รหัสโครงการ SUT1-104-43-12-10

รายงานการวิจัย

อาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นิวเตรียนท์ราคาถูก

(Low Cost Nutrient Media)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUTI-104-43-12-10

รายงานการวิจัย

อาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นิวเตรียนท์ราคาถูก

(Low Cost Nutrient Media)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. คมสัน พิระภัทรุ่งสุริยา

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผศ.ดร. สุเวทย์ นิงสานนท์

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2543

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ "ผศ. สุวลี จันทร์กระจ่าง" (Asian Institute of Technology) และ "Eland Corporation Ltd.," จ. นนทบุรี สำหรับการอนุเคราะห์ไคโตแซน ขอขอบคุณ "บริษัท ไทยเมจิฟาร์มาซิวติคัล จำกัด" ที่ให้การอนุเคราะห์ยีสต์สด และขอขอบคุณ "The East Asiatic (Thailand) Public Company Limited," จ.กรุงเทพฯ ที่ให้การอนุเคราะห์แอลคาเลส

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2543" เป็นจำนวนเงิน 165,000 บาท

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งพัฒนาแนวการผลิตอาหารเพาะเลี้ยงราคาถูกที่มีแร่ธาตุอาหารเหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ที่ใช้วัตถุดิบในประเทศไทย เพื่อการผลิตขึ้นจริง โดยเน้นการผลิต yeast extract ให้มีคุณภาพใกล้เคียงกับสินค้านำเข้า ผลการศึกษาพบว่า วัตถุดิบที่เหมาะที่สุดใน 4 ชนิดคือยีสต์สด ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ เหมาะในการผลิตเป็น yeast extract powder ที่ไม่ให้ตะกอน ละลายน้ำได้ดี และให้คุณค่าทางโภชนาการสูง การเตรียม yeast extract ที่ใช้แอลคาเลสไม่ให้ผลแตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ใช้แอลคาเลส ส่วนที่เตรียมโดยใช้ไคโตแซนพบว่าไม่ให้ผลแตกต่างในการเพาะเลี้ยงรา ให้ผลดีในการเพาะเลี้ยงยีสต์ และให้ผลยับยั้งในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ผลการเปรียบเทียบระหว่าง yeast extract ที่ผลิตขึ้น กับที่เป็นสินค้านำเข้าประเทศ โดยพิจารณาระดับการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่า yeast extract ที่ผลิตขึ้นน่าจะมีคุณภาพดีกว่าเพราะให้ค่าเฉลี่ย MEM (Modified Ecometric Method) เท่ากับ 4.78 ในกรณีของแบคทีเรีย และ 4.25 ในกรณีของยีสต์ ในขณะที่ MEM ของสินค้านำเข้าเท่ากับ 4.48 และ 3.74 ตามลำดับ (P=.05) ส่วนในกรณีของ "รา" คุณภาพของ in-house-YE และ imported YE ให้ผลไม่แตกต่างกัน (P=.05) จากข้อมูลวิธีการและแนวทางการผลิตที่ได้นี้ ชี้ว่ามีความเป็นไปได้สูงที่จะผลิต yeast extract ที่มีราคาถูก มีคุณภาพดี และใช้วัตถุดิบภายในประเทศ โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือ และเทคโนโลยีที่ละเอียดซับซ้อน

Abstract

The goal of this study is to produce yeast extract as ingredient of low cost nutrient media from raw materials made in Thailand for microbial culture. It is expected that the ingredient has the same or similar quality as of imported yeast extract. The result showed that among four types of raw materials investigated, the most appropriate for yeast extract production was by-product fresh yeast, that easily dissolved, gave no indissoluble matters, and had high nutritious value. The effect of alcalase on in-house YE quality were not different significantly from the control with no alcalase addition. Chitosan did not affect YE quality when mold growth was considered. However, when the tested organisms were the yeast, and the bacteria, chitosan made in-house YE better and poorer quality, respectively. The comparison result showed that in-house 'yeast extract (YE)' could have better quality over imported YE with the bacterial mean MEM (Modified Ecometric Method) value of 4.78, and the yeast MEM value of 4.25 while the bacterial and yeast MEM of imported YE were 4.48, and 3.74, respectively (P=.05). When the MEM value of mold growth was considered, the quality of both YE were not different significantly (P=.05). By means of data, methods, proved knowledge found, and discovered through this study, there is potential to manufacture low cost, good quality YE from raw materials produced in Thailand without sophisticated equipment and technology.

คำอธิบายศัพท์/คำย่อ

Al-YE: in-house YE ที่ขั้นการเตรียมมีการเติม 'แอลคาเลส (alcalase)'

Chi-YE: in-house YE ที่ขั้นการเตรียมมีการเติม 'ไคโตแซน (chitosan)'

imported YE: YE ที่เป็นสินค้านำเข้าของบริษัท (Oxoid product code: CM0021)

imp-PCA: PCA ที่ใช้ YE ชนิดที่เป็นสินค้านำเข้า

imp-YM: YM ที่ใช้ YE ชนิดที่เป็นสินค้านำเข้า

in-PCA-Al: PCA ที่ใช้ in-house YE ชนิด Al-YE

in-PCA-Chi: PCA ที่ใช้ in-house YE ชนิด Chi-YE

in-PCA-N: PCA ที่ใช้ in-house YE ชนิด NoAdd-YE

in-YM-Al: YM ที่ใช้ in-house YE ชนิด Al-YE

in-YM-Chi: YM ที่ใช้ in-house YE ชนิด Chi-YE

in-YM-N: YM ที่ใช้ in-house YE ชนิด NoAdd-YE

NoAdd-YE: in-house YE ที่ขั้นการเตรียมไม่มีการเติม 'แอลคาเลส หรือ ไคโตแซน'

no-YE-PCA: อาหาร PCA ที่ไม่มี YE

no-YE-YM: อาหาร YM ที่ไม่มี YE

PCA: ชื่ออาหารเพาะเลี้ยง 'Plate Count Agar Media' (รายละเอียดหน้า 6)

YE: Yeast Extract

YM: ชื่ออาหารเพาะเลี้ยง 'Yeast and Mould Agar' ซึ่งมีชื่ออื่นด้วย (รายละเอียดหน้า 6)

F material วัตถุดิบที่เป็นยีสต์สด ที่ใช้ทำขนมปัง (รายละเอียดหน้า 15)

S material วัตถุดิบที่เป็นยีสต์สด ที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ของการผลิตเบียร์ (รายละเอียดหน้า 15)

Sd material วัตถุดิบที่นำ S material มาเตรียมให้แห้ง และผ่านขั้นตอนอื่น เพื่อผลิตเป็นอาหารสัตว์ (รายละเอียดหน้า 15)

D material วัตถุดิบที่เป็นยีสต์แห้ง (รายละเอียดหน้า 15)

หมายเหตุ: คำอธิบายนี้มีอยู่แล้วในเนื้อหา แต่นำมารวมเพื่อให้สะดวกขึ้น

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ---- ก

บทคัดย่อ ---- ข

Abstract ---- ค

คำอธิบายศัพท์/คำย่อ ---- ง

สารบัญ ---- จ

สารบัญตาราง ---- ช

สารบัญตาราง (ภาคผนวก) ---- ฌ

สารบัญภาพ ---- ฎ

บทที่ 1 บทนำ ---- **1**

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย ---- 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย ---- 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย ---- 2

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น ---- 2

1.5 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ ---- 3

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย ---- 3

1.7 วรรณกรรมที่เป็นพื้นฐานการวิจัย ---- 3

1.7.1. อาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ---- *3*

1.7.2. Yeast Extract ---- *4*

Yeast Extract: Yeast Autolysis ---- *4*

Yeast Extract: การผลิตเพื่อการค้า ---- *5*

Yeast Extract: อาหารเพาะเลี้ยง ---- *6*

1.7.3. PCA ---- *6*

1.7.4. YM Agar ---- *6*

1.7.5. ไคโตแซน ---- *7*

1.7.6. แอลคาเลส ---- *7*

1.8 คำสำคัญ ---- 8

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย ---- **9**

2.1 สมมุติฐานการวิจัย ---- 9

2.2 แนวคิดการทดสอบสมมุติฐาน ---- 10
2.3 วรรณกรรมที่เป็นพื้นฐานในการออกแบบการทดลอง ---- 12
2.4 การออกแบบวิจัยและวิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล ---- 15
2.4.1. การคัดเลือกวัตถุดิบสำหรับการผลิต YE ---- 15
2.4.2. ปัจจัยอุณหภูมิช่วง 30-60°ซ. ต่อการผลิต YE ---- 17
2.4.3. ปัจจัยพีเอช 5.5, 7.0 และ 8.5 ต่อการผลิต YE ---- 17
2.4.4. ปัจจัยแอลคาเลสต่อการผลิต YE ---- 17
2.4.5. ปัจจัยไคโตแซนต่อการผลิต YE ---- 18
2.4.6. การประเมินคุณภาพ In-house YE ---- 18
2.4.6.1 การเตรียม In-house YE ผง ---- 19
2.4.6.2 การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย ---- 20
2.4.6.3 การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของยีสต์ ---- 21
2.4.6.4 การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา ---- 21

บทที่ 3 ผลการทดลอง ---- 23

3.1 การคัดเลือกวัตถุดิบสำหรับการผลิต YE (2.4.1) ---- 23
3.2 ปัจจัยอุณหภูมิช่วง 30-60°ซ. ต่อการผลิต YE (2.4.2) ---- 25
3.3 ปัจจัยพีเอช 5.5, 7.0 และ 8.5 ต่อการผลิต YE (2.4.3) ---- 27
3.4 ปัจจัยแอลคาเลสต่อการผลิต YE (2.4.4) ---- 28
3.5 ปัจจัยไคโตแซนต่อการผลิต YE (2.4.5) ---- 29
3.6 การประเมินคุณภาพ In-house YE (2.4.6) ---- 30
3.6.1. การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย ---- 30
3.6.2. การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของยีสต์และรา ---- 34

บทที่ 4 สรุป และ วิจารณ์ ---- 38

4.1 การคัดเลือกวัตถุดิบสำหรับการผลิต YE ---- 38
4.2 ปัจจัยอุณหภูมิช่วง 30-60°ซ. ต่อการผลิต YE ---- 39
4.3 ปัจจัยพีเอช 5.5, 7.0 และ 8.5 ต่อการผลิต YE ---- 39
4.4 ปัจจัยแอลคาเลสต่อการผลิต YE ---- 39
4.5 ปัจจัยไคโตแซนต่อการผลิต YE ---- 40
4.6 การประเมินคุณภาพ In-house YE ---- 40
4.6.1 การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย ---- 40
4.6.2 การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของยีสต์ ---- 41
4.6.3 การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา ---- 42
4.7 สรุปรวม ---- 42

บทที่ 5 ข้อเสนอแนะ----44

บรรณานุกรม----45

ภาคผนวก----47

ข้อมูลไคโตแซน---- 59

การวัดปริมาณ Lysine ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) ---- 60

ประวัติผู้วิจัย---- 61

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ผลเปรียบเทียบผง YE และปริมาณ Lysine ที่มีอยู่ในผง YE ที่ผลิตได้จากวัตถุดิบ 4 ชนิด (Autolysis ที่ 45°ซ., พีเอช 8.5) ---- 24
ตารางที่ 2 ผลลักษณะผง YE ที่ผลิตได้จากวัตถุดิบ 4 ชนิด ---- 25
ตารางที่ 3 ผลการประเมินคุณภาพ In-house YE โดยพิจารณาการเจริญของแบคทีเรีย ---- 31
ตารางที่ 4 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test ตามแผนการทดลองแบบ CRD ---- 32
ตารางที่ 5 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ RCBD ---- 34
ตารางที่ 6 ผลการประเมินคุณภาพ In-house YE โดยพิจารณาการเจริญของยีสต์ ---- 35
ตารางที่ 7 ผลการประเมินคุณภาพ In-house YE โดยพิจารณาการเจริญของรา ---- 35
ตารางที่ 8 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของยีสต์" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test ตามแผนการทดลองแบบ CRD ---- 35
ตารางที่ 9 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test ตามแผนการทดลองแบบ CRD ---- 36
ตารางที่ 10 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ RCBD ---- 37
ตารางที่ 11 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของจุลินทรีย์" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ RCBD ---- 43
ตารางที่ 11 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของจุลินทรีย์" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ RCBD ---- 43

สารบัญตาราง (ภาคผนวก)

หน้า

ตารางที่ 1 ปริมาณ Lysine ในการคัดเลือกแหล่งวัตถุดิบ ---- 47
ตารางที่ 2 ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิ ---- 47
ตารางที่ 3 ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบผลของพีเอช ---- 48
ตารางที่ 4 ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบผลของแอลคาเลส ---- 48
ตารางที่ 5 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ ANOVA ตามแผนการทดลองแบบ CRD ---- 49
ตารางที่ 6 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test ตามแผนการทดลองแบบ CRD (*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048) ---- 50
ตารางที่ 7 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ CRD *(Escherichia coli* ATCC 25922) ---- 50
ตารางที่ 8 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ CRD *(Flavobacterium* sp.) ---- 51
ตารางที่ 9 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ CRD *(Proteus mirabilis* ATCC 7002) ---- 51
ตารางที่ 10 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ CRD *(Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ---- 52
ตารางที่ 11 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ CRD *(Salmonella typhimurium* ATCC 13311) ---- 52
ตารางที่ 12 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ CRD *(Shigella flexneri* ATCC 12022) ---- 53
ตารางที่ 13 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ CRD *(Staphylococcus aureus)* ---- 53

ตารางที่ 14 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ RCBD ---------- 54
ตารางที่ 15 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ RCBD ---------- 54
ตารางที่ 16 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของยีสต์" โดยใช้สถิติ ANOVA ตามแผนการทดลองแบบ CRD ---------- 55
ตารางที่ 17 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของยีสต์" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test ตามแผนการทดลองแบบ CRD *(Saccharomyces cerevisiae)* ---------- 55
ตารางที่ 18 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา" โดยใช้สถิติ ANOVA ตามแผนการทดลองแบบ CRD ---------- 56
ตารางที่ 19 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test ตามแผนการทดลองแบบ CRD *(Aspergillus niger)* ---------- 56
ตารางที่ 20 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test ตามแผนการทดลองแบบ CRD *(Penicillium* sp.) ---------- 57
ตารางที่ 21 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ RCBD ---------- 57
ตารางที่ 22 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ RCBD ---------- 58

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลำดับแนวขีดลากตามวิธี MEM บนผิวอาหารในจานเพาะเลี้ยง ---------- 22
ภาพที่ 2 ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบแหล่งวัตถุดิบ 4 ชนิด ---------- 24
ภาพที่ 3 ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบปัจจัยอุณหภูมิ ---------- 26
ภาพที่ 4 ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบปัจจัยพีเอช ---------- 27
ภาพที่ 5a ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบปัจจัยแอลคาเลส ---------- 28
ภาพที่ 5b ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบปัจจัยแอลคาเลส เมื่อมี BSA ---------- 29
ภาพที่ 6 ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบปัจจัยไดโดแซน ---------- 30

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

จุลินทรีย์เกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวันของมนุษย์ ทั้งให้ประโยชน์ และโทษ จุลินทรีย์พวกแบคทีเรีย ยีสต์ และราเป็นสาเหตุทำให้อาหารเสื่อมเสีย ทำให้ผู้คน พืช และสัตว์เกิดอาการป่วย จุลินทรีย์ยังใช้เพื่อการศึกษาในหลายแขนงวิชา รวมทั้งยังให้ประโยชน์ต่อการผลิตสินค้าอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น ใช้ผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ อาหารหมักดอง (นมเปรี้ยว, โยเกิรต์, ชีส, ซีอิ๊ว, เต้าเจี้ยว, น้ำปลา ฯ) วุ้นมะพร้าว เป็นต้น การเพาะเลี้ยงเพื่อตรวจหา, ตรวจนับ หรือเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์จึงเป็นกิจกรรมที่สำคัญ ดังเห็นได้ว่ามีห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาจำนวนมาก ทั่วประเทศทั้งในภาครัฐ และเอกชน เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ การสาธารณสุข การเกษตร การจัดการสิ่งแวดล้อม การศึกษาวิจัย และโดยเฉพาะทางอุตสาหกรรมอาหาร ที่ต้องตรวจสอบสินค้าอาหารส่งออก และนำเข้าทั้งในวัตถุดิบ และผลผลิต ความสำคัญในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จึงสำคัญต่อประเทศในหลายด้านซึ่งมีผลโดยตรงต่อประชาชน

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ต้องใช้ "อาหารเพาะเลี้ยง (culture media หรือ microbiological media)" ซึ่งส่วนเป็นสินค้านำเข้าที่ประเทศต้องเสียเงินจำนวนมากจากการสั่งซื้อ ส่งผลให้เป็นแรงปัจจัยลบประการหนึ่งต่อเศรษฐกิจของชาติ ยิ่งไปกว่านั้น แนวโน้มความต้องการอาหารเพาะเลี้ยง คือเพิ่มสูงขึ้นทุกปี

ประเทศไทยมีวัตถุดิบสำหรับการผลิตอาหารเพาะเลี้ยง ขาดแต่ความสนใจ และความรู้ในกระบวนการผลิต เราจึงควรเริ่มต้นก้าวแรกในการวิจัยเพื่อหาแนวทางที่ช่วยเศรษฐกิจของประเทศโดยเริ่มต้นที่องค์ประกอบที่มีแนวโน้มใช้มากทั่วไปก่อน องค์ประกอบอาหารหนึ่งในชนิดแรกที่เราควรสนใจคือ สารสกัดจากยีสต์ ที่นิยมเรียก "yeast extract (YE)" เพราะเป็นองค์ประกอบหลักของอาหารเพาะเลี้ยงมากมายหลายชนิดในกลุ่ม complex media ซึ่งการพัฒนาผลิต YE นี้ ให้ความเป็นไปได้สูงที่จะผลิตได้เองภายในประเทศ โดยมีคุณภาพใกล้เคียงกับสินค้านำเข้า และเกิดผลดีต่อเศรษฐกิจของประเทศ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งหาข้อมูลและแนวทางในการพัฒนาการผลิต YE ผง ที่พร้อมใช้งาน ที่ใช้วัตถุดิบในประเทศเท่านั้น ทั้งนี้แนวการเลือกกระบวนการผลิต ให้มีความเป็นไปได้ที่จะผลิตขึ้นจริงภายในประเทศ มีแนวโน้มต้นทุนการผลิตต่ำ มีคุณภาพใกล้เคียงกับที่นำเข้า เพื่อให้มีโอกาสสูงที่จะพัฒนาต่อไปจนสามารถผลิตอาหารเพาะเลี้ยงขึ้นใช้ในประเทศ และเพื่อการส่งออก โดยให้มีราคาถูกกว่า และคุ้มค่ากว่าใช้สินค้านำเข้า

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

หาแนวทางเพื่อหาข้อสรุปความเป็นไปได้ในการผลิต yeast extract ขึ้นในระดับอุตสาหกรรมจากวัตถุดิบภายในประเทศ ที่มีการทดสอบคุณภาพเพื่อเปรียบเทียบกับที่นำเข้าจากต่างประเทศ โดยมีการวิจัยเพื่อสรุปว่าการใช้ แอลคาเลส (alcalase) และ ไคโตแซน (chitosan) ส่งผลดีต่อการผลิตหรือไม่

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น

(1) ข้อมูลด้านเอกสารในเรื่องที่เกี่ยวกับการผลิต มีอยู่น้อย เพราะว่า นักวิจัยไม่สนใจ เพราะ (1) โอกาสได้ลงตีพิมพ์มีน้อยมาก ในวารสารทุกระดับทั่วโลก และ (2) เนื่องจากมักถูกเก็บเป็นความลับทางการค้า เพื่อลดโอกาสเสี่ยงในการแข่งขัน ข้อมูลเชิงวิชาการหลักที่ได้มาเป็นเอกสาร "สิทธิบัตร (patent)" ซึ่งจัดว่ามีความเชื่อถือได้สูง เพราะก่อนที่จะได้รับการประกาศเป็นผลงานสิทธิบัตร มีการตรวจสอบหลายขั้น และต้องผ่านความเห็นของนักวิชาการจำนวนหนึ่ง อีกทั้งเอกสารยังเปิดเผยต่อสาธารณะ การยื่นขอจด ต้องเสียค่าใช้จ่าย และต้องรับผิดชอบความสมบูรณ์ เที่ยงตรงของข้อมูลที่ให้ตลอดไป

(2) ไคโตแซนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ผลิตภายในประเทศ ที่อาจมีผลต่างไปจากไคโตแซนอื่น เหตุผลที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้เพื่อต้องการให้เกิดประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิตไคโตแซนของประเทศไทย หากมีการใช้จริง นอกจากนั้น ยังต้องการทราบว่าไคโตแซนที่ผลิตขึ้นในประเทศ ให้ผลอย่างไรต่อการผลิต YE ข้อมูลไคโตแซนคือ เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Eland Corporation Ltd., จ. นนทบุรี; ผลิตจาก fresh shrimp และ crab shell รายละเอียดอื่นดังในภาคผนวก

(3) เนื่องจากข้อจำกัดของเวลา และงบวิจัย ทำให้การดำเนินการขาดความสมบูรณ์ในจำนวนของจุลินทรีย์ที่ใช้ไปบ้าง กล่าวคือ ใช้ยีสต์ทดสอบเพียง 1 ชนิด และรา 2 ชนิด ส่วนแบคทีเรีย 8 ชนิด

1.5 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

ดำเนินการทดลองในห้องปฏิบัติการของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสำหรับการค้นคว้าข้อมูล ดำเนินการผ่านบริการของศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี การค้นคว้าหาข้อมูล และวางแนวทางการทดลองวิจัย โดย (1) คัดเลือกหาแหล่งวัตถุดิบที่ผลิตขึ้นในประเทศ โดยต้องมีปริมาณมาก และมีความสะดวกในการรวบรวม-ขนส่งเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบจริง โดยการผลิตจริง แล้วพิจารณาความเหมาะสมในด้าน ความขุ่น สี และที่สำคัญระดับคุณภาพของ YE ซึ่งพิจารณาจากระดับ lysine เพราะเป็นค่าที่เป็นดัชนีบอกระดับปริมาณโปรตีนที่ถูกสลายของเซลล์ ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนเป็นค่าสะท้อนคุณภาพของ YE (2) ทดลองเพื่อหาข้อสรุปเกี่ยวกับพีเอช และอุณหภูมิในช่วง autolysis ของเซลล์ยีสต์ เนื่องจากเป็นปัจจัยแวดล้อมที่รายงานต่างกันไปในผลงานวิจัยต่างกัน (3) ตรวจสอบปัจจัยเอนไซม์ "แอลคาเลส (alcalase)" ซึ่งเร่งการสลายโปรตีนในสภาพเป็นด่าง จึงอาจช่วยเร่ง autolysis ของยีสต์ในสภาพที่เกิดได้ดีในสภาพเป็นด่างด้วย จึงสร้างชุดทดลองเปรียบเทียบปัจจัยแอลคาเลสต่อ autolysis ในทำนองเดียวกันมีการ (4) ตรวจสอบปัจจัยไคโตแซน ซึ่งผลิตขึ้นในประเทศที่มีรายงานว่าช่วยในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และช่วยทำให้ autolysis เกิดดีขึ้น (5) ทดสอบคุณภาพของ YE ผงที่ผลิตขึ้นเองว่ามีคุณภาพใกล้เคียงกับที่เป็นสินค้านำเข้าจากต่างประเทศหรือไม่ โดยการวัดระดับการเจริญของจุลินทรีย์

