเพื่อให้ใส ปราศจากชิ้นหรือเศษของผลไม้ และอาจทำให้เข้มข้นโดยการระเหยน้ำออก ปริมาณน้ำผลไม้หรือน้ำที่สกัดได้จากผลไม้ที่ใช้ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนัก กัมมีเยลลี่ต้องมีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว คงรูป ไม่เยิ้ม น้ำ สีสวยสม่ำเสมอ และสีไม่คล้ำ มีกลิ่นและรสชาติตามธรรมชาติของน้ำผลไม้ ต้องใสผ่านแสงได้ ไม่มีชิ้นของเศษผลไม้ที่ใช้ และอาจใช้สีผสมอาหารในการปรุงแต่งได้ (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2537) คำนิยามหรือคำจำกัดความของผลิตภัณฑ์ในกลุ่มกัมมีเยลลี่ในปัจจุบันยังไม่แน่นอนเท่าใดนัก เยลลี่จัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดเจลทั่ว ๆ ไป ที่สามารถใช้สารที่ทำให้เกิดเจลที่กฎหมายอนุญาตให้ใช้ชนิดใดก็ได้ สำหรับผู้บริโภคทั่ว ๆ ไปจะเข้าใจว่ากัมมีเยลลี่เป็นผลิตภัณฑ์เดียวกันและมักเรียกรวมว่า เยลลี่ เพราะมีลักษณะคล้ายกันคือ เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความยืดหยุ่น นิ่ม เหนียวต้องเคี้ยวกิน ไม่ได้ใช้รูปแบบลูกกวาด มีเนื้อสัมผัสแตกต่างกันไป ตั้งแต่อ่อนนุ่มแต่มีความยืดหยุ่นสูง ไปจนถึงเหนียวแข็งกัดขาดได้ยาก ตัวอย่างที่รู้จักกันดี ได้แก่ เยลลี่ กัมมีแบร์ พาสติลล์ และผลิตภัณฑ์อื่นที่เรียกด้วยชื่อทางการค้า ผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีความชื้นค่อนข้างสูงอยู่ระหว่างร้อยละ 10-20 เนื่องจากมีสมบัติในการจับตัวกับน้ำ (water binding) ของไฮโดรคอลลอยด์ซึ่งมีส่วนทำให้เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ต่างกันไปด้วย จึงสามารถใช้ปริมาณความชื้นเป็นตัวชี้บ่งชนิดของผลิตภัณฑ์ได้ดังนี้ (สุวรรณ สุภิมารส, 2543) ผลิตภัณฑ์เยลลี่ จะมีความชื้นร้อยละ 18-25 มีเนื้อสัมผัสนุ่ม กัดขาดได้ง่าย ใช้มีดตัดได้โดยไม่เหนียวติดใบมีด ผลิตภัณฑ์กัมชนิดแข็ง (hard gum) มีความชื้นร้อยละ 10-13 ลักษณะเนื้อแข็งและเหนียว กัดขาดได้ยาก เหนียวมาก เคี้ยวได้นาน ชนิดนุ่ม (soft gum) มีความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 16-20 เนื้อจะนุ่มเหนียวมีความยืดหยุ่นสูง พาสติลล์ (pastilles) เป็นผลิตภัณฑ์ที่อยู่กึ่งกลางระหว่างกัมมีและเยลลี่ ที่พบในตลาด มักจะทำเป็นยาอม ส่วนประกอบโดยเฉลี่ยของผลิตภัณฑ์ในกลุ่มกัมมีเยลลี่ มีส่วนแบ่งการตลาดในประเทศไทยประมาณครึ่งหนึ่งของตลาดลูกกวาด และมีแนวโน้มว่าจะได้รับความนิยมเพิ่มขึ้น เพราะผู้บริโภคจะนิยมรับประทานผลิตภัณฑ์ที่เคี้ยวได้มากกว่า (สุวรรณ สุภิมารส, 2543)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยปีตากุลแคน

อุปกรณ์	บริษัท/ประเทศ
1. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH 30 RF200	Olympus/ญี่ปุ่น
2. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น SPL15	Labcon/ แอฟริกาใต้
3. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BL610	Sartorius/เยอรมนี
4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-205	Denver Instrument Company/ อเมริกา
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter)	Mettler Toledo/อเมริกา
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Rotofix32	Hettich/เยอรมนี
7. เครื่องวัดสี	Konica Minolta, CR 400/ญี่ปุ่น
8. ตู้อบ (Hot air oven)	Binder/อเมริกา
9. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar Flow รุ่น PP-50	ISSOC/ไทย
10. หม้อนิ่งความดันไอน้ำ	Ta Chang Medical instrument Factory/ไต้หวัน
11. อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer)	Brand/เยอรมนี
12. โถเพาะเลี้ยงไร้ออกซิเจน 2.5 ลิตร	Oxoid/อเมริกา

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยเยลลี

อุปกรณ์	บริษัท/ประเทศ
1. เตามแม่เหล็กไฟฟ้า	Imarflex/ญี่ปุ่น
2. ตู้แช่เย็น	Mitsubishi/ไทย
3. Refractometer	Atago/เยอรมนี
4. เครื่องวัดเนื้อสัมผัส	Icon/อังกฤษ
5. เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระในอาหาร	AquaLab/อเมริกา
6. เครื่องวัดความหนืด	Fungilab/เยอรมนี

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยปีตากุลูแคน

สารเคมี	บริษัท/ประเทศ
1. Ammonium sulphate	Ajax/ออสเตรเลีย
2. Ammonium oxalate	Ajax/ออสเตรเลีย
3. Anthrone (9,10-dihydro-9-oxoanthracene)	Sigma-Aldrich/อเมริกา
4. D-glucose	Sigma/อเมริกา
5. Di-potassium phosphate	Ajax/ออสเตรเลีย
6. Ethanol ร้อยละ 95	องค์การสุรากรมสรรพสามิต/ไทย
7. Hydrochloric acid (HCl)	Ajax/ออสเตรเลีย
8. Malt extract	HiMedia/อินเดีย
9. Magnesium sulphate heptahydrate	Marck/เยอรมนี
10. Peptone	HiMedia/อินเดีย
11. Phenol	Merck/เยอรมนี
12. Potassium nitrate	Ajax/ออสเตรเลีย
13. Skim milk	HiMedia/อินเดีย
14. Sodium chloride (NaCl)	Ajax/ออสเตรเลีย
15. Sodium hydroxide (NaOH)	Ajax/ออสเตรเลีย
16. Sodium nitrate	Ajax/ออสเตรเลีย
17. Sucrose	Ajax/ออสเตรเลีย
18. Sulfuric acid ร้อยละ 96	J.T.Baker/อเมริกา
19. Tween 80	Ajax/ออสเตรเลีย
20. น้ำมันมะกอก	ล่าสูง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)/ไทย
21. น้ำมันดอกทานตะวัน	น้ำมันพืชไทย/ไทย
22. น้ำมันปาล์ม	สุขสมบูรณ์ กรู๊ป จำกัด/ไทย
23. น้ำมันรำข้าว	น้ำมันบริโภคไทย/ไทย
24. น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันพืชไทย/ไทย
25. เอนไซม์ปีตากุลูแคน	Sigma/อเมริกา

3.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยเซลล์

สารเคมี	บริษัท/ประเทศ
1. กลูโคสไซรัป	กรุงเทพเคมี/ไทย
2. ซูโครส	น้ำตาลไทยรุ่งเรือง/ไทย
3. กรดซิตริก	กรุงเทพเคมี/ไทย
4. เจลาติน	คาร์ติโน เจลาติน จำกัด/ไทย
5. กลิ่นมะนาว	กรุงเทพเคมี/ไทย
6. แป้งข้าวโพด	คาร์ติโน เจลาติน จำกัด/ไทย

3.5 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ *Aureobasidium thailandense* NRRL 58543 ได้รับจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ *Lactobacillus casei* TISTR 390 และ *L. brevis subsp. brevis* TISTR 868 ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

เก็บ stock culture โดยเลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหารสูตร Yeast Malt broth (YMB) (ภาคผนวก ก) และเลี้ยง *L. casei* และ *L. brevis* ในอาหารสูตร de Man Rogosa Sharpe (MRS) broth (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเก็บเชื้อในหลอด microcentrifuge เดิมสารละลายกลีเซอรอลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 20 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการเก็บระยะสั้น และเก็บรักษาด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง (lyophilization) โดยใช้หางนม (skim milk) เป็นสาร cryoprotectant ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สำหรับการเก็บระยะยาว

3.6 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.6.1 เตรียมหัวเชื้อ *A. thailandense* NRRL 58543

ถ่ายเชื้อ *A. thailandense* NRRL 58543 จากหลอดเก็บเชื้อแช่เยือกแข็ง ลงในอาหาร YMB เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อลงบนอาหาร Yeast Malt agar (YMA) (ภาคผนวก ก) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวถ่ายลงในอาหาร YMB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงใน

สภาวะเดียวกันกับข้างต้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemocytometer ปรับให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 2.5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางด้วยอาหาร YMB สำหรับนำไปใช้เป็นหัวเชื้อ (Lotrakul และคณะ, 2013)

3.6.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตปีตากูแคน

3.6.2.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตปีตากูแคน

เลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหารสูตร production medium (PM) (Lotrakul และคณะ, 2013) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มีซูโครสร้อยละ 6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทร้อยละ 0.06 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างปีตากูแคนและเซลล์แห้งทุกวัน จนครบ 8 วัน แยกเซลล์ยีสต์ออกโดยหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ยีสต์มาตกตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 95 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ในอัตราส่วนเอทานอลต่อสารละลาย 2:1 แชนเย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1 โดยใช้ปั๊มแรงดันสุญญากาศ (vacuum pump) ออบแห้งปีตากูแคนที่ห่อด้วยกระดาษกรองที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักหักกลับน้ำหนักของกระดาษกรอง บันทึกน้ำหนักแห้งของปีตากูแคนและน้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน พร้อมทั้งสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณปีตากูแคนและเซลล์แห้งกับเวลา เพื่อกำหนดวันที่เหมาะสมในการเก็บปีตากูแคน

3.6.2.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหารสูตร PM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มีซูโครสร้อยละ 6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันชนิดของแหล่งได้แก่ เปปโตน โซเดียมไนเตรท โพแทสเซียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมออกซาลेट ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในวันที่มีการผลิตปีตากูแคนสูงสุดตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.6.2.1 มาหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ยีสต์ออกแล้วตกตะกอนปีตากูแคนด้วยเอทานอล จากนั้นหาน้ำหนักแห้งตามวิธีจากข้อ 3.6.2.1 นำปีตากูแคนที่อบแห้งมาบดเป็นผง แล้ววัดค่าสีในระบบ CIE (ดัดแปลงจากวิธีของ Liu และคณะ, 2018) ที่มีค่าของ L^* (0=สีดำ, 100=สีขาว), a^* (ค่าลบ=สีเขียว, ค่าบวก=สีแดง) และ b^* (ค่าลบ=สีน้ำเงิน, ค่าบวก=สีเหลือง) นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าดัชนีความขาว

(whiteness index; WI) ตามสมการที่ 1 (Li และ Lee, 1996) โดยการเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเบต้ากลูแคน จะใช้เกณฑ์การผลิตเบต้ากลูแคนที่ปริมาณสูงสุด ควบคู่กับค่าดัชนีความขาวของเบต้ากลูแคน โดยใช้เบต้ากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (บริษัท โควิกเคทท์ อินเทอร์เน็ต เนชั่นแนล ไทยแลนด์ จำกัด) ที่มีค่าดัชนีความขาวเท่ากับ 48.13 เป็นเกณฑ์กำหนดสีของเบต้ากลูแคน ซึ่งเบต้ากลูแคนที่ผ่านเกณฑ์นี้จะต้องมีค่าดัชนีความขาวมากกว่าหรือเท่ากับ 48.13 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

$$WI = 100 - \sqrt{(100-L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (1)$$

3.6.2.3 ศึกษาแหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหาร PM ที่ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตเบต้ากลูแคนจากข้อ 3.6.2.2 โดยแปรผันชนิดของแหล่งอาหารเสริม ได้แก่ น้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันปาล์ม น้ำมันรำข้าว และน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เพื่อศึกษาผลของการใช้อาหารเสริมชนิดต่าง ๆ ต่อปริมาณเบต้ากลูแคนที่ผลิตได้ ในภาวะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าที่อัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในเวลาที่มีการผลิตเบต้ากลูแคนสูงสุดตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.6.2.1 วัดปริมาณเบต้ากลูแคนและค่าดัชนีความขาวตามวิธีในข้อ 3.6.2.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.2.4 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนและแหล่งอาหารเสริมชนิดที่เหมาะสมตามผลที่ได้จากข้อ 3.6.2.2 และ 3.6.2.3 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (Lotrakul และคณะ, 2013) หาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสมในการผลิตเบต้ากลูแคน โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) และออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken design, BBD) โดยใช้โปรแกรม Design Expert เวอร์ชัน 11 (Stat-Ease Inc.,US) ประกอบด้วย 15 ชุดการทดลอง (แสดงในตารางที่ 4.3) ซึ่งกำหนดระดับของปัจจัยที่ศึกษาดังตารางที่ 3.1 ตรวจสอบสมการอธิบายการผลิตเบต้ากลูแคน โดยนำค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งอาหารเสริมที่ส่งผลให้ผลิตเบต้ากลูแคนได้สูงที่สุดจากการคำนวณมาทำการทดลองซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเบต้ากลูแคนที่ได้กับค่าทำนายที่ได้จากสมการ

ตารางที่ 3.1 การกำหนดระดับปัจจัย

ปัจจัย	สัญลักษณ์	ระดับปัจจัย		
		ต่ำ (-1)	กลาง (0)	สูง (+1)
1. ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน	X_1	3	5	7
2. ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน	X_2	0.04	0.06	0.08
3. ความเข้มข้นของแหล่งอาหารเสริม	X_3	6	8	10

3.6.2.5 ศึกษาผลของ pH เริ่มต้นที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหารซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน, แหล่งไนโตรเจน และแหล่งอาหารเสริมที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมตามผลที่ได้จากข้อ 3.6.2.4 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหาร ได้แก่ 5 5.5 6 6.5 และ 7 เก็บตัวอย่างในวันที่มีการผลิตปิตากุลูแคนสูงสุดตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.6.2.1 วัดปริมาณปิตากุลูแคนและค่าดัชนีความขาวตามวิธีในข้อ 3.6.2.1 ใช้เกณฑ์การเลือก pH ที่เหมาะสมในการผลิตปิตากุลูแคนตามข้อ 3.6.2.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.2.6 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหารซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน, แหล่งไนโตรเจน และแหล่งอาหารเสริมในความเข้มข้นที่เหมาะสมตามผลที่ได้จากข้อ 3.6.2.4 ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารตามผลที่ได้จากข้อ 3.6.2.5 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ 25 28 และ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในวันที่มีการผลิตปิตากุลูแคนสูงสุดตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.6.2.1 วัดปริมาณปิตากุลูแคนและค่าดัชนีความขาวตามวิธีในข้อ 3.6.2.1 ใช้เกณฑ์การเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตปิตากุลูแคนตามข้อ 3.6.2.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.3 การลดขนาดโมเลกุลของปิตากุลูแคนโดยใช้เอนไซม์

นำปิตากุลูแคนที่ผลิตจากข้อ 3.6.2 มาย่อยด้วยเอนไซม์ปิตากุลูคาเนสซึ่งจำเพาะต่อการย่อยพันธะปีตา-1,3-ไกลโคซิดิก ตามวิธีของ Jaskari และคณะ (1998) โดยเตรียมสารละลายปิตากุลูแคนร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ใช้เอนไซม์ปิตากุลูคาเนสจาก *Trichoderma longibrachiatum* (EC 3.2.1.6) ที่ความเข้มข้น 50 ยูนิตต่อ 100

มิลลิลิตรบีตากลูแคน บ่มในอ่างน้ำแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หยุดการทำงานของเอนไซม์โดยการต้มในน้ำเดือด 15 นาที จากนั้นบีตากลูแคนที่มีมวลโมเลกุลสูงจะถูกกำจัดออกโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล (ร้อยละ 95 โดยปริมาตรต่อปริมาตร) และนำส่วนใสไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่องระเหยสารภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) แล้วทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง (lyophilization) สำหรับทดลองขั้นต่อไป

3.6.4 ตรวจสอบผลจากการลดขนาดโมเลกุลของบีตากลูแคน

3.6.4.1 วิเคราะห์โครงสร้างของบีตากลูแคนโดยใช้เทคนิค Fourier Transform-Infrared (FT-IR) spectroscopy

เตรียมตัวอย่างที่จะใช้วิเคราะห์โดยผสมผงบีตากลูแคนประมาณ 1-2 มิลลิลิตร เข้ากับผงโพแทสเซียมโบรไมด์ที่ปราศจากน้ำประมาณ 100 มิลลิลิตร บดให้เข้ากัน นำมาอัดเป็นแผ่น (pellet) ด้วยความดัน 10 ตันต่อตารางนิ้ว นำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง FT-IR spectrometer (Perkin-Elmer Spectrum One, USA) บันทึกข้อมูลสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงในช่วงเลขคลื่น 450-4000 เซนติเมตร⁻¹ จำนวนครั้งของการสแกน 16 ครั้งต่อสเปกตรัม

3.6.4.2 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของบีตากลูแคนโดยวิธีเจลเพอร์มิเอชันโครมาโทกราฟี (gel permeation chromatography, GPC)

วิเคราะห์มวลโมเลกุลของบีตากลูแคนที่ผ่านการลดขนาดโมเลกุล ด้วยวิธีเจลเพอร์มิเอชันโครมาโทกราฟี (GPC) โดยใช้เครื่อง Waters 600E, Waters วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลในช่วง 1,000-20,000,000 ดาลตัน และใช้รีแฟรกทีฟอินเด็กซ์ ดีเทคเตอร์ (refractive index detectors, IR detectors) ทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ น้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ที่อัตราการไหลเท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ส่งวิเคราะห์ ณ ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ

3.6.4.3 วัดค่าความหนืด

วัดค่าความหนืดของสารละลายบีตากลูแคนความเข้มข้นร้อยละ 0.25, 0.5, 1, 1.5 และ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Ashraf และคณะ (2017) ด้วยเครื่องวัดความหนืด (Brookfield viscometer, Model DV-II) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้หัววัดแบบ R2 อัตราเฉือน (shear rate) 150 วินาที⁻¹ รายงานค่าความหนืดในหน่วยเซนติพอยส (cP) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.4.4 ตรวจสอบโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เกิดขึ้น

ตรวจสอบโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) ในปีตาคลูแคนที่ผ่านการลดขนาดโมเลกุล ด้วยวิธีอย่างง่ายโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC) โดยหยดสารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร บนแผ่นซิลิกาเจล (Silica Gel 60 F 524 TLC plates, Merck Darmstadt, Germany) นำไปใส่ในถังทำ TLC ที่อิมมัวด้วยสารละลายผสมระหว่างเอทานอลต่อบิวทานอลต่อน้ำ ในอัตราส่วน 5:5:4 (ปริมาตรโดยปริมาตร) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้สารละลายผสมซึมขึ้นไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 10 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งและจุ่มในสารละลายอะนิซัลดีไฮด์ (anisaldehyde dipping reagent) ที่ประกอบด้วยเมทานอลต่ออะนิซัลดีไฮด์ต่อกรดซัลฟิวริก ในอัตราส่วน 95:3:3 (ปริมาตรโดยปริมาตร) จากนั้นนำไปเป่าลมร้อน (100-120 องศาเซลเซียส ประมาณ 5-10 นาที) สังเกตแถบสีและบันทึกผลการทดลอง เปรียบเทียบระยะทางเคลื่อนที่ของปีตาคลูแคนที่ได้กับสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และ เซลโลไบโอส

3.6.5 ศึกษาสมบัติฟิสิกส์ของปีตาคลูแคนไฮโดรไลเซต

3.6.5.1 ทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส

จำลองการย่อยในปากโดยใช้เอนไซม์อะไมเลส โดยใช้สารละลายน้ำลายเทียม (artificial human saliva) มี pH เท่ากับ 6.8 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) ที่มีปีตาคลูแคนละลายอยู่ประมาณ 30 กรัม (ดัดแปลงจาก Fässler และคณะ, 2006) เติมสารละลายเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ก) ลงในสารละลายน้ำลายเทียมที่มีตัวอย่างละลายอยู่ซึ่งเตรียมไว้ข้างต้น โดยเติมเอนไซม์มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.33 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที โดยสุ่มเก็บตัวอย่างครั้งละ 5 มิลลิลิตร ใส่ไว้ในหลอดทดลองที่มีฝาปิดที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 30 และ 40 นาที นำมาต้มในน้ำเดือด 15 นาที และแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ก) เพื่อคำนวณร้อยละของการย่อยตามสมการที่ 2 และ 3

$$\text{ร้อยละการย่อย} = \frac{(\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้าย} - \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น})}{(\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด} - \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น})} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{ร้อยละการย่อยรวม} = \text{ร้อยละการย่อยในปาก} + \text{ร้อยละการย่อยในกระเพาะอาหาร} \quad (3)$$

3.6.5.2 ทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยกรดในกระเพาะอาหาร

นำสารละลายที่เหลือจากการทดลองในข้อ 3.6.5.1 มาวัดปริมาตรและเติมสารเคมีต่าง ๆ ดังแสดงในภาคผนวก ก นำไปกวนผสมให้เข้ากันเพื่อปรับสถานะของสารละลายให้ใกล้เคียงกับสถานะของสารละลายอิเล็กโตรไลต์ในกระเพาะอาหาร จากนั้นปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 และ 240 นาที โดยภายหลังการสุ่มตัวอย่างให้นำสารละลายมาปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ เพื่อหยุดปฏิกิริยาที่เกิดจากการย่อยด้วยกรด ก่อนนำไปวิเคราะห์ร้อยละการย่อยเช่นเดียวกับข้อที่ 3.6.5.1

3.6.5.3 ทดสอบการกระตุ้นการเติบโตของ *L. casei* และ *L. brevis*

ศึกษาสมบัติของปีตากุลแคนไฮโดรไลเซทในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียโพรไบโอติก 2 ชนิด ได้แก่ *L. casei* และ *L. brevis* โดยเลี้ยงในอาหารสูตร MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ นำหัวเชื้อมาวัดค่าความหนาแน่นของแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วปรับค่า OD₆₀₀ ให้เท่ากับ 0.1 โดยเจือจางด้วย MRS broth จากนั้นถ่ายหัวเชื้อที่ปรับความหนาแน่นของเซลล์ปริมาณร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร MRS broth โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ปีตากุลแคนไฮโดรไลเซท ปีตากุลแคนดั้งเดิม และปีตากุลแคนจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (บริษัทโควิกเคทท์ อินเทอร์เน็ต เนชั่นแนล ไทยแลนด์ จำกัด, ประเทศไทย) และชุดควบคุมซึ่งไม่เติมแหล่งคาร์บอน โดยควบคุมความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นเท่ากับ 2 มิลลิกรัมคาร์บอนต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธีตรวจนับจุลินทรีย์มาตรฐาน (standard plate count) ที่เวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.6 ศึกษาผลของปริมาณปีตากุลแคนต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์เยลลี่โพรไบโอติก

เตรียมเยลลี่โพรไบโอติกโดยใช้สูตรกัมมีเยลลี่พื้นฐาน (Garcia, 2000) ตามขั้นตอนการผลิตกัมและเยลลี่ (สุวรรณ สุภิมากร, 2543) (ภาคผนวก ข) หลังจากต้มเคี้ยวน้ำตาลทราย กลูโคสไซรัป และเจลาติน (เรียกส่วนนี้ว่า ลิเคอร์) เติมปีตากุลแคนลงในลิเคอร์ โดยแปรปริมาณปีตากุลแคน 2 ระดับ ได้แก่ ร้อยละ 0.25 (สูตรปีตากุลแคน 0.25) และ 0.5 (สูตรปีตากุลแคน 0.50) โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสูตรควบคุมซึ่งไม่เติมปีตากุลแคน เติมกลิ่นมะนาวและสารละลายกรดซิตริกเป็นลำดับสุดท้าย จากนั้นเทลิเคอร์ลงในถาดอะลูมิเนียม นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส นำเยลลี่ที่คงรูปออกจากภาตแล้วตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1.5x1.5x1 เซนติเมตร คลุกด้วยแป้งข้าวโพดแล้วเก็บในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ชนิดที่มีซิปล็อก

3.6.6.1 ศึกษาคุณภาพทางกายภาพ

วัดค่าเนื้อสัมผัส โดยใช้เครื่อง Texture Analyser รุ่น TA-XT plus (ภาคผนวก ค) เลือกวิธีทดสอบแบบ Texture Profile Analysis (TPA) โดยใช้หัววัดแบบ cylinder ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 36 มิลลิเมตร ขนาดตัวอย่าง 1.5x1.5x1 เซนติเมตร ความเร็วของหัววัดขณะทดสอบ 1.0 มิลลิเมตรต่อวินาที ระยะแรงกดร้อยละ 50 ของความหนาตัวอย่าง ระยะเวลาในการคืนตัว 5 วินาที รายงานค่า hardness (ความแข็ง), cohesiveness (การยึดเกาะ), springiness (ความยืดหยุ่น), chewiness (การคงทนเมื่อถูกเคี้ยว), gumminess (ความเหนียวยืดติด) และวัดค่าสี ได้แก่ L* (ค่าความสว่าง), a* (ค่าสีแดง) และ b* (ค่าสีเหลือง)

3.6.6.2 ศึกษาคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์

ตรวจสอบคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเยลลี่ฟรีโบโอดิก ได้แก่ จุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา และ *E. coli* ด้วยวิธีมาตรฐานของ FDA BAM (2001) ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน เยลลี่แห้ง (มพช. 520/2547) ที่กำหนดให้มีจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 10^4 CFU/กรัม ยีสต์และราไม่เกิน 100 CFU/กรัม และ *E. coli* ไม่เกิน 3 MPN/กรัม

3.6.6.3 ศึกษาคุณภาพทางประสาทสัมผัส

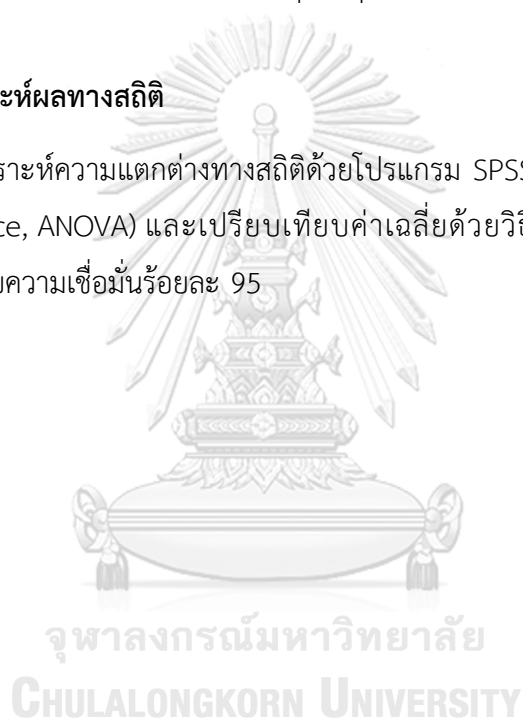
ศึกษาคุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้านสี ความยืดหยุ่น ความเหนียว และความชอบรวม ดัดแปลงวิธีจาก Charoen และคณะ (2015) โดยใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 30 คน เพศชาย 7 คน เพศหญิง 23 คน อายุระหว่าง 20-35 ปี (ดัดแปลงจาก Amjadi และคณะ, 2018) ใช้แบบทดสอบที่มีการให้คะแนนความชอบ (ภาคผนวก ง) วิธี 9-point hedonic scale ที่มีช่วงคะแนน 1-9 (1 ไม่ชอบมากที่สุด, 2 ไม่ชอบมาก, 3 ไม่ชอบปานกลาง, 4 ไม่ชอบเล็กน้อย, 5 เฉย ๆ, 6 ชอบเล็กน้อย, 7 ชอบปานกลาง, 8 ชอบมาก และ 9 ชอบมากที่สุด)

3.6.7 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เยลลี่ฟรีโบโอติก

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเยลลี่ฟรีโบโอติกทางกายภาพโดยทำการวิเคราะห์ค่าสีและลักษณะเนื้อสัมผัส (texture profile analysis) ตามวิธีในข้อ 3.6.6.1 และทางจุลินทรีย์ตามวิธีในข้อ 3.6.6.2 โดยนำผลิตภัณฑ์เยลลี่ฟรีโบโอติกบรรจุในถุงอะลูมิเนียมพอยล์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาและคุณภาพทางกายภาพ ในวันที่ 0, 7 และ 14 ของการเก็บรักษา โดยจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา และจำนวน *E. coli* จะเป็นตัวกำหนดการสิ้นสุดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์

3.6.8 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

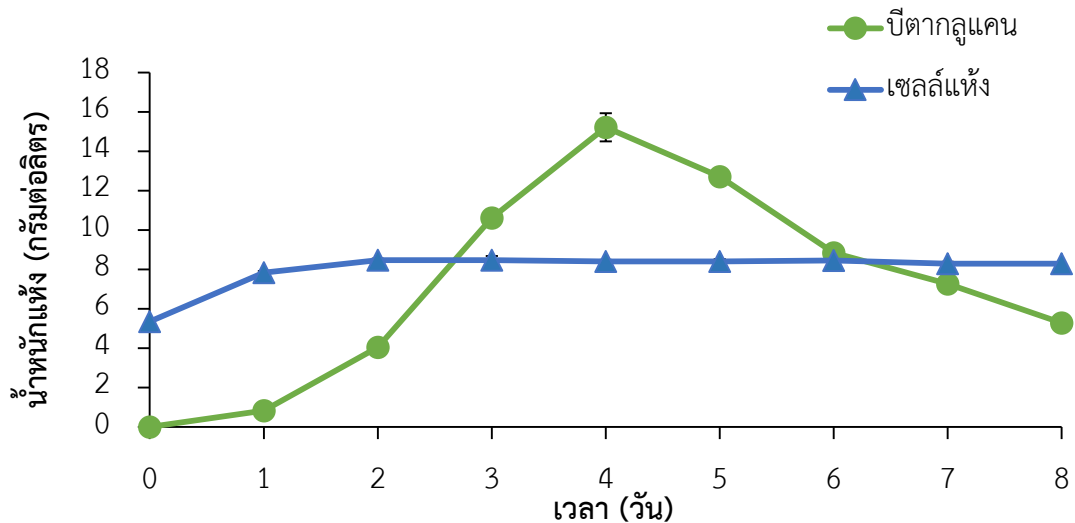


บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตปีตากูแคน

4.1.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตปีตากูแคน

จากการเลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหารสูตร production medium (PM) เป็นเวลา 8 วัน แล้วเก็บตัวอย่างปีตากูแคนและเซลล์ยีสต์เพื่อหาน้ำหนักแห้งทุกวัน พบว่า *A. thailandense* NRRL 58543 สามารถผลิตปีตากูแคนสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 4 ของการเลี้ยง โดยผลิตได้ 15.22 ± 0.71 กรัมต่อลิตร จากนั้นมีแนวโน้มลดลงจนถึงวันที่ 8 เมื่อพิจารณาการเติบโตโดยวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า *A. thailandense* NRRL 58543 มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรก และปริมาณเซลล์เริ่มคงที่เมื่อเลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 เป็นเวลา 8 วัน (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 ปริมาณปีตากูแคนและเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหาร production medium (PM) แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.1.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตปีตากุลแคน

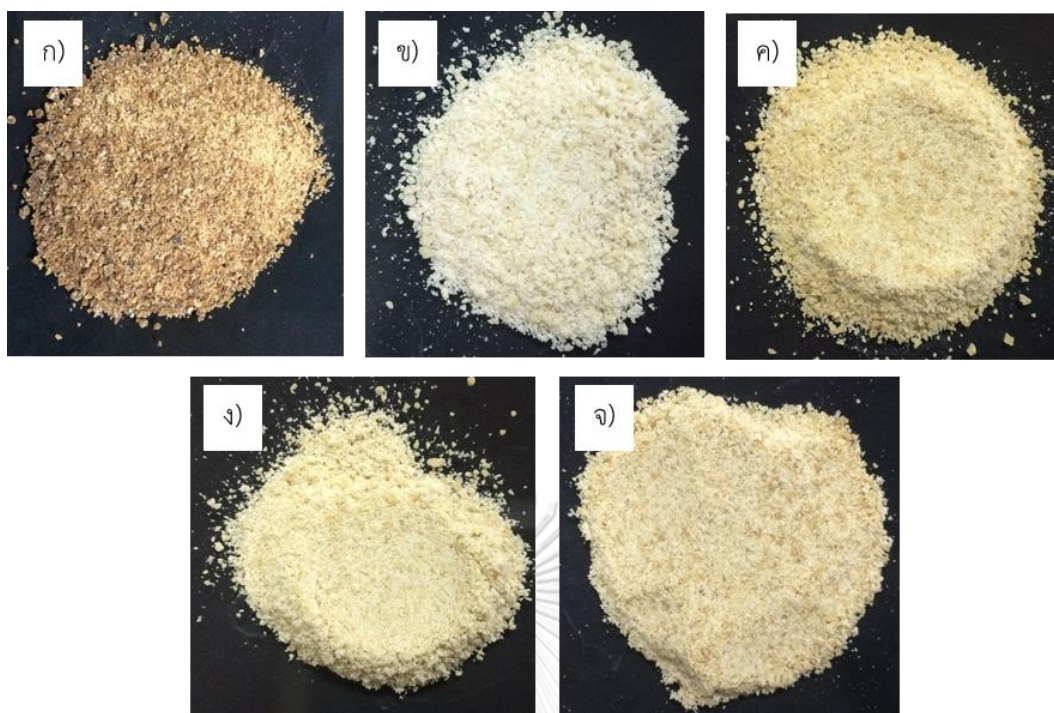
จากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตปีตากุลแคน โดยเลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหาร PM ที่แปรผันแหล่งไนโตรเจน 5 ชนิด ได้แก่ เปปโตโนโซเดียมไนเตรท โปแทสเซียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมออกซาลेट ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ศึกษาให้ผลผลิตปีตากุลแคนในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.1) โดยแหล่งไนโตรเจนชนิดโซเดียมไนเตรทให้ผลผลิตปีตากุลแคนในปริมาณสูงที่สุด (15.14 ± 0.48 กรัมต่อลิตร) รองลงมาคือ เปปโตโน โปแทสเซียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมออกซาลेट ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความขาวของปีตากุลแคน พบว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดโซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมออกซาลेट มีค่าดัชนีความขาวตามเกณฑ์ที่กำหนด (ไม่ต่ำกว่า 48.13) ซึ่งใช้เกณฑ์ค่าดัชนีความขาวของปีตากุลแคนจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (บริษัท โควิคเคทท์ อินเตอร์เนชันแนล ไทยแลนด์ จำกัด, ประเทศไทย) ที่มีค่าดัชนีความขาวเท่ากับ 48.13 ซึ่งในส่วนของเปปโตโนและโปแทสเซียมไนเตรทให้ผลผลิตปีตากุลแคนที่มีค่าดัชนีความขาวต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนด จากรูปที่ 4.2 จะเห็นว่าปีตากุลแคนที่ผลิตจากเปปโตโนมีสีในโทนน้ำตาล ในขณะที่ปีตากุลแคนจากโปแทสเซียมไนเตรทมีสีในโทนเหลือง

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป เนื่องจากให้ผลผลิตปีตากุลแคนในปริมาณสูงที่สุด และมีค่าดัชนีความขาวของปีตากุลแคนตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณปีตากุลแคนและค่าดัชนีความขาวของปีตากุลแคนที่ได้จากการเลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหารที่แปรผันแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน	ปีตากุลแคน (กรัมต่อลิตร)	ดัชนีความขาว
เปปโตโน	$14.52^{bc} \pm 0.17$	$39.56^a \pm 0.10$
โซเดียมไนเตรท	$15.14^c \pm 0.48$	$60.59^e \pm 0.10$
โปแทสเซียมไนเตรท	$14.34^b \pm 0.49$	$46.55^b \pm 0.03$
แอมโมเนียมซัลเฟต	$14.33^b \pm 0.25$	$52.44^c \pm 0.03$
แอมโมเนียมออกซาลेट	$12.39^a \pm 0.32$	$58.24^d \pm 0.04$

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



รูปที่ 4.2 ปีตากลูแคนที่ผลิตจาก *A. thailandense* NRRL 58543 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิด ก) เปปโตเนน ข) โซเดียมไนเตรท ค) โพแทสเซียมไนเตรท ง) แอมโมเนียมซัลเฟต จ) แอมโมเนียมออกซาลेट

4.1.3 แหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสมในการผลิตปีตากลูแคน

จากการศึกษาผลของการใช้แหล่งอาหารเสริม ได้แก่ น้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันปาล์ม น้ำมันรำข้าว และน้ำมันถั่วเหลือง ในการเลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่าการใช้น้ำมันดอกทานตะวัน สามารถเพิ่มผลผลิตปีตากลูแคนจากสูตรปกติ (15.14 ± 0.48 กรัมต่อลิตร) ได้ถึงร้อยละ 71.73 มีปริมาณปีตากลูแคนเท่ากับ 26.00 ± 0.68 กรัมต่อลิตร รองลงมาได้แก่อาหารเสริมชนิด น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันรำข้าว ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความขาวของปีตากลูแคนที่ได้จากการใช้อาหารเสริมพบว่ามีความใกล้เคียงกัน และมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ทั้งหมด ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้น้ำมันดอกทานตะวันเป็นแหล่งอาหารเสริมในการผลิตปีตากลูแคน สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตปีตากลูแคนได้สูงที่สุดและปีตากลูแคนมีค่าดัชนีความขาวอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ 4.2 ปริมาณปีตากลูแคนและค่าดัชนีความขาวของปีตากลูแคนที่ผลิตโดย *A. thailandense* NRRL 58543 ที่ใช้แหล่งอาหารเสริมชนิดต่างๆ

แหล่งอาหารเสริม	ปีตากลูแคน (กรัมต่อลิตร)	ดัชนีความขาว
ไม่เติม	15.14 ^a ± 0.48	60.59 ^b ± 0.10
น้ำมันมะกอก	23.23 ^c ± 0.80	62.16 ^{bc} ± 0.07
น้ำมันดอกทานตะวัน	26.00 ^d ± 0.68	63.75 ^c ± 0.16
น้ำมันปาล์ม	22.41 ^{bc} ± 0.34	52.39 ^a ± 0.35
น้ำมันรำข้าว	20.68 ^b ± 1.00	52.97 ^a ± 0.11
น้ำมันถั่วเหลือง	22.40 ^{bc} ± 0.67	51.08 ^a ± 0.03

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

4.1.4 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสม

จากการศึกษาในข้อ 4.1.2 และ 4.1.3 พบว่าโซเดียมไนเตรท และน้ำมันดอกทานตะวัน เป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสม โดยมีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากการรายงานของ Lotrakul และคณะ (2013) ในการผลิตปีตากลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้โซเดียมไนเตรท น้ำมันดอกทานตะวัน และซูโครสมาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยเลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหารสูตรที่ปรับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งอาหารเสริม ด้วยแผนการทดลองแบบ Box and Behnken Design (BBD) โดยมีปริมาณปีตากลูแคนเป็นค่าตอบสนอง

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ (ตารางที่ 4.3) มาสร้างสมการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งอาหารเสริม กับปริมาณปีตากลูแคนที่ผลิตได้ โดยใช้โปรแกรม Design Expert เวอร์ชัน 11 (Stat-Ease Inc.,US) จะได้ความสัมพันธ์ดังสมการ

$$Y = -183.84062 + 18.91208X_1 + 2455.87500X_2 + 24.95458X_3 - 3.75000X_1X_2 - 0.268750X_1X_3 - 46.87500X_2X_3 - 1.69146X_1^2 - 16827.08333X_2^2 - 1.28771X_3^2$$

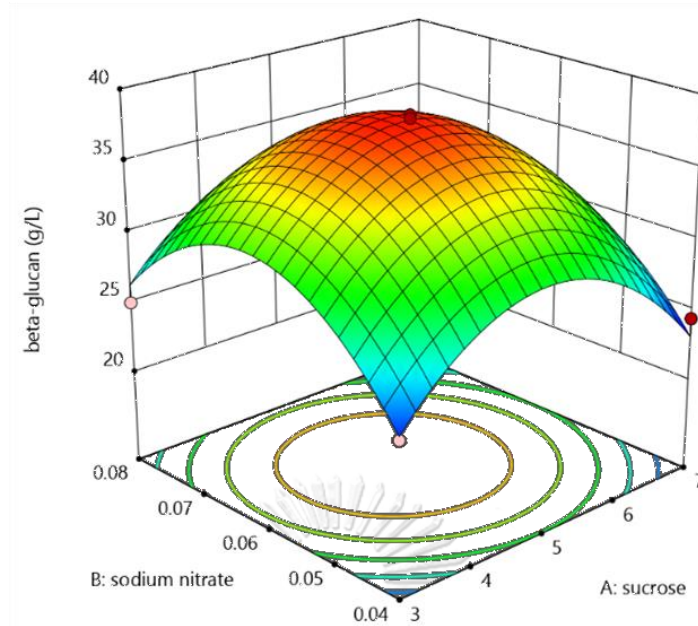
โดย Y คือ ปริมาณปีตากลูแคน (กรัมต่อลิตร) X_1 คือ ความเข้มข้นของซูโครส (ร้อยละ) X_2 คือ ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท (ร้อยละ) และ X_3 คือ ความเข้มข้นของน้ำมันดอกทานตะวัน (ร้อยละ) เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร พบว่า R^2 เท่ากับ 0.95 แสดงว่า การตอบสนองตามสมการดังกล่าวเป็นผลมาจากตัวแปรร้อยละ 95

จากค่าตอบสนอง สามารถสร้างแผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (contour plot) (รูปที่ 4.3, 4.4, 4.5) เพื่อหาค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลให้ได้ปริมาณปีตากูแคนสูงสุด และสามารถทำนายได้ว่า เมื่อปรับความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับร้อยละ 4.90 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โซเดียมไนเตรทร้อยละ 0.06 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และน้ำมันดอกทานตะวันร้อยละ 8.17 โดยปริมาตรต่อปริมาตร จะทำให้ได้ปีตากูแคนสูงสุดที่ 38.07 ± 0.11 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการทดลองซ้ำที่ ภาวะดังกล่าว พบว่า *A. thailandense* NRRL 58543 สามารถผลิตปีตากูแคนได้ 37.73 ± 0.15 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่แตกต่างจากค่าทำนายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$) แสดงว่าสามารถนำสมการที่ได้มาใช้ในการอธิบายการผลิตปีตากูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 ได้อย่างแม่นยำ

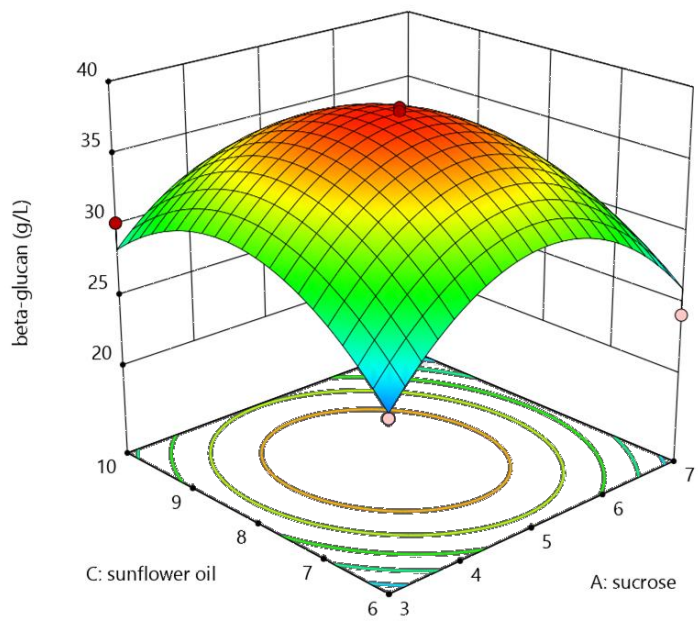


ตารางที่ 4.3 แผนการทดลองแบบ Box and Behnken Design (BBD) และผลการตอบสนอง (ปริมาณปีตากูแคน) ต่อปัจจัยที่ศึกษา สำหรับการศึกษาคความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสมต่อการผลิตปีตากูแคน จาก *A. thailandense* NRRL 58543

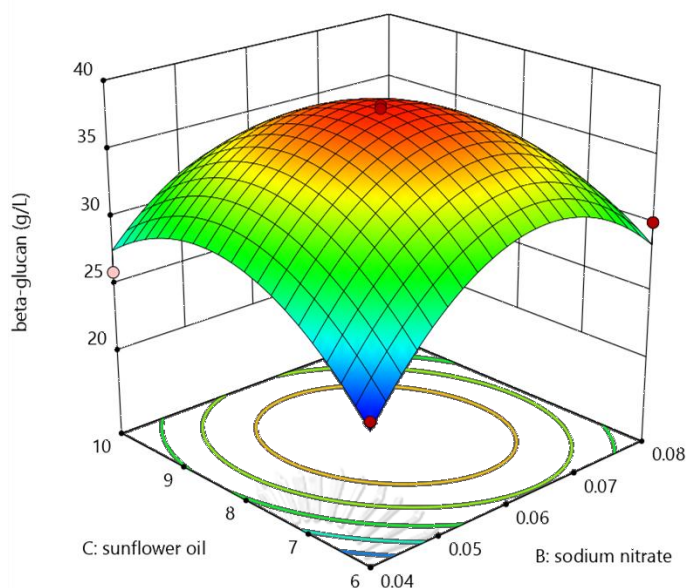
ชุดการทดลอง	รหัสปัจจัย			ปัจจัย			ปีตากูแคน (กรัมต่อลิตร)
	X ₁	X ₂	X ₃	ซูโครส (ร้อยละ)	โซเดียมไนเตรท (ร้อยละ)	น้ำมันดอกทานตะวัน (ร้อยละ)	
1	0	-1	-1	5	0.04	6	25.36
2	-1	-1	0	3	0.04	8	24.06
3	+1	0	+1	7	0.06	10	24.71
4	0	+1	+1	5	0.08	10	25.00
5	0	0	0	5	0.06	8	37.90
6	+1	-1	0	7	0.04	8	24.60
7	0	-1	+1	5	0.04	10	25.90
8	+1	+1	0	7	0.08	8	25.11
9	0	+1	-1	5	0.08	6	30.10
10	-1	0	+1	3	0.06	10	29.99
11	-1	0	-1	3	0.06	6	24.96
12	0	0	0	5	0.06	8	38.65
13	+1	0	-1	7	0.06	6	24.70
14	0	0	0	5	0.06	8	37.84
15	-1	+1	0	3	0.08	8	24.95



รูปที่ 4.3 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซูโครสและโซเดียมไนเตรตต่อปริมาณบีตากลูแคน



รูปที่ 4.4 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซูโครสและน้ำมันดอกทานตะวันต่อปริมาณบีตากลูแคน



รูปที่ 4.5 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทและน้ำมันดอกทานตะวันต่อปริมาณบีตากลูแคน

4.1.5 ค่า pH เริ่มต้นในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตากลูแคน

จากการศึกษาผลของค่า pH ในอาหารที่มีซูโครสร้อยละ 4.9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน โซเดียมไนเตรทร้อยละ 0.06 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และน้ำมันดอกทานตะวันร้อยละ 8.17 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งอาหารเสริม โดยแปรผันค่า pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่า *A. thailandense* NRRL 58543 สามารถผลิตบีตากลูแคนได้สูงสุด (37.73 ± 0.44 กรัมต่อลิตร) เมื่อ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5 (ตารางที่ 4.4) รองลงมา ได้แก่ pH 7.0 6.0 5.5 และ 5.0 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงค่าดัชนีความขาวของบีตากลูแคน พบว่ามีค่าที่ใกล้เคียงกันโดยอยู่ในช่วง 60-63 ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนดไว้

ตารางที่ 4.4 ปริมาณบีตากลูแคนและค่าดัชนีความขาวของบีตากลูแคนที่ผลิตจาก *A. thailandense* NRRL 58543 โดยแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

pH เริ่มต้น	ปริมาณบีตากลูแคน (กรัมต่อลิตร)	ดัชนีความขาว
5.0	30.26 ^a ± 0.54	60.28 ^a ± 0.07
5.5	31.62 ^b ± 1.07	63.68 ^b ± 0.16
6.0	33.29 ^c ± 0.70	60.90 ^a ± 0.35
6.5	37.73 ^e ± 0.44	62.31 ^{ab} ± 0.11
7.0	35.67 ^d ± 0.42	62.93 ^{ab} ± 0.31

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

4.1.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตบีตากลูแคน ของ *A. thailandense* NRRL 58543 โดยเลี้ยงในอาหารที่มีซูโครสร้อยละ 4.90 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน โซเดียมไนเตรทร้อยละ 0.06 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน และน้ำมันดอกทานตะวัน ร้อยละ 8.17 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งอาหารเสริม เลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่แปรผันอุณหภูมิ ได้แก่ 25 28 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อปริมาณบีตากลูแคนและค่าดัชนีความขาวของบีตากลูแคน โดย *A. thailandense* NRRL 58543 สามารถผลิตบีตากลูแคนได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (37.01±0.08 กรัมต่อลิตร) (ตารางที่ 4.5) รองลงมาได้แก่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (33.82±0.33 กรัมต่อลิตร) และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (29.76±0.37 กรัมต่อลิตร) เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความขาวของบีตากลูแคน พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บีตากลูแคนมีค่าดัชนีความขาวสูงที่สุด (63.65±0.11) รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (53.99±0.34) แต่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บีตากลูแคนมีค่าดัชนีความขาวต่ำที่สุด (27.05±0.71) และไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนดไว้ (มากกว่า 48.13) โดยสรุป พบว่า *A. thailandense* NRRL 58543 สามารถผลิตบีตากลูแคนได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะมีการผลิตน้อยลงและมีสีเข้มขึ้น (รูปที่ 4.6)

ตารางที่ 4.5 ปริมาณปีตากากูแคนและค่าดัชนีความขาวของปีตากากูแคนที่ผลิตจาก *A. thailandense* NRRL 58543 โดยแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณปีตากากูแคน (กรัมต่อลิตร)	ดัชนีความขาว
25	37.01 ^c ± 0.08	63.65 ^c ± 0.11
28	33.82 ^b ± 0.33	53.99 ^b ± 0.34
30	29.76 ^a ± 0.37	27.05 ^a ± 0.71

a,b,c ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

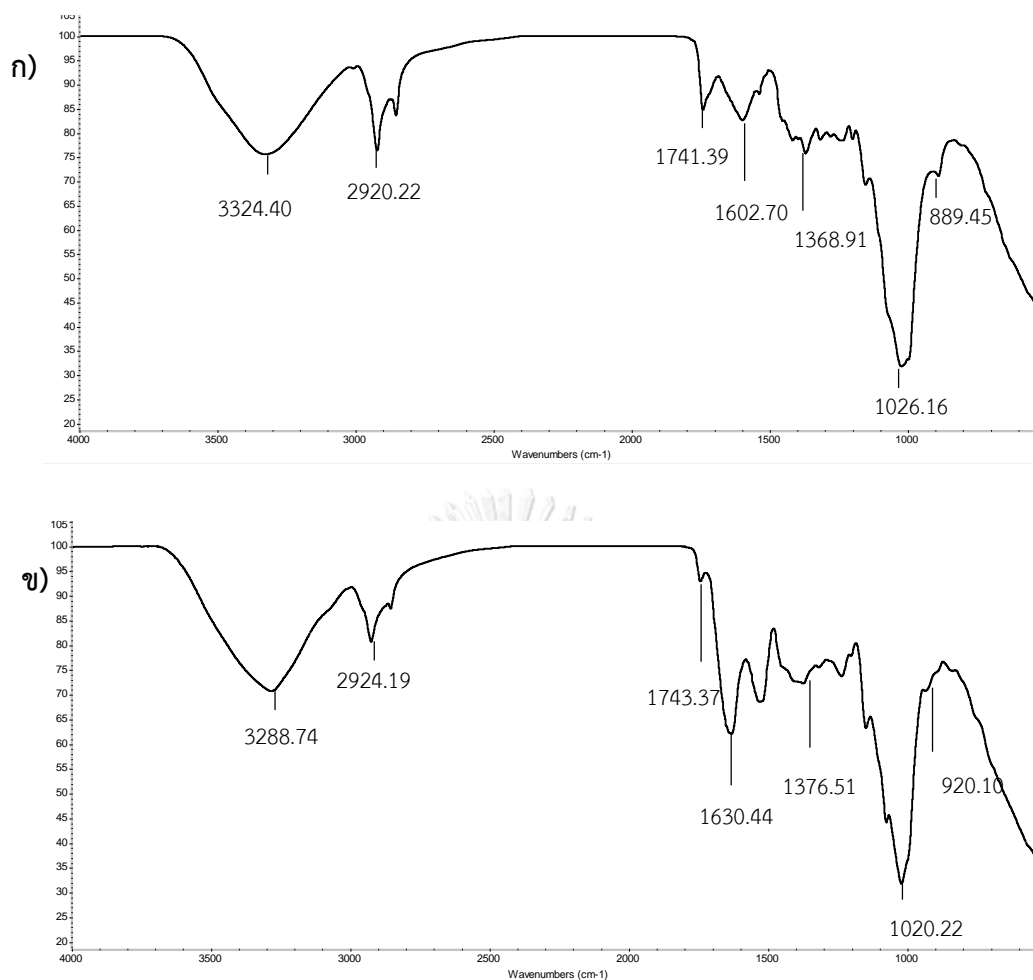


รูปที่ 4.6 ปีตากากูแคนที่ผลิตโดย *A. thailandense* NRRL 58543 ที่อุณหภูมิ ก) 25 ข) 28 และ ค) 30 องศาเซลเซียส

4.2 การตรวจสอบผลจากการลดขนาดโมเลกุลของปีตากากูแคน

4.2.1 การวิเคราะห์โครงสร้างของปีตากากูแคนโดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy

ตรวจสอบโครงสร้างของปีตากากูแคนไฮโดรไลเซตด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy เพื่อศึกษาสมบัติของปีตากากูแคนที่เปลี่ยนแปลงไปจากการย่อยของเอนไซม์ปีตากากูแคนเนส และตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันที่เกี่ยวข้องกับปีตากากูแคน (Nair และคณะ, 2016) โดยปีตากากูแคนมีเอกลักษณ์จำเพาะอยู่ระหว่างความยาวคลื่น 3,400-800 เซนติเมตร⁻¹ (รูปที่ 4.7) ผลการทดลอง พบว่าปีตากากูแคนไฮโดรไลเซตแสดงความยาวคลื่นที่ 927.10 เซนติเมตร⁻¹ ซึ่งเป็นลักษณะของพันธะปีตา-ไกลโคซิดิก (β -glycosidic) (Yurlova, 1997) ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลซึ่งยังหลงเหลืออยู่ (ตารางที่ 4.6) และพบความยาวคลื่นของหมู่ฟังก์ชันอื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกับปีตากากูแคนดั้งเดิม



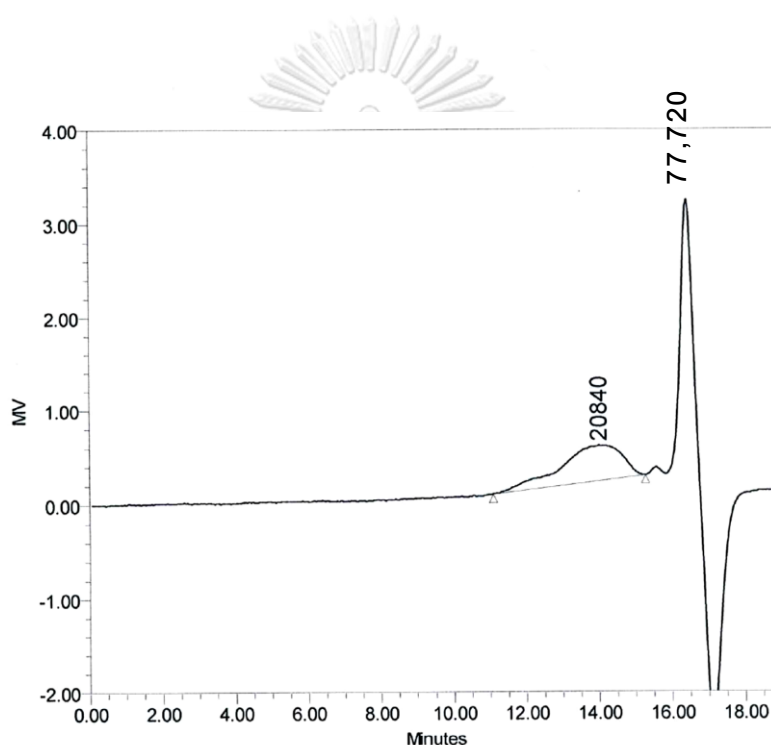
รูปที่ 4.7 FT-IR สเปกตรัมของ ก) บิตากลูแคนดั้งเดิม และ ข) บิตากลูแคนไฮโดรไลเซต

ตารางที่ 4.6 ตำแหน่งพีคของหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ซึ่งได้จาก FT-IR สเปกตรัมของบิตากลูแคนดั้งเดิมและ บิตากลูแคนไฮโดรไลเซต

หมู่ฟังก์ชัน	บิตากลูแคนดั้งเดิม	บิตากลูแคนไฮโดรไลเซต
-OH	3324.40	3288.74
-C-H	2920.22	2924.19
-C-OH	1602.70	1630.44
-OH bonding in alcohol	1368.91	1376.51
C-O	1026.16	1022.22
บิตา-ไกลโคซิดิก	889.45	927.10

4.2.2 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของปีตากลูแคนโดยวิธีเจลเพอร์มิเอชันโครมาโทกราฟี (gel permeation chromatography, GPC)

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของปีตากลูแคนไฮโดรไลเซท เพื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของปีตากลูแคนดั้งเดิมโดยวิธีเจลเพอร์มิเอชันโครมาโทกราฟี (gel permeation chromatography, GPC) พบว่าปีตากลูแคนไฮโดรไลเซทมีมวลโมเลกุลประมาณ 77,720 ดาลตัน (รูปที่ 4.8) แต่ปีตากลูแคนดั้งเดิมไม่สามารถแปรผลการวิเคราะห์ได้ เนื่องจากปีตากลูแคนเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีมวลโมเลกุลสูง ซึ่งปีตากลูแคนที่มีมวลโมเลกุลสูงนั้นจะไม่สามารถละลายน้ำได้ (insoluble glucan) ทำให้การวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วยวิธี GPC ที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายไม่สามารถทำได้

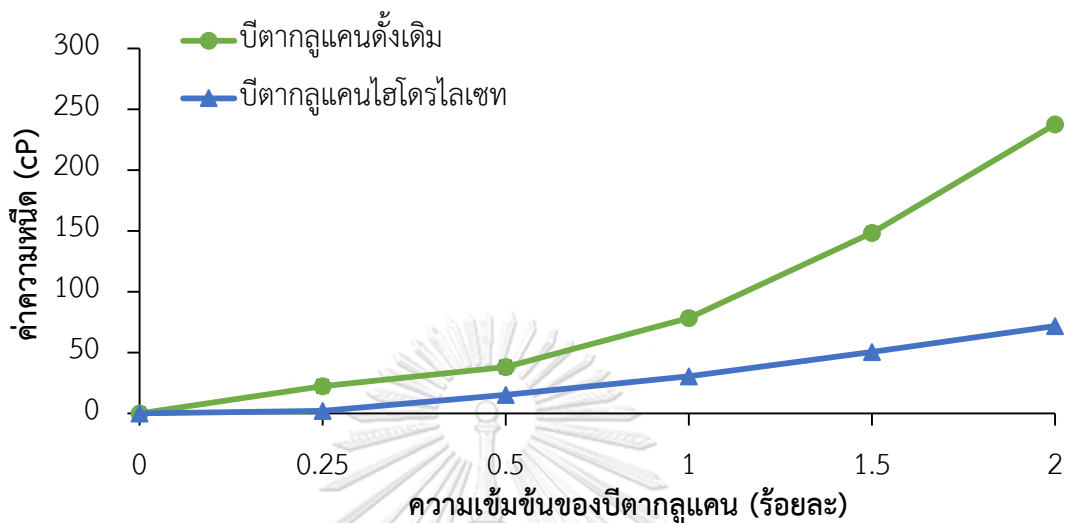


รูปที่ 4.8 GPC chromatogram ของปีตากลูแคนไฮโดรไลเซท

4.2.3 ค่าความหนืด

การวัดความหนืดของสารละลายที่ความเข้มข้นต่ำ (dilute solution viscometry) เป็นหนึ่งในเทคนิคในการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์หรือสารโมเลกุลใหญ่ (macromolecules) จากการวิเคราะห์ค่าความหนืดของสารละลายปีตากลูแคนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25-2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยเครื่องวัดความหนืด Brookfield Viscometer พบว่าปีตากลูแคนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์หรือปีตากลูแคนไฮโดรไลเซท (hydrolysate β -glucan) มีแนวโน้มของ

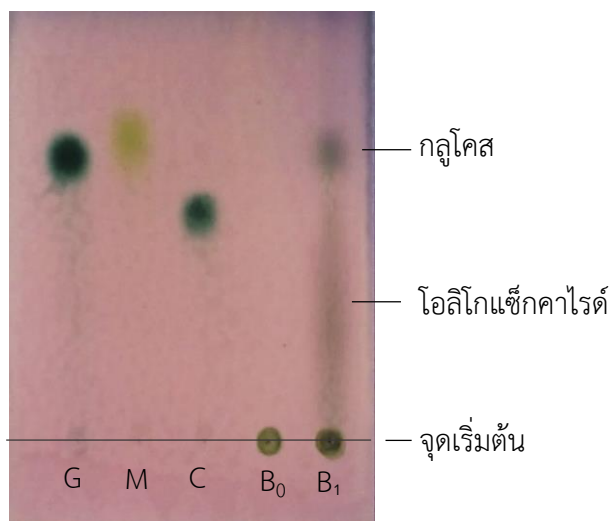
ค่าความหนืดต่ำกว่าบีตากลูแคนก่อนการย่อยหรือบีตากลูแคนดั้งเดิม (native β -glucan) ดังแสดงในรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงความหนืดของบีตากลูแคนที่ความเข้มข้นที่ต่าง ๆ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.2.4 การตรวจสอบโพลิโกลแซ็กคาไรด์ที่เกิดขึ้น

หลังจากย่อยพอลิเมอร์บีตากลูแคนด้วยเอนไซม์บีตากลูคาเนส ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ โพลิโกลแซ็กคาไรด์ เปรียบเทียบกับบีตากลูแคนดั้งเดิม โดยใช้วิธีอย่างง่ายคือเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) ระบบเอทานอลต่อบิวทานอลต่อน้ำ อัตราส่วน 5:5:4 หลังจากจุ่มแผ่น TLC ด้วยสารละลายอะนิซัลดีไฮด์ (anisaldehyde dipping reagent) ที่ประกอบด้วยเมทานอลต่ออะนิซัลดีไฮด์ต่อกรดซัลฟิวริก ในอัตราส่วน 95:3:3 แล้วให้ความร้อนที่ 160 องศาเซลเซียส พบแถบสีเขียวลากยาวจากจุดเริ่มต้นซึ่งมีบางส่วนไม่เคลื่อนที่ออกจากจุดเริ่มต้น แสดงว่าการย่อยบีตากลูแคนด้วยเอนไซม์บีตากลูคาเนสได้ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยโพลิโกลแซ็กคาไรด์ และยังมีบีตากลูแคนโมเลกุลใหญ่ซึ่งไม่ถูกย่อย และพบจุด 1 จุดที่ $R_f = 0.58$ ดังแสดงในรูปที่ 4.10 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานยืนยันว่าเป็นจุดของน้ำตาลกลูโคส แสดงว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยนอกจากโพลิโกลแซ็กคาไรด์แล้วยังมีน้ำตาลกลูโคสบางส่วน สำหรับบีตากลูแคนดั้งเดิมพบว่าไม่สามารถเคลื่อนที่ออกจากจุดเริ่มต้น คาดว่าเนื่องจากมีขนาดโมเลกุลใหญ่จึงไม่ถูกชะขึ้นไปพร้อม mobile phase

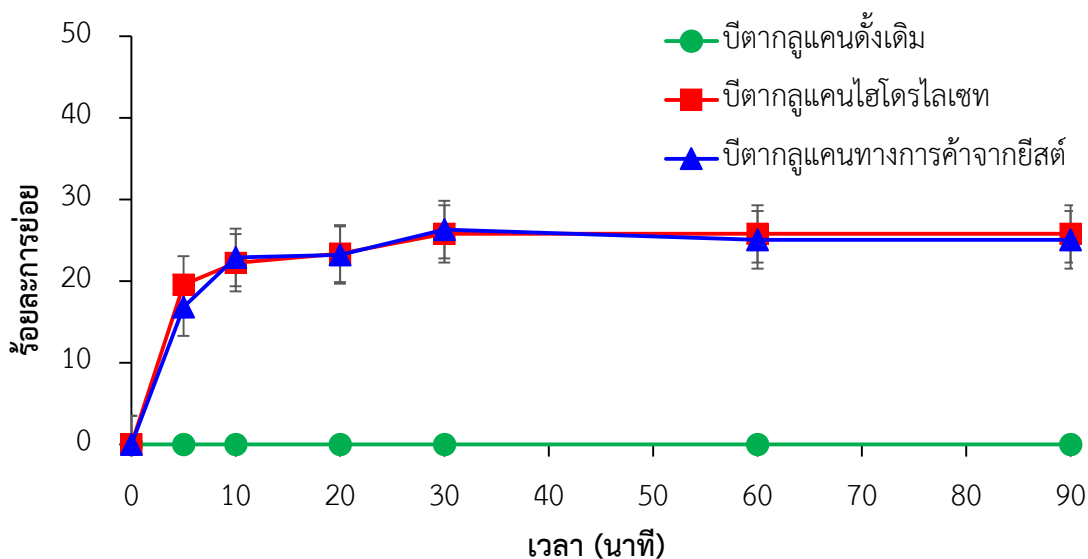


รูปที่ 4.10 โครมาโตกราฟี (TLC) ของปีตากลูแคน ซ้ายไปขวา สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (G) สารมาตรฐานน้ำตาลแมนโนส (M) สารมาตรฐานน้ำตาลเซลโลไบโอส (C) ปีตากลูแคนดั้งเดิม (B₀) และปีตากลูแคนไฮโดรไลเซท (B₁)

4.3 การศึกษาสมบัติพรีไบโอติกของปีตากลูแคนไฮโดรไลเซท

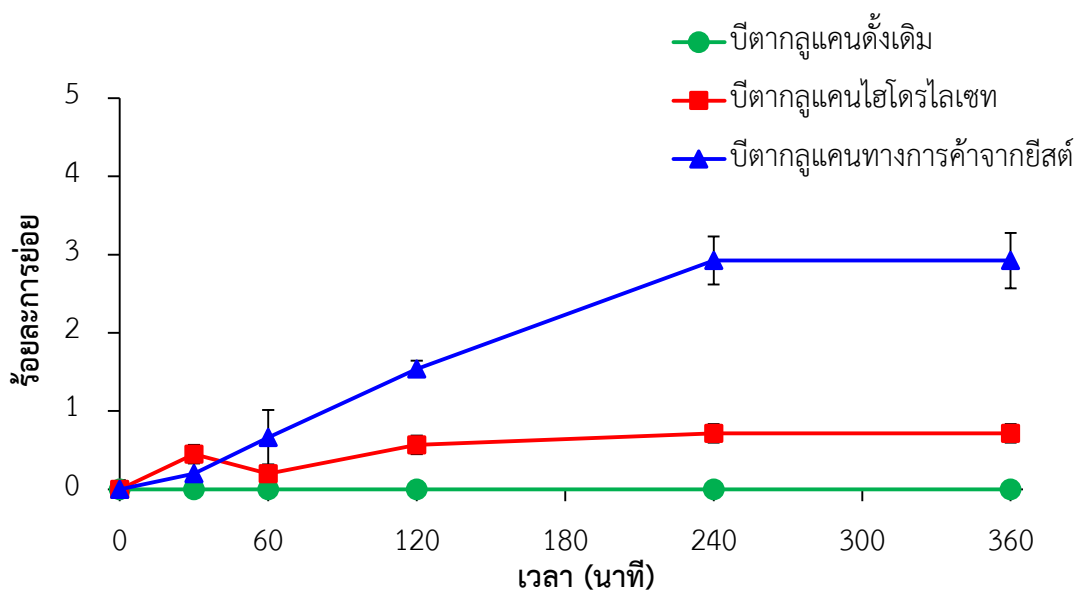
4.3.1 การทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร

ปีตากลูแคนไฮโดรไลเซทถูกนำมาศึกษาการทนต่อการย่อยของในระบบทางเดินอาหารส่วนบนแบบจำลอง ซึ่งประกอบด้วยปากและกระเพาะอาหาร การทดลองการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส แสดงผลเป็นร้อยละการย่อย (% hydrolysis) ที่เวลาต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่าเมื่อผสมตัวอย่างปีตากลูแคนกับน้ำลายเทียมและเติมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เอนไซม์เริ่มย่อยปีตากลูแคนโดยมีร้อยละการย่อยเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 10 นาทีแรก จากนั้นเริ่มย่อยอย่างช้า ๆ จนกระทั่งถึงนาทีที่ 30 ซึ่งเป็นจุดที่มีอัตราการย่อยสูงสุดและคงที่จนสิ้นสุดการย่อย โดยที่อัตราการย่อยสูงสุดของปีตากลูแคนไฮโดรไลเซทในน้ำลายเทียมที่สภาวะการย่อยในปาก คือร้อยละ 25.8 ในขณะที่ปีตากลูแคนดั้งเดิม พบว่าสามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ได้อย่างคงที่โดยมีร้อยละการย่อยเท่ากับ 0 เมื่อพิจารณาปีตากลูแคนทางการค้าที่สกัดจากยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่ามีอัตราการย่อยสูงสุดเท่ากับร้อยละ 26.32 ซึ่งใกล้เคียงกับปีตากลูแคนไฮโดรไลเซท



รูปที่ 4.11 ร้อยละการย่อยของปิตากลูแคน เมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ภายใต้สภาวะจำลองการย่อยในปาก ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เมื่อปิตากลูแคนผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในน้ำลายแล้ว จะถูกย่อยต่อภายใต้สภาวะจำลองในกระเพาะอาหาร ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ถูกยับยั้งจากค่า pH ที่เปลี่ยนไป การทดลองการย่อยด้วยกรดในกระเพาะอาหาร (ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์, pH=2) เป็นเวลา 360 นาที แสดงผลเป็นร้อยละการย่อย (% hydrolysis) ที่เวลาต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 พบว่าปิตากลูแคนไฮโดรไลเซทมีร้อยละการย่อยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ตั้งแต่เริ่มปรับสภาวะของสารละลายให้เป็นกรดจนถึงที่ 30 นาที และคงที่จนถึงสิ้นสุดการย่อย พบว่าการย่อยสูงสุดเท่ากับร้อยละ 0.71 ในขณะที่ปิตากลูแคนดั้งเดิม สามารถทนต่อการย่อยด้วยกรดในกระเพาะอาหารได้อย่างคงที่ โดยมีอัตราการย่อยเท่ากับร้อยละ 0 เมื่อเปรียบเทียบกับปิตากลูแคนที่สกัดจากยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่ามีอัตราการย่อยเพิ่มขึ้นสูงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งถึงนาทีที่ 240 ซึ่งเป็นจุดที่มีอัตราการย่อยสูงสุดเท่ากับร้อยละ 2.92 และคงที่จนถึงสิ้นสุดการย่อย



รูปที่ 4.12 ร้อยละการย่อยของปีตากลูแคน เมื่อผ่านการย่อยด้วย HCl buffer pH 2.0 ภายใต้การจำลองสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการทดสอบร้อยละการย่อยของปีตากลูแคนไฮโดรไลเซทในระบบทางเดินอาหารซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ปากและกระเพาะอาหาร พบว่ามีระดับการถูกย่อยคือร้อยละ 25.8 และ 0.71 ตามลำดับ มีร้อยละการย่อยรวมเท่ากับ 26.51 สำหรับปีตากลูแคนดั้งเดิมพบว่าไม่ถูกย่อยจากปากและกระเพาะอาหาร เมื่อเปรียบเทียบกับปีตากลูแคนทางการค้าที่สกัดจาก *S. cerevisiae* พบว่าปีตากลูแคนทางการค้ามีระดับการย่อยสูงกว่า คือร้อยละ 26.32 และ 2.92 ตามลำดับ มีการย่อยรวมเท่ากับร้อยละ 29.24

4.3.2 การทดสอบการกระตุ้นการเติบโตของ *L. casei* และ *L. brevis*

จากการทดสอบสมบัติของปีตากลูแคนไฮโดรไลเซทในการกระตุ้นการเติบโตของโพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. brevis* และ *L. casei* โดยเปรียบเทียบการเติบโตของแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ปีตากลูแคนไฮโดรไลเซท ปีตากลูแคนดั้งเดิม ปีตากลูแคนทางการค้าที่สกัดจาก *S. cerevisiae* (บริษัท โควิกเคทท์ อินเตอร์เนชันแนล ไทยแลนด์ จำกัด) และชุดควบคุมที่เติมกลูโคสและไม่เติมแหล่งคาร์บอน โดยควบคุมความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมคาร์บอน/มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ปีตากลูแคนไฮโดรไลเซทสามารถกระตุ้นการเติบโตของ *L. brevis* และ *L. casei* ได้ดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับปีตากลูแคนดั้งเดิมและชุดควบคุม ดังแสดง

ในตารางที่ 4.7 และ 4.8 แต่เมื่อเวลาที่ 48 ชั่วโมง ปิตากุลูแคนดั้งเดิมสามารถกระตุ้นการเติบโตของฟรีไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่น้อยกว่าปิตากุลูแคนจากยีสต์เมื่อเปรียบเทียบกับปิตากุลูแคนไฮโดรไลเซท แต่น้อยกว่าปิตากุลูแคนทางการค้าในผลการทดลองจาก *L. casei*

ตารางที่ 4.7 การเติบโตของแบคทีเรีย *L. brevis* โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

แหล่งคาร์บอน	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/ml)		
	0 ชั่วโมง ^{ns}	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
ปิตากุลูแคนไฮโดรไลเซท	7.33±0.30 ^A	8.87±0.16 ^{dB}	8.91±0.14 ^{cC}
ปิตากุลูแคนดั้งเดิม	7.34±0.24 ^A	8.82±0.23 ^{CB}	9.79±0.15 ^{eC}
ปิตากุลูแคนทางการค้าจากยีสต์	7.38±0.18 ^A	8.86±0.18 ^{dB}	9.42±0.19 ^{dC}
กลูโคส	7.21±0.28 ^A	7.90±0.21 ^{aC}	7.58±0.13 ^{aB}
ไม่เติม	7.25±0.25 ^A	8.53±0.12 ^{bC}	8.42±0.24 ^{bB}

ns ไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

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

A,B,C ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันแถวเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($p\leq 0.05$)

ตารางที่ 4.8 การเติบโตของแบคทีเรีย *L. casei* โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

แหล่งคาร์บอน	จำนวนแบคทีเรีย (log CFU/ml)		
	0 ชั่วโมง ^{ns}	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
ปิตากุลูแคนไฮโดรไลเซท	7.95±1.17 ^A	9.23±0.01 ^{cC}	9.07±0.06 ^{CB}
ปิตากุลูแคนดั้งเดิม	7.92±0.28 ^A	9.08±0.13 ^{bB}	10.29±0.12 ^{dC}
ปิตากุลูแคนทางการค้าจากยีสต์	7.94±1.64 ^A	9.45±0.04 ^{dB}	10.53±0.12 ^{eC}
กลูโคส	7.93±0.24 ^A	8.83±0.10 ^{aC}	8.62±0.11 ^{bB}
ไม่เติม	7.91±1.02 ^A	8.83±0.10 ^{aC}	8.27±0.07 ^{aB}

ns ไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

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

A,B,C ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันแถวเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($p\leq 0.05$)

4.4 ผลของปริมาณปีตากูแคนต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์เยลลี่พีไอโอดิก

เนื่องจากปีตากูแคนมีสมบัติไม่ละลายน้ำแต่สามารถอุ้มน้ำและทำให้เกิดความหนืดกับสารละลาย พบว่าเมื่อใส่ปีตากูแคนในระหว่างการต้มเคี้ยวเยลลี่ จะทำให้ลิเคอร์จับตัวกันเป็นก้อนซึ่งกวนผสมได้ยาก และเมื่อนำมาเทลงในถาดพบว่าเนื้อผลิตภัณฑ์ซึ่งมีความหนืดสูงมาก ทำให้เกิดส่วนเกิน (tailing) ทำให้รูปร่างไม่สวยงามเท่าที่ควร และเนื้อผลิตภัณฑ์มีความเหนียวมากเกินไปทำให้เคี้ยวยาก ดังนั้นจึงแปรปริมาณปีตากูแคนในสูตรเยลลี่พีไอโอดิกในระดับที่ค่อนข้างต่ำ คือร้อยละ 0.25 และ 0.50 เปรียบเทียบคุณภาพทางกายภาพและคุณภาพทางประสาทสัมผัสกับเยลลี่สูตรควบคุมที่ไม่เติมปีตากูแคน ซึ่งให้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

4.4.1 คุณภาพทางกายภาพ

จากการศึกษาคุณภาพทางกายภาพของเยลลี่พีไอโอดิก พบว่าการเพิ่มปริมาณของปีตากูแคนในเยลลี่จะส่งผลให้เยลลี่มีสีเข้มขึ้นและมีสีเหลืองมากขึ้น จากค่า L^* ซึ่งเป็นค่าความสว่าง มีแนวโน้มที่ลดลง ค่า a^* ซึ่งแสดงถึงสีแดงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และค่า b^* แสดงถึงสีเหลือง ($-b^*$) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาเนื้อสัมผัสของเยลลี่ พบว่า hardness (ความแข็ง), chewiness (ความคงทนเมื่อถูกเคี้ยว) และ gumminess (ความเหนียวยืดติด) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่า springiness (ความยืดหยุ่น) และ cohesiveness (การยึดเกาะ) มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงว่าการเพิ่มปริมาณปีตากูแคนทำให้เยลลี่มีความแข็งมากขึ้นและเคี้ยวยากขึ้น (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 คุณภาพทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เยลลี่สูตรที่มีปีตากลูแคนร้อยละ 0.25 และ 0.5 และสูตรควบคุมที่ไม่เติมปีตากลูแคน

คุณลักษณะ	สูตรควบคุม	สูตรปีตากลูแคน 0.25	สูตรปีตากลูแคน 0.50
L*	49.26±0.80 ^b	48.66±0.65 ^b	44.21±0.37 ^a
a*	1.10±0.07 ^a	1.03±0.08 ^a	1.77±0.05 ^b
b*	-2.83±0.42 ^a	-2.81±0.16 ^a	-4.34±0.19 ^b
hardness (N)	2.37±0.17 ^a	2.63±0.25 ^b	3.24±0.42 ^c
springiness	1.12±0.17 ^c	1.06±0.11 ^b	0.99±0.02 ^a
cohesiveness	0.98±0.01 ^b	0.96±0.02 ^{ab}	0.94±0.01 ^a
gumminess (N)	2.31±0.16 ^a	2.52±0.22 ^b	3.04±0.40 ^c
chewiness (N)	2.51±0.29 ^a	2.67±0.41 ^a	3.04±0.43 ^b

a,b,c ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

4.4.2 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

ผลการประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เยลลี่ฟรีไปโอติก จากผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 30 คน ได้แก่ เพศชาย 7 คน และเพศหญิง 23 คน อายุระหว่าง 20-35 ปี พบว่าเยลลี่ที่มีส่วนผสมของปีตากลูแคนได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค โดยจะเห็นได้จากคะแนนความชอบที่สูงกว่า 5 คะแนน จากคะแนนเต็ม 9 คะแนน ซึ่งใกล้เคียงกับสูตรควบคุม แสดงผลในตารางที่ 4.10 โดยพบว่า การเพิ่มปริมาณปีตากลูแคนในเยลลี่ฟรีไปโอติก ให้ผลทางด้านลักษณะปรากฏ ความยืดหยุ่น ความยากง่ายในการเคี้ยว และรสชาติ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในส่วนคะแนนความชอบด้านสี พบว่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาร่วมกับคุณภาพทางกายภาพจะแสดงให้เห็นว่า ผู้ทดสอบชอบผลิตภัณฑ์เยลลี่ฟรีไปโอติกที่มีสีออกไปทางที่มีสีเหลืองเข้มมากกว่า ส่วนความยืดหยุ่นถึงแม้จะมีความแตกต่างกันเมื่อตรวจวัดทางกายภาพ แต่ผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบไม่แตกต่างกัน

โดยผลิตภัณฑ์เยลลี่ฟรีไปโอติกที่มีส่วนผสมของปีตากลูแคน มีคะแนนความชอบโดยรวมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรมาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์เยลลี่สามารถผสมปีตากลูแคนได้ในปริมาณร้อยละ 0.50 โดยไม่ทำให้คุณภาพด้านประสาทสัมผัสและด้านอื่น ๆ เปลี่ยนแปลงไป

ตารางที่ 4.10 คุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เยลลี่สูตรที่มีปีตากลูแคนร้อยละ 0.25 และ 0.5 และสูตรควบคุมที่ไม่เติมปีตากลูแคน

คุณลักษณะ	สูตรควบคุม	สูตรปีตากลูแคน 0.25	สูตรปีตากลูแคน 0.50
ลักษณะปรากฏ ^{ns}	6.93±1.10	6.91±0.67	7.73±0.86
สี	7.38±1.33 ^a	7.80±0.87 ^a	8.36±0.98 ^b
ความยืดหยุ่น ^{ns}	7.46±1.75	7.58±0.95	7.50±1.04
ความยากง่ายในการเคี้ยว ^{ns}	7.50±1.16	7.08±1.19	7.08±1.04
รสชาติ ^{ns}	7.42±1.04	7.42±1.32	7.75±0.86
ความชอบโดยรวม ^{ns}	7.54±1.08	7.82±1.19	6.73±0.75

ns ไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

a,b ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวเดียวกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq 0.05$)

4.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์เยลลี่ฟรีไบโอติก

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์เยลลี่ฟรีไบโอติกที่ผสมปีตากลูแคนร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยบรรจุลงในถุงออลูมิเนียมฟอยล์ขนาด 7x11 เซนติเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบคุณภาพในวันที่ 0 7 และ 14 ของการเก็บรักษา ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

4.5.1 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ

โดยการวิเคราะห์ค่าสีและลักษณะเนื้อสัมผัส (texture profile analysis) ให้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 4.11 ค่าสีของผลิตภัณฑ์เยลลี่ฟรีไบโอติก พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ลักษณะเนื้อสัมผัสที่ประกอบด้วย hardness (ความแข็ง) cohesiveness (การยึดเกาะ) springiness (ความยืดหยุ่น) chewiness (การคงทนเมื่อถูกเคี้ยว) gumminess (ความเหนียวยืดติด) มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเก็บรักษานานขึ้น

ตารางที่ 4.11 คุณภาพทางกายภาพของเยลลี่พีรไบโอติกในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน

คุณภาพทางกายภาพ	อายุการเก็บรักษา (วัน)		
	0	7	14
L* ^{ns}	44.21±0.37	41.32±0.20	42.15±0.34
a* ^{ns}	1.77±0.05	1.68±0.03	1.78±0.01
b* ^{ns}	-4.34±0.19	-4.39±0.07	-4.61±0.12
hardness (N)	3.24±0.42 ^b	3.09±0.27 ^{ab}	2.91±0.44 ^a
springiness	0.99±0.02 ^c	0.97±0.02 ^b	0.94±0.02 ^a
cohesiveness	0.93±0.01 ^c	0.91±0.01 ^b	0.87±0.03 ^a
gumminess (N)	3.04±0.40 ^b	2.74±0.41 ^{ab}	2.68±0.25 ^a
chewiness (N)	3.04±0.43 ^b	2.73±0.57 ^{ab}	2.61±0.27 ^a

ns ไม่มีนัยสำคัญ (p>0.05)

a,b,c ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันแถวเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p≤0.05)

4.5.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์

การตรวจสอบทางจุลินทรีย์โดยตรวจหาจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนยีสต์และรา และจำนวน *E. coli* ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเยลลี่พีรไบโอติกสูตรที่มีปีตากลูแคนร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน โดยจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา และจำนวน *E. coli* เป็นตัวกำหนดการสิ้นสุดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ โดยทำการสุ่มตัวอย่างมาทำการทดสอบทุก ๆ 7 วัน พบว่าเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ 1×10⁴ CFU/กรัม และจำนวนยีสต์และราเท่ากับ 1.2×10³ CFU/กรัม ซึ่งเกินเกณฑ์ที่กำหนดของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (เยลลี่แข็ง, มผช 250/2547) ที่กำหนดว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต้องไม่เกิน 1×10⁴ CFU/กรัม และจำนวนยีสต์และราต้องไม่เกิน 1×10² CFU/กรัม โดยเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเก็บรักษา จึงทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเสื่อมเสีย (ตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.12 คุณภาพทางจุลินทรีย์ของเยลลีพรีไบโอติกระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน

อายุการเก็บรักษา (วัน)	จุลินทรีย์		
	จุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/กรัม)	ยีสต์และรา (CFU/กรัม)	<i>E. coli</i> (MPN/กรัม)
0	$<1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	<3
7	$<1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^2$	<3
14	1×10^4	1.2×10^3	<3



บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

5.1 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543

5.1.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน

จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดที่ระยะเวลาต่างกัน ดังนั้น จึงทำการศึกษาการเติบโตและการผลิตบีตากลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 เพื่อทราบถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บบีตากลูแคนให้ได้ปริมาณสูงสุด และตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตบีตากลูแคนและการเติบโต โดยเลี้ยง *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหาร PM ที่มีซูโครสและโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) พบว่า *A. thailandense* NRRL 58543 มีการเติบโตระยะ log phase ในช่วงเวลา 0 ถึง 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะ stationary phase อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้ไม่สามารถระบุช่วงเวลาของการเติบโตแบบ lag phase ได้ซึ่งอาจเนื่องมาจากอาหารที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อมีความใกล้เคียงกับอาหารสูตร production medium (PM) ส่งผลให้จุลินทรีย์ปรับตัวในอาหารได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้มีระยะ lag phase สั้นมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ สำหรับการผลิตบีตากลูแคน *A. thailandense* NRRL 58543 สามารถผลิตบีตากลูแคนในช่วง stationary phase โดยสามารถผลิตได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงคือ 15.22 ± 0.71 กรัมต่อลิตร สำหรับการผลิตบีตากลูแคน พบว่ามีลักษณะคล้ายกับการผลิตพุลูลแลนซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) คือจะเริ่มผลิตในช่วง late log phase ทั้งนี้การผลิตพุลูลแลนจะผลิตได้มากขึ้นในภาวะที่การเติบโตจำกัด หรือช่วงที่เข้าสู่ stationary phase (Ponnusami และ Gunasekar, 2015; Vicente และคณะ, 2016) การผลิตบีตากลูแคนจะเริ่มลดลง ซึ่งอาจเกิดจากภาวะที่อาหารถูกใช้หมด หรือมีการสร้างเอนไซม์บางชนิดมาช่วยย่อยบีตากลูแคน เช่น บีตา-1,3-D-กลูคาเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ Dake และคณะ (2004) พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NCIM-1041 สามารถผลิตได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมบีตากลูแคนเป็นตัวชักนำ ดังนั้น จึงทำการเก็บบีตากลูแคนในวันที่ 4 ของการเลี้ยง ในการทดลองขั้นต่อไป

5.1.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคน

แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Rajput และคณะ, 2014) และการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* (Ravella และคณะ, 2010) การศึกษาชนิดของแหล่ง

คาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มการผลิตบีตากลูแคนให้ได้ปริมาณที่สูงขึ้น Lotrakul และคณะ (2013) ได้รายงานว่าซูโครสและโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตบีตากลูแคนที่มีโครงสร้างคล้ายออบาซิแดน (aubasidan-like β -glucan) จาก *A. thailandense* NRRL 58543 ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้น (preliminary study) ของงานวิจัยนี้ โดยการแปรชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส และซูโครส พบว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้บีตากลูแคนปริมาณสูงที่สุด และไม่มีผลต่อค่าดัชนีความขาวของบีตากลูแคน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสูตร PM

สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ได้แก่ เปปโตน โซเดียมไนเตรท โพแทสเซียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมออกซาลेट พบว่า *A. thailandense* NRRL 58543 สามารถผลิตบีตากลูแคนได้ดีที่สุดในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรท ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yurlova และคณะ (1997) พบว่า *A. pullulans* var. *aubasidani* สามารถใช้โซเดียมไนเตรทในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างคล้ายออบาซิแดน (aubasidan-like EPS) ได้ดีที่สุดในอาหารของ พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล (2555) ที่ศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. thailandense* NRRL 58543 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกันกับที่ใช้ในงานวิจัยนี้ พบว่าอาหารสูตร PM ที่มีโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลการผลิตบีตากลูแคนได้สูงที่สุด (3.53 ± 0.03 กรัมต่อลิตร)

ชนิดของแหล่งไนโตรเจนยังมีผลต่อค่าดัชนีความขาวของบีตากลูแคน โดยบีตากลูแคนที่ได้จากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ได้จากการทดลองนี้คือ เปปโตน มีค่าดัชนีความขาวต่ำที่สุด (39.56) ในขณะที่บีตากลูแคนจากแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์มีค่าดัชนีความขาวใกล้เคียงกัน (52-60) ซึ่งการที่มีค่าดัชนีความขาวต่ำมีสาเหตุจากการปนเปื้อนเม็ดสีเมลานินที่เชื่อผลผลิตขึ้นโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative polymerisation) ของสารประกอบฟีนอล ที่มีกรดอะมิโนชนิดไทโรซีน (tyrosine) เป็นสารตั้งต้น ซึ่งแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จะประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด (Sun และคณะ, 2016; Yurlova และคณะ, 2008) Sun และคณะ (2016) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเมลานินจากเห็ดหูหนู (*Auricularia auricular*) พบว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน และบีฟสการ์ด ให้ผลผลิตเมลานินสูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์

5.1.3 แหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสมในการผลิตบีตาไกลูแคน

จากการทดลองใช้แหล่งอาหารเสริมชนิดต่าง ๆ เพื่อเพิ่มผลผลิตบีตาไกลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 พบว่าน้ำมันดอกทานตะวันเป็นแหล่งอาหารเสริมที่สามารถกระตุ้นการผลิตบีตาไกลูแคนได้ดีที่สุด น้ำมันดอกทานตะวันมีองค์ประกอบของกรดไขมันไลโนเลอิก (linoleic) ร้อยละ 69 ซึ่งมีสัดส่วนที่สูงกว่าแหล่งอาหารเสริมชนิดอื่น ๆ ที่นำมาศึกษา และมีกรดไขมันโอเลอิก (oleic) ร้อยละ 20 และไขมันอิ่มตัวร้อยละ 11 (Khan และคณะ, 2015) จึงเป็นไปได้ว่ากรดไขมันไลโนเลอิกมีผลต่อการผลิตบีตาไกลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 นอกจากนี้ *Aureobasidium* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ (Leathers และคณะ, 2013) จึงเป็นไปได้ว่าแหล่งอาหารเสริมจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งที่สองที่ทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดี และผลิตบีตาไกลูแคนได้ปริมาณมากขึ้น ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกที่มีการใช้น้ำมันดอกทานตะวันเป็นแหล่งอาหารเสริมในการผลิตบีตาไกลูแคนจาก *Aureobasidium* ซึ่งมีงานวิจัยที่ศึกษาการเติมแหล่งอาหารเสริมชนิดอื่น ๆ ดังนี้

Lazaridou และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตและลักษณะของพอลลูลานจากกากน้ำตาลปีโตโดยใช้ *A. pullulans* สายพันธุ์ non-pigmented เพาะเลี้ยงแบบกะ โดยศึกษาการเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอกที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ปริมาตรโดยปริมาตรและ tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตรโดยปริมาตร Roukas (1999) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากของเสียโรงงานเบียร์ โดย *A. pullulans* ในงานทดลองได้ศึกษาผลของการเติมแหล่งอาหาร โดยพบว่าในสูตรปกติที่ไม่ได้เติมแหล่งอาหารเสริมให้ปริมาณเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ 6.0 ± 0.3 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอกร้อยละ 2.5 ปริมาตรโดยปริมาตร และ tween 80 ร้อยละ 0.5 ปริมาตรโดยปริมาตร ให้ปริมาณเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ 8.5 ± 0.3 กรัมต่อลิตร Silva และคณะ (2007) ศึกษาผลกระทบของน้ำมันถั่วเหลืองและ Tween 80 ในการผลิต botryosphaeran โดย *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 โดยศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสที่ 10-50 กรัมต่อลิตร น้ำมันถั่วเหลืองที่ 0-10 มิลลิลิตรต่อลิตรและ Tween 80 ที่ 0-5 กรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่เร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมคือความเข้มข้นของกลูโคสที่ 40 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่ 10 มิลลิลิตรต่อลิตรและ Tween 80 ที่ความเข้มข้น 4.5 กรัมต่อลิตร และ Sena และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มผลผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยเชื้อ *A. pullulans* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ NRRL Y-2311-1 และ NRRL Y-6220 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร complex nitrogen broth (Pollock และคณะ, 1992) และเติมน้ำมันถั่วเหลืองเป็นอาหารเสริมที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250

รอบต่อหน้าที่ เป็นเวลา 72 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 เวลา 96 ชั่วโมง ให้ผลผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูงที่สุดคือ 29.58 และ 27.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

5.1.4 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งอาหารเสริมที่เหมาะสม

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งอาหารเสริม เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aurebasidium* (พันธกานต์ อุณหภัทรธิดิกุล, 2555) ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธี response surface methodology (RSM) ซึ่งเป็นวิธีทางสถิติที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาตัวแปรที่ซับซ้อน และวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design (BBD) วิธีนี้อาศัยการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณ (multiple regression) และการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation) ในการประเมินผลตัวแปรอิสระตั้งแต่สองตัวขึ้นไปต่อตัวแปรตามต่าง ๆ และสามารถทำนายภาวะที่เหมาะสมโดยมีจำนวนชุดการทดลองที่น้อยกว่าการออกแบบการทดลองแบบธรรมดา ทำให้ประหยัดเวลาและทรัพยากรที่ใช้ในการทำการทดลอง (Bezerra และคณะ, 2008; Sharma และคณะ, 2009) จากการวิเคราะห์ด้วย RSM สามารถทำนายได้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 4.90 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และน้ำมันดอกทานตะวันที่ความเข้มข้นร้อยละ 8.17 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ทำให้ *A. thailandense* NRRL 58543 ผลิตปีตากุลแคนได้สูงที่สุดเท่ากับ 38.07 ± 0.11 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงใช้ซูโครส โซเดียมไนเตรท และน้ำมันดอกทานตะวัน ที่ความเข้มข้นดังกล่าวสำหรับศึกษาการผลิตปีตากุลแคนในขั้นต่อไป และจากการตรวจสอบสมการอธิบายการผลิตปีตากุลแคนโดยทำการทดลองซ้ำ พบว่าสามารถผลิตปีตากุลแคนได้ 37.73 ± 0.15 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่แตกต่างจากค่าที่ทำนายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าสามารถนำสมการมาใช้ในการอธิบายการผลิตปีตากุลแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 ได้อย่างแม่นยำ ซึ่งสอดคล้องกับ พันธกานต์ อุณหภัทรธิดิกุล (2555) ที่ได้ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. thailandense* NRRL 58543 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกันกับที่ใช้ในงานวิจัยนี้ โดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite design (CCD) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของซูโครสร้อยละ 6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และโซเดียมไนเตรทร้อยละ 0.06 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงที่สุดเท่ากับ 10.25 กรัมต่อลิตร

5.1.5 ค่า pH เริ่มต้นในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตปีตากุลแคน

จากการศึกษาผลของ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เนื่องจาก pH มีความสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ และมีผลต่อประจุของโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีผล

ต่อเนื่องถึงความสามารถในการดูดซับสารอาหารเข้าสู่เซลล์ (Luepongpatana และคณะ, 2017) พบว่า *A. thailandense* NRRL 58543 สามารถผลิตปีตากลูแคนได้สูงสุดเท่ากับ 37.73 ± 0.44 กรัมต่อลิตร เมื่อปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5 แสดงว่า *A. thailandense* NRRL 58543 ผลิตปีตากลูแคนได้ในช่วง pH ที่เป็นกรดอ่อน ๆ ซึ่งการที่จุลินทรีย์ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยลงเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของ pH อาจมีสาเหตุมาจาก pH ในสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ส่งผลกระทบต่อ pH ในไซโทพลาสซึมของจุลินทรีย์ เกิดการรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์ หรือเกิดการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ทำให้จุลินทรีย์มีการเติบโตและผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ลดลง นอกจากนี้ pH อาจส่งผลต่อการแตกตัวเป็นไอออน (ionization) ของโมเลกุลสารอาหาร ส่งผลให้จุลินทรีย์ใช้สารอาหารนั้นได้น้อยลง (Singh และคณะ, 2015) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Prongsuk และคณะ (2007) ที่พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRM2 ที่คัดแยกได้จากเขตร้อนสามารถผลิตพุลลูแลนได้ดีในอาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 และงานวิจัยของ West และ Hamer (1993) ได้ศึกษาผลของ pH ต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 พบว่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์คือที่ระดับ pH เริ่มต้น 6.5 แต่จากงานวิจัยของ พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล (2555) ได้ศึกษาผลของ pH ต่อการผลิตปีตากลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 ในอาหารสูตรปกติ พบว่า pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์คือ 7.5 ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 9.28 กรัมต่อลิตร ซึ่งเชื้อที่ใช้เป็นสายพันธุ์เดียวกันกับงานวิจัยนี้ แต่มีค่า pH ที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากการเติมแหล่งอาหารเสริม (น้ำมันดอกทานตะวัน) ที่มีส่วนประกอบของไขมัน เมื่อเชื้อย่อยไขมันโดยใช้เอนไซม์ไลเปซ (Leathers และคณะ, 2013) จึงได้เป็นกรดไขมัน จึงทำให้ pH ของอาหารเปลี่ยนแปลงไป Thirumavalavan และคณะ (2009) ได้ศึกษาผลของ pH ต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ MTCC 2195 พบว่าที่ระดับ pH เริ่มต้น 7.0 เป็นระดับ pH ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ และจากงานวิจัยของ Youssef และคณะ (1999) ได้ศึกษาผลกระทบของ pH ต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ P 56 พบว่าที่ระดับ pH เริ่มต้น 7.5 เป็นระดับ pH ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ จากการศึกษาอื่น ๆ แสดงให้เห็นว่า pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิต

5.1.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตปีตากลูแคน

จากการทดลอง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตปีตากลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 คือ 25 องศาเซลเซียส ได้ปีตากลูแคน 37.01 ± 0.08 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าดัชนีความขาวของปีตากลูแคนอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด และพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ปีตากลูแคนมีการผลิตน้อยลงและมีสีเข้มขึ้น เนื่องมาจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* (McNeil และ Kristiansen, 1990) และยังเป็นปัจจัยในการกระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (Sun และคณะ, 2016) เช่นเดียวกับการศึกษาของ พันธกานต์ อุณหภูมิตริติกุล (2555) ได้รายงานการผลิตปีตากลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตปีตากลูแคนคือ 25 องศาเซลเซียส และมีศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* โดยอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 คือที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) ให้ผลผลิตสูงสุดที่ 35.78 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตต่ำสุดเมื่อใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เท่ากับ 2.51 กรัมต่อลิตร โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Prasongsuk และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตพุลลูแลนที่คัดแยกได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRM2 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตพุลลูแลนคืออุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) จากรายงานของ Ueda และคณะ (1963) ที่พบว่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และการผลิตจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และ West และ Reed-Hamer (1993) ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิ 23–33 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือช่วง 24–26 องศาเซลเซียส

5.2 การลดขนาดโมเลกุลของปีตากลูแคนโดยใช้เอนไซม์

ทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของปีตากลูแคนภายหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ปีตากลูคาเนสโดยวิธีการวัดความหนืด วิธีเจลเพอร์มิเอชันโครมาโทกราฟี (GPC) และโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC) พบว่าปีตากลูแคนที่ผ่านการย่อยมีแนวโน้มของค่าความหนืดลดลง และมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 77,720 ดาลตัน ซึ่งอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Choromanska และคณะ, 2017) การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยปีตากลูแคนด้วยเอนไซม์ โดยวิธี TLC พบว่ามีโอลิโกแซ็กคาไรด์และน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้น ดังนั้นปีตากลูแคนที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ปีตากลูคาเนสเป็นปีตากลูแคนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สามารถนำไปใช้ศึกษาสมบัติฟิสิกส์และเคมีในการทดลองขั้นต่อไปได้

การย่อยปีตาไกลูแคนจากข้าวโอ๊ตด้วยเอนไซม์ปีตาไกลูคาเนส สามารถลดขนาดโมเลกุลของปีตาไกลูแคนจาก 370,000 ดาลตัน เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 3,000 ดาลตัน (Sahasrabudhe และคณะ, 2016) Jaskari และคณะ (1998) ได้ศึกษาการนำปีตาไกลูแคนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับ *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* โดยการย่อยปีตาไกลูแคนด้วยเอนไซม์ปีตาไกลูคาเนส ได้เป็นปีตาไกลูโคโอลิโกเมอร์ (ประกอบด้วยกลูโคส 3 และ 4 โมเลกุล) Choromanska และคณะ (2017) ได้เตรียมปีตาไกลูแคนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยนำปีตาไกลูแคนจากข้าวโอ๊ตมาย่อยด้วยเอนไซม์ไลคาเนส (lichenase) ได้ปีตาไกลูแคนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 69,650 ดาลตัน Lee และคณะ (2015) ได้ปรับปรุงประสิทธิภาพทางกายภาพและเคมีของปีตาไกลูแคนจากข้าวบาร์เลย์ โดยย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก พบว่าสามารถลดน้ำหนักโมเลกุลของปีตาไกลูแคนจาก 700,000 ดาลตัน เป็น 7,800 ดาลตัน และค่าความหนืดของปีตาไกลูแคนลดลงจาก 12.8~32.8 cP เป็น 3.6~4.2 cP และ Kimura และคณะ (2006) ได้ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเนื้องอกของปีตาไกลูแคนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ 1A1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตปีตาไกลูแคนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำประมาณ 100,000 ดาลตัน ซึ่งปีตาไกลูแคนนี้มีความหนืดต่ำและสามารถละลายน้ำได้

จากการวิเคราะห์โครงสร้างของปีตาไกลูแคนไฮโดรไลเซทและปีตาไกลูแคนดั้งเดิม พบว่ามีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน โดยมีพีคของหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกัน และพบหมู่ฟังก์ชันที่เป็นพันธะปีตา-ไกลโคซิดิก โดยมีพีคที่ตำแหน่ง 920.10 และ 889.45 เซนติเมตร⁻¹ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yurlova และ De Hoog (1997) ที่พบว่า *A. pullulans* var. *aubasidani* สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดที่คล้ายออบาซิแดน ซึ่งพบหมู่ฟังก์ชันของพันธะปีตา-ไกลโคซิดิก ที่บริเวณความถี่ที่ 890 เซนติเมตร⁻¹ และรายงานของ Leal-Serrano และคณะ (1980) ที่ระบุว่าพันธะปีตา-ไกลโคซิดิก ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* จะมีความถี่ที่ 890 เซนติเมตร⁻¹

5.3 การทดสอบสมบัติฟิสิกส์ของปีตาไกลูแคนไฮโดรไลเซท

5.3.1 การทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร

จากการศึกษาการทนต่อการย่อยของปีตาไกลูแคนไฮโดรไลเซทในระบบทางเดินอาหารส่วนต้นจำลอง ได้แก่ ปากและกระเพาะอาหาร พบว่ามีร้อยละการย่อยคือ 25.8 และ 0.71 ตามลำดับ มีร้อยละการย่อยรวมเท่ากับ 26.51 แต่พบว่าปีตาไกลูแคนดั้งเดิมสามารถต้านการย่อยได้ดีกว่า โดยมีร้อยละการย่อยรวมเท่ากับ 0 และมีปีตาไกลูแคนประมาณร้อยละ 100 และ 73.49 ตามลำดับ ที่เหลือไปถึงลำไส้ โดยสารที่มีสมบัติฟิสิกส์ของปีตาไกลูแคนที่ดัดแปลงต้องสามารถทนต่อการย่อยด้วยกรด

และเอนไซม์ได้ และต้องเหลือไปถึงลำไส้ได้มากกว่าร้อยละ 60 ดังนั้นสรุปได้ว่า ทั้งปีตาไกลูแคน ไฮโดรไลเซทและปีตาไกลูแคนดั้งเดิม มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ดีเนื่องจากสามารถทนต่อการย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนบนได้ ผลการทดลองสอดคล้องกับ Nakada และคณะ (2003) พบว่า โคจิ-โอลิโกแซ็กคาไรด์ (koji-oligosaccharide) สามารถต้านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากน้ำลายมนุษย์และจากตับอ่อนหนูได้ร้อยละ 100 แต่โคจิ-โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีโมเลกุลต่ำ (ประกอบด้วยน้ำตาล 2 หน่วย) มีร้อยละการย่อยอยู่ในช่วง 56.8-87.5

5.3.2 ทดสอบการกระตุ้นการเติบโตของ *L. casei* และ *L. brevis*

จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า ปีตาไกลูแคนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือปีตา-กลูโคโอลิโกแซ็กคาไรด์ มีสมบัติในการเป็นพรีไบโอติกได้ดีกว่าปีตาไกลูแคนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (Jaskari และคณะ, 1998) มีการอธิบายว่า สารพรีไบโอติกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือที่เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์จะถูกนำไปใช้โดยแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิด *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* ได้รวดเร็วกว่าพรีไบโอติกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีปลายนอนรีดิวิง (non-reducing ends) ต่อหน่วยมวลมากกว่า ซึ่งโพรไบโอติกจะหลั่งเอนไซม์ออกมาย่อยสลายพรีไบโอติกที่ส่วนปลายนี้ (Gibson, 2004) แต่ในกรณีของงานวิจัยนี้ จากผลการทดลองพบว่าปีตาไกลูแคนดั้งเดิมซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูง สามารถกระตุ้นการเติบโตของ *L. brevis* และ *L. casei* ได้ดีกว่าปีตาไกลูแคนไฮโดรไลเซทที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ที่เวลาในการเลี้ยง 48 ชั่วโมง

การเลือกปีตาไกลูแคนที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ดีที่สุด สำหรับใช้เป็นส่วนผสมของเยลลีพรีไบโอติก จะพิจารณาจากการทนต่อการย่อยในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารและการกระตุ้นการเติบโตของ *L. brevis* และ *L. casei* เมื่อพิจารณาผลการทดลองพบว่า ปีตาไกลูแคนไฮโดรไลเซทและปีตาไกลูแคนดั้งเดิมสามารถทนต่อการย่อยในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารได้ดีตามสมบัติการเป็นพรีไบโอติก และแม้ว่าปีตาไกลูแคนดั้งเดิมจะมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเติบโตของโพรไบโอติก *L. brevis* และ *L. casei* ได้สูงสุดภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งใช้เวลานานกว่าการใช้ปีตาไกลูแคนไฮโดรไลเซท แต่พบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ปีตาไกลูแคนไฮโดรไลเซทในการกระตุ้นการเจริญของโพรไบโอติกที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งนอกจากปีตาไกลูแคนดั้งเดิมจะมีประสิทธิภาพในการเป็นพรีไบโอติกที่ดีแล้วนั้น ยังสะดวกในการผลิตเพราะไม่ต้องมีขั้นตอนการลดขนาดโมเลกุลที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง (เอนไซม์ปีตาไกลูคาเนส ราคาขวดละ 6,351 บาท, Sigma/USA) ซึ่งหากผลิตในระดับอุตสาหกรรมจะเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตอย่างมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกปีตาไกลูแคนดั้งเดิมสำหรับประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมของเยลลีพรีไบโอติก

มีการรายงานที่สนับสนุนว่าปีตากุลแคนที่มีสายโมเลกุลยาว (long chain β -glucan) เป็นพรีไบโอติกชนิดใหม่ที่ถูกหมักย่อยโดยแบคทีเรียโพรไบโอติกแบบช้า ๆ (slowly fermentable prebiotic) แต่เมื่อสิ้นสุดการหมักพบผลิตภัณฑ์ของกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acids, SCFA) ในปริมาณมากกว่าการหมักที่ใช้พรีไบโอติกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Lam และ Chi, 2013) Kaur และคณะ (2011) ศึกษาปีตากุลแคนสายยาวในการหมักโดยโพรไบติก พบว่าในระยะเริ่มแรกมีการหมักที่ช้ากว่าการใช้พรีไบโอติกที่มีมวลโมเลกุลต่ำ โดยมีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และกรดไขมันในปริมาณต่ำ แต่ในช่วงหลังสามารถหมักได้อย่างรวดเร็วและมีปริมาณปีตากุลแคนเหลือน้อยในช่วงครึ่งหลังของการหมัก และมีการศึกษาที่ใช้ปีตากุลแคนเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Bifidobacterium pseudocatenulatum* และ *Lactobacillus* sp. ในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนควบคุม พบว่าปีตากุลแคนสามารถส่งเสริมการเติบโตของโพรไบโอติกชนิด *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* ได้อย่างมีนัยสำคัญ

5.4 ผลของปริมาณปีตากุลแคนต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์เยลลีพรีไบโอติก

จากการพิจารณาผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เยลลีสูตรที่มีปีตากุลแคนจะมีค่าสีและค่าเนื้อสัมผัสต่างจากสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยการเพิ่มปริมาณปีตากุลแคนในเยลลีจะส่งผลให้เยลลีมีความเข้มข้นของสีเหลืองมากขึ้น และเยลลีมีความแข็ง ความคงทนเมื่อถูกเคี้ยว และ ความเหนียวเพิ่มขึ้น แต่มีความยืดหยุ่นและการยึดเกาะกันของเนื้อเยลลิลดลง ซึ่งจะเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจนในสูตรปีตากุลแคนร้อยละ 0.5 ที่มีปริมาณปีตากุลแคนสูงสุด ซึ่งเป็นผลจากความสามารถในการอุ้มน้ำของปีตากุลแคน (Symons และ Brennan, 2004) จึงทำให้เยลลีมีความแข็งเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาข้อมูลการยอมรับของผู้บริโภค พบว่าทุกสูตรได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค โดยจะเห็นได้จากคะแนนความชอบที่สูงกว่า 5 คะแนนจากคะแนนเต็ม 9 คะแนน นอกจากนี้ยังพบว่า สำหรับแต่ละลักษณะที่ทดสอบ คะแนนความชอบของตัวอย่างในแต่ละสูตรมีค่าใกล้เคียงกัน จึงมีความเป็นไปได้ที่จะเพิ่มปริมาณปีตากุลแคนให้มีค่าสูงกว่าร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในเยลลีพรีไบโอติกได้ โดยที่ผลิตภัณฑ์ยังได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค แต่อาจต้องคำนึงร่วมกับต้นทุนในการผลิตที่จะเพิ่มขึ้นจากการใช้ปีตากุลแคนนี้ด้วย

5.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เยลลีพรีไบโอติก

จากผลการทดลองการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเยลลีพรีไบโอติก โดยเลือกเยลลีสูตรปีตากุลแคน 0.5 มาศึกษาอายุการเก็บรักษา พบว่าลักษณะเนื้อสัมผัส ได้แก่ hardness (ความแข็ง),

cohesiveness (การยึดเกาะ), springiness (ความยืดหยุ่น), chewiness (การคงทนเมื่อถูกเคี้ยว) และ gumminess (ความเหนียวยึดติด) มีค่าลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้น เนื่องจาก ร่างแหพอลิเมอร์ในโครงสร้าง 3 มิติของเจลหดตัวเข้าใกล้กันมากขึ้น ทำให้น้ำที่กักเก็บอยู่ภายในถูก บีบออกมาด้านนอกของเจล โดยการแยกตัวของน้ำจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา ทำให้เจลมีความแข็งแรงลดลง (Piculell และคณะ, 1995) ค่าสีไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติอาจเนื่องจากถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในช่วง 25 ± 2 องศาเซลเซียส ซึ่งโดยทั่วไปเมื่อ เก็บรักษาเป็นระยะเวลาสั้นเยลลี่จะมีสีเข้มขึ้นจากการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (browning reaction) ที่เกิดขึ้นระหว่างน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) กับโปรตีน โดยมีความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งน้ำตาลซูโครสสามารถเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ได้ถึงแม้ว่าน้ำตาลซูโครสจะเป็นสารที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์ (non-reducing sugar) แต่ซูโครสเป็นน้ำตาล ไตแซ็กคาไรด์ที่สามารถแตกตัวเป็นกลูโคสและฟรุกโตส ซึ่งน้ำตาลทั้งสองชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยา เมลลาร์ดได้ (ณัฐรัตน์ ศรีสังวาลย์, 2555) และเยลลี่ฟรีโอบีอิติกสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็น เวลา 7 วัน โดยไม่เกิดการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ แต่เมื่อเก็บรักษานานเป็นเวลา 14 วัน พบว่า ผลิตภัณฑ์เกิดการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ ซึ่งในขั้นตอนการผลิตเยลลี่และบรรจุภัณฑ์ไม่ได้ทำแบบ ปลอดเชื้อ ทำให้มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในเยลลี่ได้ แม้ว่าเยลลี่เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นของ น้ำตาลสูงทำให้มีแรงดันออสโมซิสสูง ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่เมื่อเก็บรักษาเป็น ระยะเวลาที่นานขึ้น โครงสร้างร่างแหของเจลจะยึดกันแน่น ซึ่งน้ำที่แทรกอยู่ในโครงสร้างเจลถูกบีบ ออกมาภายนอก ทำให้มีปริมาณน้ำอิสระในเยลลี่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Saeng-on และคณะ, 2015) มีการศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เยลลี่ชนิดต่าง ๆ เช่น ศศิธร สิทธิเนตร และ สุนิสา เครือจ้อย (2545) ศึกษาการผลิตผลิตภัณฑ์เยลลี่ใบเตยเสริมว่านหางจระเข้ โดยเปรียบเทียบ ระหว่างสูตรที่ใช้เจลาตินธรรมชาติ และสูตรที่ใช้ผงเจลาตินสำเร็จรูป (JK) เมื่อนำมาศึกษาอายุการเก็บ รักษาที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิของตู้เย็น พบว่าการเก็บรักษาเยลลี่ใบเตยเสริมว่านหางจระเข้ที่ อุณหภูมิห้องมีอายุการเก็บรักษาไม่เกิน 3 วัน ส่วนการเก็บรักษาที่ตู้เย็น มีอายุการเก็บรักษา 21 วัน และ สุธาสิณี น้อยสุวรรณ (2543) ศึกษาอายุการเก็บของเยลลี่ที่ใช้แป้งบุกผสมคาร์ราจีแนน พบว่า เมื่อนำไปศึกษาอายุการเก็บที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้อง ได้ 1 สัปดาห์ และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้มากกว่า 4 สัปดาห์ โดยไม่มีความแตกต่างจาก ผลิตภัณฑ์เริ่มต้นในทุกด้านที่ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัส ($p > 0.05$) และยังเป็นที่ยอมรับของ ผู้บริโภค

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

6.1 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตปีตากุลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543

A. thailandense NRRL 58543 สามารถผลิตปีตากุลูแคนได้สูงสุด 37.73 ± 0.15 กรัมต่อลิตร และมีค่าดัชนีความขาวตามเกณฑ์ที่กำหนด เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร production medium ที่มีโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำมันดอกทานตะวันที่ความเข้มข้นร้อยละ 8.17 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เป็นแหล่งอาหารเสริม ค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 6.5 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 25 องศาเซลเซียส และพบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนและอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง มีผลต่อค่าดัชนีความขาวของปีตากุลูแคน โดยมีผลทำให้ได้ปีตากุลูแคนที่มีค่าดัชนีความขาวสูงที่สุดสำหรับการทดลองนี้

6.2 ผลของการลดขนาดโมเลกุลของปีตากุลูแคนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อประสิทธิภาพในการเป็นพรีไบโอติก

จากการย่อยปีตากุลูแคนด้วยเอนไซม์ปีตากุลูแคนเนส พบว่าได้ปีตากุลูแคนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำประมาณ 77,720 ดาลตัน ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยนี้ พบว่าเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์และมีน้ำตาลกลูโคสบางส่วน และปีตากุลูแคนไฮโดรไลเซทมีค่าความหนืดต่ำกว่าปีตากุลูแคนดั้งเดิม จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างปีตากุลูแคนด้วย FT-IR spectroscopy พบว่าปีตากุลูแคนไฮโดรไลเซทมีความยาวคลื่นที่ 927.10 เซนติเมตร⁻¹ ซึ่งเป็นลักษณะของพันธะปีตา-ไกลโคซิดิก และมีความยาวคลื่นที่ตำแหน่งพันธะอื่น ๆ ที่คล้ายคลึงกับปีตากุลูแคนดั้งเดิม เมื่อวิเคราะห์สมบัติพรีไบโอติก โดยทดสอบการทนต่อการย่อยในระบบทางเดินอาหารจำลอง พบว่าปีตากุลูแคนไฮโดรไลเซทมีร้อยละการย่อยรวมเท่ากับ 26.51 ส่วนปีตากุลูแคนดั้งเดิมสามารถทนต่อการย่อยได้ ปีตากุลูแคนไฮโดรไลเซทสามารถกระตุ้นการเจริญของ *L. casei* และ *L. brevis* ได้ดีอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่การทดลองนี้พบว่าปีตากุลูแคนดั้งเดิมสามารถกระตุ้นการเติบโตของทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับปีตากุลูแคนไฮโดรไลเซท แต่มีผลการกระตุ้น *L. casei* น้อยกว่าปีตากุลูแคนทางการค้าที่สกัดจาก *S. cerevisiae* จากการทดสอบดังกล่าวจึงเลือกปีตากุลูแคนดั้งเดิมสำหรับศึกษาในขั้นต่อไป

6.3 ผลของปริมาณปีตากุลูแคนต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์เยลลีฟรีไปโอติก

จากการทดลองใช้ปีตากุลูแคนดั้งเดิมเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เยลลีฟรีไปโอติก พบว่าการใช้ปริมาณร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเหลืองเข้มขึ้น และมีค่าเนื้อสัมผัส ได้แก่ ค่าความแข็ง ความคงทนเมื่อถูกเคี้ยว และความเหนียวยืดติด เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าความยืดหยุ่น และการยึดเกาะมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ เยลลีสูตรควบคุม และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคจำนวน 30 คน

6.4 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์เยลลีฟรีไปโอติก

หลังเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เยลลีฟรีไปโอติกเป็นเวลา 14 วัน แล้วตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเยลลี พบว่าเยลลีฟรีไปโอติกมีลักษณะเนื้อสัมผัส ได้แก่ ความแข็ง การยึดเกาะ ความยืดหยุ่น การคงทนเมื่อถูกเคี้ยว และความเหนียวยืดติด มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเก็บรักษานานขึ้น และพบว่าเยลลีฟรีไปโอติกมีอายุการรักษาที่อุณหภูมิห้องได้นาน 7 วัน เนื่องจากในวันที่ 14 ของการเก็บรักษาพบการเจริญของจุลินทรีย์เกินเกณฑ์ที่กำหนดของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนเยลลีแห่ง

6.6 ข้อเสนอแนะ

1.) งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตปีตากุลูแคนจาก *A. thailandense* NRRL 58543 ในระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory scale) หากจะนำผลการวิจัยนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมควรมีการศึกษาวิจัยในระดับที่ใหญ่ขึ้น เช่น การผลิตในถังหมัก เนื่องจากภาวะที่เหมาะสมและความเข้มข้นของแหล่งอาหารอาจมีการเปลี่ยนแปลง

2.) ปีตากุลูแคนที่ผลิตได้มีสมบัติฟรีไปโอติก โดยสามารถกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียโพรไปโอติก *L. casei* และ *L. brevis* ได้ จึงควรศึกษาความสามารถในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียโพรไปโอติกชนิดอื่นเพิ่มเติม

3.) ผลการใช้ปีตากุลูแคนเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เยลลีฟรีไปโอติกจากงานวิจัยนี้ สามารถเพิ่มทางเลือกให้ผู้ผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ อย่างไรก็ตาม เยลลีฟรีไปโอติกยังมีปริมาณน้ำตาลสูง จึงควรมีการวิจัยและปรับปรุงสูตร โดยอาจใช้สารทดแทนความหวานแทนการใช้น้ำตาลทราย

รายการอ้างอิง

- ณัฐรัตน์ ศรีสังวาลย์. 2555. การปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการของขนมอาลัวและฝอยทอง โดยการใช้สารให้ความหวานทดแทนน้ำตาล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- พันธกานต์ อุดมทรัพย์ฐิติกุล. 2555. การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนและการขึ้นรูปฟิล์ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย .
- ภูษิตา ขวัญยืน. 2557. ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งบางชนิดของบีตาไกลูแคนจาก *Aureobasidium pullulans*. โครงการงานวิทยาศาสตร์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย .
- มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2537. มาตรฐานอุตสาหกรรมแยม เยลลี่ มาร์มาเลด. กรุงเทพฯ: กระทรวงอุตสาหกรรม.
- ศศิธร สิทธิเนตร และ สุนิสา เครือจ้อย. 2545. เยลลี่ไบโอดีเอเสริมว่านหางจระเข้. สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี.
- สุธาสินี น้อยสุวรรณ. 2543. การใช้ผงบุกเพื่อเป็นสารที่ทำให้เกิดเจลในผลิตภัณฑ์เยลลี่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุวรรณมา สุภิมารส. 2543. เทคโนโลยีการผลิตลูกกวาดและซ็อกโกแลต. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Ahmad, A., Munir, B., Abrar, M., Bashir, S., Adnan, M. and Tabassum, T. 2012. Perspective of β -glucan as functional ingredient for food industry. *Journal of Nutrition and Food Sciences* 2.
- Amjadi, S., Ghorbani, M., Hamishehkar, H. and Roufegarinejad, L. 2018. Improvement in the stability of betanin by liposomal nanocarriers: Its application in gummy candy as a food model. *Food Chemistry* 256: 156-162.
- Arzanlou, M. and Khodaei, S. 2012. *Aureobasidium iranianum*, a new species on bamboo from Iran. *Mycosphere* 3: 404-408.

- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. and Escaleira, L. A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76: 965-977.
- Bulmer, M. A., Catley, B. J. and Kelly, P. J. 1987. The effect of ammonium ions and pH on the elaboration of the fungal extracellular polysaccharide, pullulan, by *Aureobasidium pullulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 25: 362-365.
- Charoen, R., Savedboworn, W., Phuditcharnchnakun, S. and Khuntaweetap, T. 2015. Development of Antioxidant Gummy Jelly Candy Supplemented with *Psidium guajava* Leaf Extract. *King Mongkut's University of Technology North Bangkok International Journal of Applied Science and Technology* 8: 145-151.
- Cheng, K.-C., Demirci, A. and Catchmark, J. M. 2011. Evaluation of medium composition and fermentation parameters on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Food Science and Technology International* 17: 99-109.
- Cheng, K.-C., Demirci, A. and Catchmark, J. M. 2011. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92: 29.
- Chi, Z. and Zhao, S. 2003. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 206-211.
- Choromanska, A., Kulbacka, J., Harasym, J., Oledzki, R., Szewczyk, A. and Saczko, J. 2017. High- and low-Molecular Weight oat Beta-Glucan Reveals Antitumor Activity in Human Epithelial Lung Cancer. *Pathology & Oncology Research*
- Crous, P. W., Summerell, B. A., Swart, L., Denman, S., Taylor, J., Bezuidenhout, C., Palm, M. E., Marinowitz, S. and Groenewald, J. Z. 2011. Fungal pathogens of Proteaceae. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 27: 20.
- Dake, M., Jadhav, J. and Patil, N. 2004. Induction and properties of (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucanase from *Aureobasidium pullulans*. *Indian Journal of Biotechnology* 3: 58-64.
- Deshpande, M. S., Rale, V. B. and Lynch, J. M. 1992. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report. *Enzyme and Microbial Technology* 14: 514-527.

- Duan, X., Chi, Z., Wang, L. and Wang, X. 2008. Influence of different sugars on pullulan production and activities of α -phosphoglucose mutase, UDPG-pyrophosphorylase and glucosyltransferase involved in pullulan synthesis in *Aureobasidium pullulans* Y68. *Carbohydrate Polymers* 73: 587-593.
- El-Tayeb, T. and Khodair, T. 2006. Enhanced production of some microbial exopolysaccharides by various stimulating agents in batch culture. *Research journal of agriculture and biological sciences* 2: 483-492.
- Engstad, R. E., Robertsen, B. and Frivold, E. 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish & Shellfish Immunology* 2: 287-297.
- Fässler, C., Arrigoni, E., Venema, K., Hafner, V., Brouns, F. and Amadò, R. 2006. Digestibility of resistant starch containing preparations using two in vitro models. *European journal of nutrition* 45: 445-453.
- Frei, R., Akdis, M. and O'Mahony, L. 2015. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. *Current opinion in gastroenterology* 31: 153-158.
- Gao, L., Chi, Z., Sheng, J., Ni, X. and Wang, L. 2007. Single-cell protein production from *Jerusalem artichoke* extract by a recently isolated marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and its nutritive analysis. *Applied microbiology and biotechnology* 77: 825-832.
- Garcia, T. 2000. Analysis of gelatin-based confections. *Manufacturing Confectioner* 80: 93-101.
- Gardiner, G. E., Heinemann, C., Baroja, M. L., Bruce, A. W., Beuerman, D., Madrenas, J. n. and Reid, G. 2002. Oral administration of the probiotic combination *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 for human intestinal applications. *International Dairy Journal* 12: 191-196.
- Gaur, R., Singh, R., Gupta, M. and Gaur, M. K. 2010. *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. *African Journal of Biotechnology* 9: 7989-7997.
- Gibson, G. R. 2004. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition Supplements* 1: 25-31.

- Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. 1999. *Colonic microbiota, nutrition and health*. Springer.
- Gilliland, S. and Speck, M. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. *Journal of food protection* 40: 820-823.
- Gostinčar, C., Ohm, R. A., Kogej, T., Sonjak, S., Turk, M., Zajc, J., Zalar, P., Grube, M., Sun, H. and Han, J. 2014. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC genomics* 15: 549.
- Gunstone, F. 2011. *Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses*. John Wiley & Sons.
- Hermanides-Nijhof, E. 1977. *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology* 15: 141-177.
- Hirabayashi, K., Kondo, N. and Hayashi, S. 2016. Characterization and enzymatic hydrolysis of hydrothermally treated β -1, 3-1, 6-glucan from *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32: 206.
- Hofer, M. A. 1996. Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology* 21: 203-217.
- Humphries, Z., Seifert, K. A., Hirooka, Y. and Visagie, C. M. 2017. A new family and genus in Dothideales for *Aureobasidium*-like species isolated from house dust. *IMA fungus* 8: 299-315.
- Jaskari, J., Kontula, P., Siitonen, A., Jousimies-Somer, H., Mattila-Sandholm, T. and Poutanen, K. 1998. Oat beta-glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49: 175-181.
- Jiang, H., Liu, G.-L., Chi, Z., Wang, J.-M., Zhang, L.-L. and Chi, Z.-M. 2017. Both a PKS and a PPTase are involved in melanin biosynthesis and regulation of *Aureobasidium melanogenum* XJ5-1 isolated from the Taklimakan desert. *Gene* 602: 8-15.
- Kaur, A., Rose, D. J., Rumpagaporn, P., Patterson, J. A. and Hamaker, B. R. 2011. In vitro batch fecal fermentation comparison of gas and short-chain fatty acid

- production using “slowly fermentable” dietary fibers. *Journal of food science* 76:
- Khan, S., Choudhary, S., Pandey, A., Khan, M. K. and Thomas, G. 2015. Sunflower Oil: Efficient Oil Source for Human Consumption. *Emer Life Science Research* 1: 1-3.
- Kimura, Y., Sumiyoshi, M., Suzuki, T. and Sakanaka, M. 2006. Antitumor and antimetastatic activity of a novel water-soluble low molecular weight beta-1,3-D-glucan (branch beta-1,6) isolated from *Aureobasidium pullulans* 1A1 strain black yeast. *Anticancer Research* 26: 4131-4141.
- Kivelä, R., Gates, F. and Sontag-Strohm, T. 2009. Degradation of cereal beta-glucan by ascorbic acid induced oxygen radicals. *Journal of Cereal Science* 49: 1-3.
- Kudanga, T. and Mwenje, E. 2005. Extracellular cellulase production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Canadian journal of microbiology* 51: 773-776.
- Laakso, S. and Lehtinen, P. 2005. Fiber composition in liquid form. *PCT application*. WO2006/040395 A 1:
- Lam, K.-L. and Chi, P. 2013. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 2: 45-64.
- Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., Roukas, T. and Izydorczyk, M. 2002. Production and characterization of pullulan from beet molasses using a nonpigmented strain of *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *Applied biochemistry and biotechnology* 97: 1-22.
- Leal-Serrano, G., Ruperez, P. and Leal, J. 1980. Acidic polysaccharide from *Aureobasidium pullulans*. *Transactions of the British Mycological Society* 75: 57-62.
- Leathers, T. D., Rich, J. O., Anderson, A. M. and Manitchotpisit, P. 2013. Lipase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology letters* 35: 1701-1706.
- Lee, S. H., Jang, G. Y., Hwang, I. G., Kim, H. Y., Woo, K. S., Kim, K. J., Lee, M. J., Kim, T. J., Lee, J. and Jeong, H. S. 2015. Physicochemical Properties of β -Glucan from Acid Hydrolyzed Barley. *Preventive Nutrition and Food Science* 20: 110-118.

- Lei, X. and Chang-hai, W. 2010. Isolation and Extraction of Intracellular Melanin from *Aureobasidium pullulans*. *Natural Product Research & Development* 22:
- Li, M. and Lee, T.-C. 1996. Effect of cysteine on the functional properties and microstructures of wheat flour extrudates. *Journal of agricultural and food chemistry* 44: 1871-1880.
- Lilly, D. M. and Stillwell, R. H. 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.
- Lotrakul, P., Deenarn, P., Prasongsuk, S. and Punnapayak, H. 2009. Isolation of *Aureobasidium pullulans* from bathroom surfaces and their antifungal activity against some Aspergilli. *African Journal of Microbiology Research* 3: 253-257.
- Lotrakul, P., Unhapattaratitukul, P., Seelanan, T., Prasongsuk, S. and Punnapayak, H. 2013. An aubasidan-like β -glucan produced by *Aureobasidium pullulans* in Thailand. *ScienceAsia* 39: 363.
- Luepongpatana, S., Thaniyavarn, J. and Morikawa, M. 2017. Production of massoia lactone by *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 isolated from the Gulf of Thailand and its fragrant biosurfactant properties. *Journal of applied microbiology* 123: 1488-1497.
- Manitchotpsit, P., Leathers, T. D., Peterson, S. W., Kurtzman, C. P., Li, X.-L., Eveleigh, D. E., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Dunlap, C. A. and Vermillion, K. E. 2009. Multilocus phylogenetic analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Mycological research* 113: 1107-1120.
- Manitchotpsit, P., Watanapoksin, R., Price, N. P., Bischoff, K. M., Tayeh, M., Teeraworawit, S., Kriwong, S. and Leathers, T. D. 2014. *Aureobasidium pullulans* as a source of liamocins (heavy oils) with anticancer activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30: 2199-2204.
- Manitchotpsit, P., Skory, C. D., Leathers, T. D., Lotrakul, P., Eveleigh, D. E., Prasongsuk, S. and Punnapayak, H. 2011. α -Amylase activity during pullulan production and α -amylase gene analyses of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 38: 1211-1218.

- McNeil, B. and Kristiansen, B. 1990. Temperature effects on polysaccharide formation by *Aureobasidium pullulans* in stirred tanks. *Enzyme and Microbial Technology* 12: 521-526.
- Metchnikoff, E. 1908. Optimistic studies New York. *Putman's Sons* 161-183.
- Mitsou, E. K., Panopoulou, N., Turunen, K., Spiliotis, V. and Kyriacou, A. 2010. Prebiotic potential of barley derived β -glucan at low intake levels: A randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical study. *Food Research International* 43: 1086-1092.
- Muramatsu, D., Iwai, A., Aoki, S., Uchiyama, H., Kawata, K., Nakayama, Y., Nikawa, Y., Kusano, K., Okabe, M. and Miyazaki, T. 2012. β -glucan derived from *Aureobasidium pullulans* is effective for the prevention of influenza in mice. *PLoS One* 7: e41399.
- O'Sullivan, D. J., McSweeney, P. L., Cotter, P. D., Giblin, L. and Sheehan, J. J. 2016. Compromised *Lactobacillus helveticus* starter activity in the presence of facultative heterofermentative *Lactobacillus casei* DPC6987 results in atypical eye formation in Swiss-type cheese. *Journal of dairy science* 99: 2625-2640.
- Parker, R. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition & Health* 29: 4-8.
- Pelizon, A., Kaneno, R., Soares, A., Meira, D. and Sartori, A. 2005. Immunomodulatory Activities Associated with [beta]-Glucan Derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiological research* 54: 557.
- Peterson, S. W., Manitchotpisit, P. and Leathers, T. D. 2013. *Aureobasidium thailandense* sp. nov. isolated from leaves and wooden surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 790-795.
- Piculell, L., Thuresson, K. and Ericsson, O. 1995. Surfactant binding and micellisation in polymer solutions and gels: Binding isotherms and their consequences. *Faraday discussions* 101: 307-318.
- Pollock, T. J., Thorne, L. and Armentrout, R. W. 1992. Isolation of new *Aureobasidium* strains that produce high-molecular-weight pullulan with reduced pigmentation. *Applied and environmental microbiology* 58: 877-883.

- Ponnusami, V. and Gunasekar, V. 2015. Production of pullulan by microbial fermentation. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology* 581-596.
- Prasongsuk, S., Sullivan, R. F., Kuhirun, M., Eveleigh, D. E. and Punnapayak, H. 2005. Thailand habitats as sources of pullulan-producing strains of *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 393-398.
- Prasongsuk, S., Berhow, M. A., Dunlap, C. A., Weisleder, D., Leathers, T. D., Eveleigh, D. E. and Punnapayak, H. 2007. Pullulan production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 34: 55-61.
- Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Ali, I., Bankeeree, W. and Punnapayak, H. 2018. The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. *Folia microbiologica* 1-12.
- Punnapayak, H., Sudhadham, M., Prasongsuk, S. and Pichayangkura, S. 2003. Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30: 89-94.
- Rajput, A. Q., Khanzada, M. A. and Shahzad, S. 2014. Effect of different substrates and carbon and nitrogen sources on growth and shelf life of *Trichoderma pseudokoningii*. *International Journal of Agriculture & Biology* 16: 893-898.
- Ravella, S. R., Quiñones, T. S., Retter, A., Heiermann, M., Amon, T. and Hobbs, P. J. 2010. Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers* 82: 728-732.
- Rich, J. O., Leathers, T. D., Anderson, A. M., Bischoff, K. M. and Manitchotpisit, P. 2013. Laccases from *Aureobasidium pullulans*. *Enzyme and microbial technology* 53: 33-37.
- Robertsen, B., Ørstad, G., Engstad, R. and Raa, J. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of fish diseases* 13: 391-400.
- Roukas, T. 1999. Pullulan production from brewery wastes by *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 447-450.
- Saeng-on, S., Daodee, S. and Sakloetsakun, D. 2015. Development of gummy jelly from Makmao (*Antidesma velutinsum* Blume) crude extract. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences* 11: 261-266.

- Sahasrabudhe, N. M., Tian, L., van den Berg, M., Bruggeman, G., Bruininx, E., Schols, H. A., Faas, M. M. and de Vos, P. 2016. Endo-glucanase digestion of oat β -Glucan enhances Dectin-1 activation in human dendritic cells. *Journal of Functional Foods* 21: 104-112.
- Sarteshnizi, R. A., Hosseini, H., Bondarianzadeh, D. and Colmenero, F. J. 2015. Optimization of prebiotic sausage formulation: Effect of using β -glucan and resistant starch by D-optimal mixture design approach. *LWT-Food Science and Technology* 62: 704-710.
- Sena, R., Costelli, M., Gibson, L. and Coughlin, R. 2006. Enhanced production of pullulan by two strains of *A. pullulans* with different concentrations of soybean oil in sucrose solution in batch fermentations. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 23: 507-515.
- Seo, H.-P., Chung, C.-H., Kim, S.-K., Gross, R. A., Kaplan, D. L. and LEE, J. 2004. Mass Production of Pullulan with Optimized Concentrations of Carbon and Nitrogen Sources by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 in a 100-L. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 14: 237-242.
- Sharma, P., Singh, L. and Dilbaghi, N. 2009. Optimization of process variables for decolorization of Disperse Yellow 211 by *Bacillus subtilis* using Box–Behnken design. *Journal of Hazardous Materials* 164: 1024-1029.
- Shimokawa, T., Yoshida, S., Takeuchi, T., Murata, K., Ishii, T. and Kusakabe, I. 1996. Preparation of two series of oligo-guluronic acids from sodium alginate by acid hydrolysis and enzymatic degradation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 60: 1532-1534.
- Shingel, K. I. 2004. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydrate Research* 339: 447-460.
- Siehr, D. 1981. MELANIN BIOSYNTHESIS IN AUREOBASIDIUM-PULLULANS. *Journal of Coatings Technology* 53: 23-25.

- Silva, C. C., Dekker, R. F., Silva, R. S. S., da Silva, M. d. L. C. and Barbosa, A. M. 2007. Effect of soybean oil and Tween 80 on the production of botryosphaeran by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *Process Biochemistry* 42: 1254-1258.
- Singh, R., Gaur, R., Bansal, S., Biswas, P., Pandey, P. K., Jamal, F., Tiwari, S. and Gaur, M. K. 2015. *Aureobasidium pullulans*-An Industrially Important Pullulan Producing Black Yeast. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 4: 605-622.
- Snart, J., Bibiloni, R., Grayson, T., Lay, C., Zhang, H., Allison, G. E., Laverdiere, J. K., Temelli, F., Vasanthan, T., Bell, R. and Tannock, G. W. 2006. Supplementation of the diet with high-viscosity beta-glucan results in enrichment for lactobacilli in the rat cecum. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1925-1931.
- Sugumaran, K., Gowthami, E., Swathi, B., Elakkiya, S., Srivastava, S., Ravikumar, R., Gowdhaman, D. and Ponnusami, V. 2013. Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian palm kernel: A novel substrate. *Carbohydrate polymers* 92: 697-703.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. and Kailasapathy, K. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology* 62: 47-55.
- Sun, S., Zhang, X., Chen, W., Zhang, L. and Zhu, H. 2016. Production of natural edible melanin by *Auricularia auricula* and its physicochemical properties. *Food chemistry* 196: 486-492.
- Sung, N.-Y., Byun, E.-H., Kwon, S.-K., Song, B.-S., Choi, J.-i., Kim, J.-H., Byun, M.-W., Yoo, Y.-C., Kim, M.-R. and Lee, J.-W. 2009. Immune-enhancing activities of low molecular weight β -glucan depolymerized by gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* 78: 433-436.
- Symons, L. and Brennan, C. 2004. The Effect of Barley β -Glucan Fiber Fractions on Starch Gelatinization and Pasting Characteristics. *Journal of Food Science* 69:

- Tabata, K., Ito, W., Kojima, T., Kawabata, S. and Misaki, A. 1981. Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* Fries. *Carbohydrate Research* 89: 121-135.
- Tarabasz, S., L and Galas, E. 1993. Two-step mutagenesis of *Pullularia pullulans* leading to clones producing pure pullulan with high yield. *Enzyme and microbial technology* 15: 317-320.
- Thambugala, K. M., Ariyawansa, H. A., Li, Y.-M., Boonmee, S., Hongsanan, S., Tian, Q., Singtripop, C., Bhat, D. J., Camporesi, E. and Jayawardena, R. 2014. Dothideales. *Fungal Diversity* 68: 105-158.
- Thirumavalavan, K., Manikkadan, T. and Dhanasekar, R. 2009. Pullulan production from coconut by-products by *Aureobasidium pullulans*. *African Journal of Biotechnology* 8: 254.
- Tokumasu, S., Tubaki, K., Manoch, L. and Janardhanan, K. 1997. Microfungal communities on decaying pine needles in Thailand. *Tropical Mycology* 93-106.
- Ueda, S., Fujita, K., Komatsu, K. and Nakashima, Z. I. 1963. Polysaccharide produced by the genus *Pullularia*. I. Production of polysaccharide by growing cells. *Applied Microbiology* 11: 211-215.
- Van Den Bogaerde, J., Cahill, J., Emmanuel, A., Vaizey, C., Talbot, I., Knight, S. and Kamm, M. 2002. Gut mucosal response to food antigens in Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 16: 1903-1915.
- Vårum, K. M., Smidsrød, O. and Brant, D. A. 1992. Light scattering reveals micelle-like aggregation in the (1→3),(1→4)- β -d-glucans from oat aleurone. *Food Hydrocolloids* 5: 497-511.
- Vicente, F., Reyes, F. and Genilloud, O. 2016. Fungal Secondary Metabolites as Source of Antifungal Compounds. *Fungi: Applications and Management Strategies* 80.
- Wachowska, U., Głowacka, K., Mikołajczyk, W. and Kucharska, K. 2016. Biofilm of *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* on winter wheat kernels and its effect on other microorganisms. *Microbiology* 85: 523-530.
- Wang, W., Chi, Z., Chi, Z., Li, J. and Wang, X. 2009. Siderophore production by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* and its antimicrobial activity. *Bioresource technology* 100: 2639-2641.

- West, T. P. and Reed-Hamer, B. 1993. Polysaccharide production by a reduced pigmentation mutant of the fungus *Aureobasidium pullulans*. *FEMS Microbiology Letters* 113: 345-349.
- Wijayawardene, N. N., Crous, P. W., Kirk, P. M., Hawksworth, D. L., Boonmee, S., Braun, U., Dai, D.-Q., D'souza, M. J., Diederich, P. and Dissanayake, A. 2014. Naming and outline of Dothideomycetes–2014 including proposals for the protection or suppression of generic names. *Fungal Diversity* 69: 1-55.
- Williams, D. L., Mueller, A. and Browder, W. 1996. Glucan-based macrophage stimulators. *Clinical Immunotherapeutics* 5: 392-399.
- Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S. and Jamnong, P. 2006. β -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food hydrocolloids* 20: 68-78.
- Wu, S., Jin, Z., Tong, Q. and Chen, H. 2009. Sweet potato: A novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers* 76: 645-649.
- Wu, S., Chen, H., Jin, Z. and Tong, Q. 2010. Effect of two-stage temperature on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 737-741.
- Xiumei, N., Zhenming, C., Zhiqiang, L. and Lixi, Y. 2008. Screening of protease-producing marine yeasts for production of the bioactive peptides. *海洋学报(中文版)* 27: 116-125.
- Youssef, F., Roukas, T. and Biliaderis, C. 1999. Pullulan production by a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* using batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry* 34: 355-366.
- Yurlova, N. and De Hoog, G. 1997. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek* 72: 141-147.
- Yurlova, N. A., de Hoog, G. S. and Fedorova, L. G. 2008. The influence of ortho- and para-diphenoloxidase substrates on pigment formation in black yeast-like fungi. *Studies in Mycology* 61: 39-49.

- Zalar, P., Gostinčar, C., De Hoog, G., Uršič, V., Sudhadham, M. and Gunde-Cimerman, N. 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in mycology* 61: 21-38.
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A. and Gullino, M. L. 2010. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biological Control* 54: 172-180.
- Zou, X., Zhou, Y. and Yang, S. T. 2013. Production of polymalic acid and malic acid by *Aureobasidium pullulans* fermentation and acid hydrolysis. *Biotechnology and bioengineering* 110: 2105-2113.





ภาคผนวก ก

การเตรียมสาร

1. สูตรอาหาร Yeast Malt (YM) Broth/Agar (Atlas, 1993)

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Peptone	5	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น แล้วตามเติมวุ้น 15 กรัม แล้วนำไปอุ่นให้ร้อนจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. สูตรอาหาร Production medium (PM) (Lotrakul และคณะ, 2013)

ซูโครส	6	กรัม
โซเดียมไนเตรท	0.06	กรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04	กรัม
NaCl	0.2	กรัม
ยีสต์สกัด	0.08	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

3. de Man Rogosa Sharpe (MRS) Broth/Agar (De Man, Rogosa และ Sharpe, 1960)

เปปโตน	10	กรัม
บีฟสกัด	10	กรัม
ยีสต์สกัด	5	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร
K_2HPO_4	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Tri-ammonium citrate	2	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.02	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น หากต้องการเตรียม MRS Agar ให้เติมวุ้น 15 กรัม ลงในส่วนผสมที่ละลายในน้ำกลั่นแล้ว จากนั้นนำไปอุ่นจนวุ้นละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไป

4. การวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Modified dinitrosalicylic acid method (Fox and Robyt, 1991)

4.1 การเตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959)

3,5-Dinitrosalicylic Acid	7.49	กรัม
NaOH	13.98	กรัม
Rochelle salt (sodium potassium tartrate)	216.10	กรัม
Phenol (pH 7.0)	5.37	มิลลิลิตร
Sodium metabisulphate	5.86	กรัม
น้ำกลั่น	1,0000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

4.2 การเตรียมตัวอย่างสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

โดยทำการเตรียมตัวอย่างสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสให้ได้ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสให้ได้ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 และ 450 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำการทดลองในไมโครไตเตอร์เพลท 96 หลุม โดยเติมสารละลายกลูโคส 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายกรดไตโนโตรซาลิไซลิก (DNS) 100 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ปิดไมโครไตเตอร์เพลท ด้วย Polyvinylchloride cling film แล้วใส่ในถุงซิปลง นำไปต้มในน้ำ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร ใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานหาสมการ

4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล

ดูดตัวอย่างน้ำตาลที่เจือจางเหมาะสม (ช่วง 100 หรือ 200 เท่า) 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมของไมโครไตเตอร์เพลท 3 หลุม 3 ซ้ำ เติมสารละลายกรดไตโนโตรซาลิไซลิก (DNS) 100 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ปิดไมโครไตเตอร์เพลท ด้วย Polyvinylchloride cling film แล้วใส่ในถุงซิปลง นำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร ใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานหาสมการ

5. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Modified Phenol Sulfuric Method

ทำการทดลองโดยการดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสมปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลท ขนาด 96 หลุม เติม Phenol ร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่าเบาๆ 30 วินาที นำไมโครไตเตอร์เพลท ไปแช่น้ำแข็ง จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาณ 125 ไมโครลิตร ปิดไมโครไตเตอร์เพลท ด้วย Polyvinylchloride cling film แล้วใส่ในถุงซิปลง นำไปต้มในน้ำ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 50-500 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เทียบค่า OD ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของกลูโคส

6. การเตรียมน้ำลายเทียม

6.1 ชั่งสารเคมีตามรายการที่แสดงในตารางที่ 1 และนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร โดยกวนตลอดเวลาจนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของน้ำลายเทียม (Sarkar, Goh and Singh, 2009)

รายการที่	ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	ปริมาณ (กรัม/ 500 มิลลิลิตร)
1	Sodium chloride	NaCl	0.797
2	Ammonium nitrate	NH ₄ NO ₃	0.164
3	Potassium phosphate	NH ₂ PO ₄	0.318
4	Potassium chloride	KCl	0.101
5	Potassium citrate Monohydrate	K ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .H ₂ O	0.154
6	Uric acid sodium salt	C ₅ H ₃ N ₄ O ₃ Na	0.0105
7	Urea	H ₂ NCONH ₂	0.099
8	Lactic acid sodium salt	C ₃ H ₃ O ₃ Na	0.073
9	Porcine gastric mucin type II	-	15
10	น้ำกลั่น	H ₂ O	ใช้ปรับปริมาตร

6.2 ปรับ pH ของสารละลายเป็น 6.8 ด้วย 0.1 M NaOH

6.3 ปรับปริมาตรสารละลายจนเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

7. การเตรียมเอนไซม์ Human salivary α -amylase

7.1 เตรียมเอนไซม์ Human salivary α -amylase type XIII-A (sigma A1031, Buchs, CH, 15.1 mg solid; 66.3 unit/mg solid) โดยชั่งเอนไซม์ 3.02 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นแช่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (เอนไซม์มีความเข้มข้น เท่ากับ 100.113 unit/ml)

7.2 การเตรียมเอนไซม์ Human pancreatic α -amylase

7.2.1 เตรียม Phosphate buffer (Na_2HPO_4 1.42 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 1.36 กรัมต่อลิตร) ปรับ pH เป็น 6.9 ด้วย 1N NaOH

7.2.2 ดูด PBS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่เก็บเอนไซม์ เขย่าจนกระทั่งละลาย และดูดสารละลายเอนไซม์เก็บในหลอด centrifuge

7.2.3 เติม PBS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดเก็บเอนไซม์ เขย่าเพื่อ rinse เอนไซม์ที่ค้างอยู่ในหลอด ทำซ้ำ อีก 3 ครั้ง (ปริมาตรรวมของ PBS ที่ใช้ เท่ากับ 2 มิลลิลิตร)

7.2.4 stock ของสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้จะมีความเข้มข้น เท่ากับ 564.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

7.2.5 แบ่งสารละลายเอนไซม์เก็บไว้ในหลอด หลอดละ 0.665 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอด (มีความเข้มข้นของเอนไซม์สุดท้าย เท่ากับ 375.23 ยูนิต) เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดสอบ

ภาคผนวก ข

การผลิตเยลลี่

สูตรเยลลี่พื้นฐาน (Garcia, 2000)

ส่วนประกอบ	(ร้อยละโดยน้ำหนัก)
เจลาติน	8
น้ำตาลทราย	33
กลูโคสไซรัป	31.5
น้ำ	24.5
สารละลายกรดซิตริกร้อยละ 50	3
สารแต่งกลิ่น	0.05

ขั้นตอนการผลิตเยลลี่ (ดัดแปลงจาก สุวรรณฯ สุภิมารส, 2543)

ละลายเจลาตินกับน้ำตาล



เมื่ออุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ค่อยๆ โรยเจลาตินลงไป

คนเรื่อยๆ จนเจลาตินกับน้ำตาลละลายหมด



เติมกลูโคสไซรัป



เติมปีตากลูแคน



เติมกรดซิตริก



วัดค่าของแข็งที่ละลายได้ ให้ได้ 75 องศาบริกซ์ (ถ้าบริกซ์ไม่ถึงให้คนต่อไปเรื่อยๆ)



เติมกลิ่นสังเคราะห์



ช้อนฟองและผิวหน้าที่แห้งออก

เทส่วนผสมลงในถาดอะลูมิเนียม ให้มีความหนา 1 เซนติเมตร



ใส่ในตู้เย็น (0-4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



นำเยลลี่ออกจากพิมพ์ ตัดให้เป็นชิ้นขนาด 1.5x1.5x1



คลุกด้วยแป้งข้าวโพด



ปิดผนึกในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ (ถุงซิปป)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์คุณลักษณะทางเนื้อสัมผัสของเยลลี่

หลักการ

การวัดเนื้อสัมผัสโดยวิธี Texture Profile Analysis (TPA) เป็นการวัดเนื้อสัมผัสในลักษณะเลียนแบบการเคี้ยวของมนุษย์ โดยใช้เครื่องวัดเนื้อสัมผัส และกำหนดสภาวะต่างๆดังนี้

1. ทำการ Calibrate Force
2. ใช้หัววัด P/36R
3. ทำการ Calibrate Probe ก่อนการวัด
4. ทำการวิเคราะห์โดยเครื่อง TA-XT2i

สภาวะที่ใช้ในการวัด

1. Option TPA
2. Pre-Test speed 1.0 mm/s
3. Test-speed 1.0 mm/s
4. Post-Test Speed 1.0 mm/s
5. Distance 10 mm
6. Trigger Type Auto-5g
7. Time 5 s.
8. Data Acquisition Rate 200 pps.

ในการวัดจะทำการกดตัวอย่าง 2 ครั้ง ค่าเนื้อสัมผัสที่ได้จากการวัดโดยวิธี TPA ได้แก่ค่า hardness (ความแข็ง) cohesiveness (การยึดเกาะ) springiness (ความยืดหยุ่น) chewiness (การคงทนเมื่อถูกเคี้ยว) และ gumminess (ความเหนียวยึดติด)

ภาคผนวก ง

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ตัวอย่างแบบทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส ผลิตภัณฑ์เยลลี่ฟรีไปโอดิก

หมายเลขผู้ทดสอบ _____

วันที่ทดสอบ _____

คำแนะนำ : กรุณาทดสอบตัวอย่างจากซ้ายไปขวา โดยชิมแล้วคายทิ้งลงในถังขยะที่เตรียมไว้ให้ พร้อมให้คะแนนความชอบในแต่ละคุณลักษณะของตัวอย่างตามคำอธิบายคะแนนต่อไปนี้ และบ้วนปากก่อนทุกครั้งที่จะทดสอบตัวอย่างต่อไป

- | | |
|--------------------|-----------------|
| 1= ไม่ชอบมากที่สุด | 6= ชอบเล็กน้อย |
| 2= ไม่ชอบมาก | 7= ชอบปานกลาง |
| 3= ไม่ชอบปานกลาง | 8= ชอบมาก |
| 4= ไม่ชอบเล็กน้อย | 9= ชอบมากที่สุด |
| 5= เฉยๆ | |

คุณลักษณะ	รหัสตัวอย่าง		

สี			
ความยืดหยุ่น			
ความเหนียว			
ความชอบรวม			

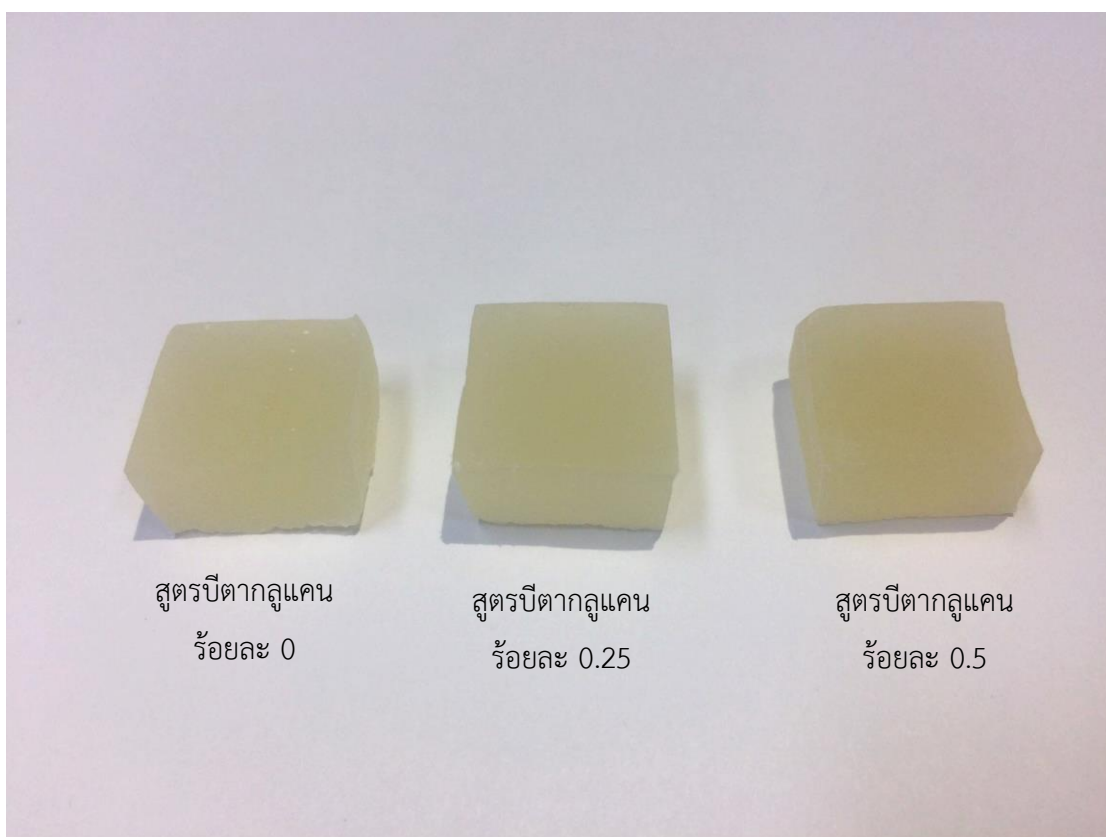
ข้อเสนอแนะ

.....

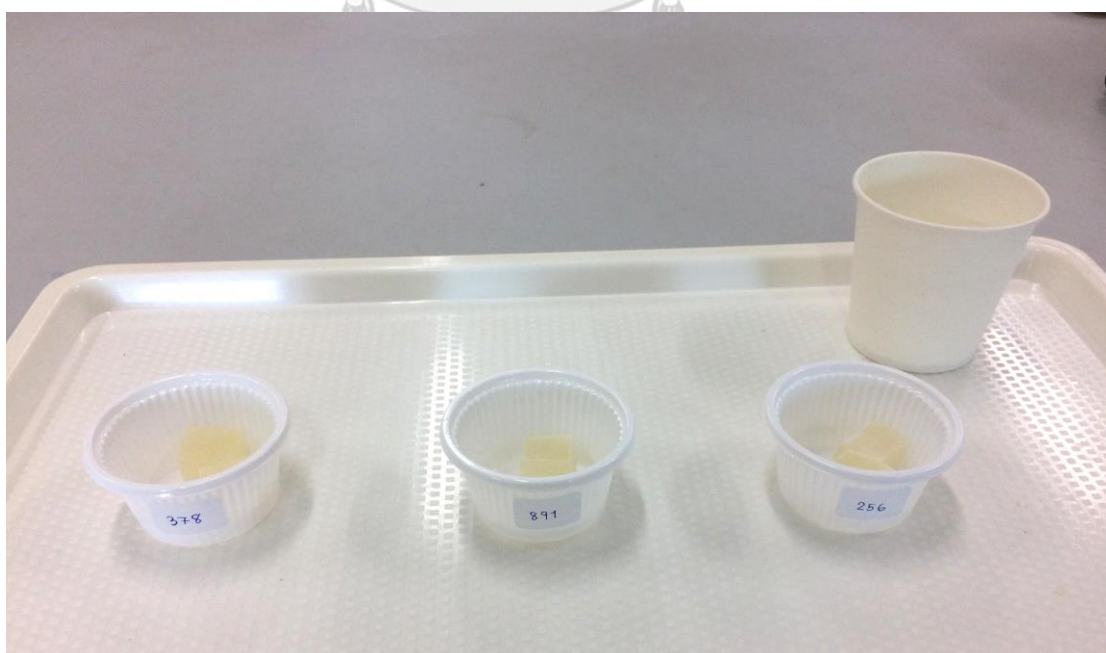
.....

.....

ผลิตภัณฑ์เยลลี่



ตัวอย่างการนำเสนอผลิตภัณฑ์เยลลี่สำหรับทดสอบทางประสาทสัมผัส



การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เยลลี่ในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ที่มีซิปล็อค



CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนันท์ชพร กำหยั้่นนะ เกิดเมื่อวันที่ 9 ธันวาคม พ.ศ.2534 ที่จังหวัดแม่ฮ่องสอน สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ.2557 จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเสนอผลงาน

Khayanna, N., Suppavorasatit, I., and Prasongsuk, S. 2017. β -glucan production by black yeast *Aureobasidium thailandense* NRRL 58543 and its prebiotic property. In proceeding of the 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference: Swissôtel Le Concorde, Bangkok, Thailand. November 23-25, 2017.

อนุสิทธิบัตร

สีหนาท ประสงค์สุข, นันท์ชพร กำหยั้่นนะ, พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล, วิชาณี แบนศิริ, ھرรรษา ปุณณะพยัคฆ์, และ อินทาวุฒ สรรพวรสถิตย์. 2561. กรรมวิธีการผลิตบีตากลูแคนจาก ยีสต์ดำ ออริโอเบซิเดียม (*Aureobasidium*). อนุสิทธิบัตรการประดิษฐ์เลขที่คำขอ: 1803000369.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY