การวิเคราะห์และเปรียบเทียบยีสต์บีตากลูแคน จากลูกแป้งข้าวหมากในภาคกลางของประเทศไทย

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์[1*] สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ[2] และเกร็ดแก้ว มุขแสง[1]

[1]สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏ
บ้านสมเด็จเจ้าพระยา ธนบุรี กรุงเทพฯ 10600
[2]ภาควิชาชีววิทยา และหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วัฒนา กรุงเทพฯ 10110
[*]E-mail: arunchan_57@hotmail.com

รับบทความ: 13 กรกฎาคม 2558 ยอมรับตีพิมพ์: 27 ตุลาคม 2558

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณบีตากลูแคนจากเซลล์ยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากซึ่งทำในจังหวัดอ่างทอง อยุธยา สระบุรี และลพบุรี ได้แก่ *Candida* sp. ATY1 *Candida* sp. AUY3 *C. quercitrusa* SRY4 *Pichia kudriavzevii* LBY2 และข้าวหมากที่ทำในห้องปฏิบัติการ การวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนในผนังเซลล์ยีสต์และข้าวหมากใช้วิธีสเปกโทรโฟโท-เมทรี (spectrophotometry) ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ตรวจวัดระดับปริมาณยีสต์บีตากลูแคนที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาการบ่ม 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง จากผลการวิจัยพบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. ATY1 *Candida* sp. AUY3 *C. quercitrusa* SRY4 *Pichia kudriavzevii* LBY2 และข้าวหมากมีปริมาณบีตากลูแคนในปริมาณสูงสุดที่ร้อยละ 75.1 71.7 75.1 71.9 และ 2.6 ตามลำดับ แนวโน้มการสร้างบีตากลูแคนสูงสุดอยู่ที่ 72 – 96 ชั่วโมง ซึ่งยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์อาจใช้เป็นแหล่งทางเลือกสำหรับผลิตบีตากลูแคนในระดับการค้าได้ในอนาคต

คำสำคัญ: ข้าวหมาก บีตากลูแคน *Candida* sp. ATY1 *Candida* sp. AUY3 *Candida quercitrusa* SRY4 *Pichia kudriavzevii* LBY2

Analysis and Comparison of Yeast β-Glucan from Loog-Pang Kao-Mak in the Central Part of Thailand

Arun Chanchaichaovivat, Somkiat Phornphisutthimas and Kredkaew Mookseang

[1]Program study Microbiology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Thonburi, Bangkok 10600, Thailand

[2]Department of Biology, and Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Wattana, Bangkok 10110, Thailand

E-mail: arunchan_57@hotmail.com

Abstract

The objectives of this research were to analyze and compare β-glucan contents of yeast isolates from Angthong, Ayutthaya, Saraburi and Lopburi provinces including *Candida* sp. ATY1, *Candida* sp. AUY3, *C. quercitrusa* SRY4, *Pichia kudriavzevii* LBY2 and Kao-Mak made in the laboratory. β-glucan from yeasts' cell walls were analysed by spectrophotometric method with wave length of 510 nm. The samples were incubated at room temperature for 24, 48, 72 and 96 hours. The results showed that *Candida* sp. ATY1, *Candida* sp. AUY3, *C. quercitrusa* SRY4, *Pichia kudriavzevii* LBY2 and Kao–Mak synthesized maximum β-glucan at 75.1%, 71.7% 75.1%, 71.9% and 2.6%, respectively. All sample produced β-glucan in the highest level at an incubation time range of 72 – 96 hours. In the future, these 4 yeast strains may be alternative resources for β-glucan production in the commercial uses.

Keywords: Kao-Mak, β-glucan, *Candida parapsilosis* ATY1, *Candida parapsilosis* AUY3, *Candida quercitrusa* SRY4, *Pichia kudriavzevii* LBY2

บทนำ

บีตากลูแคนจัดเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีหน่วยย่อยดีกลูโคส (D-glucose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตาไกลโคซิดิก (β-glycosidic bond) บีตากลูแคนที่พบในธรรมชาติมีหลายกลุ่มโดยมีลักษณะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีและโครงสร้างสามมิติของบีตากลูแคนชนิดนั้น ๆ จากการศึกษาโครงสร้างผนังเซลล์ยีสต์พบว่าประกอบด้วยบีตากลูแคนที่มีโครงสร้างเป็นบีตา-1,3 กลูแคน (β-1,3 glucan) ประกอบด้วยหน่วยย่อยกลูโคสต่อเชื่อมกันด้วยพันธะบีตา-1,3 และสายโซ่ข้าง (side chain) ที่เชื่อมกลูโคสด้วยพันธะบีตา-1,6 โดยทั่วไปบีตากลูแคนพบได้ในพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ข้าวโอต (oat) ข้าวบาร์เลย์ (barley) รำข้าว สาหร่ายทะเล เห็ด และแบคทีเรียบางชนิด ซึ่งพบโครงสร้างและปริมาณแตกต่างกัน (ตาราง 1)

ตาราง 1 ปริมาณบีตากลูแคนจากแหล่งต่าง ๆ ที่วิเคราะห์โดยวิธีทางเอนไซม์ (enzymatic assay)

แหล่งที่มา	ปริมาณบีตากลูแคน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
บีตากลูแคนมาตรฐาน Lot 90201a	66.8
Saccharomyces cerevisiae	60.0
บีตากลูแคนจากข้าวบาร์เลย์ Lot 90801a	97.6
สเคลอโรกลูแคน (scleroglucan) ของ Actigum CS11	89.1
เคิร์ดแลน (curdlan) Lot 60201a	97.4
แพไคแมน (pachyman) Lot 10301a	86.6
ลามินาลิน (laminarin) จาก *Eisenia arborea* หรือ Tokyo Kasei	89.7
อัลฟาเซลลูโลส (α-cellulose)	9.6
เอวิเซล (Avicel®)	14.5
แป้งชนิดละลายได้ (soluble starch) ของ Sigma Chemical	0.34
ไกลโคเจน ประเภท II (glycogen Type II) ของ Sigma G-8751	0.27

ที่มา: Megazyme, 2011; The National Innovation Agency, 2005

ในรำข้าวชนิดต่าง ๆ พบโครงสร้างเป็นแบบบีตา-1,3/1,4 กลูแคน ซึ่งจากการศึกษาพบว่าบีตา-1,3/1,6 กลูแคนมีสมบัติทางด้านชีวเคมีดีกว่าบีตา-1,3/1,4 กลูแคน โดยลักษณะของพันธะที่เชื่อมต่อกันมีผลต่อความสามารถในการละลาย สมบัติทางชีวภาพ และประสิทธิภาพของบีตากลูแคนในการนำมาใช้ประโยชน์ (Onderdonk et al., 1992) ซึ่งขณะนี้เป็นที่ยอมรับว่าบีตากลูแคนที่สกัดจากยีสต์มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์มากมาย (Chanchaichaovivat, 2010) โดยมีงานวิจัยที่แสดงหลักฐานจากการทดสอบในระดับสัตว์ทดลองและในมนุษย์ที่แสดงให้เห็นว่าบีตากลูแคนจากยีสต์สามารถลดอาการเจ็บป่วยได้หลายประการ ที่สำคัญได้แก่ ความสามารถในการลดปริมาณเซลล์มะเร็งและเนื้องอก ลดการติดเชื้อหลังการผ่าตัด ทำให้บาดแผลหายเร็วขึ้น (Dellinger et al., 1999; Demir et al., 2007; Hong et al., 2004) และลดอัตราการเพิ่มจำนวนของไวรัสในหมู (swine flu virus) จึงมีแนวโน้มในการศึกษานำยีสต์บีตากลูแคนมาใช้ป้องกันการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในอนาคต (Fuller, 2010) ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ของบีตากลูแคน ได้แก่ การผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพ เป็นแหล่งไฟเบอร์ (fiber) ผสมในเครื่องสำอาง และเป็นสารเพิ่มผิวสัมผัส (texturing agent) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำบีตากลูแคนมาใช้เป็นสารเพิ่มภูมิต้านทานให้กับมนุษย์ ซึ่งจากผลการวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของยีสต์บีตากลูแคนที่จะนำมาใช้เป็นอาหารเสริมภูมิคุ้มกันโรคและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมากมายในอนาคต (Kogan et al., 2005)

สำหรับประเทศไทยได้เริ่มมีการนำบีตากลูแคนจากยีสต์มาใช้ประโยชน์โดยนำมาผสมในอาหารประเภทต่างๆ มากขึ้น เช่น ผลิตภัณฑ์นม เครื่องดื่ม ขนมอบ (bakery) อาหารเสริมสุขภาพ อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ยีสต์ที่อยู่ในอาหารหมักของไทยดังเช่นข้าวหมากนับเป็นแหล่งบีตากลูแคนที่ได้จากการเจริญของยีสต์ในระหว่างการหมักข้าวด้วยลูกแป้งและเป็นอาหารที่นิยมรับประทานกัน

ในสมัยโบราณ จัดเป็นขนมหวานที่ทำขึ้นจากภูมิปัญญาท้องถิ่นของชาวบ้าน แต่ปัจจุบันพบว่ามีผู้สนใจรับประทานน้อยลงเนื่องจากไม่รู้จักและหาซื้อได้ยาก ดังนั้นเพื่อเผยแพร่ประโยชน์ของข้าวหมากและจุลินทรีย์ที่อยู่ในลูกแป้งจึงสนใจวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนในสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดแยกได้จากลูกแป้งที่ทำในท้องถิ่นไทยและปริมาณบีตากลูแคนในข้าวหมาก

วัตถุประสงค์

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากใน 4 จังหวัดภาคกลางของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา อ่างทอง สระบุรี และลพบุรี รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนในข้าวหมาก

วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของสายพันธุ์ยีสต์

สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการวิจัยได้มาจากลูกแป้งข้าวหมากที่ทำขึ้นในท้องถิ่น 4 จังหวัดของเขตภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดอ่างทอง (ตำบลเทวราช อำเภอไชโย) จังหวัดอยุธยา (ตำบลพระยาบันลือ อำเภอลาดบัวหลวง) จังหวัดสระบุรี (ตำบลห้วยป่าหวาย อำเภอพระพุทธบาท) และจังหวัดลพบุรี (ตำบลหัวสำโรง อำเภอท่าวุ้ง) ประกอบด้วย *Candida* sp. ATY1 *Candida* sp. AUY3 *C. quercitrusa* SRY4 และ *Pichia kudriavzevii* LBY2 ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ชนิดของสายพันธุ์ยีสต์ด้วยเทคนิควิเคราะห์ลำดับเบสบนยีน 26S rRNA (Chanchaichaovivat and Pasuk, 2013)

การสังเกตสัณฐานเซลล์ยีสต์

นำคอโลนี (colony) ของสายพันธุ์ยีสต์ที่เก็บไว้ในหลอดอาหาร ได้แก่ *Candida* sp. ATY1, *Candida* sp. AUY3, *C. quercitrusa* SRY4 และ *Pichia kudriavzevii* LBY2 มาลาก (streak) บนจานอาหาร yeast malt agar (YMA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 – 2 วัน สังเกตสัณฐานคอโลนี จากนั้นนำคอโลนีเดี่ยวที่ได้มาลากบนอาหารซ้ำอีก 2 – 3 ครั้ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง แล้วจึงใช้ลูป (loop) แตะคอโลนีเดี่ยวนำมากระจายเซลล์บนสไลด์ (slide) ที่หยดสีย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู (methylene blue) หรือแลกโทฟีนอลคอตทอลบลู (lactophenol cotton blue) 2 – 3 หยด และปิดโดยกระจกปิดสไลด์ (cover glass) นำมาตรวจสอบลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายเลนส์วัตถุ 100 เท่า พร้อมบันทึกภาพ

เพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์

เลี้ยงยีสต์ในอาหารเอียง YMA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำยีสต์ถ่ายลงในอาหาร yeast malt broth (YMB) ปริมาณ 150 มิลลิลิตร เขย่า 150 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 – 96 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเก็บตะกอนยีสต์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ใช้ความร้อนช่วยให้ผนังเซลล์ยีสต์แตก

นำตะกอนยีสต์อบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาชั่งน้ำหนักครั้งละ 2 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 16×125 มิลลิเมตร ปิดฝานำไปนึ่งหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

สกัดบีตากลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์

เติม KOH (potassium hydroxide) ลงในหลอดทดลองที่มีเซลล์ยีสต์หลอดละ 0.4 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) ให้เข้ากันดี แช่ในถังน้ำแข็งนาน 30 นาที เติมโซเดียมแอซีเทตบัฟเฟอร์ (sodium acetate buffer, pH 3.8) ลงในหลอดๆ ละ 1.6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม และเติม Glucazyme™ หลอดละ 40 ไมโครลิตร ปิดฝาพร้อมกับพันรอบฝาด้วยพาราฟิล์ม (parafilm) นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) หรือบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 12 – 16 ชั่วโมง

วิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนด้วยวิธีทางเอนไซม์

1. ละลายและไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) กลูแคนทั้งหมด (อัลฟากลูแคนกับบีตากลูแคน) โดยเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 37 (ปริมาตรโดยปริมาตร) ในหลอดที่บรรจุสารสกัดจาก *Candida* sp. ATY1 *Candida* sp. AUY3 *C. quercitrusa* SRY4 และ *Pichia kudriavzevii* LBY2 ปิดฝาหลอดและเขย่าแรง ๆ ด้วยเครื่องปั่นผสม นำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที แล้วจึงนำไปเขย่าทุก ๆ 15 นาที (เพื่อให้บีตากลูแคนละลายสมบูรณ์)

2. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรในแต่ละหลอด ปิดฝาแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นคลายฝาหลอด นำหลอดไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำมาเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 นอร์มัล (N)

3. ใส่ตัวอย่างในแต่ละหลอดลงในฟลาสก์ปริมาตร (volumetric flask) ใช้โซเดียมแอซีเทตบัฟเฟอร์ (pH 5.0) เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ (mM) ล้างหลอดและปรับปริมาตรให้พอดี จากนั้นนำไปเขย่าจนผสมเข้ากัน

4. นำตัวอย่างไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 rpm นาน 10 นาที

5. วัดปริมาณกลูแคนทั้งหมด (total glucan) โดยแบ่งตัวอย่างของเหลวที่ปั่นแยกตะกอนออกไปแล้วปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วขนาด 16×100 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ผสมเอ็กโซ-1,3 บีตากลูแคเนส (exo-1,3 β-glucan) 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μg/mL) กับเอนไซม์บีตากลูโคซิเดส (β-glucosidase) 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 200 มิลลิโมลาร์ (mM) โซเดียมแอซีเทตบัฟเฟอร์ (pH 5.0) เติมลงในหลอด เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร และไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

6. เติมเอนไซม์ GOPOD (glucose oxidase/peroxidase mixture) ลงในแต่ละหลอดแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

7. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ 510 นาโนเมตร (nm) เทียบกับแบลงก์รีเอเจนต์ (blank reagent)

การคำนวณปริมาณบีตากลูแคน

การคำนวณปริมาณบีตากลูแคนทั้งหมด (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) สามารถวิเคราะห์ได้จากสมการโดย Megazyme (2011) หน่วยเป็น %w/w ดังนี้

$$\beta\text{-glucan} = \Delta E \times F \times \frac{12.04}{0.1} \times \frac{100}{w} \times \frac{1}{1,000} \times \frac{162}{180}$$

$$= \Delta E \times \frac{F}{W} \times 10.836$$

โดยที่ ΔE = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างเทียบกับแบลงก์รีเอเจนต์

F = ค่าใช้เปลี่ยนจากค่าการดูดกลืนแสงไปเป็นไมโครกรัม = (ปริมาณดีกลูโคสมาตรฐาน 150 μg / ค่าการดูดกลืนแสงของดีกลูโคสมาตรฐาน 150 μg ในปฏิกิริยา GOPOD

12.04/0.1 = ค่าปรับปริมาตรให้ถูกต้อง (ใช้ 0.1 มิลลิลิตร จากปริมาตร 12.04 มิลลิลิตร)
1/1,000 = ค่าที่ใช้เปลี่ยนหน่วยไมโครกรัมเป็นมิลลิกรัม
w = น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม)
100/w = ค่าที่ใช้แสดงบีตากลูแคนเป็นร้อยละของน้ำหนักตัวอย่าง
162/180 = ค่าที่ใช้ปรับจากดีกลูโคสอิสระ (free D-glucose) ไปเป็นแอนไฮโดรดีกลูโคส (anhydro-D-glucose) ที่อยู่ในบีตากลูแคน

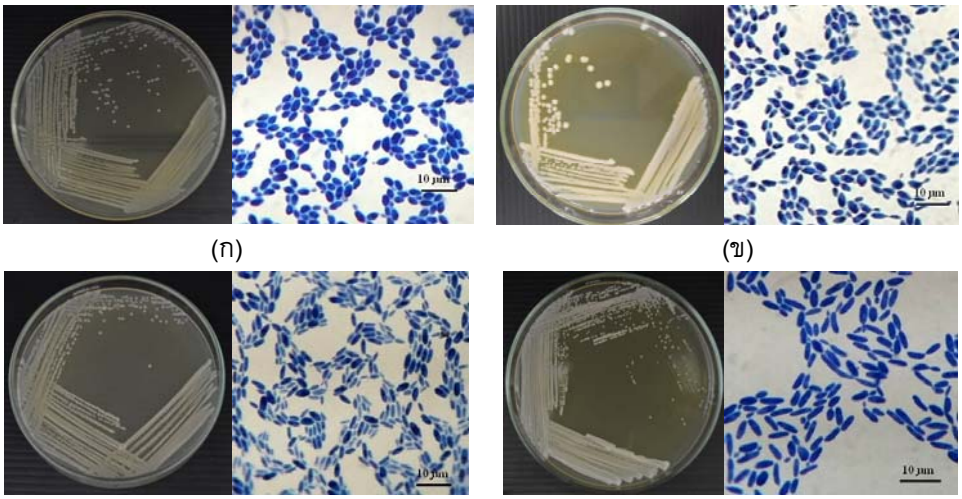
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำผลจากการทดลอง 3 ซ้ำ มาหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ .05

ผลการวิจัย

สัณฐานของคอโลนีและเซลล์ยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก

ผลการสังเกตสัณฐานของสายพันธุ์ยีสต์ซึ่งคัดแยกได้จากลูกแป้งที่ทำขึ้นใน 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดอยุธยา อ่างทอง สระบุรี และลพบุรี พบว่าคอโลนีมีสีแตกต่างกันและผิวเรียบ เซลล์มีลักษณะเป็นรูปไข่ (ovoid) และรูปยาวรี (elongate) มีการแตกหน่อแบบขั้วเดียว (monopolar budding) ดังในภาพที่ 1 และตาราง 2



(ก) (ข)

(ค) (ง)

ภาพที่ 1 ลักษณะคอโลนี (ซ้าย) และลักษณะรูปร่างของเซลล์ (ขวา) (กำลังขยายเลนส์วัตถุ 100×)
(ก) ยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. ATY1 ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากในจังหวัดอ่างทอง
(ข) ยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. AUY3 ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากในจังหวัดอยุธยา
(ค) ยีสต์สายพันธุ์ *C. quercitrusa* SRY4 ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากในจังหวัดสระบุรี
(ง) ยีสต์สายพันธุ์ *Pichia kudriavzevii* LBY2 ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากในจังหวัดลพบุรี

ตาราง 2 ลักษณะคอโลนีและรูปร่างของเซลล์ยีสต์ชนิดต่าง ๆ ที่แยกจากลูกแป้งข้าวหมาก 4 ชนิด

จังหวัด	สายพันธุ์ยีสต์	สีของคอโลนีและผิวหน้า	ลักษณะรูปร่าง
อ่างทอง	*Candida* sp. ATY1	ครีม ผิวเรียบ มันวาว	รูปไข่และแตกหน่อแบบขั้วเดียว
อยุธยา	*Candida* sp. AUY3	ครีม ผิวเรียบ มันวาว	รูปไข่และแตกหน่อแบบขั้วเดียว
สระบุรี	*C. quercitrusa* SRY4	ขาว ผิวเรียบ มันวาว	ยาวรีและแตกหน่อแบบขั้วเดียว
ลพบุรี	*Pichia kudriavzevii* LBY2	ขาว ผิวเรียบ ด้าน	ยาวรีและแตกหน่อแบบขั้วเดียว

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณร้อยละบีตากลูแคนจากยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากและบีตากลูแคนในข้าวหมาก ที่เวลาการบ่มแตกต่างกัน

ผลจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณร้อยละบีตากลูแคนโดยน้ำหนักจาก *Candida* sp. ATY1 *Candida* sp. AUY3 *C. quercitrusa* SRY4 *Pichia kudriavzevii* LBY2 และข้าวหมากที่บ่มไว้ 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า บีตากลูแคนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงเวลา 24 – 72 ชั่วโมง และค่อนข้างคงที่หลังจาก 72 ชั่วโมง (ตาราง 3)

ผลจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณร้อยละบีตากลูแคนโดยน้ำหนักจาก *Candida* sp. ATY1 *Candida* sp. AUY3 *C. quercitrusa* SRY4 *Pichia kudriavzevii* LBY2 และข้าวหมากที่บ่มไว้ 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมง *C. quercitrusa* SRY4 สร้างบีตากลูแคนสูงสุด ($\bar{x}$ = 75.1) โดยมีค่ามากกว่าสายพันธุ์อื่น ($p < .05$) และที่เวลา 96 ชั่วโมง *Candida* sp. ATY1 สร้างบีตากลูแคนสูงสุด ($\bar{x}$ = 75.1) มากกว่าสายพันธุ์อื่น ($p < .05$) (ตาราง 4)

ตาราง 3 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณร้อยละบีตากลูแคนจากสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากและบีตากลูแคนในข้าวหมากที่เวลาการบ่มแตกต่างกัน

สายพันธุ์ยีสต์/ข้าวหมาก	ค่าเฉลี่ยปริมาณบีตากลูแคน (ร้อยละ)			
	24 ชั่วโมง	**48 ชั่วโมง**	**72 ชั่วโมง**	**96 ชั่วโมง**
Candida sp. ATY1	59.8±.025^{a}	63.3±.028^{b}	74.3±.015^{c}	75.1±.020^{d}
Candida sp. AUY3	61.6±.010^{a}	61.9±.026^{b}	70.7±.025^{c}	71.7±.020^{d}
C. quercitrusa SRY4	65.4±.015^{b}	64.4±.015^{a}	75.1±.030^{d}	73.9±.025^{c}
Pichia kudriavzevii LBY2	57.2±.015^{a}	57.2±.005^{a}	73.7±.025^{c}	71.9±.015^{b}
ข้าวหมาก	1.4±.010^{a}	1.6±.010^{b}	2.0±.010^{c}	2.6±.010^{d}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในแถวเดียวกันแสดงผลค่าเฉลี่ยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p = 0.05$

ตาราง 4 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณร้อยละบีตากลูแคนของยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากและบีตากลูแคนในข้าวหมากที่เวลา 72 และ 96 ชั่วโมง

สายพันธุ์ยีสต์/ข้าวหมาก	ค่าเฉลี่ยบีตากลูแคน (ร้อยละ)	
	72 ชั่วโมง	**96 ชั่วโมง**
Candida sp. ATY1	74.3±.015[d]	75.1±.020[d]
Candida sp. AUY3	70.7±.025[b]	71.7±.020[b]
C. quercitrusa SRY4	75.1±.030[e]	73.9±.025[c]
Pichia kudriavzevii LBY2	73.7±.025[c]	71.9±.015[b]
ข้าวหมาก	2.0±.010[a]	2.6±.010[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงผลค่าเฉลี่ยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p = 0.05$

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณบีตากลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากซึ่งทำในจังหวัดอ่างทอง อยุธยา สระบุรี ลพบุรี และบีตากลูแคนในข้าวหมาก พบว่า ยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida* sp. ATY1 *Candida* sp. AUY3 *C. quercitrusa* SRY4 และ *Pichia kudriavzevii* LBY2 ให้ปริมาณบีตากลูแคนสูงสุดระหว่างร้อยละ 71.7 – 75.1 ที่เวลา 72 – 96 ชั่วโมง เมื่อศึกษาสัณฐานของเซลล์พบว่ามีรูปร่าง 2 แบบ ได้แก่ รูปไข่ และรูปยาวรี แตกหน่อขั้วเดียว คอโลนีผิวเรียบ มีสีขาวและสีครีม ยีสต์แต่ละสายพันธุ์ให้ปริมาณบีตากลูแคนสูงสุดที่เวลาแตกต่างกันในเวลา 72 – 96 ชั่วโมง โดย *Candida* sp. ATY1 ให้ปริมาณสูงสุดที่ 96 ชั่วโมง *Candida* sp. AUY3 สูงสุดที่ 96 ชั่วโมง *C. quercitrusa* SRY4 สูงสุดที่ 72 ชั่วโมง และ *Pichia kudriavzevii* LBY2 สูงสุดที่ 72 ชั่วโมง สำหรับปริมาณบีตากลูแคนที่พบในข้าวหมาก พบว่า มีค่าสูงสุดเมื่อบ่มไว้ 96 ชั่วโมง ให้ปริมาณร้อยละ 2.6 เมื่อนำค่าปริมาณบีตากลูแคนไปเปรียบเทียบกับบีตากลูแคนที่ได้จากแหล่งอื่น ๆ (ตาราง 1) พบว่าบีตากลูแคนจากยีสต์แต่ละไอโซเลตในงานวิจัยนี้ให้ปริมาณร้อยละบีตากลูแคนสูงกว่าบีตากลูแคนจาก *Saccharomyces cerevisiae* บีตากลูแคนมาตรฐาน Lot 90201a อัลฟาเซลลูโลส เอวิเซล แป้งชนิดละลายได้ และไกลโคเจน สำหรับข้าวหมากมีปริมาณบีตากลูแคนสูงกว่าแป้งชนิดละลายได้และไกลโคเจนแต่มีปริมาณน้อยกว่าที่ได้จากเซลล์ยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ เนื่องจากในข้าวหมากมีปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เจริญอยู่ต่อน้ำหนักของข้าวหมากค่อนข้างน้อย การรับประทานข้าวหมากจึงได้รับปริมาณบีตากลูแคนปริมาณหนึ่งรวมทั้งยังได้ประโยชน์จากเซลล์ยีสต์ในข้าวหมากที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายและมีประโยชน์ต่อการทำงานของระบบทางเดินอาหาร (Chanchaichaovivat, 2012) ในกรณีที่รับประทานสารสกัดบีตากลูแคนจากเซลล์ยีสต์ ร่างกายจะได้รับปริมาณบีตากลูแคนมากกว่าการรับประทานข้าวหมาก แต่มีข้อเสียคือเซลล์ยีสต์ได้ผ่าน

การฆ่าเชื้อให้ตายแล้ว ดังนั้นจึงไม่ได้รับประโยชน์จากสมบัติโพรไบโอติกจากยีสต์เหล่านั้นและควรรับประทานในปริมาณที่ทางการแพทย์กำหนดคือ 2 – 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน (Chanchaichaovivat, 2010) ซึ่งการวิจัยในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของยีสต์ *Candida* sp. ATY1 *Candida* sp. AUY3 *C. quercitrusa* SRY4 และ *Pichia kudriavzevii* LBY2 ที่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตบีตากลูแคนในระดับการค้าหากมีการศึกษาด้านความปลอดภัยในการใช้กับมนุษย์และสัตว์เพิ่มเติม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบีตากลูแคนของยีสต์ทั้ง 4 ไอโซเลต ได้แก่ สูตรอาหารราคาถูก อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส และอัตราการให้อากาศ ในระดับถังหมัก 3 – 5 ลิตร

2. ควรทดสอบสมบัติของบีตากลูแคนของยีสต์ทั้ง 4 ไอโซเลต ในการกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวหรือการสร้างสารภูมิต้านทานในสัตว์ทดลองและทดสอบความเป็นพิษ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยแห่งชาติ คณะกรรมการการอุดมศึกษาที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ (รหัสโครงการ 2555A13862014)

เอกสารอ้างอิง

Chachaichaovivat, A. (2010). Yeast beta-glucan: Food supplement for immune system. **Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning** 1(2): 113–118. (in Thai)

Chanchaichaovivat, A. (2012). Yeast probiotic. **Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning** 3(1): 72–79. (in Thai)

Chanchaichaovivat, A., and Pasuk, A. (2013). Inhibitory effect of fermented glutinous rice on enteropathogenic bacteria. **The Journal of Interdisciplinary Networks** 2(2): 30–36.

Dellinger, E. P., Babineau, T. J., Bleicher, P., Kaiser, A. B., Seibert, G. B., Postier, R. G., Vogel, S. B., Norman, J., Kaufman, D., Galandiuk, and Condon, R. E. (1999). Effect of PGG-glucan on the rate of serious postoperative infection or death observed after high-risk gastrointestinal operations. Betafectin Gastrointestinal Study Group. **Archives of Surgery** 134(9): 977–983.

Demir, G., Klein, H. O., Mandel-Molinas, N., and Tuzuner, N. (2007). Beta glucan induces proliferation and activation of monocytes in peripheral blood of patients with advanced breast cancer. **International immunopharmacology** 7(1): 113–116.

Fuller, R. (2010). **The Importance of Innate Immune Function in Disease Management and Prevention: 1-3, 1-6 Beta glucan Supplementation Advice**. Retrieved from Web site: http://www.doveclinic.com/downloads/.../ImmiflexDoveWebsiteInfo.

pdf, May 3, 2010.

Hong, F., Yan, J., Baran, J. T., Allendorf, D. J., Hansen, R. D., Ostroff, G R., Xing, P. X., Cheung, N. K., and Ross, G. D. (2004). Mechanism by which orally administered β-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. **Journal of Immunology** 173(2): 797–806.

Kogan, G., Stasko, A., Bauerova, K., Polovka, M., Soltes, L., Brezova, V., and Navarova, J. (2005). Antioxidant properties of yeast (1,3)-β-D-glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy and its activity in the adjuvant arthritis. **Carbohydrate Polymers** 61(1): 18–28.

Megazyme. (2011). **Enzymatic yeast beta-glucan**. Ireland: Megazyme International.

Onderdonk, A. B., Cisneros, R. L., Hinkson, P., and Ostroff, G. (1992). Anti-infective effect of poly-beta 1-6-glucotriosyl-beta 1-3-gluco pyranose glucan *in vivo*. **Infection and Immunity** 60(4): 1642–1647.

The National Innovation Agency (NIA). (2005). **Yeast Products**. Chonburi, Thailand.