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

นำไปสู่แนวทางการพัฒนาต่อยอดให้มีการผลิตอาหารเพาะเลี้ยงราคาต่ำ ซึ่งเป็นแนวทางใหม่ของประเทศ โดยเริ่มต้นที่การผลิต YE ขึ้นเองในประเทศในเชิงอุตสาหกรรม โดยได้ข้อมูลที่เป็นขั้นตอนของกระบวนการผลิต เพื่อเสริมศักยภาพของประเทศ การสร้างงาน ลดการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศ อันจะส่งผลบวกต่อเศรษฐกิจของชาติ โดยอาจนำไปสู่การผลิตเพื่อเป็นสินค้าส่งออกได้ และช่วยส่งเสริมให้ผู้ขายวัตถุดิบมีรายได้เพิ่มขึ้น

1.7 วรรณกรรมที่เป็นพื้นฐานการวิจัย

1.7.1. อาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

การศึกษาจุลินทรีย์ใดก็ตาม ต้องมีวิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นั้นได้ การเพาะเลี้ยงจำเป็นต้องใช้ "อาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (microbiological media)" ซึ่งมีทั้งอยู่ในรูปของแข็ง กึ่งแข็ง หรือของเหลว ขึ้นกับสัดส่วนของ "วุ้น (agar)" ในอาหาร โดยมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก และมีแร่ธาตุอาหารพร้อมตามที่จุลินทรีย์ต้องการ อาหารเพาะเลี้ยงมีสูตรส่วนผสมแตกต่างกันได้มาก ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง โดยตกแต่งสูตรอาหารให้มีองค์ประกอบต่างชนิดกันไป หรือมี

ปริมาณต่างกัน นอกจากนั้นอาจปรับให้มีพีเอช หรือมีสารที่มีผลเฉพาะอื่นใดลงในอาหารเพาะเลี้ยงก็ได้ จึงพอเปรียบให้เข้าใจง่ายขึ้นได้ว่า "อาหารเพาะเลี้ยง หรือ (culture media)" เปรียบเสมือนดินสำหรับเพาะปลูกพืช เพื่อให้พืชใช้ยึดเกาะ เพื่อเป็นแหล่งน้ำ และอาหาร โดยที่สามารถดกแต่งดิน (เช่น ปรับปริมาณน้ำ ส่วนผสมของแร่ธาตุอาหาร และสารอื่น พีเอช) ให้เหมาะเพื่อการปลูกพืชแต่ละชนิด

อาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในประเทศเป็นสินค้านำเข้า และมีมูลค่าสูง เพราะมีความต้องการใช้ในปริมาณมาก แนวโน้มความต้องการใช้ในประเทศ เพิ่มสูงขึ้นทุกปี

ข้อมูลขั้นตอน แนวทางการผลิตอาหารเพาะเลี้ยงมักเป็นที่ไม่เปิดเผย เพราะ (1) เป็นความลับทางการค้า ที่บริษัทไม่ต้องการเปิดเผย เพื่อเลี่ยงการแข่งขัน (2) ระดับความสำคัญของงานวิจัยเรื่องนี้มักอยู่ในระดับต่ำ ทำให้มีผู้สนใจด้านนี้ทั่วโลกน้อย เพราะไม่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

อาหารเพาะเลี้ยงที่เกี่ยวข้องในงานวิจัยนี้มีสองชนิด และหนึ่งองค์ประกอบคือ อาหาร PCA และ YM Agar ซึ่งมีองค์ประกอบหนึ่งที่เหมือนกันคือ yeast extract (YE) ที่เป็นจุดหลักของงานวิจัยนี้ โดย PCA และ YM Agar ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทดสอบ เพื่อบ่งชี้คุณภาพของ YE ที่ผลิตขึ้นเอง

1.7.2. Yeast Extract

สารสกัดยีสต์ (yeast extract) คือ สารผสมที่เตรียมจากองค์ประกอบของยีสต์ หลังการย่อยสลายของเซลล์ และผ่านขั้นตอนการเตรียมหลายขั้น โดยทั่วไปอยู่ในรูปผง Yeast extract มีคุณค่าทางโภชนาการ เพราะประกอบด้วยสารหลายชนิด จึงนิยมใช้เป็นองค์ประกอบอาหารเพาะเลี้ยง อาหารเสริม และสารปรุงแต่งรส โดยสารผสมนี้มีองค์ประกอบหลากหลายชนิดยากต่อการวิเคราะห์ว่า มีสารใดบ้าง และมีปริมาณเท่าไร ตัวอย่างองค์ประกอบ เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ โปรตีน กรดนิวคลีอิค น้ำตาล โพลีแซคคาไรด์ของน้ำตาล ไวตามิน โคแฟคเตอร์ เกลือแร่ เป็นต้น โดยมีปริมาณไขมันต่ำมาก เนื่องจากมีองค์ประกอบมากมาย จึงนิยมใช้ yeast extract เป็นส่วนผสมอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (culture media หรือ microbiological media) (Kelly, 1983; Difco, 1984; Nagodawithana, 1992).

Yeast Extract: Yeast autolysis

การย่อยสลายของเซลล์ยีสต์ ก่อนเตรียมเป็น yeast extract มีได้ 2 แนวทาง คือการใช้ 'กรด' และ 'เอนไซม์' แนวการใช้กรดมีข้อดีที่ให้อัตราผลผลิตสูงกว่า แต่ข้อเสียคือ ให้สารข้างเคียงที่มีพิษต่อสิ่งแวดล้อม และมีรสชาติที่ไม่ดี ส่วนแนวที่สอง ซึ่งใช้เอนไซม์หลายชนิดของเซลล์ยีสต์เองมีข้อดีหลายประการ เป็นกระบวนการธรรมชาติในการจัดการตัวเองที่เรียกว่า yeast autolysis ให้

สารผสม ที่เรียกว่า yeast autolysate ส่วนสารผสมที่ใช้กรดย่อย เรียกว่า yeast hydrolysate สารผสมทั้งสองนี้เองที่นำไปเตรียมต่อเป็น yeast extract

นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่ากระบวนการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 'yeast autolysis' เป็นธรรมชาติที่ช่วยให้ยีสต์ดำรงเผ่าพันธุ์ของตัวเองได้ คือเกิดเซลล์ใหม่ที่ได้รับอาหารจากเซลล์เก่าที่แตกสลาย จึงมีเซลล์ที่อยู่รอด เพื่อเพิ่มจำนวน เมื่อสภาพเหมาะสมมาถึง ปัจจัยที่ทำให้เกิด yeast autolysis เช่น เซลล์แก่, ขาดอาหาร, เกลือ, ด่าง, ตัวทำละลายอินทรีย์ (ethyl acetate, toluene), สารเคมีอื่น ซึ่งส่งผลให้ผนังเซลล์ หรือเยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย และนำไปสู่ขั้นตอนหลายอย่างต่อเนื่องที่ทำให้เซลล์สลายไปในที่สุด Yeast extract อาจมีชนิด และปริมาณองค์ประกอบ เช่น กรดอะมิโน ต่างกันได้ขึ้นกับขั้นตอนการชักนำให้เกิด autolysis และขั้นตอนอื่นที่มีการควบคุมปัจจัยแวดล้อม

โดยธรรมชาติ yeast autolysis เป็นกระบวนการที่ดำเนินไปอย่างค่อยเป็นค่อยไป อาจใช้เวลานานกว่า 3 วัน หลายกลวิธีจึงถูกพัฒนาขึ้นเพื่อร่นระยะเวลาให้สั้นลง โดยใช้ความร้อน ตัวทำละลาย เกลือ และสารอื่น

งานวิจัยนี้ใช้วิธีพื้นฐานสภาพที่เหนี่ยวนำให้เกิด autolysis ตาม Kanegae, Sugiyama and Minami (1989) ที่ใช้ความร้อนกระตุ้นการเกิด autolysis เพราะให้ผล 100% ของ autolysis ของเซลล์ยีสต์ทั้งหมด อีกทั้งเป็นวิธีที่ให้ผลผลิต YE ที่สะอาด ปลอดสารรบกวน

Yeast Extract: การผลิตเพื่อการค้า

Yeast extract เป็นผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ ที่หลายประเทศ ซึ่งเชื่อว่าล้วนแต่เป็นประเทศพัฒนาแล้ว ผลิตขึ้นเพื่อการค้า จนถึงระดับส่งเป็นสินค้าออก เพื่อนำเงินเข้าประเทศ จึงเป็นธรรมดาที่ข้อมูลขั้นตอน และวิธีการผลิตไม่ถูกเปิดเผยอย่างชัดเจน หนังสือ วารสาร หรือเอกสารทางวิชาการอื่นก็ไม่มีเรื่องโดยละเอียดของการผลิต yeast extract ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเป็นที่ทราบทั่วไปว่าไม่ให้ความก้าวหน้าทางวิชาการต่อผู้วิจัย อย่างไรก็ตาม ยุทธศาสตร์การสร้างระบบสิทธิบัตรเพื่อความก้าวหน้าของวิทยาการทำให้ ข้อมูลดังกล่าวมาอยู่ในระบบที่สามารถสืบค้นได้

จากการสืบค้นยัง United States Patent [http://www.uspto.gov] พบว่ามีสิทธิบัตรด้านนี้จำนวนหนึ่ง ที่กล่าวถึงการผลิต yeast extract ซึ่งมีวัตถุประสงค์ และใช้วิธีการแตกต่างกันไป โดยเฉพาะขั้นตอนในการกระตุ้นให้เกิด autolysis บางสิทธิบัตรมีวัตถุประสงค์ที่ต้องการ yeast extract เพื่อเป็นอาหารเสริม จึงมีขั้นตอนที่ลดปัญหาปริมาณกรดนิวคลีอิค และทำให้ได้กลิ่นรสที่ชวนรับประทาน บางสิทธิบัตรต้องการผลิต yeast extract เพื่อเป็นสารปรุงแต่งรส จึงใช้ขั้นตอนที่ทำให้ได้สาร 5'-IMP, 5'-GMP ปริมาณมาก นอกจากนั้น yeast extract ยังถูกผลิตขึ้นเพื่อใช้ในเครื่องสำอางอีกด้วย

Yeast Extract: อาหารเพาะเลี้ยง

เนื่องจากมีองค์ประกอบสำคัญทางโภชนาการ เช่น แหล่งโปรตีน และไวตามิน yeast extract จึงถูกใช้เป็น (1) อาหารเสริมสำหรับเด็ก และผู้ใหญ่ และการที่มีกลิ่น และรสชาติชวนลิ้มลอง (โดยผ่านขั้นตอนการเตรียมที่เฉพาะ) จึงถูกใช้เป็น (2) "สารปรุงแต่งรสอาหาร" ในหลายประเทศ แต่การใช้ประโยชน์ YE มากที่สุดในเชิงปริมาณคือ ใช้เป็น (3) "ส่วนผสมของอาหารเพาะเลี้ยง"

Yeast extract (YE) นิยมใช้เป็นองค์ประกอบอาหารเพาะเลี้ยงประเภท complex media เนื่องจากความสำคัญที่มีสารอาหารหลากหลาย ครอบคลุมความต้องการของจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะ แหล่งอะมิโนไนโตรเจน (amino-nitrogen) และวิตามิน อาหารเพาะเลี้ยงนี้จึงเหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้เซลล์ปริมาณมาก และเร็ว

ลักษณะที่ดีของ yeast extract เพื่อใช้เป็นองค์ประกอบอาหารเพาะเลี้ยง คือ (1) ละลายน้ำได้ดี (2) ไม่ให้ตะกอน หรือสีเข้มที่รบกวนการสำรวจการเจริญของเซลล์ (3) มีสารอาหารหลากหลายชนิด เพื่อตอบสนองความต้องการของจุลินทรีย์ และ (4) ไม่ดูดความชื้น (เมื่อดูดความชื้น yeast extract จะแข็งเป็นก้อน และมีน้ำหนักเพิ่มเกินจริง)

1.7.3. PCA

อาหารเพาะเลี้ยงที่นิยมใช้เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียคือ Plate Count Agar หรือที่นิยมเรียกย่อทั่วไปว่า PCA ชื่ออื่นของ PCA (สูตรอาหารเดียวกัน) เช่น Tryptic/Tryptone Glucose Yeast Agar, Casein Peptone Dextrose-Yeast Agar และ Standard Methods Agar PCA เป็นอาหารซึ่งแนะนำให้ใช้โดย Oxoid Ltd., FDA BAM, APHA, AOAC, ICMSF, ISO (FDA, 1995) สำหรับการนับจำนวน aerobic microorganism และ heterotrophic facultative anaerobe สูตรอาหารที่เป็นแบบฉบับของ PCA (Oxoid product code: CM0325) คือ tryptone, 5.0; yeast extract, 2.5; glucose, 1.0; agar, 9.0 ก./ลิตร (pH 7.0 ± 0.2) งานวิจัยนี้เลือกอาหาร PCA และสูตรอาหารตามแบบฉบับนี้ เพื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบ ในการบอกคุณภาพของ YE ที่ผลิตขึ้น

1.7.4. YM Agar

อาหารเพาะเลี้ยง YM Agar เป็นอาหารประเภท complex media ในทำนองเดียวกับ PCA แต่ YM Agar เหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ และรา ชื่ออื่นของ YM Agar (สูตรอาหารเดียวกัน) เช่น Yeast and Mold Agar, MY Agar, Malt Extract Yeast-Extract Agar, Malt-Yeast-Extract Agar, Universal Medium for Yeasts YM Agar เป็นอาหารเพาะเลี้ยงที่รู้จักทั่วไป และเป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งของบริษัทผู้ผลิตอาหารเพาะเลี้ยง Oxoid Ltd. ซึ่งแนะนำว่าอาหารเพาะเลี้ยง Yeast and Mould Agar (Oxoid product code: CM0920) หรือ YM Agar เหมาะสำหรับแยก และเก็บรักษาจุลินทรีย์กลุ่ม ยีสต์

และรา โดยมีสูตรอาหารคือ สูตรอาหาร (ก./ลิตร) คือ yeast extract, 3.0; malt extract, 3.0; peptone, 5.0; glucose/dextrose, 10.0; agar, 20.0 (pH 6.2 ± 0.2) งานวิจัยนี้เลือกอาหาร YM Agar และสูตรอาหารตามแบบฉบับนี้ เพื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบ ในการบอกคุณภาพของ YE ที่ผลิตขึ้น

1.7.5. ไคโตแซน

ไคโตแซนจัดเป็นคาร์โบไฮเดรท โดยมีโครงสร้างคล้ายเซลลูโลส แหล่งที่มีไคโตแซนตามธรรมชาติ คือ เปลือกของสัตว์กลุ่ม crustacean เช่น ปู, กุ้ง, กุ้งฝอย, แมลง, ฟังไจ เป็นต้น แต่แหล่งที่นิยมเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไคโตแซนคือ เปลือกกุ้ง และปู ประโยชน์ของไคโตแซน เช่น ยึดจับสารในโรงบำบัดน้ำเสีย, ส่วนผสมในเจลจัดทรงผม, ห้ามเลือด, สมานแผล, และใช้ประโยชน์หลายอย่างที่เกี่ยวกับอุตสาหกรรมอาหาร (เช่น edible film, thickener, emulsion stabilizer เป็นต้น) (Origane *et al.*, 1993) ไคโตแซนมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Barrette, Champagne, and Goulet, (1999); Chen *et al.* (2002); CHUNG *et al.* 2004; Loosdrecht *et al.* (1987); Nam (2001) นอกจากนั้น ไคโตแซนมีประโยชน์ในการเร่งการเกิด yeast autolysis.

วิธีการผลิต yeast extract (YE) แนวหนึ่งที่เร่งให้ yeast autolysate เกิดขึ้นเร็วขึ้นคือ การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (เช่น ethyl acetate, toluene) ซึ่งระดับความเข้มข้นที่ใช้ไม่เป็นตามธรรมชาติ และเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตาม Origane *et al.* (1993) รายงานว่า "ไคโตแซน (chitosan)" มีผลเร่งการเกิด autolysis และไม่ก่อปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม โดยกล่าวว่าการใช้ไคโตแซนที่ความเข้มข้น 0.01-3% ไคโตแซน/เซลล์ยีสต์มีชีวิต (w/w) และปล่อยให้เกิด autolysis ที่พีเอช 2.5-7.5, 30-54^{0}ซ. เป็นเวลา 10 ถึง 20 ชม.

งานวิจัยนี้ได้วางแผนเพื่อทดสอบสมมุติฐานเกี่ยวกับไคโตแซน ที่ผลิตขึ้นในประเทศไทยว่าให้ผลอย่างไรในการผลิต YE เนื่องจากอาจมีสารปนเปื้อนที่มีผลสำคัญได้ ไคโตแซนนี้เป็นผลิตภัณฑ์ของ Eland Corporation Ltd. ซึ่งผลิตจาก fresh shrimp และ crab shell รายละเอียดอื่นดังในภาคผนวก

1.7.6. แอลคาเลส

"แอลคาเลส (alcalase หรือ alkalase)" เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม protease ที่ย่อยสลายโปรตีน ข้อมูลพื้นฐานของแอลคาเลส หรือ alkaline peptidase อยู่ในวงศ์ serine endopeptidases จากความจริงที่ yeast autolysis เป็นกระบวนการที่อาศัยเอนไซม์ protease เป็นกลุ่มหลักที่สำคัญ ประกอบกับช่วงพีเอชที่เลือกใช้เป็นด่าง จึงเป็นเหตุผลที่วางแผนทดสอบปัจจัยเอนไซม์ 'แอลคาเลส' ต่อคุณภาพ YE ที่ผลิตขึ้นในงานวิจัยนี้ โดยที่ขณะนี้ยังไม่สามารถสืบค้นพบงานวิจัยใดที่มีการใช้แอลคาเลสในรูปแบบนี้ โดยหวังว่าจะให้ผลดีต่อคุณภาพ YE ที่ผลิตขึ้น แอลคาเลสที่ใช้ได้รับความอนุเคราะห์จาก

บริษัท The East Asiatic โดยสินค้าชื่อ ALCALASE 2.4L FG คุณภาพระดับ food-grade ซึ่งบริษัทผู้ผลิตคือ Novozymes และมีอุณหภูมิ และพีเอชที่เหมาะสมคือ 55-60°ซ. และ pH: 8.0-9.5

1.8 คำสำคัญ

yeast extract, culture media, Thailand, production, alcalase, chitosan, economy, low cost

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 สมมุติฐานการวิจัย

2.1.1. "การคัดเลือกวัตถุดิบสำหรับการผลิต YE" แหล่งวัตถุดิบที่ดีที่สุดน่าจะเป็น F material เพราะนอกจากเป็นยีสต์สด ยังมียีสต์ปริมาณมากกว่า และขายในราคาถูก แหล่งยีสต์อันดับรองลงมาคือ S, Sd และ D material ทั้งหมดมีความแตกต่างที่ความสดของยีสต์ ปริมาณน้ำ และองค์ประกอบ การเลือกแหล่งวัตถุดิบทั้ง 4 ชนิดขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของ YE ที่ผลิตได้ ซึ่งควรมีลักษณะที่ ละลายน้ำได้สมบูรณ์ ไม่มีตะกอน และเกิด autolysis ของเซลล์ยีสต์เพื่อให้องค์ประกอบของเซลล์มาเป็นองค์ประกอบของ YE โดยขึ้นอยู่กับเงื่อนไขความเป็นไปได้ในการใช้เป็น YE เพื่อการผลิตอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

2.1.2. "อุณหภูมิช่วง 30-60^{0}ซ. น่าจะมีผลต่อ YE" อุณหภูมิอื่นนอกเหนือจากที่ใช้ในสมมุติฐานการวิจัย 2.1.1 น่าจะส่งผลดีต่อการเกิด autolysis ที่อาจทำให้ autolysis เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าได้ อย่างไรก็ตาม กรณีที่ส่งผลลบ ก็นับว่าเป็นข้อมูลที่ควรทราบไว้ เพื่อการระมัดระวัง และการจัดการที่เหมาะสมในการผลิต YE ต่อไป

2.1.3. "พีเอช 5.5, 7.0 และ 8.5 น่าจะมีผลต่อ YE" สมมุติฐานการวิจัยคือ อุณหภูมิที่ 8.5 น่าจะเหมาะสมกว่าที่ 5.5 และ 7.0

2.1.4. "แอลคาเลสน่าจะมีผลดีต่อการผลิต YE" แอลคาเลส เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม protease ที่ย่อยโปรตีนได้ดีที่พีเอชเป็นด่าง Protease นี้เองเป็นเอนไซม์ที่ยีสต์ใช้ในการเกิด autolysis ซึ่งเป็นกระบวนการที่ต้องการให้เกิดขึ้นในการศึกษานี้ ดังนั้นสมมุติฐานคือ การใช้ แอลคาเลสน่าจะช่วยให้ yeast autolysis เกิดดีขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพการเกิด YE สูงขึ้น โดยเกิดกรดอะมิโน อันเป็นสารอาหารกลุ่มหลัก และเป็นดัชนีชี้คุณค่าทางโภชนาการของ YE

2.1.5. "ไคโตแซนน่าจะมีผลดีต่อการผลิต YE" สมมุติฐานการวิจัยคือ chitosan (ที่ทดลองผลิตขึ้นในประเทศ ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. สุวลี จันทร์กระจ่าง, Asian Institute of Technology) น่าจะมีผลดีต่อการผลิต YE เพราะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนที่แย่งอาหาร และสร้างสารรบกวนการเกิด autolysis ของยีสต์ ผลรวมของการใช้ ไคโตแซนจึงน่าจะทำให้ได้ YE มีคุณสมบัติที่ดีตามวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้

2.1.6. "การประเมินคุณภาพ In-house YE" สมมุติฐานการวิจัยคือ เชื่อว่า in-house YE มีคุณภาพใกล้เคียงกับ imported YE (YE ที่นำเข้าจากต่างประเทศ)

2.2 แนวคิดการทดสอบสมมุติฐาน

2.2.1. "การคัดเลือกวัตถุดิบสำหรับการผลิต YE" ดำเนินการจัดสภาพให้เซลล์ยีสต์ของแหล่งวัตถุดิบทั้ง 4 ชนิด เกิด autolysis จากนั้นเปรียบเทียบว่าแหล่งยีสต์ใดเกิด autolysis มากกว่า การพิจารณานี้ดูปริมาณกรดอะมิโนเป็นหลัก เพราะ YE ที่ใช้เป็นส่วนประกอบอาหารเพาะเลี้ยงนั้นใช้เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นหลัก (แหล่งไนโตรเจนนี้เป็นได้ทั้งกรดอะมิโน, กรดนิวคลีอิค, เบสพิวรีน, เบสไพริมิดีน, และอนุพันธุ์ของสารเหล่านี้) ระดับการเกิด autolysis นี้สามารถพิจารณาเฉพาะกรดอะมิโน lysine เพียงชนิดเดียว เพราะสามารถใช้เป็นตัวแทนการเกิดการย่อยสลายโปรตีนโดยรวมได้ (Adler-Nissen, 1979) ดังนั้นหากเริ่มต้นที่วัตถุดิบที่มีเซลล์น้ำหนักแห้งเท่ากัน ก็สามารถใช้ปริมาณ lysine บ่งบอกความสมบูรณ์ของการย่อยโปรตีน ซึ่งสะท้อนการเกิด yeast autolysis ได้ ดังนั้นหากจัดสภาพให้เป็นเช่นเดียวกัน ต่างตรงที่แหล่งวัตถุดิบ (แหล่งยีสต์) ก็สามารถเปรียบเทียบได้ว่าแหล่งยีสต์ใดที่ให้กรดอะมิโนสูงสุดน่าจะเป็นแหล่งยีสต์ที่คุ้มค่าที่สุด สำหรับการจัดสภาพให้เกิด autolysis นั้น ปฏิบัติตาม Kanegae, Sugiyama and Minami (1989) ซึ่งเป็นเอกสารสิทธิบัตรที่บรรยายวิธีการผลิตYE

นอกจากพิจารณาปริมาณ lysine แล้ว ควรต้องพิจารณาสมบัติในการละลาย และความใส (หรือการมีตะกอน) ของผง YE หลังการละลายด้วย เพราะว่าหากมีตะกอนอยู่และไม่สามารถแยกออกได้โดยง่าย ก็จะได้ YE ที่ไม่เหมาะสมในการใช้งานจริง

2.2.2. "อุณหภูมิช่วง 30-60^{0}ซ. น่าจะมีผลต่อ YE" แนวคิดการทดสอบสมมุติฐานคือ สร้างชุดควบคุมที่เหมือนกับการดำเนินการผลิต YE ในทำนองเดียวกับที่ปฏิบัติใน "การคัดเลือกวัตถุดิบสำหรับการผลิต YE" แต่จัดให้มีชุดทดลองที่สภาพการเกิด autolysis เกิดที่อุณหภูมิต่างกัน 5 ระดับคือ 30, 40, 45, 50 และ 60^{0}ซ. โดยใช้ยีสต์จากแหล่งวัตถุดิบที่คัดเลือกแล้วว่าเหมาะสมกว่าแหล่งวัตถุดิบอื่น วัดปริมาณ lysine ที่เกิดขึ้นในช่วง autolysis เพื่อเป็นดัชนีชี้วัดการผลิต YE ที่ดี

2.2.3. "พีเอช 5.5, 7.0 และ 8.5 น่าจะมีผลต่อ YE" แนวคิดการทดสอบสมมุติฐานคือ จัดให้มีชุดควบคุมที่ดำเนินการผลิต YE ในทำนองเดียวกับที่ปฏิบัติใน "การคัดเลือกวัตถุดิบสำหรับการผลิต YE" และจัดชุดทดลองที่ต่างกันเฉพาะพีเอช คือที่ 5.5, 7.0 และ 8.0 โดยใช้แหล่งวัตถุดิบที่คัดเลือกแล้วว่าเหมาะสมกว่าแหล่งวัตถุดิบอื่น และวัดปริมาณ lysine ที่เกิดขึ้นในช่วง autolysis เพื่อเป็นดัชนีในการเลือกพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต YE

2.2.4. "แอลคาเลสน่าจะมีผลดีต่อการผลิต YE" แอลคาเลสเป็น protease ที่สลายโปรตีนในสภาพเป็นด่าง แนวคิดการทดสอบสมมุติฐานคือ สร้างชุดควบคุมที่ปล่อยให้มี autolysis ตามที่ทดสอบแล้วว่าได้ผล (Autolysis ใช้เอนไซม์ของยีสต์) เปรียบเทียบกับชุดทดลองที่เพิ่มแอลคาเลส (Autolysis ใช้เอนไซม์ทั้งของยีสต์ และ แอลคาเลส) ทั้งนี้ใช้วัตถุดิบและสภาพการบ่มที่พิจารณาแล้วว่าเหมาะสม โดยเลือกใช้พีเอชที่ 8.5 ตามที่ทราบแล้วว่าเหมาะสมต่อการเกิด yeast autolysis และเป็นพีเอชช่วงที่เหมาะสมของ basic alcalase ที่ได้คัดเลือกมา นอกจากนั้น ได้เตรียมทดลองกับวัตถุดิบอื่นควบคู่ไปด้วย เพื่อการสำรวจที่อาจให้ข้อมูลที่น่าสนใจ เช่น แหล่งวัตถุดิบที่ให้ผลการผลิต YE ไม่ดีในการทดสอบก่อนหน้านี้นั้น อาจเนื่องจาก protease สำหรับ autolysis ทำงานไม่ดี ดังนั้นการมีแอลคาเลสอาจช่วยให้มีการผลิต lysine สูงขึ้น สำหรับดัชนีชี้วัดการผลิต YE คือ อัตราการผลิต lysine ในทำนองเดียวกับการทดลองอื่น หากมีอัตราการผลิต lysine สูงขึ้น ยิ่งแสดงว่าให้ผลดีต่อการผลิต YE

ควรมีการตรวจสอบยืนยันก่อนว่าแอลคาเลสทำงานได้จริง และเพื่อเลือกปริมาณเอนไซม์นี้ไม่น้อย หรือมากเกินไป การตรวจสอบยืนยันนั้นดำเนินการทดลองในสภาพเป็นด่าง และใช้โปรตีนมาตรฐานคือ BSA (bovine serum albumin) สำหรับปริมาณแอลคาเลสที่เลือกใช้ในการทดสอบนี้ให้พิจารณาอัตราการผลิต lysine ในการย่อยสลาย BSA ในสภาพที่เป็นด่างถึง 24 ชม. กับอัตราการผลิต lysine จากแหล่งวัตถุดิบ F, S และ D material

เพื่อเป็นการบ่งชี้ผลปัจจัยแอลคาเลสในอีกแนวทางหนึ่ง จึงได้มีการเพิ่มแหล่งโปรตีนซึ่งคือ bovine serum albumin (BSA) ให้กับ reaction mixture ที่จัดขึ้นเป็นการเฉพาะ โดยใช้สภาวะที่คัดเลือกได้ก่อนหน้านี้ว่าเหมาะสม ในทำนองเดียวกับการทดสอบอื่น หากให้ผล lysine ที่สูงขึ้น แสดงว่าการเพิ่ม BSA ส่งผลดีต่อการผลิต YE แต่เรื่องของความคุ้มทุน เป็นเรื่องที่ควรพิจารณาต่อไป

2.2.5. "ไคโตแซนน่าจะมีผลดีต่อการผลิต YE" แนวคิดการทดสอบสมมุติฐานคือ สร้างชุดทดสอบควบคุมที่มีสภาพการผลิตที่ให้ YE ที่ดีที่สุด เปรียบเทียบกับชุดทดลองที่เหมือนกันนี้ แต่เพิ่มไคโตแซน (ผลิตขึ้นในประเทศไทย) เพื่อสามารถสรุปผลว่า ไคโตแซนช่วยในการผลิต lysine ให้สูงขึ้น ดัชนีชี้วัดการผลิต YE คือ อัตราการผลิต lysine ใช้วิธีการขั้นตอนทั้งหลายตามวิธีที่ปฏิบัติก่อนหน้านี้ และใช้สภาพการทดลองที่คัดเลือกแล้วว่าเหมาะสม เป็นชุดควบคุม โดยมีการรายงานค่า total bacterial count ทั้งก่อน และหลังใส่ไคโตแซน ใช้ความเข้มข้นของไคโตแซนที่ 0.2% (น้ำหนักไคโตแซนต่อน้ำหนักของเซลล์ยีสต์)

2.2.6. "การประเมินคุณภาพ In-house YE" แนวคิดคือ วิเคราะห์คุณภาพ YE ทั้งสอง โดยทางเคมี ด้วยการวัดค่า lysine และทางจุลชีววิทยา ด้วยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สามกลุ่มคือ แบคทีเรีย. ยีสต์ และรา โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยง (PCA สำหรับแบคทีเรีย และ MY สำหรับยีสต์ และรา) ที่มี in-house YE เป็นองค์ประกอบ เปรียบเทียบกับอาหารที่ใช้ imported YE ผลการประเมินคุณภาพพิจารณาจากระดับการเจริญของจุลินทรีย์ และปริมาณ lysine

ชุดทดลอง in-house YE มีด้วยกัน 3 ชุดคือ Chi-YE (มีการเติมไคโตแซน), Al-YE (มีการเติมแอลคาเลส) และ NoAdd-YE (ไม่มีการเติมสารอื่นเพิ่มในช่วง autolysis) เปรียบเทียบกับอาหาร PCA/YM Agar ที่ใช้ imported YE และมีชุดควบคุมที่เป็น PCA/YM Agar ที่ไม่ใส่ yeast extract ขั้นแรกคือ <u>การเตรียม YE</u> โดยปฏิบัติตาม 2.4.1.1 ถึง 2.4.1.6 และโดยใช้ข้อมูลที่ทราบแล้วว่าให้ผลดี (ใช้วัตถุดิบเป็น F material, อุณหภูมิ และพีเอชที่เหมาะสมสำหรับขั้น autolysis คือ 45^{0}ซ. และ 5.5 สำหรับชุดทดลอง Chi-YE และ NoAdd-YE ส่วน Al-YE ใช้พีเอชเป็น 8.5 เพราะแอลคาเลสแสดงผลในสภาพเป็นด่าง) ผลที่ได้คือผง in-house YE 3 ชนิด คือ NoAdd-YE, Chi-YE, และ Al-YE ขั้นที่สองคือ การวัดคุณภาพผง in-house YE โดยพิจารณาจากการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่มีความแตกต่างกันของ YE ถ้าระดับการเจริญใกล้เคียงกันระหว่างที่เจริญบนอาหารที่มี in-house YE และ ที่มี imported YE แสดงว่าสมมุติฐานเป็นจริง

2.3 วรรณกรรมที่เป็นพื้นฐานในการออกแบบการทดลอง

2.3.1. "การคัดเลือกวัตถุดิบสำหรับการผลิต YE" ดำเนินการทำให้เซลล์ยีสต์จากแต่ละแหล่งเกิด autolysis ด้วยเซลล์ยีสต์เองตามธรรมชาติ โดยเลือกปฏิบัติตามแนวของ Kanegae, Sugiyama, and Minami (1989) ซึ่งสำหรับการเกิด autolysis ของยีสต์ โดยเฉพาะจีนัส *Saccharomyces* เริ่มต้นเตรียมเซลล์ให้มีสารแขวนลอยเซลล์ที่ 15-20% (w/v), ทำให้ผนังเซลล์แตกโดยใช้ความร้อน 60-65^{0}ซ. (หรืออย่างน้อยอยู่ในช่วง 55 ถึง 70^{0}ซ.) เป็นเวลา 5-20 วินาที และเกิด autolysis ตามธรรมชาติโดยเอนไซม์ของยีสต์เอง ระดับความร้อนนี้มีผลสำคัญต่อการเกิด autolysis การใช้ความร้อนที่ระดับต่ำกว่า 60^{0}ซ. หรือสั้นกว่า 5 วินาที ทำให้เกิด autolysis ไม่สมบูรณ์ โดยได้ประสิทธิภาพของการผลิต YE ต่ำ และหากให้ความร้อนนานกว่า 70^{0}ซ. หรือนานกว่า 30 วินาที ทำให้เอนไซม์ protease ที่เกี่ยวข้องเสื่อม ส่งผลให้ autolysis เกิดไม่ดี

Kanegae, Sugiyama, and Minami (1989) ยังให้ข้อมูลว่าพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิด autolysis ที่ดีคือ 8.5-9.5 และ 40-45^{0}ซ. (Autolysis เกิดได้ที่พีเอช

8.0-10.0 และ 35-50^{0}ซ.) เป็นเวลา 4-10 ชม. ซึ่งเป็นช่วงที่เอนไซม์เพื่อการ autolysis เกิดได้ดีที่สุด จึงได้จัดสภาพการเกิด autolysis ที่พีเอช 8.5, 45^{0}ซ., เวลาประมาณ 4-10 ชม.

ตามวิธีปฏิบัตินี้จะได้สารแขวนลอยที่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ องค์ประกอบนี้มีทั้งสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ โดยไม่มีลิพิด หรือมีน้อยมาก สารอินทรีย์ส่วนใหญ่เป็น กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิค วิตามิน น้ำตาล และอนุพันธ์ของสารอินทรีย์หลายชนิด

การวัดระดับ yeast autolysis พิจารณาจากปริมาณ lysine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นเมื่อโปรตีน หรือเพปไทด์เกิดการย่อยสลายโดย protease ซึ่งมีอยู่ในเซลล์ยีสต์และทำงานโดยเฉพาะเมื่อเกิด autolysis การวัดปริมาณ lysine ดำเนินการตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) ซึ่งยังมีการใช้ในปัจจุบัน รายละเอียดปรากฏในภาคผนวก

2.3.2. "ปัจจัยอุณหภูมิช่วง 30-60^{0}ซ. ต่อการผลิต YE" จากการที่ Kanegae, Sugiyama, and Minami (1989) ระบุว่าอุณหภูมิช่วงที่เหมาะสมในการเกิด autolysis 35-50^{0}ซ. โดยได้ผลดีมากกว่าในช่วง 40-45^{0}ซ. นั้น อาจต่างไปจากสภาพการศึกษานี้ เพราะยีสต์ที่ได้มามิได้เริ่มต้นด้วยการเพาะเลี้ยงเหมือนกับของ Kanegae, Sugiyama, and Minami (1989) จึงสมควรทดสอบปัจจัยอุณหภูมิของอุณหภูมิที่มีต่อ autolysis เพื่อเก็บไว้เป็นข้อมูลในการดูแลจัดการการผลิต YE เชิงอุตสาหกรรมต่อไป

2.3.3. "ปัจจัยพีเอช 5.5, 7.0 และ 8.5 ต่อการผลิต YE" หลังจากได้รับความร้อนในรูปแบบที่กระตุ้นให้เกิด autolysis แล้ว ยีสต์เกิด autolysis ได้ดีที่พีเอช 8 ถึง 10 โดยให้ผลดีที่ 8.5 ถึง 9.5 ตามที่สำรวจไว้โดย Kanegae, Sugiyama, and Minami (1989) ทั้งนี้พีเอชอาจปรับที่ช่วงดังกล่าวก่อนการรับความร้อนก็ได้ แต่เพื่อให้ได้ผลดีกว่าแล้วควรปรับพีเอชหลังได้รับความร้อน โดยด่างที่ใช้ปรับเป็นได้หลายอย่าง แต่ที่เหมาะสมควรเป็น NaOH หรือ KOH ที่นิยมใช้ทั่วไป เนื่องจากสามารถรับประทานได้ด้วย

2.3.4. "ปัจจัยแอลคาเลสต่อการผลิต YE" การออกแบบการทดลองนี้ไม่ได้อยู่บนพื้นฐานของวรรณกรรมใด เพราะจากการสืบหาข้อมูลพบว่า ไม่มีวารสารใดมีการทดสอบการใช้แอลคาเลสเพื่อเร่งการเกิด yeast autolysis สำหรับเหตุผลที่ทดสอบปัจจัยแอลคาเลสคือ เพื่อมุ่งหวังว่าจะเป็นผลดีต่อการเกิด YE ข้อมูลพื้นฐานของแอลคาเลส หรือ alkaline peptidase อยู่ในวงศ์ serine endopeptidases ที่เป็นเอนไซม์กลุ่มสำคัญของยีสต์ที่ใช้ในการเกิด yeast autolysis โดยมีลักษณะ/สมบัติคือ ทำงานเร่งการย่อยสลายโปรตีนดีที่สุดที่พีเอช 8.5-9.5 ที่ 55-65^{0}ซ. และมีการทำงานสมบูรณ์เพียง 1 ปีหากเก็บรักษาที่ต่ำกว่า -20^{0}ซ. อย่างคงที่ (หมายเหตุ: อุณหภูมิเหมาะสมของเอนไซม์นี้สูงกว่าที่ได้ทำการทดลองจริง)

2.3.5. "ปัจจัยไคโตแซนต่อการผลิต YE" ปัญหาอันเนื่องจากแบคทีเรียปนเปื้อนในวัตถุดิบที่น่าจะรบกวนการผลิต YE ในระดับอุตสาหกรรมเป็นสิ่งที่ควรคำนึงถึง ไคโตแซนสามารถลดปัญหานี้ได้จึงควรทดสอบดูว่าไคโตแซนที่ผลิตขึ้นในประเทศให้ผลสอดคล้องหรือไม่ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการต่อยอดงานวิจัย หรือมีผลรบกวนใดหรือไม่ ต่อการผลิต YE จากสภาพที่คัดเลือกได้

ผลงานวิจัยที่ชี้ว่าไคโตแซนมีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียทั่วไปคือ Barrette, Champagne, and Goulet (1999), Sudarshan, Hoover, and Knorr (1992), และ No, Park, Lee, and Meyers (2002) แต่ทั้งนี้ยังมิได้มีงานที่บ่งชี้เป็นเบื้องต้นว่าไคโตแซนที่ผลิตขึ้นในประเทศมีสารรบกวน หรือสิ่งใดที่มีผลต่อ autolysis ของยีสต์ในสภาพที่คัดเลือกได้ จึงควรได้มีการวิจัยตรวจสอบไว้เป็นเบื้องต้น

2.3.6. "การประเมินคุณภาพ In-house YE" แนวทางการเตรียม YE ตาม Kanegae, Sugiyama, and Minami (1989) การเปรียบเทียบคุณภาพของ in-house YE ใช้วิธีวัดการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารที่มี YE เป็นส่วนผสม แม้ว่าการวัดการเจริญมีหลายวิธีการที่ยอมรับทั่วไป เช่น การพิจารณา growth kinetic โดยการวัดความขุ่น (optical density) ในอาหารเหลว อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ใช้เวลามาก โดยยิ่งมีจุลินทรีย์ทดสอบมาก ยิ่งใช้เวลานานและเวลาที่ต่างกันไปเพียงเล็กน้อยในช่วงเก็บและวัดตัวอย่างที่มีจุลินทรีย์ทดสอบมาก อาจนำไปสู่ความคลาดเคลื่อนของผลได้ง่าย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเลือกเทคนิคการวัดแบบ semi-quantitative ที่เรียกว่า MEM (modified ecometric method) ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่าย ที่พัฒนาขึ้นเพื่อประเมินคุณภาพของอาหารแบบ selective media วิธีการนี้ใช้หลักการที่มี standardization ของกล้าเชื้อลงบนอาหารแข็ง โดยการขีดลากด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ เป็นช่วงต่อเนื่อง โดยไม่มีการแตะเชื้อเพิ่ม เพื่อให้ได้ช่วงที่มีจำนวนโคโลนีน้อยลงเป็นลำดับ ดังนั้น จึงเกิดแนวที่มีจำนวนโคโลนีลดลงกว่าแนวเริ่มต้นอย่างชัดเจน จึงสามารถแปรผลเป็นค่าตัวเลขสำหรับการขีดลากแต่ละแนวได้ ทำให้สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างระดับการเจริญของจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์ได้

Ecometric method ถูกพัฒนาขึ้นโดย Mossel *et al.* ในปี 1980 และ 1983 ส่วน MEM (modified ecometric method) โดย Kociubinski, Pérez, and De Antoni ในปี 1999 เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับในปัจจุบัน เพื่อประเมินประสิทธิภาพของอาหาร หรือเพื่อเปรียบเทียบอาหารชนิดใหม่ (ที่อาจมีองค์ประกอบเปลี่ยนแปลงไป) จากอาหารที่ได้รับการยอมรับโดยทั่วไป ซึ่งใช้ในชุดควบคุม งานวิจัยที่ใช้ MEM เช่น Komacki *et al.* (2003); Byrne *et al.* (2001); Corry, and Atabay (1997); Johnson, and Murano (1999); Presser,

Ross, and Ratkowsky (1998) และบริษัท Lab M แนะนำให้ใช้วิธีนี้ (http://www.lab-m.com/TroubleshootingGuide.htm, 28 Jul 2004)

2.4 การออกแบบวิจัย และวิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

แหล่งวัตถุดิบที่เลือกมาทดสอบมีด้วยกัน 4 ชนิด โดยมีรายละเอียดดังนี้

A) "F material" หมายถึง fresh baker's yeast material เป็นยีสต์สดที่ใช้สำหรับการผลิตขนมปัง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by-product) ที่บริษัท ไทยเมจิฟาร์มาซิวติคัล จำกัด F material เป็นผลพลอยได้ และเป็นยีสต์มีชีวิต และมีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 85%

B) "S material" หมายถึง slurry-yeast material เป็นยีสต์สด ที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตเบียร์ของบริษัทแห่งหนึ่ง (บริษัทยังไม่ประสงค์เอ่ยนาม) ที่ผลิตขึ้นเพื่อเตรียมเป็น Sd material มีองค์ประกอบที่เป็นตะกอน และมีสีน้ำตาลเข้ม มีเซลล์ 30% (โรงงานสามารถเลือกปรับระดับความเข้มข้นได้) มีน้ำประมาณ 69%

C) "Sd material" หมายถึง semi-dry-yeast material คือ slurry yeast ที่ไล่น้ำออก และเติมส่วนผสมบางอย่างได้เป็นยีสต์แบบกึ่งแห้ง ของบริษัทแห่งหนึ่ง (บริษัทยังไม่ประสงค์เอ่ยนาม) ซึ่ง มีสารเจือปนสูง มีเซลล์ 95% องค์ประกอบหลักที่เหลือมีสีน้ำตาล เป็นเซลลูโลสประมาณ 5%

D) "D material" หมายถึง dry baker's yeast material เป็นยีสต์แห้งแบบ instant บรรจุซองสุญญากาศ เป็นผลิตภัณฑ์นำเข้าสำหรับผลิตขนมปัง มีขายในตลาดทั่วไป โดยมีชื่อการค้าว่า Fermipan ขนาด 500 ก./ซอง มีเซลล์ 98%

2.4.1. การออกแบบวิธีการ "การคัดเลือกวัตถุดิบสำหรับการผลิต YE"

ขั้นตอนต่อไปนี้ปฏิบัติกับแหล่งวัตถุดิบทั้ง 4 ชนิด เพื่อผลิต YE แหล่งวัตถุดิบที่ควรเลือก ให้พิจารณาจากสมบัติและปริมาณของ YE ที่ผลิตได้ โดยวัตถุดิบที่ให้ lysine สูงสุด และคุณค่าของ YE ที่ได้ไม่มีตะกอน มีสีจาง ถือว่าเหมาะสมที่สุด เพราะลักษณะดังกล่าวเป็นพื้นฐานทั่วไปขององค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง และโดยเฉพาะต่อ YE ขั้นตอนดัดแปลงจาก Kanegae, Sugiyama, and Minami (1989)

2.4.1.1. "การเตรียมเซลล์: 20% เซลล์ (w/v) ที่ระยะ log phase ใน 0.85% NaCl" แนวดำเนินการคือ เติมอาหารเหลว และบ่ม เพื่อให้เซลล์อยู่ในระยะ log phase จากนั้นปั่นเหวี่ยง (ที่ 800 รอบ/นาที, นาน 1 นาที), ล้างเซลล์ และเตรียมให้ได้เซลล์ความเข้มข้น 20% เริ่มโดยการเตรียมเซลล์ของแต่ละวัตถุดิบให้อยู่ในระยะ log phase โดยการเติม molasses ที่สัดส่วน 200:1 (v/v) ลงในวัตถุดิบ

500 มล. และบ่มเซลล์ที่ 28^{0}ซ. โดยการเขย่าที่ 100 รอบ/นาที นาน 15 ชม. จากนั้นปล่อยให้เซลล์ตกตะกอนเอง เทส่วนใสทิ้ง ปั่นเหวี่ยง และล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ท้ายสุดเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ให้ได้ 20% (w/v) 500 มล.

2.4.1.2. "การกระตุ้น Autolysis ด้วยความร้อน" การกระตุ้นให้เกิด autolysis ด้วยการทำให้เซลล์แตกด้วยความร้อน ดำเนินการโดยนำสารแขวนลอยเซลล์ 20% (w/v) ใน 0.85% NaCl ปริมาตร 100 มล. (แบ่งบรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 มล.) ไปรับความร้อนที่ 60^{0}ซ. เป็นเวลา 10 วินาที (ช่วงที่ยอมรับได้คือ 5-20 วินาที) จากนั้นรีบทำให้เย็น โดยแช่ในน้ำผสมน้ำแข็งทันที จากนั้นปล่อยให้อยู่ที่ระดับอุณหภูมิห้อง

2.4.1.3. "Autolysis" ปรับสารแขวนลอยเซลล์ให้ได้พีเอช 8.5 และ 45^{0}ซ. ด้วย (HCl, NaOH/KOH ซึ่งไม่ให้ผลตกค้างที่รบกวนการผลิต หรือใช้ YE) ปล่อยให้เกิด autolysis โดยเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันที่ 100 รอบ/นาที นาน 24 ชม. เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, และ 24 ชม. วัดปริมาณ lysine เพื่อบ่งชี้ถึงระดับการเกิด autolysis ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) นอกจากนั้น มีขั้นตอนตรวจลักษณะปรากฏของเซลล์ทั้งในช่วงก่อน, ระหว่าง และหลังการเกิด autolysis โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.4.1.4. "การแยก YE" เตรียมให้องค์ประกอบของ YE ตกตะกอน ด้วยการปรับพีเอชเป็น 6.0 (ช่วงที่รับได้คือ 5-7) ด้วย 2N HCl และต้มนาน 5 นาที จากนั้นปั่นแยก (ที่ 14,000 รอบ/นาที, 4^{0}ซ. นาน 15 นาที), ล้างตะกอนด้วยน้ำ, และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 250 มล. (กรองแยกตะกอนออก หากมี) ได้เป็นของเหลวข้น (slurry)

2.4.1.5. "การเตรียมผง YE" นำของเหลวข้นที่ได้ไปปรับพีเอชให้เป็น 7.0, ต้ม, ปั่นเหวี่ยง (ที่ 14,000 รอบ/นาที, 4^{0}ซ. นาน 15 นาที), และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มล. จากนั้น ทำให้เป็นผง โดยใช้เครื่อง freeze dryer (Heto, model: FD8) แล้วบรรจุในภาชนะปิดสนิท (เก็บในที่แห้งและเย็น เพื่อไม่ให้ดูดความชื้น)

2.4.1.6. "การเปรียบเทียบ YE" ประเด็นที่ใช้ในการเลือกแหล่งวัตถุดิบคือ ให้ YE ที่มีแหล่งไนโตรเจนสูง โดย YE ละลายน้ำได้สมบูรณ์ และให้ YE ในสัดส่วนที่สูงระดับ และอัตราการผลิตกรดอะมิโน และค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องเป็นรายละเอียดที่ควรพิจารณา หมายเหตุ: กรองแยกตะกอนออก หากมี

2.4.2. การออกแบบวิธีการ "ปัจจัยอุณหภูมิช่วง 30-60^{0}ซ. ต่อการผลิต YE"

ดำเนินการเช่นเดียวกับ 2.4.1.1 ถึง 2.4.1.3 เพื่อสำรวจปัจจัยอุณหภูมิต่อการผลิต YE จาก F material เพื่อคัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะต่อการผลิต YE การทดสอบนี้จัดให้มีชุดทดลองที่ต่างกันเฉพาะที่อุณหภูมิ คือมีด้วยกัน 5 ระดับ (30, 40, 45, 50 และ 60^{0}ซ.) อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดพิจารณาจากปริมาณ lysine โดยอุณหภูมิที่ให้ lysine สูงสุด เหมาะสมที่สุด

2.4.3. การออกแบบวิธีการ "ปัจจัยพีเอช 5.5, 7.0 และ 8.5 ต่อการผลิต YE"

ดำเนินการเช่นเดียวกับ 2.4.1.1 ถึง 2.4.1.3 โดยใช้แหล่งวัตถุดิบ และอุณหภูมิที่คัดเลือกจาก 2.4.2 และจัดให้มีชุดทดลองที่มีพีเอชต่างกันในช่วงบ่มให้เกิด autolysis โดยมีพีเอช 3 ระดับคือ 5.5, 7.0 และ 8.5 พีเอชที่เหมาะสมที่สุดพิจารณาจากปริมาณ lysine โดยพีเอชที่ให้ lysine สูงสุด ถือว่าเหมาะสมที่สุด

2.4.4. การออกแบบวิธีการ "ปัจจัยแอลคาเลสต่อการผลิต YE"

ดำเนินการเช่นเดียวกับ 2.4.1.1 ถึง 2.4.1.3 โดยใช้แหล่งวัตถุดิบ และอุณหภูมิที่คัดเลือกจาก 2.4.2 แต่เลือกพีเอชที่ 8.5 ชุดควบคุมมี 3 ชุด โดยจัดให้เหมือนกันกับใน 2.4.2 แต่ใช้วัตถุดิบ 3 ชนิดคือ F, S, และ D material เปรียบเทียบกับชุดทดลองที่เพิ่มแอลคาเลส จึงมีด้วยกัน 6 ชุดทดลอง ทั้งนี้ปริมาตรรวมท้ายสุดของชุดทดลองที่มีการเติมแอลคาเลส ปรับให้เท่ากันกับชุดควบคุม การทดลองที่จัดขึ้นนี้ให้ความสำคัญต่อสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต YE ที่ได้ จึงเลือกอุณหภูมิ (ที่ต่อมาทราบว่าคือ 45^{0}ซ.) ซึ่งอยู่นอกช่วงเหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของแอลคาเลส

สำหรับการทดลองที่เพิ่มแหล่งโปรตีน BSA เลือกใช้แอลคาเลสที่ความเข้มข้น 0.04 หน่วย ให้ผลการย่อยโปรตีน BSA ที่อุณหภูมิ 45^{0}ซ. และพีเอช 8.5 ในอัตราที่ให้ lysine ได้มากกว่า 100 มก./วินาที จากโปรตีน 1 ก. ความเข้มข้นของเอนไซม์นี้เกินพอสำหรับแสดงผลต่อโปรตีนทั้งหมดที่มีในชุดควบคุม และทดสอบ อย่างไรก็ตาม ได้เลือกปริมาณแอลคาเลสในครั้งนี้เป็น 0.1 หน่วย (210 ไมโครลิตร) เพื่อให้มากเกินพอ เพียงเพื่อสำรวจแนวโน้มความเป็นไปได้ของการใช้แอลคาเลส

2.4.5. การออกแบบวิธีการ "ปัจจัยไคโตแซนต่อการผลิต YE"

ดำเนินการเช่นเดียวกับ 2.4.1.1 ถึง 2.4.1.3 โดยใช้ แหล่งวัตถุดิบ และอุณหภูมิ และพีเอชที่คัดเลือกแล้วว่าเหมาะสม โดยจัดให้มีชุดทดลองที่ต่างกันเพียงการมี และไม่มีไคโตแซน ชุดทดลองที่ให้ lysine สูงสุด ถือว่าเหมาะสมที่สุด

สำหรับการเตรียม stock solution ของไคโตแซนปฏิบัติตาม Origane, and Sato (1993) โดยเตรียมที่ 4% ของ Shrimp Chitosan โดยใช้ glacial acetic acid (99.7%) ความเข้มข้นรวมของไคโตแซนที่ใช้ในสารแขวนลอยของเซลล์ช่วง autolysis คือ 0.2%

2.4.6. การออกแบบวิธีการ "การประเมินคุณภาพ In-house YE"

แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ คือ "การเตรียม in-house YE ผง" และขั้น "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE" โดยการวัดการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารที่มี in-house YE เปรียบเทียบกับอาหารที่มี imported YE และอาหารควบคุมที่ไม่มี yeast extract จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบมีทั้งกลุ่มแบคทีเรีย ยีสต์ และรา วิธีวัดการเจริญใช้วิธีการ MEM (modified ecometric method) ที่ให้ผลเป็นตัวเลข เรียกค่า AGI ผลตัวเลขระดับการเจริญของจุลินทรีย์ และระดับ lysine ใน in-house YE จะถูกนำมาพิจารณาคุณภาพของ in-house YE ที่ผลิตขึ้นนี้ สำหรับการวัดการเจริญของราใช้วิธีวัดขนาดของโคโลนี ซึ่งเจริญจากตำแหน่งศูนย์กลางของผิวอาหาร กล่าวคือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางยิ่งกว้าง แสดงว่าอาหารมีคุณภาพทางโภชนาการเหมาะกว่า ดีกว่าอาหารที่ให้โคโลนีที่มีขนาดเล็กกว่า

อาหารเพาะเลี้ยงมีด้วยกัน 2 ชนิดคือ PCA สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย และ YM Agar สำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ และรา PCA เป็นอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในมาตรฐานตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโดยทั่วไปที่รู้จักกันดี สูตรอาหาร (ก./ลิตร) คือ tryptone, 5.0; yeast extract, 2.5; glucose, 1.0; agar, 9.0 (pH 7.0 ± 0.2) (Oxoid product code: CM0325) สำหรับ YM Agar เป็นอาหารเพาะเลี้ยงที่นิยมทั่วไปในการเพาะเลี้ยงยีสต์ และรา สูตรอาหาร (ก./ลิตร) คือ yeast extract, 3.0; malt extract, 3.0; peptone, 5.0; glucose, 10.0; agar, 20.0 (pH 6.2 ± 0.2)

อาหารทั้งสองชนิดเตรียมให้มีความแตกต่างเฉพาะองค์ประกอบ yeast extract ผง ได้เป็นสูตรอาหารที่ต่างกัน 3 ชนิดย่อย ดังนี้

- in-PCA / in-YM หมายถึงอาหาร PCA / YM Agar ที่ใช้ in-house YE ผง
- imp-PCA / imp-YM หมายถึงอาหาร PCA/YM Agar ที่ใช้ imported YE ผง (Oxoid product code: LP0021)
- no-YE-PCA / no-YE-YM หมายถึง อาหาร PCA / YM Agar ที่ไม่มี YE ผง

2.4.6.1 "การเตรียม In-house YE ผง"

2.4.6.1.1 "การเตรียมเซลล์: 20% เซลล์ (w/v) ที่ระยะ log phase ใน 0.85% NaCl" แนวดำเนินการคือ เพาะเลี้ยงเซลล์ให้อยู่ในระยะ log phase จากนั้นปั่นเหวี่ยง (ที่ 800 รอบ/นาที, นาน 1 นาที), ล้างเซลล์ และเตรียมให้ได้เซลล์ความเข้มข้น 20% เริ่มโดยการเติมอาหาร molasses ที่สัดส่วน 200:1 (v/v) ลงในวัตถุดิบ 500 มล. และบ่มเซลล์ที่ 28^{0}ซ .โดยการเขย่าที่ 100 รอบ/นาที นาน 15 ชม. จากนั้น วาง F material ให้อยู่นิ่งเพื่อให้เซลล์ตกตะกอนเอง เทส่วนใสทิ้ง ปั่นเหวี่ยง และล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ท้ายสุดเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ให้ได้ 20% (w/v) 500 มล.

2.4.6.1.2 "การกระตุ้น Autolysis ด้วยความร้อน" การกระตุ้นให้เกิด autolysis ด้วยการทำให้เซลล์แตกด้วยความร้อน ดำเนินการโดยนำสารแขวนลอยเซลล์ 20% (w/v) ใน 0.85% NaCl ปริมาตร 100 มล. (แบ่งบรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 มล.) ไปรับความร้อนที่ 60^{0}ซ. เป็นเวลา 10 วินาที (ช่วงที่ยอมรับได้คือ 5-20 วินาที (จากนั้นรีบทำให้เย็น โดยแช่ในน้ำผสมน้ำแข็งทันที จากนั้นปล่อยให้อยู่ที่ระดับอุณหภูมิห้อง

2.4.6.1.3 "Autolysis"

— <u>ชุดทดลอง NoAdd-YE</u>: ปรับสารแขวนลอยเซลล์ให้ได้พีเอช 5.5 และ 45^{0}ซ. ด้วย (HCl, NaOH/KOH) ปล่อยให้เกิด autolysis โดยเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันที่ 100 รอบ/นาที นาน 24 ชม. เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, และ 24 ชม. วัดปริมาณ lysine ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979)

— <u>ชุดทดลอง Chi-YE</u>: ปฏิบัติเช่นเดียวกับ "ชุดทดลอง NoAdd-YE" แต่เติมไคโตแซนที่ความเข้มข้น 0.2% ไคโตแซน/เซลล์ยีสต์มีชีวิต (w/w)

สำหรับการเตรียม stock solution ของไคโตแซนปฏิบัติตาม Origane, and Sato (1993) โดยเตรียมที่ 4% ของ shrimp chitosan โดยใช้ glacial acetic acid (99.7%)

— <u>ชุดทดลอง Al-YE</u>: ปฏิบัติเช่นเดียวกับ "ชุดทดลอง NoAdd-YE" แต่ใส่แอลคาเลสที่ความเข้มข้น 0.04 หน่วย โดยไม่ใส่ไคโตแซน และปรับพีเอชเป็น 8.5

2.4.6.1.4 "การแยก YE" เตรียมให้องค์ประกอบของ YE ตกตะกอน ด้วยการปรับพีเอชเป็น 6.0 (ช่วงที่รับได้คือ 5-7) ด้วย 2N HCl และต้มนาน 5 นาที เพื่อฆ่า

เชื้อ จากนั้นปั่นเหวี่ยง (ที่ 14,000 รอบ/นาที, 40°ซ. นาน 15 นาที), ล้างตะกอนด้วยน้ำ, และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 250 มล. (กรองแยกตะกอนออก หากมี) ได้เป็นของเหลวข้น (slurry)

2.4.6.1.5 "การเตรียมผง YE" นำของเหลวข้นที่ได้ไปปรับพีเอชให้เป็น 7.0, ต้มนาน 5 นาที, ปั่นเหวี่ยง (ที่ 14,000 รอบ/นาที, 4°ซ. นาน 15 นาที), ล้างด้วยน้ำกลั่น, ปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มล. จากนั้น ทำให้เป็นผง โดยใช้เครื่อง freeze dryer (Heto, model: FD8) แล้วบรรจุในภาชนะปิดสนิท (เก็บในที่แห้งและเย็น เพื่อไม่ให้ดูดความชื้น

2.4.6.2 "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของ**แบคทีเรีย**"

2.4.6.2.1 "เตรียมอาหาร" อาหาร PCA ที่ใช้มีด้วยกัน 3 ชนิด คือ (1) in-PCA (2) imp-PCA และ (3) no-YE-PCA อาหารทั้งสามชนิดถูกเตรียมเป็น agar medium โดยปริมาตรอาหารเท่ากันทุกจานที่ 15 มล. อาหารทุกจานที่เตรียมแล้วนี้นำไปผ่านขั้น sterility check โดยการบ่มที่ 35°ซ. นาน 48 ชม. เพื่อสำรวจและแยกจานที่บังเอิญมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนออก

2.4.6.2.2 "เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์" แบคทีเรียทดสอบมีด้วยกันรวม 8 ชนิด คือ *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 (DMST 0562), *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (DMST 4739), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Proteus mirabilis* ATCC 7002, *Staphylococcus aureus*, และ *Flavobacterium* sp. สำหรับวิธีการเพาะเลี้ยงคือ บ่มจุลินทรีย์บน Nutrient agar slant ที่ 35°ซ. นาน 20-24 ชม. เพื่อให้ได้เซลล์ในระยะ stationary phase (10^8 ถึง 10^9 CFU/ml) จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ใน 0.85% NaCl ให้ได้ OD_{600}=1.1-1.2 การขีดลากปฏิบัติตามวิธี MEM ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้ออันเดียวกัน ที่ล้างสะอาดใหม่ทุกครั้ง (เพื่อนำเซลล์และสิ่งติดค้างจากการไหม้ไฟออกจากห่วง) เริ่มโดยจุ่มเฉพาะส่วนห่วงลงในสารแขวนลอยเซลล์ข้างต้นนี้ ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว แล้วนำไปลากบนผิวอาหาร 5 แนว โดยเริ่มที่แนว 1A, 2A, 3A, 4A และ 5A (หรืออาจเริ่มที่ 1B-5B) ดังภาพที่ 1 และโดยไม่แตะเซลล์เพิ่ม หรือลนไฟจนครบ 5 แนวลาก หนึ่งสายพันธุ์ทดสอบถูกนำมาลาก 5 แนว แต่ละสายพันธุ์ทำบน 7

จานเพาะเลี้ยง (7 ซ้ำ) ต่ออาหารหนึ่งชนิด จากนั้น บ่มที่ 35^0ซ. เป็นเวลา 48 ชม. โดยทำชุดทดลอง (เริ่มตั้งแต่เพาะเชื้อ) ละ 5 ซ้ำ

2.4.6.2.3 "วัดระดับการเจริญ" ผลรวมของระดับการเจริญตาม 5 แนวลากของแต่ละจานเพาะเลี้ยงถูกนำมาพิจารณา และให้ระดับการเจริญเป็นตัวเลข เรียกว่า absolute growth index (AGI) ค่า AGI แปรตามระดับการเจริญ กำหนดให้ที่มีทศนิยม 1 ตำแหน่ง โดยค่าต่ำสุด และสูงสุดคือ 0.2 และ 5.0 ตัวอย่างค่า AGI เช่น "1.0" หมายถึงมีการเจริญเฉพาะแนวลากที่ 1 (โดยไม่มีการเจริญตามแนวลากที่ 2), "5.0" หมายถึงมีการเจริญตามแนวลากที่ 1 ถึงเต็มแนวลากที่ 5 และ "2.5" หมายถึง มีการเจริญ ½ ของแนวลากที่ 3 โดยมีการเจริญเต็มในแนวลากที่ 1 และ 2 เพื่อให้มีมาตรฐาน การประเมินใช้ผู้ประเมินคนเดียวกันโดยตลอด นอกจากนั้น อายุ และปัจจัยการบ่มอื่น มีค่าคงที่เท่ากันโดยตลอด นำค่า AGI ของแต่ละซ้ำไปคำนวณโดยใช้สถิติ ANOVA

2.4.6.3 "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของยีสต์"

2.4.6.3.1 "เตรียมอาหาร" อาหาร YM Agar ที่ใช้มีด้วยกัน 3 ชนิด คือ (1) in-YM (2) imp-YM และ (3) no-YE-YM โดยปริมาตรอาหารเท่ากันทุกจานที่ 15 มล. อาหารทุกจานที่เตรียมแล้วนี้นำไปผ่านขั้น sterility check โดยการบ่มที่ 30^0 ซ. นาน 48 ชม. เพื่อสำรวจ และแยกจานที่บังเอิญมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนออก

2.4.6.3.2 "เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์" ยีสต์ทดสอบมีเพียง 1 ชนิดคือ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7752 การเพาะเลี้ยงโดยบ่มจุลินทรีย์บน YM slant ที่ 30^0 ซ. นาน 30-34 ชม. เพื่อให้ได้เซลล์ในระยะ stationary phase (10^5 ถึง 10^6 CFU/ml) จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ใน 0.85% NaCl ให้ได้ OD_{660}=2.1-2.2 รายละเอียดการขีดลากปฏิบัติแบบเดียวกับกรณีของแบคทีเรีย แต่บ่มที่ 30^0ซ. เป็นเวลา 48 ชม.

2.4.6.3.3 "วัดระดับการเจริญ" ปฏิบัติแบบเดียวกับ 2.4.6.2.3

2.4.6.4 "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา"

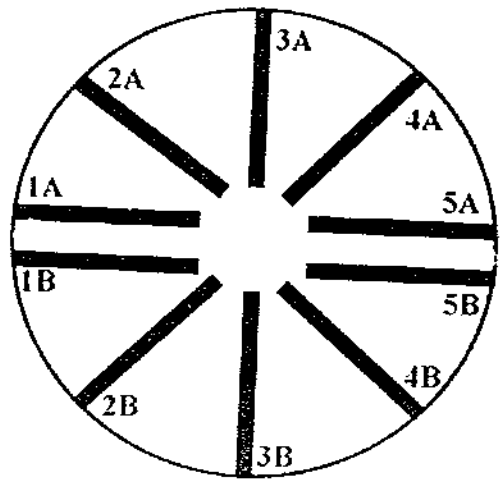
2.4.6.4.1 "เตรียมอาหาร" เช่นเดียวกับ 2.4.6.3.1

2.4.6.4.2 "เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์" ราทดสอบมี 2 ชนิดคือ *Aspergillus niger* และ *Penicillium* sp. การเพาะเลี้ยงโดยถ่ายสปอร์ของรา ลงตำแหน่งศูนย์กลางของผิวอาหาร บ่มที่ 30^0ซ. นาน 48 ชม. ราแต่ละชนิดเพาะเลี้ยงทั้งหมด 10

จาน (10 ซ้ำ) บนอาหารแต่ละชนิด โดยทำชุดทดลอง (เริ่มตั้งแต่เพาะเชื้อ) ละ 5 ซ้ำ

2.4.6.4.3 "วัดระดับการเจริญ" วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ในแต่ละซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ย นำค่าแต่ละซ้ำไปคำนวณโดยใช้สถิติ ANOVA

<u>ภาพที่ 1</u> ลำดับแนวขีดลากตามวิธี MEM บนผิวอาหารในจานเพาะเลี้ยง



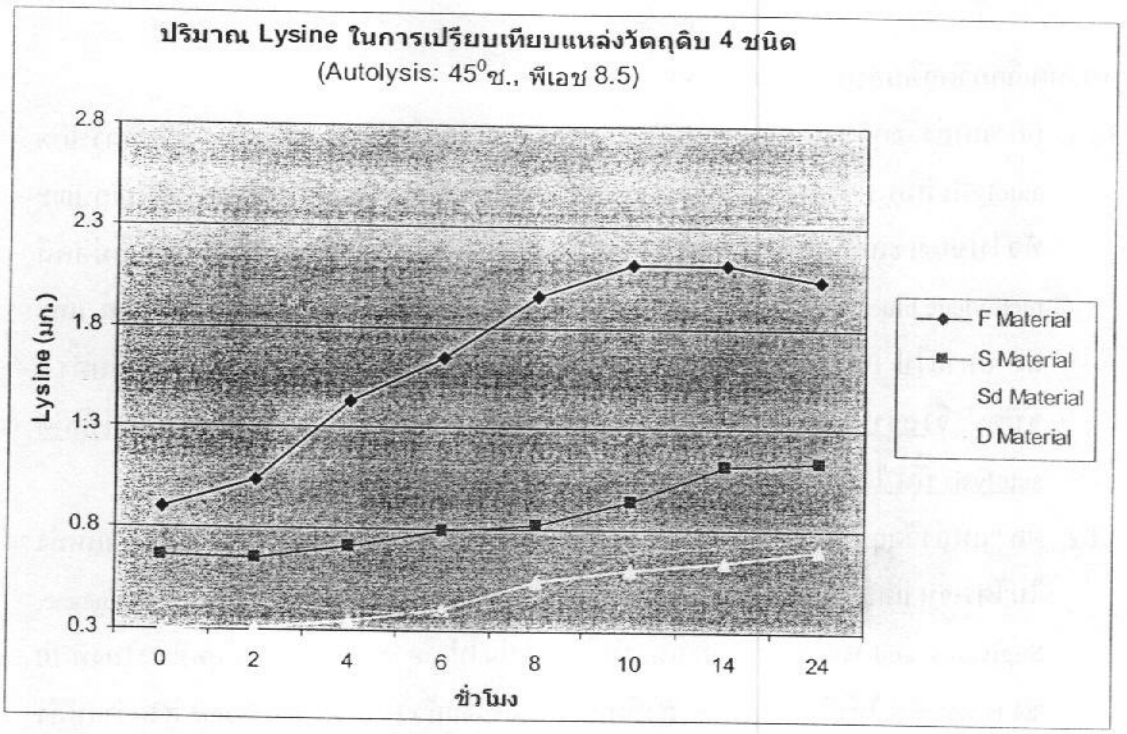
บทที่ 3
ผลการทดลอง

3.1 "การคัดเลือกวัตถุดิบสำหรับการผลิต YE" (2.4.1)

3.1.1. ผล "แหล่งวัตถุดิบ และสภาพ Yeast Autolysis" เซลล์ยีสต์ในวัตถุดิบทั้ง 4 ชนิดมีการเกิด autolysis สมบูรณ์ เพราะผลการสำรวจเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เริ่มต้นลักษณะทั่วไปของเซลล์ยีสต์ ประมาณมากกว่า 80% มีความปกติสมบูรณ์ มีชีวิต (ไม่ติดสี methylene blue) และอยู่ใน log phase ในช่วงบ่มให้เกิด autolysis เซลล์มีการแตก และสลายหายไป และตรวจไม่พบเซลล์หลังชั่วโมงที่ 6 ของการบ่มของยีสต์ในวัตถุดิบทั้ง 4 ชนิด จึงสรุปได้ว่าเซลล์ยีสต์ในวัตถุดิบมีชีวิต และเทคนิคการใช้ความร้อนให้เกิด autolysis นั้น ได้ผลกับเซลล์ยีสต์นี้ โดยตรวจไม่พบเซลล์

3.1.2. ผล "แหล่งวัตถุดิบ และปริมาณ lysine" ปริมาณ lysine เป็นดัชนีบ่งชี้ทั้งระดับแหล่งไนโตรเจน และคุณค่าอาหารโดยรวมของ YE และระดับการเกิด autolysis Kanegae, Sugiyama, and Minami (1989) แนะนำว่า การบ่มให้เกิด autolysis ควรหยุดที่ชั่วโมงที่ 10 ซึ่ง F material ให้ปริมาณ lysine สูงที่สุด และที่จริงแล้ว F material มี lysine สูงกว่าแหล่งวัตถุดิบอื่นตลอด 0-24 ชม. ของการบ่ม (ภาพที่ 2) ทั้งที่มีปริมาณ น้ำหนักแห้งของแหล่งวัตถุดิบทั้ง 4 ชนิดในช่วงบ่มใกล้เคียงกันคือ 19.95 $\pm$0.03 ก. ของวัตถุดิบ และมีปริมาณ lysine ที่ 10 ชม. เท่ากับ 2.11, 0.94, 0.61, และ 0.69 ของ F, S, Sd และ D material ตามลำดับ (ภาคผนวก ตารางที่ 1) จึงเห็นได้ว่าปริมาณ lysine ของ F material สูงมากกว่าที่ได้จากแหล่งวัตถุดิบอื่นมาก สรุปได้ว่า F material ควรจะเป็นแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับทดลองผลิต YE มากที่สุด ทั้งระดับคุณค่าโภชนาการ ระยะเวลาเกิด autolysis และปริมาณ YE ที่ได้

ภาพที่ 2 ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบแหล่งวัตถุดิบ 4 ชนิด



หมายเหตุ: ค่าปริมาณ lysine แสดงในภาคผนวก (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลเปรียบเทียบผง YE และปริมาณ Lysine ที่มีอยู่ในผง YE ที่ผลิตได้จากวัตถุดิบ 4 ชนิด (Autolysis ที่ 45°ซ., พีเอช 8.5)

	ผง Yeast Extract	
แหล่งวัตถุดิบ [1]	น้ำหนัก (ก.)	Lysine [2] (มก.)
F Material	19.95	2.11
S Material	19.92	0.94
Sd Material	19.97	0.61
D Material	19.96	0.69

หมายเหตุ: [1] แหล่งวัตถุดิบเริ่มต้นมีปริมาตร 500 มล. (20%, w/v)

[2] Lysine สูงสุดที่เวลา 10 ชม.

3.1.3. ผล "สมบัติของผง YE และการละลายน้ำ" การเปรียบเทียบผง YE ที่ผลิตได้จากวัตถุดิบทั้ง 4 ชนิด ในการละลายน้ำ เสมือนการใช้งานจริง พบว่าผง YE ที่ผลิตได้จาก F และ D material มีข้อดีกว่าที่ได้จากแหล่งวัตถุดิบอื่น เนื่องจากละลายน้ำได้สมบูรณ์ โดยไม่มีตะกอน และให้สีอ่อน จึงมีสมบัติที่ดีในการใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง สมบัติการละลายน้ำของผง YE จากวัตถุดิบทั้ง 4 แหล่ง แสดงในตารางที่ 1 สำหรับผง YE ที่ได้จากแหล่งวัตถุดิบอื่นคือ S และ SD material มีข้อจำกัดคือ มีสีเข้ม และมีตะกอน แม้มีขั้นตอนเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาให้สมบัติของผง YE ดีขึ้น และเหมาะสมขึ้น ก็ไม่น่าจะคุ้มค่า สรุปได้ว่า F และ Sd material ให้ผง YE ซึ่งมีสมบัติที่ดีในการละลายน้ำ เพื่อใช้งานจริง โดยสมบัตินี้เป็นเช่นเดียวกับผง YE ที่นำเข้าจากต่างประเทศ เนื่องจากมีข้อเด่นที่ปริมาณ lysine สูงมาก จึงคัดเลือก F material เป็นแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมที่สุด

ตารางที่ 2 ผลลักษณะผง YE ที่ผลิตได้จากวัตถุดิบ 4 ชนิด

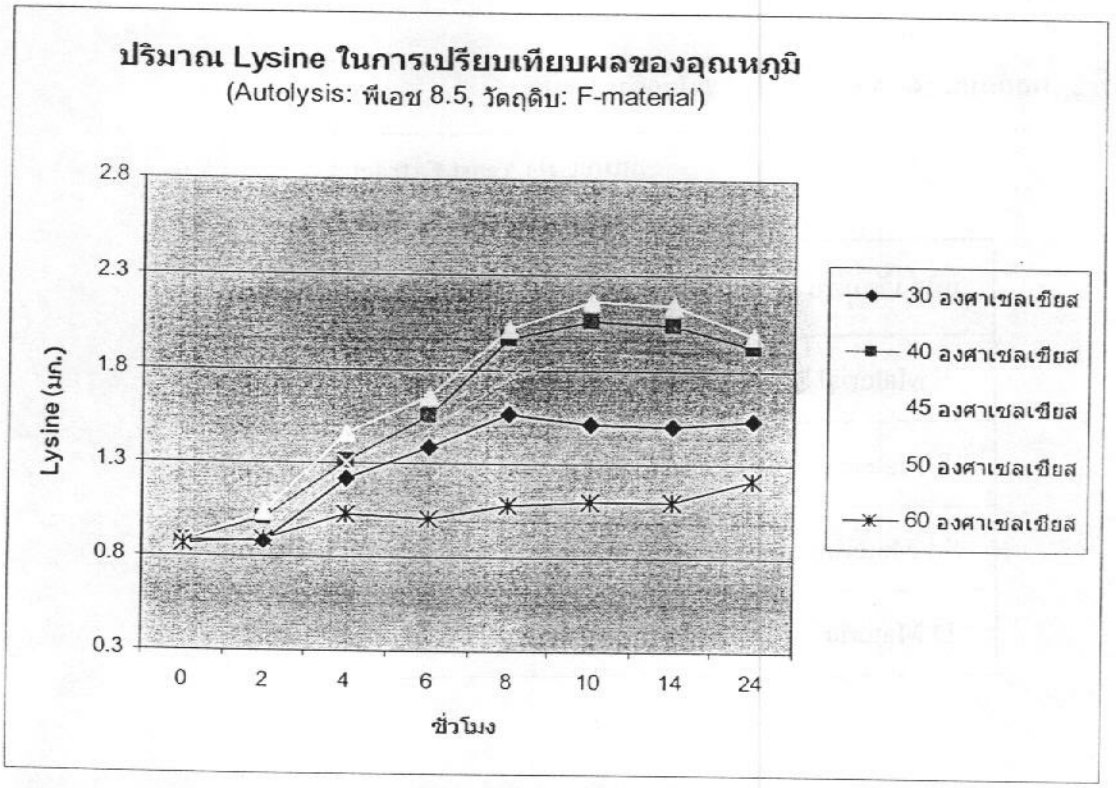
	ลักษณะผง Yeast Extract (Autolysis ที่ 45^{0}ซ, พีเอช 8.5)		
แหล่งวัตถุดิบ	สี	การละลาย	ตะกอน
F Material	เหลืองออกน้ำตาล	ดี	ไม่มี
S Material	น้ำตาลเข้ม	ดี	มีน้อย
Sd Material	น้ำตาลเข้ม	ดี	มีมาก
D Material	เหลืองออกน้ำตาล	ดี	ไม่มี

3.2 "ปัจจัยอุณหภูมิช่วง 30-60^{0}ซ. ต่อการผลิต YE"

จากการใช้อุณหภูมิต่างกัน คือที่ 30, 40, 45, 50 และ 60^{0}ซ. เพื่อดูผลที่มีต่อการเกิด autolysis พบว่า "อุณหภูมิมีผลต่อการเกิด autolysis จริง" โดยระดับอุณหภูมิที่ต่างกันมีผลต่อการเกิด autolysis และระดับ lysine ดังแสดงในภาพที่ 3 ทั้งนี้อุณหภูมิที่ทำให้มี lysine สูงที่สุดคือ "45^{0}ซ." โดยมีค่าสูงกว่าที่ได้จากอุณหภูมิ 40^{0}ซ. ไม่มากนักในตลอด 24 ชม. ของการบ่ม โดยมีค่า lysine สูงสุดที่ 2.16 มก. ที่เวลา 10 ชม. สำหรับการบ่มที่อุณหภูมิ 45^{0}ซ. ส่วนอุณหภูมิอื่นที่ให้

ระดับ lysine รองลงมาคือ 2.06, 1.89, 1.51 และ 1.11 มก. ของการบ่มที่ 40, 50, 30 และ 60^{0}ซ. ตามลำดับ โดยทั้งหมดให้ค่า lysine สูงสุดนี้ที่เวลาบ่ม 10 ชม. ตรงกัน ชั่วโมงที่ 10 ของ autolysis ยังคงให้ปริมาณ lysine สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับที่รายงานโดย Kanegae, Sugiyama, and Minami (1989) ปริมาณ lysine ที่เกิดขึ้นในสภาพอุณหภูมิต่างกัน 5 ระดับนี้แสดงในภาคผนวก (ตารางที่ 2) ผลการทดลองมีแนวโน้มว่าระดับอุณหภูมิส่งเสริมให้มี lysine เพิ่มสูงขึ้นจาก 30, 40 และดีที่สุดที่ 45^{0}ซ. แล้วเริ่มลดลงที่ 50 โดยต่ำสุดที่ 60^{0}ซ. สรุปว่า หากบ่มที่พีเอช 8.5 อุณหภูมิ 45^{0}ซ. ให้ระดับ lysine สูงกว่าที่อุณหภูมิอื่นตลอดช่วงการบ่ม 0-24 ชม. โดยสูงสุดที่เวลา 10 ชม. โดยให้ lysine 2.16 มก. อย่างไรก็ตาม ที่อุณหภูมิ 40^{0}ซ. ก็ให้ lysine ต่ำกว่าที่ได้จาก 45^{0}ซ. เพียงเล็กน้อย

ภาพที่ 3 ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบปัจจัยอุณหภูมิ



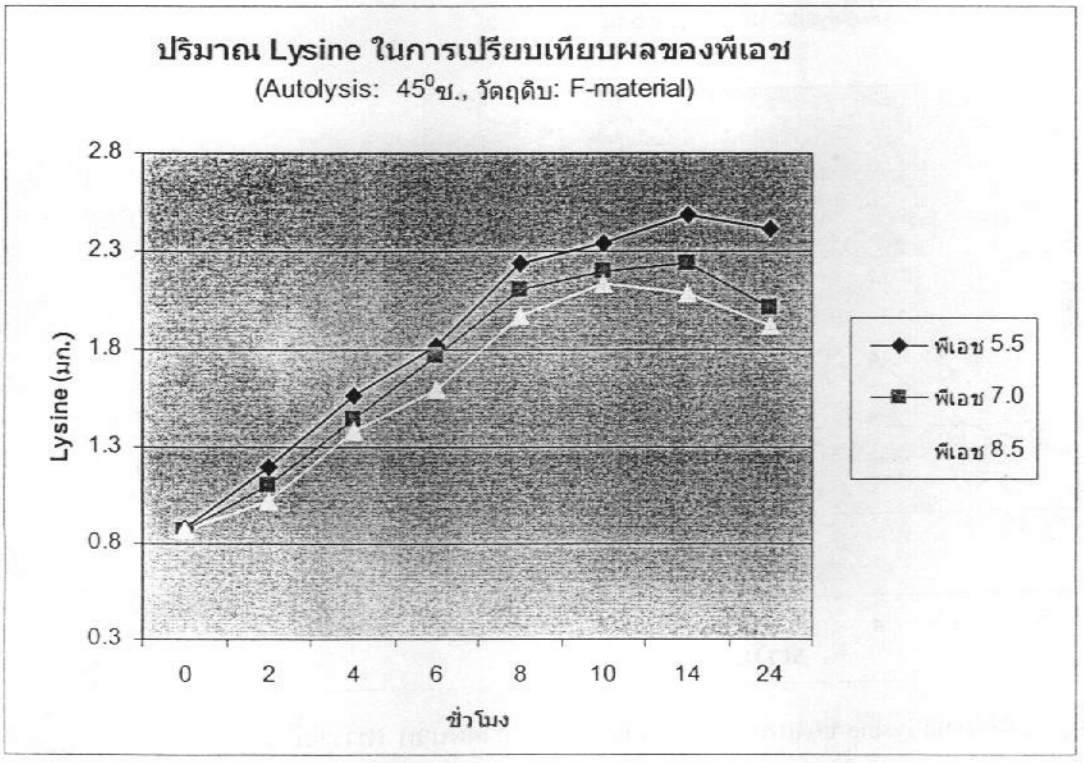
หมายเหตุ: ค่าปริมาณ lysine แสดงในภาคผนวก (ตารางที่ 2)

3.3 **"ปัจจัยพีเอช 5.5, 7.0 และ 8.5 ต่อการผลิต YE"** (2.4.3)

พีเอชมีผลต่อ autolysis โดยปริมาณ lysine สูงสุดจากการบ่มที่พีเอชทั้ง 3 ระดับอยู่ที่เวลาบ่มเดียวกัน คือที่ชั่วโมงที่ 11 ปริมาณ lysine สูงสุดเกิดจากการบ่มที่พีเอช 5.5 คือที่ 2.34 มก. รองลงมาคือ 2.20 และ 2.14 มก. จากการบ่มที่พีเอช 7.0 และ 8.5 ตามลำดับ พีเอชทั้ง 3 ระดับไม่ทำให้เกิดความแตกต่างมากนักต่อ autolysis เพราะให้ปริมาณ lysine สูงสุดที่ใกล้เคียงกัน และใกล้เคียงตลอดช่วงการบ่ม

เวลาที่ให้ lysine สูงสุดยังคงอยู่ที่ชั่วโมงที่ 11 ซึ่งเป็นเช่นเดียวกับที่ได้ในการทดลองเปรียบเทียบปัจจัยอุณหภูมิ ปริมาณ lysine ที่เกิดขึ้นในสภาพพีเอชต่างกัน 3 ระดับนี้แสดงในภาคผนวก (ตารางที่ 3) จากผลการทดลองสรุปว่า สามารถเลือกใช้พีเอชในช่วง 5.5 ถึง 8.5 เพื่อการผลิต YE ได้เพราะให้ปริมาณ lysine สูงสุดใกล้เคียงกัน โดยอัตราผลิต lysine สูงสุดที่พีเอช 5.5 และอุณหภูมิ 45^{0}ซ.

ภาพที่ 4 ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบปัจจัยพีเอช

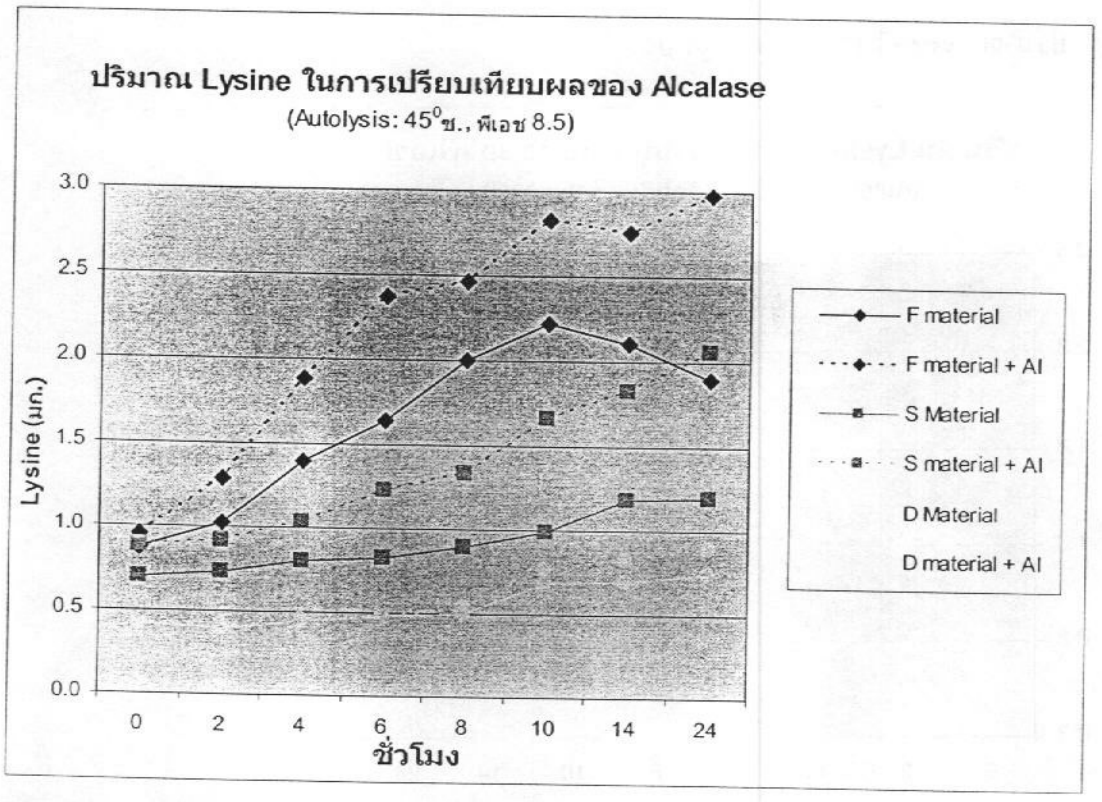


หมายเหตุ: ค่าปริมาณ lysine แสดงในภาคผนวก ตารางที่ 3

3.4 "ปัจจัยแอลคาเลสต่อการผลิต YE"

แอลคาเลสช่วยให้ autolysis เกิดดีขึ้น ซึ่งบ่งชี้จากอัตราการผลิต lysine สูงขึ้นสำหรับแหล่งวัตถุดิบชนิด F และ S material อย่างเห็นได้ชัด แต่ไม่สูงขึ้นสำหรับ D material แอลคาเลส ทำให้ปริมาณ lysine สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดการบ่ม 24 ชม. โดยสูงสุดที่ 2.98 มก. ที่ชั่วโมงที่ 24 สำหรับ F material (ชุดทดลอง F material+Al ในภาพที่ 5a) ในขณะที่ชุดควบคุม (F material ในภาพที่ 5a) ซึ่งไม่มีแอลคาเลส มีระดับ lysine สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 10 และเริ่มลดลง ในทำนองเดียวกันกับ F material, แอลคาเลสทำให้ lysine สูงขึ้นตลอดการบ่ม 24 ชั่วโมงของการบ่มในชุดทดลอง S material+Al โดยสูงสุดที่ 2.06 มก. ที่ชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่ชุดควบคุม S material มีระดับ lysine ต่ำกว่าค่อนข้างมาก

ภาพที่ 5a ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบปัจจัยแอลคาเลส

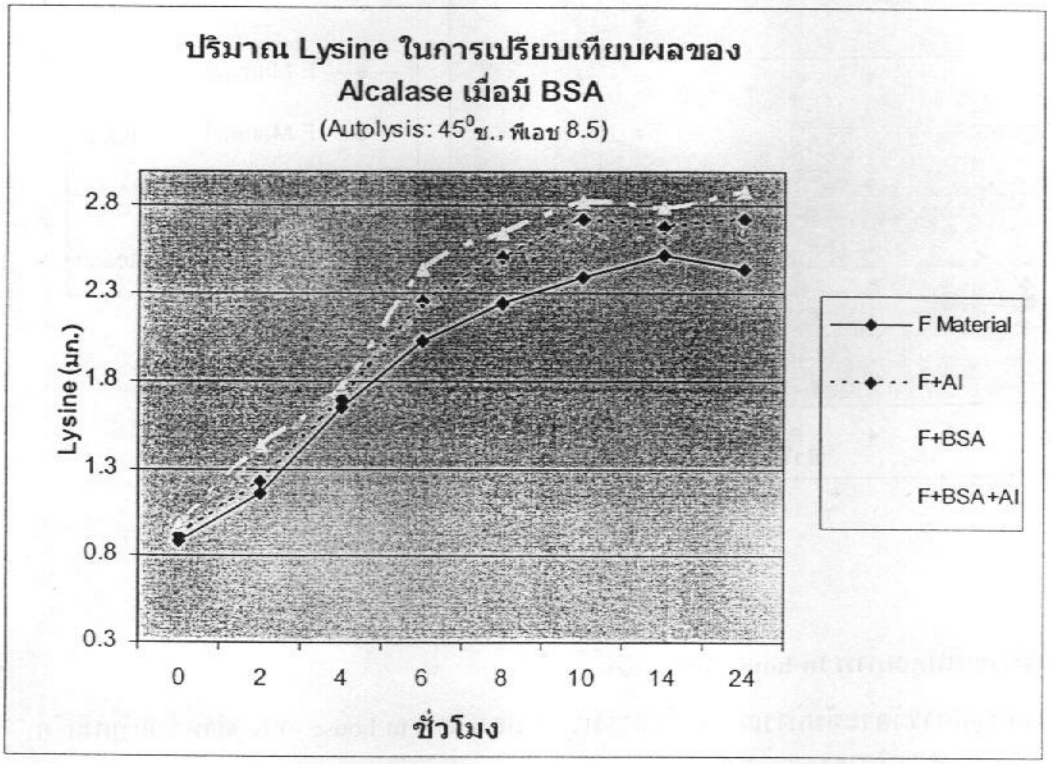


หมายเหตุ: ค่าปริมาณ lysine ของแต่ละชุดทดลองแสดงในภาคผนวก (ตารางที่ 4)

สำหรับกรณีที่ทดสอบแอลคาเลสที่มี BSA ได้ผลแสดงในภาพที่ 5b ที่เลือกแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมที่สุดชนิดเดียวคือ F material ซึ่งผลชี้ว่า (1) แอลคาเลส และ BSA มิได้ส่งผลดีต่อการผลิต YE กล่าวคือ ชุดทดลอง "F+BSA+Al" (มี F material, BSA และแอลคาเลส) ให้ lysine น้อย

กว่าชุดทดลอง "F+Al" (มี F material และ แอลคาเลส) เล็กน้อย ซึ่งตรงข้ามกับความคาดหวัง ยิ่งกว่านั้น ผลการทดลองกลับชี้ว่า (2) การเพิ่ม BSA โดยไม่มีทั้ง แอลคาเลส กลับให้ lysine มากกว่าชุดทดลองอื่น

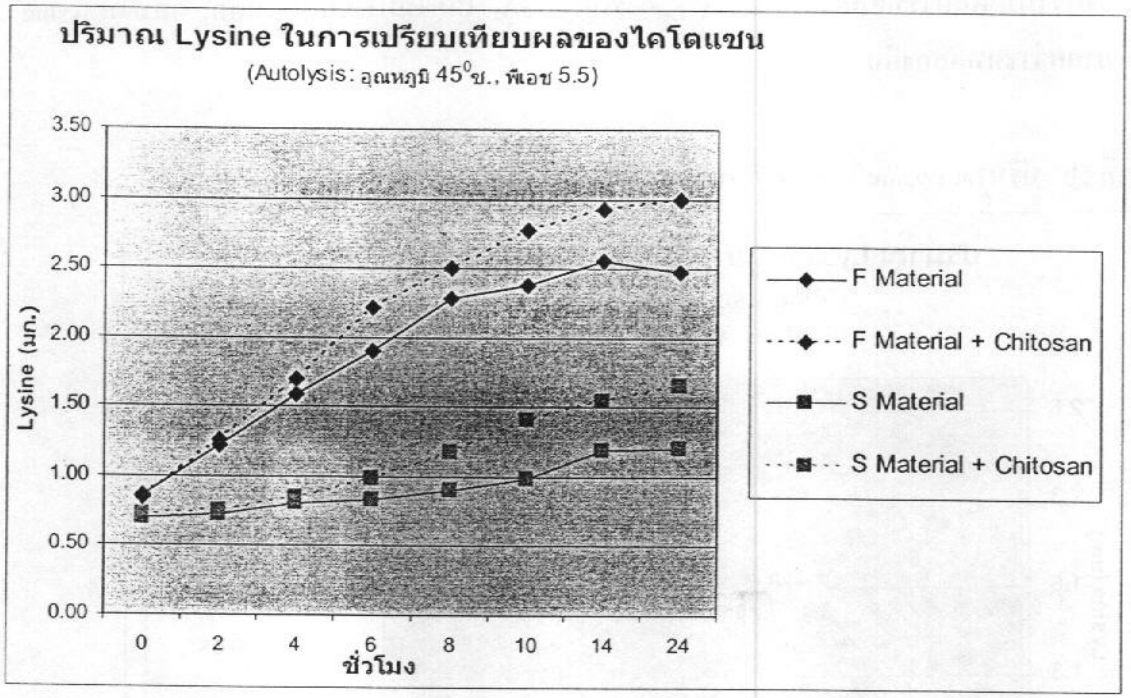
ภาพที่ 5b ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบปัจจัยแอลคาเลส เมื่อมี BSA



3.5 "ปัจจัยไคโตแซนต่อการผลิต YE"

ที่ 45°ซ. และพีเอช 5.5 autolysis เกิดตามปกติของชุดควบคุมที่มี F material และอีกชุดควบคุมหนึ่งที่มี S material เป็นวัตถุดิบ เพราะได้ lysine ในปริมาณ และอัตราที่ใกล้เคียงกับที่ได้ทดสอบก่อนหน้านี้นั้น ผลที่ได้ในการสำรวจปัจจัยไคโตแซนชี้ว่า ไคโตแซนที่ความเข้มข้น 0.2% มีแนวโน้มที่ผลดีต่อการผลิต YE เพราะทำให้ปริมาณ lysine สูงขึ้นทั้งต่อวัตถุดิบ F และ S material เกือบตลอดช่วง 24 ชม. ของการบ่ม

ภาพที่ 6 ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบปัจจัยไคโตแซน



3.6 ผล "การประเมินคุณภาพ In-house YE" (2.4.6)

ผลสรุปการวัดระดับการเจริญ เพื่อการประเมินคุณภาพ in-house YE สำหรับแบคทีเรีย แสดงในตารางที่ 3 และสำหรับยีสต์ และรา แสดงในตารางที่ 4 โดยใช้สถิติแบบ CRD และ RCBD ในการเปรียบเทียบ 5 ชุดทดลองที่ต่างกันเฉพาะ ชนิดของ YE ที่เป็นองค์ประกอบอาหารเพาะเลี้ยง

3.6.1. "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย"

การประเมินนี้มีด้วยกัน 5 ชุดทดลอง (treatment) ที่ใช้อาหาร PCA (ตามสูตรของ (Oxoid product code: CM0325) ซึ่งต่างกันเฉพาะที่องค์ประกอบ YE สำหรับชื่อชุดทดลอง และลักษณะเฉพาะมีดังนี้ (โดยชุดทดลองที่ (1) และ (2) เป็นชุดควบคุม)

(1) imp-PCA: ใช้ YE นำเข้า (imported YE) (Oxoid product code: LP0021)

(2) no-YE-PCA: ไม่มี YE

(3) in-PCA-N: ใช้ in-house YE ที่เตรียมขึ้นโดยไม่มีการเติมไคโตแซน หรือ แอลคาเลส

(4) in-PCA-Chi: ใช้ in-house YE ที่เตรียมขึ้นโดยมีการเติมไคโตแซน

(5) in-PCA-Al: ใช้ in-house YE ที่เตรียมขึ้นโดยมีการเติมแอลคาเลส

ผลการวัดการเจริญแบคทีเรีย โดยวิธี MEM (Kociubinski, Pérez, and De Antoni, 1999) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance = ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ของข้อมูลในตารางที่ 3 ได้ผลการวิเคราะห์ (ในภาคผนวก ตารางที่ 5) ซึ่งชี้ว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่าง 5 ชุดทดลอง เพราะให้ค่า Sig. เป็น .000 ในทุกค่าผลการเจริญของแบคทีเรีย จึงใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test เพื่อหาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับการเจริญระหว่างชุดทดลอง ของแบคทีเรียทั้ง 8 ชนิด

ตารางที่ 3 ผลการประเมินคุณภาพ In-house YE โดยพิจารณาการเจริญของแบคทีเรีย

Microorganism	no-YE-PCA	imp-PCA	in-PCA-N	in-PCA-Chi	in-PCA-Al
Enterobacter aerogenes	3.40	4.46	4.74	2.34	4.77
Escherichia coli	4.51	4.97	4.97	2.31	4.97
Flavobacterium sp.	3.46	4.51	4.86	2.20	4.51
Proteus mirabilis	3.54	4.43	4.69	2.31	4.83
Pseudomonas aeruginosa	4.34	4.94	4.97	2.20	4.86
Salmonella typhimurium	3.23	4.23	4.71	2.03	4.86
Shigella flexneri	3.23	4.23	4.74	2.00	4.46
Staphylococcus aureus	3.29	4.11	4.63	2.29	4.71

ผลการวิเคราะห์โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test เพื่อหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับการเจริญระหว่างชุดทดลองของแบคทีเรียทั้ง 8 ชนิด แสดงในภาคผนวก (ตารางที่ 6-13) โดยนำมาสรุปในตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการเจริญของแต่ละแบคทีเรียในแต่ละชุดทดลอง (P = 0.05) มีความแตกต่างกันบ้าง แต่แนวโน้มคือ (1) in-PCA-N และ in-PCA-Al ดีกว่า imp-PCA (ชุดควบคุม) และ (2) ที่ให้ระดับการเจริญต่ำสุดคือ in-PCA-Chi ซึ่งต่ำกว่า no-YE-PCA (ชุดควบคุม ที่คาดว่าให้ผลการเจริญต่ำสุด) จึง (3) คาดว่าอาหารเพาะเลี้ยงใน in-PCA-Chi มีสารรบกวนการเจริญของแบคทีเรีย เพื่อเป็นการเปรียบเทียบผลรวมของแบคทีเรียทั้ง 8 ชนิดจึงวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยสถิติ RCBD

ตารางที่ 4 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test ตามแผนการทดลองแบบ CRD

Name	Treatment	N	MEM (Subset for alpha = .05)	Detail in Appendix Table:
Enterobacter aerogenes	in-PCA-Chi	7	2.3429	6
	no-YE-PCA	7	3.4000	
	imp-PCA	7	4.4571	
	in-PCA-N	7	4.7429 [a]	
	in-PCA-Al	7	4.7714 [a]	
Escherichia coli	in-PCA-Chi	7	2.3143	7
	no-YE-PCA	7	4.5143	
	imp-PCA	7	4.9714 [a]	
	in-PCA-N	7	4.9714 [a]	
	in-PCA-Al	7	4.9714 [a]	
Flavobacterium sp.	in-PCA-Chi	7	2.200	8
	no-YE-PCA	7	3.4571	
	imp-PCA	7	4.5143 [a]	
	in-PCA-Al	7	4.5143 [a]	
	in-PCA-N	7	4.8571	
Proteus mirabilis	in-PCA-Chi	7	2.3143	9
	no-YE-PCA	7	3.5429	
	imp-PCA	7	4.4286	
	in-PCA-N	7	4.6857	
	in-PCA-Al	7	4.8286	
Pseudomonas aeruginosa	in-PCA-Chi	7	2.2000	10
	no-YE-PCA	7	4.3429	
	in-PCA-Al	7	4.8571 [a]	
	imp-PCA	7	4.9429 [a]	
	in-PCA-N	7	4.9714 [a]	

(continued on next page)

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Name	Treatment	N	MEM (Subset for alpha = .05)	Detail in Appendix Table:
Salmonella typhimurium	in-PCA-Chi	7	2.0286	11
	no-YE-PCA	7	3.2286	
	imp-PCA	7	4.2286	
	in-PCA-N	7	4.7143	
	in-PCA-Al	7	4.8571	
Shigella flexneri	in-PCA-Chi	7	2.0000	12
	no-YE-PCA	7	3.2286	
	imp-PCA	7	4.2286	
	in-PCA-Al	7	4.4571	
	in-PCA-N	7	4.7429	
Staphylococcus aureus	in-PCA-Chi	7	2.2857	13
	no-YE-PCA	7	3.2857	
	imp-PCA	7	4.1143	
	in-PCA-N	7	4.6286 [a]	
	in-PCA-Al	7	4.7143 [a]	
	Total	280		

หมายเหตุ [a] ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) ตาม Duncan's New Multiple Range Test

เมื่อใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนผลรวมตามแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) และวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดทดลองซึ่งต่างกันที่ปัจจัยชนิด YE ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ได้ผล Sig. ของ TRT และ BLK เป็น .000 (ตารางที่ 14 ภาคผนวก) จึงสรุปได้ว่า ชุดทดลองมีความแตกต่างกัน จึงวิเคราะห์ต่อด้วย Duncan's New Multiple Range Test ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5) ซึ่งสรุปได้ว่า in-PCA-N และ in-PCA-Al ให้ค่าการเจริญของแบคทีเรียสูงที่สุด โดยที่ทั้งสองชุดทดลองนี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ลำดับลองลงมาที่แตกต่างกันจากมากไปน้อย 3 ระดับคือ imp-PCA, no-YE-PCA และ in-PCA-Chi

ตารางที่ 5 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ RCBD

Duncan

TREATMENT	N	Subset 1	2	3	4
in-PCA-Chi	56	2.2107			
no-YE-PCA	56		3.6250		
imp-PCA	56			4.4857	
in-PCA-Al	56				4.7464
in-PCA-N	56				4.7893
Sig.		1.000	1.000	1.000	.284

3.6.2. "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของยีสต์และรา"

เช่นเดียวกับกรณีแบคทีเรีย แต่ใช้อาหาร YM Agar การประเมินนี้มีด้วยกัน 5 ชุดทดลอง (treatment) ที่ใช้อาหาร YM Agar (Yeast and Mould Agar (Oxoid product code: CM0920)) ซึ่งต่างกันเฉพาะที่องค์ประกอบ YE ในทำนองเดียวกับกรณีของแบคทีเรีย สำหรับชื่อชุดทดลองและลักษณะเฉพาะมีดังนี้ (โดยชุดทดลองที่ (1) และ (2) เป็นชุดควบคุม)

(1) imp-YM: ใช้ YE นำเข้า (imported YE) (Oxoid product code: LP0021)

(2) no-YE-YM: ไม่มี YE

(3) in-YM-N: ใช้ in-house YE ที่เตรียมขึ้นโดยไม่มีการเติมไคโตแซน หรือ แอลคาเลส

(4) in-YM-Chi: ใช้ in-house YE ที่เตรียมขึ้นโดยมีการเติมไคโตแซน

(5) in-YM-Al: ใช้ in-house YE ที่เตรียมขึ้นโดยมีการเติมแอลคาเลส

ในทำนองเดียวกับกรณีของแบคทีเรีย ผลการวัดการเจริญยีสต์ โดยวิธี MEM (Kociubinski, Pérez, and De Antoni, 1999) และรา โดยวิธีวัดขนาดโคโลนี ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 และ 7 เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD ได้ผลการวิเคราะห์ (ในภาคผนวก ตารางที่ 16 และ 18) ซึ่งชี้ว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่าง 5 ชุดทดลอง เพราะให้ค่า Sig. เป็น .000 ในทุกค่าผลการเจริญของยีสต์และรา ดังนั้นจึงใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test เพื่อหาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับการเจริญระหว่างชุดทดลอง ของยีสต์และรา

ตารางที่ 6 ผลการประเมินคุณภาพ In-house YE โดยพิจารณาการเจริญของยีสต์

Microorganism	no-YE-PCA	imp-PCA	in-PCA-N	in-PCA-Chi	in-PCA-Al
Saccharomyces cerevisiae	3.09	3.74	4.26	4.46	4.31

ตารางที่ 7 ผลการประเมินคุณภาพ In-house YE โดยพิจารณาการเจริญของรา

Microorganism	no-YE-PCA	imp-PCA	in-PCA-N	in-PCA-Chi	in-PCA-Al
Aspergillus niger	40.4	40.9	40.8	40.8	40.8
Penicillium sp.	30.2	30.5	30.5	30.5	30.6

ผลการวิเคราะห์โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test เพื่อหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับการเจริญระหว่างชุดทดลองของยีสต์ ชี้ว่า in-YM-Chi ให้ผลดีที่สุด รองลงมาเท่ากันสองชุดทดลองคือ in-YM-Al และ in-YM-N โดยให้ผลที่ดีกว่า imp-YM (ชุดควบคุม) โดยมี no-YE-YM (ชุดควบคุม) ให้ผลต่ำที่สุด (P – 0.05) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของยีสต์" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test ตามแผนการทดลองแบบ CRD

Name	Treatment	N	MEM (Subset for alpha=.05)	Detail in Appendix Table:
Saccharomyces cerevisiae	no-YE-YM	7	3.0857	17
	imp-YM	7	3.7429	
	in-YM-N	7	4.2571 [a]	
	in-YM-Al	7	4.3143 [a]	
	in-YM-Chi	7	4.4571	
	Total	35		

หมายเหตุ [a] ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) ตาม Duncan's New Multiple Range Test

สำหรับกรณีของรา ผลวิเคราะห์ทางสถิติ Duncan's New Multiple Range ชี้ว่า ทั้ง *Aspergillus niger* และ *Penicillium* sp. ให้ผลที่ใกล้เคียงกัน คือ ทั้ง 4 ชุดทดลองที่มี YE คือ imp-YM, in-YM-N, in-YM-Chi และ in-YM-Al ให้ผลการเจริญใกล้เคียงกัน ส่วนชุดควบคุม no-YE-YM ให้ผลการเจริญต่ำที่สุด (P = 0.05) ดังแสดงในตารางที่ 9 ซึ่งสรุปได้ว่า สำหรับกรณีของ *Aspergillus niger* นั้น imp-YM ให้ผลเท่ากันทางสถิติกับ in-YM-Chi ที่ยังให้ผลไปเท่ากับ in-YM-N และ in-YM-Al อีกด้วย และสำหรับ *Penicillium* sp. ทั้ง 4 ชุดทดลองที่มี YE ให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติ (P = 0.05) เพื่อเป็นการวิเคราะห์ผลรวมของราทั้ง 2 ชนิด จึงวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยสถิติ RCBD

ตารางที่ 9 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test ตามแผนการทดลองแบบ CRD

Name	Treatment	N	Colony Size (Subset for alpha = .05)	Detail in Appendix Table:
Aspergillus niger	no-YE-YM	10	44.1000	19
	in-YM-N	10	48.2000 [a]	
	in-YM-Al	10	48.3000 [a]	
	in-YM-Chi	10	48.5000 [a, b]	
	imp-YM	10	48.9000 [b]	
Penicillium sp.	no-YE-YM	10	32.1000	20
	in-YM-N	10	35.0000 [a]	
	imp-YM	10	35.1000 [a]	
	in-YM-Chi	10	35.4000 [a]	
	in-YM-Al	10	35.5000 [a]	
	Total	100		

หมายเหตุ [a, b] ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) ตาม Duncan's New Multiple Range Test โดย [a] ต่างจาก [b] แต่ [a] ไม่ต่างจาก [a] และ [b] ไม่ต่างจาก [b]

เมื่อใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนผลรวมตามแผนการทดลองแบบ RCBD และวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดทดลองซึ่งต่างกันที่ปัจจัยชนิด YE ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ได้ผล Sig. ของ TRT และ BLK เป็น .000 (แสดงตารางที่ 21 ภาคผนวก) จึงสรุปได้ว่า ทุกชุดทดลองมีความแตกต่างกัน จึงวิเคราะห์ต่อด้วย Duncan's New Multiple Range Test ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10 ซึ่งสรุปได้ว่า ทุกชุดทดลองที่มี YE คือ imp-YM, in-YM-N, in-YM-Chi และ in-YM-Al ให้การเจริญเท่ากัน โดยไม่แตกต่างทางสถิติ โดย no-YE-YM ให้การเจริญต่ำที่สุด

ตารางที่ 10 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ RCBD

Duncan[a, b]

		Subset for alpha = .05	
TREATMENT	N	1	2
no-YE-YM	20	38.1000	
in-YM-N	20		41.6000
in-YM-Al	20		41.9000
in-YM-Chi	20		41.9500
imp-YM	20		42.0000
Sig.		1.000	.069

บทที่ 4
สรุป และ วิจารณ์

4.1 "การคัดเลือกวัตถุดิบสำหรับการผลิต YE"

"F material เหมาะสมที่สุด เพราะให้ YE ที่มี lysine สูงสุด, ละลายน้ำได้ดี และไม่มีตะกอน" ผง YE ที่ผลิตได้จาก F material มีสมบัติละลายน้ำได้อย่างสมบูรณ์ ใส ไม่มีตะกอน และมี lysine สูงที่สุด ซึ่งเป็นดัชนีสะท้อนปริมาณไนโตรเจนว่าสูงสุดอีกด้วย ซึ่งเป็นลักษณะพื้นฐานสำคัญของ YE ดังนั้นสรุปว่า (1) จากการเปรียบเทียบวัตถุดิบทั้ง 4 ชนิด และตามวิธีการที่ใช้นี้ F material เป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีความเหมาะสมที่สุด (2) การเกิด autolysis เกิดขึ้นจริง โดยมีระดับเพิ่มขึ้น และลดลง โดยบ่งชี้ด้วยปริมาณ lysine ที่มีการเพิ่มขึ้นและลดลงในช่วงบ่ม นอกจากนั้นท้ายสุดของการบ่ม ตรวจไม่พบเซลล์ในน้ำหมัก ซึ่งแสดงว่าเซลล์มี autolysis และหมดไปจากแหล่งวัตถุดิบ (3) มีความเป็นไปได้สูงที่จะผลิต YE ขึ้นภายในประเทศ เพราะใช้เทคโนโลยีที่ไม่ซับซ้อน (4) ปัญหาที่ต้องทดสอบเบื้องต้นคือ YE ที่ผลิตขึ้นได้นี้ มีคุณภาพเทียบได้กับ YE ที่นำเข้าจากต่างประเทศหรือไม่ เมื่อนำไปใช้ผลิตเป็นอาหาร และเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จริง และสามารถปรับปรุงเพื่อให้ได้ YE ที่มีคุณภาพ และกระบวนการผลิตดีขึ้นกว่าที่ได้ทดลองนี้หรือไม่

ข้อวิจารณ์ กรณีตะกอนไม่ละลายน้ำใน S และ Sd material นั้น กรณีของ S material ไม่จัดเป็นปัญหาสำคัญ เพราะเป็นขนาดตะกอนใหญ่ จึงสามารถกรองแยกออกได้ โดยไม่ยุ่งยากด้วยกระดาษกรองละเอียด ในขณะที่ตะกอนของ Sd material เป็นตะกอนขนาดเล็กร่วมอยู่ในขนาดใหญ่ ทำให้การกรองแบบง่าย ไม่สามารถแยกตะกอนขนาดเล็กออกไม่ได้ จึงยังคงมีสภาพขุ่น และเป็นปัญหาในการใช้งาน YE ตะกอนนี้มากจากส่วนผสมอื่นที่โรงงานต้องการให้มี ในการขาย หรือใช้งาน byproduct นี้ แม้ว่าสามารถจัดการ หรือเตรียมให้ไม่มีตะกอน ทั้ง S และ Sd material ก็ยังมีเซลล์ไม่มากพอ และเซลล์ก็ไม่อยู่ในสภาพเหมาะสมที่จะให้คุณค่าทางโภชนาการของ YE ดังนั้นจึงไม่ควรใช้แหล่งวัตถุดิบนี้สำหรับการผลิต YE

F material เป็นแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสม เพราะไม่มีตะกอน มีปริมาณเซลล์สูง และเซลล์อยู่ในสภาพที่เหมาะสม หลังกระตุ้นให้เกิด autolysis ก็ให้ระดับ lysine สูง จึงน่าจะนำไปเป็นแหล่งผลิตวัตถุดิบที่ให้ YE ที่มีสารอาหารมากพอ คือมีคุณค่าทางโภชนาการสูง (จากการทดสอบต่อมาสรุปได้ว่ามีคุณค่าทางโภชนาการตามคาดหวัง)

ราคาของ YE ที่ผลิตได้ 100 ก. จากแต่ละวัตถุดิบคำนวณได้ดังนี้ คือ F, S, Sd และ D material คือ 4, 6, 3 และ 327 บาท ตามลำดับ ราคานี้ไม่รวมค่าใช้จ่ายใด (ปี พ.ศ. 2543) ราคาของ D material สูงเพราะเป็นสินค้านำเข้าจากต่างประเทศ ที่ผ่านกระบวนการหลายขั้นตอน อยู่ในรูป lyophilization

และบรรจุในซองปิดสนิท ส่วนวัตถุดิบอื่นเป็นสินค้าที่ผลิตในประเทศ จากราคาดังกล่าวนี้ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้มากที่จะได้ผลกำไร หากมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

4.2 "ปัจจัยอุณหภูมิช่วง 30-60°ซ. ต่อการผลิต YE"

อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเกิด autolysis ที่พีเอช 8.5 เมื่อใช้ F material เป็นวัตถุดิบ คือที่ 45°ซ. โดยที่เวลา 10 ชม. เป็นตำแหน่งที่ให้ lysine สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ Kanegae, Sugiyama, and Minami (1989) ที่แนะนำว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเกิด autolysis คือ 40-45°ซ. จึงเลือกอุณหภูมิ 45°ซ. นี้สำหรับการศึกษาการผลิต YE ขั้นต่อไป อย่างไรก็ตามอาจเลือกใช้อุณหภูมิ 40°ซ. ได้ เพราะให้ lysine ต่ำกว่าที่ได้จาก 45°ซ. เพียงเล็กน้อย

ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Kanegae, Sugiyama, and Minami (1989) ตามที่พบว่าอุณหภูมิ 45°ซ. ให้ผลดีที่สุดในการเกิด autolysis และใกล้เคียงกับที่ได้จากอุณหภูมิ 40 และ 45°ซ. ที่พีเอช 8.5 ที่ช่วง 10 ชม. ของการเกิด autolysis สอดคล้องกับที่ได้รายงานโดย Kanegae, Sugiyama, and Minami (1989) ที่ได้รายงานว่ายีสต์หลายชนิดที่ใช้ในอุตสาหกรรมเกิด autolysis ได้ดีที่พีเอช 8.0-10.0 และ 35-50°ซ. ที่ช่วงเวลา 4-10 ชม. แม้ว่ายีสต์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความแตกต่างที่ ไม่มีการเพาะเลี้ยง แต่ก็ยังให้ผลสอดคล้อง ดังนั้นการผลิตจริงในระดับอุตสาหกรรมอาจมีการวิจัยทดสอบเพื่อให้มีการผลิตที่มีประสิทธิภาพ ที่อุณหภูมิการบ่มต่ำกว่า 45°ซ. เพื่อการประหยัดพลังงาน โดยเลือกอุณหภูมิอื่นหากให้ความคุ้มทุนสูงกว่าในการผลิต YE

4.3 "ปัจจัยพีเอช 5.5, 7.0 และ 8.5 ต่อการผลิต YE"

พีเอช 5.5 ให้ผล lysine สูงที่สุด ที่ชั่วโมงที่ 11 (ที่ 45°ซ.) จึงน่าจะใช้พีเอช และอุณหภูมินี้ในการผลิต YE (ยกเว้นกรณีที่มีการใช้แอลคาเลส เพราะเอนไซม์นี้ทำงานได้เฉพาะที่พีเอชมากกว่า 8)

พีเอชทั้ง 3 ระดับอยู่ในช่วงที่เป็นทั้งกรด, กลาง, และด่าง ส่งผลแตกต่างกันไม่มากนักต่อการผลิต YE หากผลิตจริง และพีเอชของวัตถุดิบอยู่ในช่วง 5.5 ถึง 8.5 ก็น่าจะเป็นเรื่องที่ยอมรับได้ โดยไม่ต้องกังวล เพราะน่าจะให้ปริมาณ และคุณค่าทางโภชนาการของ YE ในระดับไม่ห่างกันมากนัก ทั้งนี้คงต้องใช้ผลคำนวณทางเศรษฐศาสตร์

4.4 "ปัจจัยแอลคาเลสต่อการผลิต YE"

แอลคาเลสช่วยให้ autolysis เกิดดีที่สุดกับ F material ที่พีเอช 8.5, 45°ซ. และความเข้มข้นแอลคาเลส 0.1 หน่วย โดยให้ lysine มากที่สุดอย่างเห็นได้ชัดตลอดการบ่ม 24 ชม. โดย มีแนวโน้มสูงขึ้นอีก แอลคาเลสยังให้ผลดีขึ้นกับ S material และให้ผลไม่ดีนักกับ D material ที่สภาพแวดล้อม

เดียวกัน กรณีที่เพิ่มแหล่งโปรตีน BSA ในการทดสอบกิจกรรมแอลคาเลสกลับพบว่า ให้ผลเชิงลบในการผลิต YE และการเพิ่ม BSA โดยไม่มีแอลคาเลสกลับให้ผลที่ดีกว่า

จากการที่แอลคาเลสช่วยให้ปริมาณ lysine สูงขึ้นทั้งใน F และ S material นั้นแสดงว่าแนวคิดการใช้เอนไซม์นี้เป็นแนวทางที่น่าสนใจวิจัยต่อไป เพราะช่วยให้คุณภาพทางโภชนาการของ YE ที่ผลิตได้สูงขึ้น และการที่แอลคาเลสมิได้ช่วยเพิ่มปริมาณ lysine จาก D material อาจเป็นเพราะทั้งโปรตีนของเซลล์ยีสต์ใน D material มีน้อยเกินไป และ protease ทำงานดีอยู่แล้ว ดังนั้น แอลคาเลสจึงมิได้ช่วยเพิ่มปริมาณ lysine เนื่องจาก แอลคาเลสแสดงให้เห็นว่าช่วยการผลิต YE ให้มีคุณภาพทางโภชนาการสูงขึ้นนี้จึงควรได้มีการวิจัยเพิ่มเติมต่อไปกับ F material

สำหรับกรณีที่มีการใช้ BSA ร่วมกับ แอลคาเลส ต่อ F material และให้ผลเชิงลบกว่าที่ไม่มี BSA และมี BSA โดยไม่มี แอลคาเลส ให้ผลดีที่สุดนั้นตรงข้ามกับสมมุติฐาน แม้ว่าเป็นเรื่องน่าสนใจ แต่คงไม่คุ้มค่าในการวิจัยเพื่อหาเหตุผลว่า เพราะเหตุใด BSA มีผลลบต่อแอลคาเลส โดยสรุปจากการที่เมื่อมี BSA ค่า lysine สูงขึ้นกว่าชุดทดลองใด อย่างไรก็ตามไม่ควรใช้ BSA ในรูปแบบนี้เพื่อการผลิต YE เพราะคงไม่คุ้มทุน การใช้แอลคาเลสในกระบวนการผลิต YE น่าจะให้ผลดีในการผลิตจริง

แอลคาเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ในพีเอชที่เป็นด่าง จึงไม่ควรใช้พีเอช 5.5 (ที่ได้ทดลอง และสรุปแล้วว่าเหมาะสมต่อการผลิต YE) การดูผลปัจจัยแอลคาเลส จึงควรเลือกใช้พีเอช 8.5-9.0 เพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด หากต้องการดูผลจากเอนไซม์นี้ จึงควรจัดสภาพให้พีเอชเป็นด่างด้วย และตรวจสอบเปรียบเทียบว่าการใช้ 'แอลคาเลส' ในช่วง autolysis ให้ผลดีต่อการผลิต YE หรือไม่

4.5 "ปัจจัยไคโตแซนต่อการผลิต YE"

ไคโตแซน มีผลดีตามสมมุติฐานในการผลิต YE โดยวิธี autolysis ที่ 45°ซ. และ พีเอช 5.5 โดยให้ค่า lysine สูงขึ้นกว่าที่ไม่ใช้ไคโตแซน จึงควรใช้วัตถุดิบเป็น F material และมีไคโตแซนอยู่ด้วย

ปัจจัยไคโตแซนที่ทดลองผลิตขึ้นในประเทศให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยอื่น คือให้ผลดีกับสภาพการผลิต YE ที่คัดเลือกได้ และไม่รบกวน autolysis ของยีสต์ จึงควรจัดให้มีการตรวจสอบเปรียบเทียบว่าการใช้ 'ไคโตแซน' ในช่วง autolysis ให้ผลดีต่อการผลิต YE หรือไม่

4.6 "การประเมินคุณภาพ In-house YE"

4.6.1 "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย"

4.6.1.1 ชุดควบคุม ให้ผลเป็นตามคาดคือ no-YE-PCA (ไม่มี YE) ให้ผลการเจริญต่ำ (MEM=3.6250)และต่ำกว่า imp-PCA (มี imported YE) (MEM=4.4857) ที่มี im-

ported YE ซึ่งคงเป็นเพราะว่า ชุดทดลองอื่นใช้อาหารที่มี YE เป็นองค์ประกอบ จึงมีคุณค่าอาหารมากกว่า

4.6.1.2 ชุดทดลอง in-PCA-N (มี NoAdd-YE) และ in-PCA-Al (มี Al-YE) เอื้อให้แบคทีเรียเจริญได้เท่ากัน โดยไม่แตกต่างทางสถิติ (P=.05) และดีกว่าชุดควบคุม imp-PCA ซึ่งสรุปได้ว่าเป็นเพราะ YE (in-house YE) ที่ผลิตขึ้นเอง ทั้งชนิด NoAdd-YE (YE ที่ขั้นเตรียมไม่มีการใส่แอลคาเลส หรือไคโตแซน) และ Al-YE (YE ที่ขั้นเตรียมมีการใส่แอลคาเลส) มีคุณภาพน่าจะดีกว่า imported YE ที่นำเข้าจากต่างประเทศ (Oxoid product code: LP0021) สำหรับกรณีแบคทีเรีย 8 ชนิดที่ทดสอบ เพราะ imp-PCA (MEM=4.4857) ให้ผลการเจริญของแบคทีเรียต่ำกว่า in-PCA-N (MEM=4.7464) และ in-PCA-Al (MEM=4.48973) สรุปว่า in-house-YE ที่ผลิตขึ้นน่าจะมีคุณภาพดีกว่า imp-PCA (ที่ใช้ imported YE)

4.6.1.3 ชุดทดลอง in-PCA-Chi ให้ผลไม่เป็นตามคาด เพราะให้ผลการเจริญต่ำสุด (MEM=2.2107) และต่ำกว่า no-YE-PCA (ชุดทดลองที่ไม่มี YE ในอาหารเพาะเลี้ยง) (MEM=3.6250) จึงตั้งสมมุติฐานว่า in-house YE น่าจะมีสารที่รบกวนการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ และคำอธิบายที่น่าเป็นไปได้มากสุดคือ สารไคโตแซนที่ใส่ในช่วง autolysis มีผลตกค้างอยู่ใน in-house YE ที่นำมาเตรียมใน in-PCA-Chi ทั้งนี้เพราะ ไคโตแซนที่ความเข้มข้นระดับหนึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Barrette, Champagne, and Goulet, (1999); Chen *et al.* (2002); Loosdrecht *et al.* (1987); Nam (2001)

4.6.1.4 in-house YE ที่ผลิตได้น่าจะมีคุณภาพดีกว่า imported YE จึงควรได้นำข้อมูลและวิธีการเตรียม YE ไปศึกษาต่อ หรือปฏิบัติผลิตจริงต่อไป

4.6.2 "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของยีสต์"

4.6.2.1 ชุดควบคุม ให้ผลเป็นตามคาดคือ no-YE-PCA (ไม่มี YE) ให้ผลการเจริญต่ำสุด (MEM=3.0857) เพราะไม่มี YE ในอาหาร จึงมีคุณค่าโภชนาการน้อยกว่า อีก 4 ชุดทดลองที่มี YE

4.6.2.2 ชุดทดลองที่ใช้ in-house YE ทั้งสามชนิดคือ in-YM-N, in-YM-Chi และ in-YM-Al ให้การเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สูงกว่า imp-YM (มี imported YE) ซึ่งเป็นชุดควบคุม ซึ่งเป็นเรื่องดี ที่ YE ผลิตขึ้นเอง (in-house YE) ให้การเจริญที่สูงกว่าชุดควบคุม imp-YM

4.6.2.3 ชุดทดลองที่ให้ผลการเจริญสูงสุดคือ in-PCA-Chi (ซึ่งมี Chi-YE) (MEM=4.4571) และระดับรองลงมาคือ in-YM-N (NoAdd-YE) และ in-YM-Al (Al-YE) ซึ่งให้ค่า MEM เป็น 4.2571 และ 4.3143 ซึ่งถือว่าไม่ต่างกันทางสถิติ (P=.05) แสดงว่า Chi-YE น่าจะให้ผลการเจริญสำหรับ *S. cerevisiae* ที่ดีกว่า NoAdd-YE และ Al-YE

4.6.2.4 กรณีทดสอบกับยีสต์นี้พบว่า in-house YE ทั้ง 3 ชนิดน่าจะมีคุณภาพดีกว่า จึงควรได้นำข้อมูลและวิธีการเตรียม YE ไปศึกษาต่อ หรือปฏิบัติผลิตจริงต่อไป

4.6.3 "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา"

4.6.3.1 ชุดควบคุม ให้ผลเป็นตามคาดคือ no-YE-YM ให้ผลการเจริญต่ำสุด เพราะไม่มี YE ในอาหาร จึงมีคุณค่าโภชนาการน้อยกว่า อีก 4 ชุดทดลองที่มี YE

4.6.3.2 สี่ชุดทดลองที่มี YE คือ imp-PCA, in-YM-N, in-YM-Chi และ in-YM-Al ให้ผลระดับการเจริญที่ไม่แตกต่างทางสถิติ จึงแสดงว่า YE ทั้งสองชนิดคือ in-house YE และ imported YE น่าจะมีคุณภาพเท่ากัน สำหรับราทั้งสองชนิด (ทั้งสี่ชุดทดลองต่างกันเฉพาะชนิดของ YE ที่ใช้ โดย in-house YE ใช้ใน in-YM-N, in-YM-Chi และ in-YM-Al ส่วน imp-PCA ใช้ imported YE ของ Oxoid)

4.6.3.3 ผลของชุดทดลอง in-YM-Chi ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ไม่ปรากฏในกรณีทดสอบกับรา ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า ไคโตแซนที่เชื่อว่าเป็นสาเหตุนั้น ไม่มีผลยับยั้งยีสต์ และรา

4.6.3.4 กรณีทดสอบกับรานี้พบว่า in-house YE ที่ผลิตได้น่าจะมีคุณภาพเท่ากับ imported YE จึงควรได้นำข้อมูลและวิธีการเตรียม YE ไปศึกษาต่อ หรือปฏิบัติผลิตจริงต่อไป

4.7 "สรุปรวม"

4.7.1 ตามสมมุติฐานเชื่อว่า "in-house YE มีคุณภาพใกล้เคียงกับ imported YE" และผลพบว่าเป็นจริงคือ in-house YE น่าจะมีคุณภาพที่ดีกว่า หรือใกล้เคียงกับ yeast extract powder ของ Oxoid (product code: CM0021) ที่ใช้ในชุดควบคุม ซึ่งเป็นไปตามสมมุติฐานการวิจัย กล่าวคือ ในกรณีของ "แบคทีเรีย และยีสต์" in-house YE ในรูป NoAdd-YE (ที่ใช้ใน in-PCA-N) ให้ผลดีกว่า โดยมีค่า MEM เป็น 4.78 ในกรณีของ "แบคทีเรีย" และ 4.25 ในกรณีของ "ยีสต์" ในขณะที่ MEM ของ imported YE (ที่ใช้ใน imp-PCA) เป็น 4.48 และ 3.74 ตามลำดับ ส่วนในกรณีของ "รา" คุณภาพของ in-house-YE และ imported YE ให้ผลไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของจุลินทรีย์" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ RCBD

ชนิด Yeast Extract	แบคทีเรีย	ยีสต์	รา
imported YE	4.4857	3.7429	42.0000[a]
NoAdd-YE	4.7893[a]	4.2571[a]	41.6000[a]
Chi-YE	2.2107	4.4571	41.9500[a]
Al-YE	4.7464[a]	4.3143[a]	41.9000[a]

หมายเหตุ [a] ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

4.7.2 ตามสมมุติฐานเชื่อว่า "แอลคาเลสน่าจะมีผลดีต่อการผลิต YE" แต่ผลพบว่า แอลคาเลสไม่ให้ผลดีในการผลิต YE เพราะจากค่าทางสถิติชี้ว่า in-house YE (มี Al-YE) ที่มีการใช้แอลคาเลสนั้น ไม่ได้ให้ผลดีกว่าที่ได้จาก NoAdd-YE ดังนั้นไม่น่าจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมสำหรับการใช้เอนไซม์นี้เพื่อการผลิต YE ในรูปแบบตามแนววิจัยนี้ เพราะต้องการต้นทุนสูงขึ้น และต้องการขั้นตอนดูแลมากกว่า

4.7.3 ตามสมมุติฐานเชื่อว่า "ไคโตแซนน่าจะมีผลดีต่อการผลิต YE" แต่ผลที่ได้คือ ไคโตแซนให้ผลดีเฉพาะต่อการผลิต YE สำหรับการเจริญของ *S. cerevisiae* เท่านั้น แต่เป็นผลลบต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 8 ชนิด และให้ผลไม่ต่างจาก YE ที่ไม่มีไคโตแซน สำหรับการเจริญของรา YE ชนิด Chi-YE ให้ผลดีที่สุดสำหรับ *S. cerevisiae* ซึ่งควรได้ศึกษาผลเพิ่มเติมกับยีสต์สายพันธุ์อื่น

4.7.4 ควรเลือกผลิต in-house YE ชนิด NoAdd-YE เพราะให้ผลการเจริญสูงสุดสำหรับทั้งแบคทีเรีย และราทดสอบ และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่า และมีความยุ่งยากน้อยกว่า

4.7.5 ได้ข้อมูลแนวทางในการพัฒนาการผลิต YE ผงที่ใช้วัสดุภายในประเทศ และมีความเป็นไปได้สูงในการผลิตขึ้นจริงภายในประเทศ เพราะต้นทุนการผลิตต่ำ และมีคุณภาพใกล้เคียงกับสินค้านำเข้า ทั้งเพื่อใช้ในประเทศ และเพื่อการส่งออก โดยมีราคาถูกกว่า

4.7.6 F material เหมาะสมในการผลิตเป็น "สารสกัดยีสต์ผง" ให้ lysine สูงสุด, ละลายน้ำได้ดี และไม่มีตะกอน จึงควรใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิต YE

บทที่ 5

ข้อเสนอแนะ

5.1 ควรได้มีการพัฒนาการผลิต YE ชนิด NoAdd-YE ขึ้น เพื่อเป็นสินค้า เนื่องจากจะให้ประโยชน์เชิงเศรษฐกิจแก่ประเทศ เพราะช่วยลดการนำเข้า, วัตถุดิบผลิตขึ้นในประเทศไทย, กระบวนการผลิตไม่ซับซ้อน, และมีความต้องการสูง นอกจากนั้น ประเทศไทยน่าจะมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่าประเทศผู้ผลิต จึงควรมีการผลิตสินค้านี้ขึ้น เพื่อประโยชน์เชิงเศรษฐกิจ

5.2 YE ไม่เพียงแต่ใช้ในวงการอาหารเพาะเลี้ยงเท่านั้น ยังใช้เป็นสารเพิ่มรสในอุตสาหกรรมอาหารได้อีกด้วย แม้ว่ายังไม่เป็นที่นิยมในประเทศ แต่ก็สามารถผลิตขึ้นเพื่อการส่งออกได้ ซึ่งมีใช้ในหลายประเทศ ซึ่งน่าจะเป็นอีกหนึ่งช่องทางการตลาด ของสินค้านี้

5.3 ควรได้มีการศึกษากับอาหารเพาะเลี้ยงอื่น และจุลินทรีย์อื่นเพิ่มเติม ซึ่งแนวโน้มน่าจะเป็นในทางที่สนับสนุนการผลิต YE ขึ้นเองในประเทศ

5.4 ควรได้ศึกษาถึงผลของไคโตแซนใน Chi-YE ที่ทำให้ยีสต์เจริญดีขึ้นกว่า in-house YE อื่น และหาความจริงว่าทำไมจึงมีผลยับยั้งแบคทีเรีย

บรรณานุกรม

Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. Agric. Food. Chem. Nov-Dec; 27(6):1256-62. PMID: 544653 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Akin, C., and R.M. Murphy. 1981. Method for Accelerating Autolysis of Yeast. United States Patent: 4,285,976. [Available URL: http://www.uspto.gov]

AOAC International. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arrington. V.A.

Barrette, J., C. P. Champagne, and J. Goulet. 1999. Development of Bacterial Contamination during Production of Yeast Extracts. Applied and Environmental Microbiology. 65 (7): 3261-3263.

Byrne, C., D. Doherty, A. Mooney, M. Byrne, D. Woodward, W. Johnson, F. Rodgers, and B. Bourke. 2001. Basis of the Superiority of Cefoperazone Amphotericin Teicoplanin for Isolating *Campylobacter upsaliensis* from Stools. Journal of Clinical Microbiology. 7 (39): 2713-2716.

Chao, K.C., E.F. McCarthy, and G.A. McConaghy. 1980. Yeast Autolysis Process. United States Patent: 4,218,481. [Available URL: http://www.uspto.gov]

Chen, Y.M., Y.C. Chung, L.W. Wang, K.T. Chen, S.Y. Li. 2002. Antibacterial Properties of Chitosan in Waterborne Pathogen. J. Environ. Sci. Health. 37: 1379-90. in CHUNG *et al.* 2004.

Chung, Y., Y. Su, C. Chen, G. Jia, H. Wang, J.C.G. Wu, and J. Lin. 2004. Relationship between Antibacterial Activity of Chitosan and Surface Characteristics of Cell Wall. Acta Pharmacol Sin. 25 (7): 932-936.

Conway, J., H. Gaudreau, C.P. Champagne. 2001. The Effect of the Addition of Proteases and Glucanases during Yeast Autolysis on the Production and Properties of Yeast Extracts. Can. J. Microbiol. 47: 18-24.

Corry, J.E.L., and H.I. Atabay. 1997. Comparison of the Productivity of Cefoperzone Amphotericin Teicoplanin (CAT) Agar and Modified Charcoal Cefoperzone Deoxycholate (mCCD) agar for various strains fo *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter pullorum*. International Journal of Food Microbiology. 38: 201-209.

Difco. 1984. Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology. In DIFCO Manual. 10thed. Difco Laboratories, Detroit. pp. 1133–1134. *in* Conway, Gaudreau, and Champagne (2001).

FDA (1995) Bacteriological Analytical Manual. 8thed. Revision A, 1998. AOAC International.

Johnson, L.G., and E.A. Murano. 1999. Development of a New Medium for the Isolation of *Arcobacter* spp. Journal of Food Protection. 62(5): 456-462.

Kado, H., T. Shibata, F. Kobayashi, and M. Kubota. 1980. Process for Producing Yeast Extract. United States Patent: 6,051,212. [Available URL: http://www.uspto.gov]

Kanegae, Y., Y. Sugiyama, and K. Minami. 1989. Method for Producing Yeast Extract. United States Patent: 4,810,509. [Available URL: http://www.uspto.gov]

Kelly, M. 1983. Yeast Extract. In Industrial Enzymology. The application of enzymes in industry. Edited by T. Godfrey, and J.Reichelt. M – The Nature Press, New York. pp. 457–464. *in* Conway, Gaudreau, and Champagne (2001).

Kociubinski, G., P. Pérez, and G. De Antoni. 1999. Screening of Bile Resistance and Bile Precipitation in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. Journal of Food Protection. 62(8): 905-912.

Kornacki, J.L. J.B. Gurtler, Z. Yan, and C.M. Cooper. 2003. Evaluation of Several Modifications of an Ecometric Technique for Assessment of Media Performance. Journal of Food Protection. 66 (9): 1727-1732(6).

Loosdrecht, M.M., J. Lyklema, W. Norde, A.J.B. Zehnder. 1987. The Role of Bacteria Cell Wall Hydrophilicity in Adhesion. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1893-98.

Mossel, D.A.A., F. van Rossem, M. Koopmans, M. Hendriks, M. Verouden, and I. Eelderink. 1980. Quality Control of Solid Culture Media: A Comparison of the Classic and the So-called Ecometric Technique. Journal of Applied Bacteriology. 49: 439-454.

Mossel, D.A.A., T.M.G. Gonants-Van Laarhoven, A.M.Th. Ligtenbert-Merkus, and M.E.B. Werdler. 1983. Quantitative Assurance of Selective Culture Media for Bacteria, Moulds and Yeasts: An Attempt at Standardization at the International Level. J. Appl. Bacteriol. 54: 313-327.

Nagodawithana, T. 1992. Yeast-derived Flavors and Flavor Enhancers and Their Probable Mode of Action. Food Technol. 46(11): 138–143. *in* Conway, Gaudreau, and Champagne (2001).

Nam, K.S. 2001. Evaluation of the Antimutagenic Potential of Chitosan Oligosaccharide: Rec, Ames, and Umu tests. Biotechnol. Lett. 23: 971-75. in CHUNG *et al.* 2004.

Origane, A., and T. Sato. 1993. Production of Yeast Extract. United States Patent: 5,188,852. [Available URL: http://www.uspto.gov]

Peppler, H.J. 1982. Yeast Extracts. Econ. Microbiol. 7:293-312.

Presser, K.A., T. Ross, and D.A. Ratkowsky. 1998. Modelling the Growth Limits (Growth/No Growth Interface) of *Escherichia coli* as a Function of Temperature, pH, Lactic Acid Concentration, and Water Activity. Appl. Environ. Microbiol. 64 (5): 1773–1779.

Sudarshan, N.R., D.G. Hoover, and D. Knorr. 1992. Antibacterial Action of Chitosan. Food Biotechnol. 6:257-272.

Sugimoto, H., H. Takeuchi, and T. Yokotsuka. 1976. Process for Autolysis of Yeast. United States Patent: 3,961,080. [Available URL: http://www.uspto.gov]

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ปริมาณ Lysine ในการคัดเลือกแหล่งวัตถุดิบ

	Lysine (มก.) ชั่วโมงที่: (Autolysis ที่ 45°ซ. และพีเอช 8.5)							
แหล่งวัตถุดิบ	0	2	4	6	8	10	14	24
F Material	0.90	1.04	1.43	1.65	1.95	2.11	2.11	2.03
S Material	0.66	0.65	0.71	0.79	0.82	0.94	1.12	1.14
Sd Material	0.30	0.31	0.35	0.41	0.55	0.61	0.64	0.70
D Material	0.42	0.43	0.40	0.38	0.47	0.69	0.72	0.77

ตารางที่ 2 ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิ

	Lysine (มก.) ชั่วโมงที่ (Autolysis ที่พีเอช 8.5)							
อุณหภูมิ	0	2	4	6	8	10	14	24
30	0.89	0fs9	1.22	1.39	1.57	1.51	1.50	1.53
40	0.89	1.01	1.31	1.56	1.96	2.06	2.04	1.92
45	0.89	1.04	1.46	1.66	2.02	2.16	2.14	1.98
50	0.89	0.94	1.30	1.48	1.75	1.89	1.87	1.82
60	0.87	0.90	1.03	1.01	1.08	1.11	1.11	1.22

ตารางที่ 3 ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบผลของพีเอช

	Lysine (มก.) ชั่วโมงที่ (Autolysis ที่อุณหภูมิ 45°ซ.)							
พีเอช	0	2	4	6	8	10	14	24
5.5	0.88	1.20	1.57	1.82	2.24	2.34	2.48	2.41
7.0	0.87	1.11	1.44	1.77	2.11	2.20	2.24	2.01
8.5	0.87	1.02	1.38	1.60	1.97	2.14	2.09	1.92

ตารางที่ 4 ปริมาณ Lysine ในการเปรียบเทียบผลของแอลคาเลส

	Lysine (มก.) ชั่วโมงที่ (Autolysis ที่อุณหภูมิ 45°ซ. , พีเอช 8.5)							
Material	0	2	4	6	8	10	14	24
F Material	0.87	1.02	1.39	1.64	2.00	2.22	2.11	1.90
F Material + Al	0.95	1.29	1.88	2.37	2.46	2.82	2.76	2.98
S Material	0.70	0.73	0.80	0.83	0.90	0.99	1.19	1.20
S Material + Al	0.88	0.92	1.03	1.23	1.34	1.66	1.82	2.06
D Material	0.42	0.40	0.44	0.48	0.50	0.69	0.70	0.74
D Material + Al	0.42	0.42	0.45	0.47	0.53	0.77	0.82	0.89

ตารางที่ 5 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ ANOVA ตามแผนการทดลองแบบ CRD

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ENTEROB	Between Groups	31.120	4	7.780	816.900	.000
	Within Groups	.286	30	.010		
	Total	31.406	34			
E.COLI	Between Groups	37.307	4	9.327	1165.857	.000
	Within Groups	.240	30	.008		
	Total	37.547	34			
FLAVO	Between Groups	33.296	4	8.324	753.466	.000
	Within Groups	.331	30	.011		
	Total	33.627	34			
PROTEUS	Between Groups	30.681	4	7.670	544.176	.000
	Within Groups	.423	30	.014		
	Total	31.104	34			
PSEUDO	Between Groups	39.056	4	9.764	800.953	.000
	Within Groups	.366	30	.012		
	Total	39.422	34			
SAL	Between Groups	39.207	4	9.802	756.750	.000
	Within Groups	.389	30	.013		
	Total	39.595	34			
SHIG	Between Groups	35.333	4	8.833	1008.130	.000
	Within Groups	.263	30	.009		
	Total	35.595	34			
STAP	Between Groups	29.250	4	7.313	349.009	.000
	Within Groups	.629	30	.021		
	Total	29.879	34			

ตารางที่ 6 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test ตามแผนการทดลองแบบ CRD (*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048)

TREATMENT		N	Subset for alpha =.05			
			1	2	3	4
Duncan[a]	in-PCA-Chi	7	2.3429			
	no-YE-PCA	7		3.4000		
	imp-PCA	7			4.4571	
	in-PCA-N	7				4.7429
	in-PCA-Al	7				4.7714
	Sig.		1.000	1.000	1.000	.588

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

[a] Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

ตารางที่ 7 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ CRD (*Escherichia coli* ATCC 25922)

TREATMENT		N	Subset for alpha =.05		
			1	2	3
Duncan[a]	in-PCA-Chi	7	2.3143		
	no-YE-PCA	7		4.5143	
	imp-PCA	7			4.9714
	in-PCA-N	7			4.9714
	in-PCA-Al	7			4.9714
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

[a] Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

ตารางที่ 8 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ CRD (*Flavobacterium* sp.)

TREATMENT		N	Subset for alpha =.05			
			1	2	3	4
Duncan[a]	in-PCA-Chi	7	2.2000			
	no-YE-PCA	7		3.4571		
	imp-PCA	7			4.5143	
	in-PCA-Al	7			4.5143	
	in-PCA-N	7				4.8571
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

[a] Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

ตารางที่ 9 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ CRD (*Proteus mirabilis* ATCC 7002)

TREATMENT		N	Subset for alpha = .05				
			1	2	3	4	5
Duncan[a]	in-PCA-Chi	7	2.3143				
	no-YE-PCA	7		3.5429			
	imp-PCA	7			4.4286		
	in-PCA-N	7				4.6857	
	in-PCA-Al	7					4.8286
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

[a] Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

ตารางที่ 10 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ CRD (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)

	TREATMENT	N	Subset for alpha =.05		
			1	2	3
Duncan[a]	in-PCA-Chi	7	2.2000		
	no-YE-PCA	7		4.3429	
	in-PCA-Al	7			4.8571
	imp-PCA	7			4.9429
	in-PCA-N	7			4.9714
	Sig.		1.000	1.000	.076

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

[a] Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

ตารางที่ 11 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ CRD (*Salmonella typhimurium* ATCC 13311)

	TREATMENT	N	Subset for alpha = .05				
			1	2	3	4	5
Duncan[a]	in-PCA-Chi	7	2.0286				
	no-YE-PCA	7		3.2286			
	imp-PCA	7			4.2286		
	in-PCA-N	7				4.7143	
	in-PCA-Al	7					4.8571
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

[a] Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

ตารางที่ 12 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ CRD (*Shigella flexneri* ATCC 12022)

TREATMENT		N	Subset for alpha = .05				
			1	2	3	4	5
Duncan[a]	in-PCA-Chi	7	2.0000				
	no-YE-PCA	7		3.2286			
	imp-PCA	7			4.2286		
	in-PCA-Al	7				4.4571	
	in-PCA-N	7					4.7429
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

[a] Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

ตารางที่ 13 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ CRD (*Staphylococcus aureus*)

TREATMENT		N	Subset for alpha =.05			
			1	2	3	4
Duncan[a]	in-PCA-Chi	7	2.2857			
	no-YE-PCA	7		3.2857		
	imp-PCA	7			4.1143	
	in-PCA-N	7				4.6286
	in-PCA-Al	7				4.7143
	Sig.		1.000	1.000	1.000	.277

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

[a] Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

ตารางที่ 14 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ RCBD

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: เชื้อ

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	4694.455[a]	12	391.205	8777.447	.000
TRT	266.231	4	66.558	1493.357	.000
BLK	11.995	7	1.714	38.449	.000
Error	11.945	268	4.457E-02		
Total	4706.400	280			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .997)

ตารางที่ 15 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของแบคทีเรีย" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ RCBD

Duncan[a,b]

TREATMENT	N	Subset 1	2	3	4
in-PCA-Chi	56	2.2107			
no-YE-PCA	56		3.6250		
imp-PCA	56			4.4857	
in-PCA-Al	56				4.7464
in-PCA-N	56				4.7893
Sig.		1.000	1.000	1.000	.284

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square (Error) = 4.457E-02

[a] Uses Harmonic Mean Sample Size = 56.000.

[b] Alpha = .05.

ตารางที่ 16 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของยีสต์" โดยใช้สถิติ ANOVA ตามแผนการทดลองแบบ CRD

ANOVA

SACCHARO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.903	4	2.226	216.389	.000
Within Groups	.309	30	.010		
Total	9.211	34			

ตารางที่ 17 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของยีสต์" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test ตามแผนการทดลองแบบ CRD (*Saccharomyces cerevisiae*)

Duncan[a]

TREATMENT	N	Subset			
		1	2	3	4
no-YE-YM	7	3.0857			
imp-YM	7		3.7429		
in-YM-N	7			4.2571	
in-YM-Al	7			4.3143	
in-YM-Chi	7				4.4571
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

[a] Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.000.

ตารางที่ 18 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา" โดยใช้สถิติ ANOVA ตามแผนการทดลองแบบ CRD

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ASPERGIL	Between Groups	1.560	4	.390	175.500	.000
	Within Groups	.100	45	.002		
	Total	1.660	49			
PENICILI	Between Groups	.811	4	.203	48.778	.000
	Within Groups	.187	45	.004		
	Total	.998	49			

ตารางที่ 19 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test ตามแผนการทดลองแบบ CRD *(Aspergillus niger)*

Duncan[a]

TREATMENT	N	Subset for alpha =.05		
		1	2	3
no-YE-YM	10	44.1000		
in-YM-N	10		48.2000	
in-YM-Al	10		48.3000	
in-YM-Chi	10		48.5000	48.5000
Imp-YM	10			48.9000
Sig.		1.000	.186	.064

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000

ตารางที่ 20 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test ตามแผนการทดลองแบบ CRD *(Penicillium* sp.)

Duncan[a]

TREATMENT	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
no-YE-YM	10	32.1000	
in-YM-N	10		35.0000
imp-YM	10		35.1000
in-YM-Chi	10		35.4000
in-YM-Al	10		35.5000
Sig.		1.000	.120

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000

ตารางที่ 21 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา" โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยใช้สถิติ RCBD

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: เชื้อ

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	1734.437[a]	6	289.073	72771.40	.000
TREAT	2.284	4	.571	143.769	.000
BLK	42.120	1	42.120	10603.35	.000
Error	.373	94	3.972E-03		
Total	1734.810	100			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

ตารางที่ 22 ผล "การเปรียบเทียบคุณภาพ YE โดยวัดการเจริญของรา" โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test แบบ RCBD

Duncan[a, b]

TREATMENT	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
no-YE-YM	20	38.100	
in-YM-N	20		41.600
in-YM-Al	20		41.900
in-YM-Chi	20		41.950
imp-YM	20		42.000
Sig.		1.000	.069

Means for groups in homogeneous subsets are displayed based on Type III Sum of Squares.
The error term is Mean Square (Error) = 3.972E-03.

[a] Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.000.

ข้อมูลไคโตแซน

- ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Eland Corporation Ltd., 142/58/67 ถ. ติวานนท์, ต. ท่าทราย, อ. เมือง, จ. นนทบุรี, 11000
- ชนิด: Micronized chitosan
- ผลิตจาก fresh shrimp และ crab shell
- Appearance: white powder
- Micronied powder: 120 mesh sive
- Odor: odorless
- Deacetylation degree: 90% max
- Solubility: Soluble in organic acid
- Moisture: 0% nmax
- Viscosity (1% solution/1% acid): 50 cps
- Ash conten: 2% max (with calcium supplements)
- Heavy Metals: 10 ppm max
- Total plate count: less than 10,000/g
- *E. coli*: absent
- Coliform bacteria: absent
- Salmonella: absent
- Mold and yeast: less than 100/g

การวัดปริมาณ Lysine ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979)

วิธีนี้นิยมใช้ทั่วไปในการวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร หรือวิเคราะห์ระดับการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของโปรตีน หรือเปบไทด์ เป็นกรดอะมิโนอิสระ (free amino group) โดยใช้สาร TNBS (trinitrobenzenesulfonic acid) ในการทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนในสภาพ unprotonated state เท่านั้น ค่าที่วัดจึงแปรผันโดยตรงกับ 'หมู่อะมิโน/กรดอะมิโน' ที่เกิดขึ้น วิธีนี้จึงสามารถวัดปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา hydrolysis ของโปรตีนยีสต์ ซึ่งสะท้อนโดยตรงต่อระดับ autolysis ของเซลล์ยีสต์ วิธีนี้ให้ผลแม่น (precision), เที่ยง (accurate) และไว (sensitive) TNBS ทำปฏิกิริยาภายใต้สภาพด่างเล็กน้อยทำให้ได้ chromophore สภาพพีเอชที่เป็นกรดทำให้ปฏิกิริยาระหว่าง TNBS และ free amino group หยุด ระดับความเข้มของ chromophore วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 nm วิธีการมีดังนี้

1. นำตัวอย่าง 500 µl ที่บรรจุในหลอดฝาเกลียวไปแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 90°ซ. เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปิดหลอดให้สนิท
2. นำเฉพาะส่วนใส หลังการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที มาเจือจางด้วย 1% sodium dodecyl sulfate ตามความเหมาะสมเพื่อให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.25-2.5x10^{-3} amino equivalent/L
3. ผสมตัวอย่างปริมาตร 125 µL กับ 1.00 mL ของ 0.2125 M sodium phosphate buffer (pH 8.2) และ 1.00 mL ของ 0.100% TNBS(trinitrobenzenesulfonic acid) จากนั้นบ่มที่ 50°ซ. ในสภาพมืดเป็นเวลา 60 นาที
4. เติม 2.00 mL ของ 0.100 M HCl และอ่านค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 340 nm โดยใช้ l-leucine solution เป็นมาตรฐานในการสร้างกราฟมาตรฐาน

หมายเหตุ: ทุกครั้งที่วัด มีตัวอย่างควบคุม และต้องได้ค่า R^2 ของกราฟมาตรฐานในช่วง 0.9950-1.000 ในช่วง 0.25-2.00 mM

ประวัติผู้วิจัย

นายคมสัน พิระภัทรุ่งสุริยา เป็นอาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เกิดเมื่อ ๑๖ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๐๖ ระดับการศึกษา และสถาบันที่จบคือ มัธยมปลาย, อุดมศึกษาระดับปริญญาตรี, โท และเอก ตามลำดับดังนี้คือ 'โรงเรียนกองทัพบกอุปถัมภ์ช่างกลขนส่งทหารบก (๒๕๒๔),' มหาวิทยาลัยรามคำแหง(๒๕๓๐), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (๒๕๓๔), และ Edinburgh University (๒๕๔๑) ปัจจุบันปฏิงานตำแหน่งอาจารย์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, อ. เมือง, จ. นครราชสีมา, ๑๑๐๐๐ โทรศัพท์: ๐๔๔-๒๒-๔๒๕๔; แฟกซ์: ๐๔๔-๒๒-๔๖๓๓; E-mail: komson@ccs.sut.ac.th ผลงานวิจัย: (๑) K. Pirapatrungsuriya. 1993. Improvement of *Pichia stipitis* CBS5773 through Mutation and Ethanol Fermentation from the Mixture of D-Glucose and D-Xylose by the Mutant. International Symposium of the 20th Anniversary of International Post-Graduate University Course in Microbiology. Osaka University, Japan. (๒) K. Pirapatrungsuriya, CJ Thomson and SGB Amyes. 1996. *GyrA* Mutations causing ciprofloxacin-resistance in *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sakazakii*, and *Escherichia coli* isolated in Malaysia and Thailand. 5th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases (WPCCID). Singapore. (๓) K. Pirapatrungsuriya. Antibiotic-Fluoroquinolone-resistant sequence of *gyrA* and *ParC* of *Moraxella catarrhalis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sakazakii*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter sakazakii*. Available at National Center for Biotechnology Information URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez.