สรุป

1. <u>การคัดเลือก *Saccharomyces serevisiae* สายพันธุ์ที่มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูง และชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคน</u>

จากการนำ *S. cerevisiae* 10 สายพันธุ์ คือ AM12, F65UV89, M30, MRF44, MR195, MRF65, RL6, Sc90, TJ1 และ TJ3 มาคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD และอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรับ pH (pH 5.3) ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 0.5 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เพาะเลี้ยงโดยบ่มเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ที่มีบีตา-กลูแคนที่ผนังสูงที่สุดในอาหารทั้งสองชนิดคือ *S. cerevisiae* TJ3 ซึ่งมีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ 108.1 และ 89.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD และอาหารเหลวกากน้ำตาลตามลำดับ เมื่อพิจารณาชนิดของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง พบว่าอาหารเหลว YPD เป็นอาหารสังเคราะห์ซึ่งมีราคาสูง ในขณะที่อาหารเหลวกากน้ำตาลเตรียมได้จากกากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาล จึงมีราคาถูกกว่ามาก ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลสำหรับศึกษาการผลิตบีตา-กลูแคนด้วย *S. cerevisiae* TJ3

2. <u>การศึกษา pH องค์ประกอบของอาหารเหลวกากน้ำตาล และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* TJ3 โดยการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์</u>

จากการศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนด้วย *S. cerevisiae* TJ3 โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีพบว่าเมื่อใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่ไม่ปรับ pH (pH 5.3) *S. cerevisiae* TJ3 ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูง และมีความสะดวกเมื่อขยายขนาดการผลิต ดังนั้นจึงเลือกอาหารเหลวกากน้ำตาลไม่ปรับ pH ในการผลิตบีตา-กลูแคนด้วย *S. cerevisiae* TJ3

เมื่อศึกษาผลของน้ำตาล 1 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวกากน้ำตาล พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลตั้งแต่ 2 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปเชื้อเจริญให้เซลล์ไม่แตกต่างกันและเซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ใกล้เคียงกัน มีผลให้การผลิตบีตา-กลูแคนจึงใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลิตบีตา-กลูแคนโดย *S. cerevisiae* TJ3

เมื่อศึกษาปริมาณและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* TJ3 พบว่าการใช้ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ หรือแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากัน *S. cerevisiae* TJ3 มีการเจริญให้เซลล์สูงที่สุดเท่ากันคือ 6.0 กรัมต่อลิตร แต่การใช้ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มีบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์สูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 เปอร์เซ็นต์ จึงส่งผลให้การผลิตบีตา-กลูแคนสูงกว่าตามไปด้วย คือ 853.3 และ 600.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นยูเรียความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ จึงเหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนด้วย *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาล

เมื่อศึกษาปริมาณฟอสเฟตในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนด้วย *S. cerevisiae* TJ3 พบว่าเมื่ออาหารเหลวกากน้ำตาลมีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นสูงขึ้นปริมาณบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* TJ3 ลดลง แต่เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงพิจารณาที่การผลิตบีตา-กลูแคนซึ่งพบว่าเมื่ออาหารเหลวกากน้ำตาลมีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนที่สุด คือผลิตได้ 924.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นต่อการผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* TJ3 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นลดลง เซลล์มีการเจริญช้า แต่เซลล์ที่ได้มากขึ้นเล็กน้อย เช่นเดียวกับการผลิตบีตา-กลูแคน โดยความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 0.5 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงที่สุด คือ 964.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* TJ3 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนคือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งผลิตบีตา-กลูแคนได้ 1,215.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้นองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* TJ3 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาล 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร และบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที คืออาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 เปอร์เซ็นต์ และสภาวะที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 0.5 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่ง *S. cerevisiae* TJ3 ผลิตบีตา-กลูแคนได้ 1,215.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. <u>การคัดเลือกชนิดของถังหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* TJ3 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์</u>

จากการศึกษาการใช้ถังหมักแบบถังกวนขนาด 4 ลิตรที่บรรจุอาหารเหลวกากน้ำตาล 3 ลิตร ในการผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* TJ3 พบว่าไม่มีความเหมาะสม เพราะเซลล์เจริญน้อย การผลิตบีตา-กลูแคนจึงน้อยตามไปด้วย ในขณะที่เมื่อใช้ถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 6 ลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวกากน้ำตาล 3 ลิตร สามารถผลิตบีตา-กลูแคนได้ดีกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้ถังหมักแบบอากาศลอยตัวสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

4. <u>การพัฒนาถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* TJ3 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์</u>

พัฒนาถังหมักแบบอากาศลอยตัวที่มีความสูง 28 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 16.5 เซนติเมตร ติดตั้งหัวจ่ายอากาศสูงจากก้นถัง 2 เซนติเมตร ให้มีความเหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* TJ3 พบว่าถังหมักที่เหมาะสมสำหรับการผลิตบีตา-กลูแคนคือ มีอัตราส่วน H_b/D_t เท่ากับ 4 มีอัตราส่วน H_{dt}/H_m เท่ากับ 1.4 และมีอัตราส่วน D_{dt}/D_t เท่ากับ 1.65 ซึ่งจากการใช้ถังหมักที่พัฒนาขึ้นเพื่อเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 โดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีองค์ประกอบที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้อ 3. และใช้เซลล์เริ่มต้นเท่ากับความขุ่น 0.5 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรผลิตบีตา-กลูแคนได้ 1,004.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งอาจเกิดจากการใช้ draught tube สูง ปริมาตรอาหารเหลวกากน้ำตาลที่อยู่เหนือ draught tube จึงน้อยที่สุด น้ำหนักของอาหารเหลวกากน้ำตาลที่กดทับอาหารเหลวกากน้ำตาลที่อยู่ภายใน draught tube จึงน้อยที่สุด การส่งผ่านอาหารเหลวกากน้ำตาลจากก้นถังผ่าน

ภายใน draught tube ขึ้นไปสู่ผิวอาหารเหลวกากน้ำตาลแล้วหมุนเวียนกลับสู่ก้นถังหมักจึงง่ายกว่าถังหมักที่มี draught tube ความสูงน้อย และการที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ draught tube ที่มากขึ้นทำให้ส่วน downcomer มีขนาดเล็กลง จึงรับกระแสการไหลของอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ผ่านออกมาจาก draught tube ได้เต็มที่ การหมุนเวียนอาหารเหลวกากน้ำตาลเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องหรือกล่าวคือมีบริเวณที่อาหารเหลวอยู่นิ่งน้อยลง อาหารเหลวกากน้ำตาลจึงหมุนเวียนได้มาก การผลิตบีตา-กลูแคนจึงมากตามไปด้วย

5. <u>การผลิตบีตา-กลูแคนของ *S. cerevisiae* TJ3 ในถังหมักแบบอากาศลอยตัวขนาด 150 ลิตร โดยการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์และแบบเฟดแบตช์</u>

จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบแบตช์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์เจริญและผลิตบีตา-กลูแคนได้เร็ว สามารถผลิตบีตา-กลูแคนได้ 764.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 20 แต่เนื่องจากน้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลหมดไปตั้งแต่ในช่วง 12 ชั่วโมงแรก จึงไม่สามารถเพิ่มการผลิตขึ้นไปได้อีก ดังนั้นจึงทำการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบแบตช์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์เจริญและผลิตบีตา-กลูแคนได้ใกล้เคียงกับเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์คือ ผลิตบีตา-กลูแคนได้ 783.3 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ยังมีน้ำตาลเหลืออยู่ในอาหารพอสมควร จึงเลือกใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มการผลิตบีตา-กลูแคนด้วยการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบเฟด-แบตช์

สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์โดยการเติมอาหาร 3 แบบ ได้ผลดังนี้

(1) การเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ linear incremental feeding พบว่าในชั่วโมงที่ 20 ซึ่งเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลไป 2 ครั้ง ใช้น้ำตาลเพียง 2.9 เปอร์เซ็นต์ *S. cerevisiae* TJ3 ผลิตบีตา-กลูแคนสูงที่สุด 1,165.4 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อมีการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลในครั้งต่อๆ ไป ไม่สามารถเพิ่มการผลิตบีตา-กลูแคนได้

(2) การเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ exponential incremental feeding พบว่าในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลไป 4 ครั้ง ใช้น้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตบีตา-กลูแคนสูงที่สุด 991.8

มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่าการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาล 3 ครั้งแรกปริมาตรอาหารที่ใช้น้อยมาก น้ำตาลในอาหารไม่สูงขึ้น การผลิตบีตา-กลูแคนจึงไม่สูงนัก แต่เมื่อเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลครั้งที่ 4 ซึ่งใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลปริมาตรสูง น้ำตาลในอาหารเหลวกากน้ำตาลสูงขึ้นมาก การผลิตบีตา-กลูแคนจึงเริ่มสูงขึ้น แต่ระยะเวลาที่ใช้ค่อนข้างนาน

(3) การเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ sigmoidal incremental feeding พบว่าในชั่วโมงที่ 40 ซึ่งเติมอาหารเหลวกากน้ำตาลไป 4 ครั้ง ใช้น้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตบีตา-กลูแคนสูงที่สุด 1,038.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่าการเติมอาหารเหลวกากน้ำตาล 3 ครั้งแรกปริมาตรอาหารที่ใช้ไม่มากนัก น้ำตาลในอาหารสูงขึ้นเล็กน้อย การผลิตบีตา-กลูแคนจึงดำเนินอย่างช้าๆ แต่มีความต่อเนื่อง

จากการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบแบตช์ (ใช้น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์) และเฟด-แบตช์ (ใช้น้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์) พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ที่เติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ linear incremental feeding ใช้เวลาในการผลิตสั้น แต่ได้บีตา-กลูแคนสูง ใช้น้ำตาลไม่มากนักคือใช้เพียงแค่ 2.9 เปอร์เซ็นต์ จึงมีความเหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนด้วย *S. cerevisiae* TJ3 มากที่สุด การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์เป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจเพราะใช้เวลาในการผลิตสั้น และใช้น้ำตาลน้อยเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ แต่ได้บีตา-กลูแคนต่ำกว่าวิธีอื่นในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ที่เติมอาหารเหลวกากน้ำตาลแบบ exponential incremental feeding และ sigmoidal incremental feeding แม้จะผลิตบีตา-กลูแคนได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ แต่ใช้เวลาในการผลิตที่ยาวนานและใช้น้ำตาลในการผลิตสูงกว่ามาก จึงมีความเหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนน้อย

จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* TJ3 แบบแบตช์และเฟด-แบตช์ พบว่าอุณหภูมิภายในถังหมักสูงมาก โดยสามารถสูงถึง 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานหลายชั่วโมง ซึ่งอุณหภูมิดังกล่าวไม่เหมาะสมต่อการผลิตบีตา-กลูแคนด้วย *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาล ดังนั้นการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมอาจเพิ่มการผลิตบีตา-กลูแคนด้วย *S. cerevisiae* TJ3 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

วิศัลย์ อินชนบท. 2546. **การผลิตยีสต์อาหารสัตว์ด้วยถังหมักระบบอากาศลอยตัวร่วมกับการหมักแบบเฟด-แบตช์ โดยใช้ยีสต์ตกตะกอนที่ทนอุณหภูมิสูง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมใจ ศิริโภค. 2537. **เทคโนโลยีการหมัก**. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพฯ.

สาโรจน์ ศิริศันสนีย์กุล. 2544. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน2**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Abadias M., N. Teixido, J. Usall and I. Vinas. 2003. **Optimization of growth conditions of the postharvest biocontrol agent Candida sake CPA-1 in a lab-scale fermenter**. J. Appl. Microbiol. 95: 301–309.

Anomymous. n.d.a. **Beta-glucan**. Available Source:http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/22940/Yeast_Beta_Glucan_Structure.gif, November 25, 2006.

_____. n.d.c. **Whey**. Available Source:http://www.innovatewithdairy.com/InnovateWithDairy/Articles/IF_Facts_Whey_062905.htm, November 25, 2006.

_____. n.d.d. **Sugar_cane**. Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Sugar_cane.htm, November 25, 2006.

_____. n.d.e. **molasses_composition**. Available Source: http://www.suga-lik.com/molasses/composition.html, November 25, 2006.

Ahsen Baig Mirza, K. Shafiq, S. Mirza, S. Ali and I. Haq. 2003. **Effect of urea as an inducer of fructofuranosidase in *Saccharomyces* fermentation**. Pak. J. Nutri. 2 (2): 106-108.

Babineau, T. J., A. Hackford and A. Kenler 1994. **A phase II multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of three dosages of an immunomodulator (PGG-glucan) in high-risk surgical patients**. Arch. Surg. 129: 1204-1210.

Bai, F. W., L. T.Chen, W. A. Anderson and M. Moo-Young 2004. **Parameter oscillations in a very high gravity medium continuous ethanol fermentation and their attention on a multistage packed column bioreator system**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 88(5): 442-448.

Bohn, J. A. and J. N BeMiller. 1995. **(1,3)-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships**. Carbohydr. Polym. 28: 3–14.

Butshek, G. and G. K. Zellstoffablaugen. 1962. **Zellstoffablaugen**. In Die Hefen. Verlag. Hans. Carl, Nuremberg, Germany.

Chorvatovičová , D., Z. Kovacikova, J. Šandula and J. Navarova. 1993. **Protective effect of sulfoethylglucan against hexavalent chromium**. Mutation Res. 302: 207–211.

_____ and J. Šandola. 1995. **Effect of carboxymethyl-chitin glucan on cyclophosphamide induced mutagenicity**. Mutation Res. 346: 43–48.

Dallies, N., Francois J. and V. Paquet. 1998. **A new method for quatitative determination of polysaccharide in the yeast cell wall**. Yeast. 14: 1297-1306.

Demirci, L., A. Pometto and J. Donald Cox. 1999. **Enhanced Organically Bound Selenium Yeast Production by Fed-Batch Fermentation**. J. Agric. Food Chem. 47: 2496-2500.

Dunyak Stephen A. and M. Thomas Cook. 1985. **Continuous fermenter growth of a methionine-overproducing mutant of *Candida utilis***. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21:182-186.

Engstad Rolf E., B. Robertsen and E. Frivold. 1992. **Yeast glucan induce increase in lysozyme and complement mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood**. Fish & Shellfish immunol. 2: 287-297.

Flieger, M., M. Kantorova, T. Benesova, S. Pazoutova and J. Votruba. 2003. **Kinetic of soluble glucan production by *Claviceps viridis***. Folia. Microbiol. 48(5): 633-638.

Freimund Stefan, M. Suater, O. Kappeli and H. Dutler. **A new non-degrading isolation process for 1,3-3/4 D-glucan of high purity from baker 's yeast *Saccharomyces cerevisiae***. Carbohydr. Polymers. 54: 159-171.

Gelinas, P. and J. Barrette J. 2007. **Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation**. Bioresour. Technol. 98: 1138–1143.

Goksungur and Zorlu. 2001. **Production of ethanol from beet molasses by Ca-alginate Immobilized yeast cells in a packed-bed Bioreactor**. Turk. J. Biol. 25: 265-275.

Gough, S, O. Flynn., C. J. Hack and R. Marchant. 1996. **Fermentation of molasses using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3: simplex optimization of media supplements**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46:187-190.

Ha, C.H., K.H. Lim, Y.T. Kim, S.T. Lim, C.W. Kim and H.I. Chang. 2002. **Analysis of alkali-soluble glucan produced by *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutants**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 370–377.

Hoek, Y.D., J.P. Van Dijken and J.T. Pronk. 1999. **Fermentataion capacity in high-cell-density fed-batch culture of baker's yeast**. Biotechnol. Bioeng. 68: 517-523.

Hofer, M., M. Pospisil, I. Pipalova, J. Hola and J. Sandula. 1995. **Hemopoiesis-enhancing effects of repeatedly administered carboxymethylglucan in mice exposed to fractionated irradiation**. Folia Biologica. 41: 249–256.

Inoue, S.B., N. Takewaki, T. Takasuka, T. Mio, M. Adachi, Y. Fujii, C. Miyamoto, M. Arisawa, Y. Furuichi and T. Watanabe. 1995. **Characterization and gene cloning of 1,3-D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae***. Eur. J. Biochem. 231: 845–854.

Jahic, M., W. Fredrik, B. Monika, G. Percival and E. Sven-Olof. 2003. **Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures**. Microb. Cell Fact. 2(6): 221-226.

Jin, B., Yu Q. and J. Leeuwen. 2001. **A bioprocessing mode for simultaneous fungal biomass protein production and wastewater treatment using an external air-lift bioreactor**. J. Chem. Tech & Biotechnol. 76(10): 1041-1048.

_____ and Yan X.Q. 2001. **Characterization and improvement of oxygen transfer in pilot plant external air-lift bioreactor for mycelial biomass production**. World. J. Microbiol. Biotechnol. 17(3): 265-272.

Kapteyn, J.C., R.C. Montijn, E. Vink, A. Llobell, J.E. Douwes, H. Shimoi, P.N. Lipke and F.M. Klis. 1996. **Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked β-1,3-/β-1,6- glucan heteropolymer**. Glycobiol. 6: 337–345.

Kerckhoffs, A., AJM. Daniëlle, H. Gerard and R.P Mensink. 2003. **Cholesterol-lowering effect of beta-glucan from oat bran in mildly hypercholesterolemic subjects may decrease when beta-glucan is incorporated into bread and cookies**. Am J Clin Nutr. 78:221–227

Khunrae, P. 2001. **Preparation of brewer's yeast glucan with a potential application as an immunostimulant for the black tiger shrimp (Penaues monodon)**. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science (Biotechnology). Faculty of graduated studies. Mahidol university.

Kim Joong, K., T. Keon-Tae and M. Jung-Hye. 1998. **A continuous fermentation of *Kluyveromyces fragilis* for the production of a highly nutritious protein diet**. Aquacultural Engineering. 18 : 41–49

Kim Kwang, S. and S. Hyun Yun. 2006. **Production of soluble beta-glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae***. Enzyme and Microbial Technology. 39: 496–500.

Klein, J., S. Andrej , A. Antonio Vicente and A. José. Teixeira. 2002. **Hydrodynamic considerations in three-phase internal-loop airlift bioreactors –effect of dual separator and draught tube design**. 29th Conference SSCHE, Proceedings on CD ROM, Tatranské Matliare (SK), 27 – 31 May.

Kogan, G., L. Masler, J. Sandula, J. Navarova and T. Trnovec. 1989. **Recent results on the structure and immunomodulating activities of yeast glucan**. Biomed. and biotech. Adv. Indust. polysac. pp. 251–258.

Koide, K., K. Kurematsu, S. Iwamoto, Y. Iwata and K. Horibe. 1983. J. Chem. Eng. Jpn. 16: 413-419.

Kollar, R., B. Reinhold, E. Petrakova, H. J. Yeh, G. Ashwell, J. Drgonova, J.C. Kapteyn, F.M. Klis and E. Cabib. 1997. **Architecture of the yeast cell wall. β (1,6)-glucan interconnects mannoprotein, β (1,3)-glucan, and chitin**. J. Biol. Chem. 272: 17762–17775.

Kopecka, M. and D.R. Kreger. 1986. **Assembly of microfibrils *in vivo* and *in vitro* from 1-3 β -D-glucan synthesized by protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae***. Arch. Microbiol. 143: 387–395.

Koide, K., K. Kurematsu, S. Iwamoto, I.Y. wata and K. Horibe .1983. **Fermenter: a review**. J. Chem. Eng. Jpn. 16: 413-419.

Ksungur, G., U. Asli and G.V. Ulgar. 2004. **Production of pullulan from beet molasses and synthetic medium by *Aureobasidium pullulans***. Turk. J. Biol. 28: 23-30.

Koutinas, A., I. Athanasiadis, A. Bekatorou, M. Icocomopoulou and G. Blekas. 2005. **Kefir yeast Technology : Scale-up in SCP production using milk whey**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89(7): 579-584.

Lee, B.Y. and J.K. Kim. 2001. **Production of *Candida utilis* biomass in different culture types**. Aquacult. Eng. 25: 111-124.

Lee, In Young. N.d.b. **Curdlan**. Available Source:http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v05/bpol5006_135_144.pdf, November 12, 2006.

Lee, J.N., D.Y. Lee, I.H. Ji, G.E. Kim and H.N. Kim. 2001. **Purification of soluble β-glucan with immune enhancing activity from the cell wall of yeast**. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65(4): 837-841.

Manners, D.J., J.C. Masson, H. Bjorndal and B. Lindberg. 1973. **The structure of a β -(1,6)-D-glucan from yeast cell walls**. Biochem. J. 135: 31-36.

Mazur, P. and W. Baginsky. 1996. **In vitro activity of 1,3- β -D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1**. J. Biol. Chem. 271: 14604-14609.

Meyer, P.S., J.C. Du Preez and S.G. Kilian. 1992. **Effect of temperature and pH on *Candida blankii* in chemostat culture**. World J. Microbiol. and Biotechnol. 8: 434-438.

Meyer, Petrus S., C.J. ames, D. Preez and G. Kilian. 1992. **Cultivation of *Candida blankii* in simulated bagasse hemicellulose hydrolysate**. J. Ind. Microbiol. 9: 109-113.

Moeini, H., I. Nahvi and M. Tavassoli. 2004. **Improvement of SCP production and BOD removal of whey with mixed yeast culture**. Elect. J. of Biotech. 3: 155-162.

Mostafa, A N. A. 1995. **Utilization of molasses and akalona hydrolyzate for glycerol production using a local yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)**. Biomass Bioenergy. 8(6): 427-431.

Nicolosi, R., S. J. Bell and BR. Bistrian. 1999. **Plasma lipid changes after supplementation with beta-glucan fiber from yeast**. Am. J. Clin. Nutr. 70: 208-212.

Nobel, H. and P.N. Lipke. 1994. **Is there a role for GPIs in cell wall assembly in yeast?** Trends. Cell. Biol. 4: 42-45.

Norris, J.R. and D.W. Ribbon. 1971. **Method in Microbiology**. Vol. 5. Academic Press.

Parlati, F., M. Dominguez, J.M. Bergeron and D.Y. Thomas. 1995. ***Saccharomyces cerevisiae* CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with a sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus**. J. Biol. Chem. 270: 244-253.

Pelizon, A.C., R. Kaneno, A.M.V.C. Saores, D.A. Meira and A. Sartori. 2004. **Immunomodulatory activities associated with β-glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*.** Physiol. Res. 54: 557-564.

Pometto, A. Demirci, L. Anthony and D. J. Cox. 1999. **Enhanced Organically Bound selenium yeast production by fed-batch fermentation**. J. Agric. Food. Chem. 47: 2496-2500.

Pospíšil, M., J. Sandula, I. Pipalova, M. Hofer and S. Viklicka. 1992. **Enhancement of hematopoietic recovery in gamma-irradiated mice by the joint use of diclofenac, an inhibitor of prostaglandin production, and glucan, a macrophage activator**. Exp. Hematol. 20: 891–895.

Pramanik, K. 2003. **Parametric studies on batch alcohol fermentation using Saccharomyces yeast extracted from toddy**. J. Chin. Inst. Chem. Engrs. 34(4): 487-492.

Rajoka, M. Ibrahim, S. Hassan Khan, M.A. Jabbar, M.S. Awan and A.S. Hashmi. 2006. **Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors**. Biores. Technol. 97: 1934–1941.

Ratledge and Kristiansen. 2001. **Basic Biotechnology**. 2nd edition. Cambridge University Press, New York. 154-156.

Ren, Y., P.R. Ellis, S.B. Ross-Murphy, Q. Wang and P.J. Wood. 2003. **Dilute and semi-dilute solution properties of (1 ,3), (1 ,4)-b-D-glucan, the endosperm cell wall polysaccharide of oats (Avena sativa L.)**. Carbohydr. Polym. 53: 401–408.

Revillion, jean p., D. palma, A. brandelli and A. marco zachia ayub. 2003. **Production of yeast extract from whey using *Kluveromyces marxianus***. Brazil. Arch. of boil. technol. 46: 121-127.

Riggi, S. J. and N. R. Di Luzio. 1961. **Identification of RE stimulating agent in zymosan**. Am. J. physiol. 200: 297-305.

Robertsen B., G. Rorstad, R. Engstad and J. Ra. 1990. **Enhancement of non specific Diseaseresistant in atlantic salmon, Salmo salar L., by glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls**. J. fish dis. 3: 391-400.

Roemer, T. and H. Bussey. 1991. **Yeast β -glucan synthesis: KRE6 encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis in vivo and for glucan synthase activity in vitro**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 11295-11299.

Roemer, T., G. Paravicini, M.A. Payton and H. Bussey. 1994. **Characterization of the yeast (1,6)-β-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly**. J. Cell Biol. 127: 567-579.

Roh, D.H.2002. **Rho1p mutations specific for regulation of beta (1,3) glucan synthesis and the order of assembly of the yeast cell wall**. Mol. Microbiol. 44(5): 1167-83.

Romero, P.A., G.J.P. Dijkgraaf, S. Shahinian, A. Herscovics and H. Bussey. 1997. **The yeast CWH41 gene encodes glucosidase I**. Glycobiol. 7: 997-1004.

Saito, H., Y. Yoshioka, N. Uchara, J. Aketagawa, S. Tanaka and Y. Shibata. 1991. **Relationship between conformation and biological response for (1,3)- β-D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus amebocyte lysate and host-mediated antitumour activity. Demonstraiton of single-helix conformation as a stimulant**. Carbo. Res. 217: 181-190.

Selbmann, L., S. Crognale and M. Petruccioli. 2004. **Beta-glucan production by *Botryosphaeria rhodina* in different bench-top bioreactors**. J. Appl. Microbiol. 96(5): 1074-1081.

Samperman S.C., A. Karos and F. Fagas. 2005. **Cultivation of yeast in beet molasses**. J. Appl. Microbiol. 98(3): 552-563.

Shahinian, S. and H. Bussey. 2000. **Microreview beta-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae***. Mol. Microbiol. 35(3): 477-489.

_____, G.J.P. Dijkgraaf, A.M. Sdicu, D.Y. Thomas, C.A. Jakob, M. Aebi and H. Bussey. 1998. **Involvement of protein N-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall beta-1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae***. Genetics. 149 : 843-856.

Shang, F., Sh. Wen, X. Wang and T. Tan. 2006. **High-cell-density fermentation for ergosterol production by *Saccharomyces cerevisiae***. J. Biosci. Bioeng. 101(1): 38–41.

Shematek, E.M. and Cabib E. 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall. II. **Regulation of beta-(1 leads to 3) glucan synthetase by ATP and GTP**. J. Biol. Chem. 255(3): 895-902.

Skendi, A., C.G. Biliaderis, A. Lazaridou and M.S. Izydorczyk. 2003. **Structure and rheological properties of water soluble beta-glucans from oat cultivars of *Avena sativa* and *Avena bysantina***. J. Cereal Sci. 38: 15–31.

Soares, E.V and A. Vroman. 2003. **Effect of different starvation conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae***. J. Appl. Microbiol. 95: 325–330.

Taherzadeh, M., J. Mohammad, F. Martijn, H. Henrik and E. Lars. 2003. **Production of mycelium biomass and ethanol from paper pulp sulfite liquor by *Rhizopus oryzae***. Biores. Technol. 88: 167–177.

Takeshige, K. and K. Ouchi. 1995. **Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses**. J. ferm. bioeng. 79(5): 449-452.

Thasaprapha, L. 2004. **Single cell protein production from stillage by *Saccharomyces cerevisiae* using fed-batch fermentation**. A thesis submitted in a partial fulfillment of the requirement for the degree of master of engineering of chemical engineering, Chulalongkorn university.

Tosh, M., J. Peter Wood, Q. Wang and J. Weisz. 2004. **Structural characteristics and rheological properties of partially hydrolyzed oat b-glucan: the effects of molecular weight and hydrolysis method**. Carbo. Polymers. 55: 425–436.

Varga, E., B. Helene Klinke, R. Kati and B. Anne. 2004. **High Solid Simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol**. Biotechnol. Bioeng. 88(5): 423-429.

Vitolo, M., M.A. Duranti, and M.B. Pellegrim. 1995. **Effect of pH, aeration and sucrose feeding on invertase activity of intact *Saccharomyces cerevisiae* cells grown in sugarcane black strap molasses**. J. Ind. Microbiol. 15: 75–79.

Vereschagin, E.I., T.A. Korolenko and J. Sandula. 1994. **Protective effect of β-1,3-d-carboxymethylglucan in acute massive blood loss (in Russian)**. Patolog. Fiziolog. Exp. Terap. 3: 33–35.

Wang, Y., S. Yao and T. Wu. 2003. **Combination of induced autolysis and sodium hypochlorite oxidation for the production of *Saccharomyces cerevisiae* (1 →3)-β-D-glucan**. World J. Microbiol. Biotechnol. 19(9): 947-952.

Williams, D.L., A . Mueller and W. Browder. 1996. **Glucan-based macrophage stimulators: a review of their anti-infective potential**. Clin. Immunother. 5: 392-399.

Weiland, P. 1984. Ger. Chem. Eng. 7: 375-385

Yekta G, L. Ksungur and N. Zorlu. 2001. **Production of Ethanol from Beet Molasses by Ca-Alginate Immobilized Yeast Cells in a Packed-Bed Bioreactor**. Turk. J. Biol. 25: 265-275

ภาคผนวก

ภาคผนวก

การวิเคราะห์

1. <u>วิธีวิเคราะห์</u>

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างอาหารเหลว 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นอาหารเหลวไปวิเคราะห์น้ำตาลและเอทานอล ส่วนที่เป็นเซลล์นำมาล้างเอาอาหารกากน้ำตาลที่เหลือออก 2 ครั้งด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยการเขย่าเซลล์ให้กระจายตัวในโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นของเหลวโซเดียมคลอไรด์ทิ้ง จากนั้นล้างโซเดียมคลอไรด์ออกด้วยน้ำกลั่นโดยการ เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายตัว แยกสารแขวนลอยตัว 0.5 มิลลิลิตร ไปวัดการเจริญ ใช้เครื่องเซ็นตริฟิวจ์ปั่นเหวี่ยงส่วนที่เหลือ 4.5 มิลลิลิตร ด้วยความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายตัว แล้วถ่ายลง Eppendorf (ขนาด 1.5 มิลลิลิตร) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนของเหลวทิ้ง นำเซลล์ไปสกัดและวิเคราะห์ปริมาณบีตา-กลูแคน

1.2 การวัดการเจริญของยีสต์

การวัดการเจริญของยีสต์สามารถกระทำโดยนำตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร จากข้อ 9.1 มาเจือจางให้มีความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ไม่เกิน 0.6 จากนั้นนำมาวัดความขุ่นโดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-1600/1700 Series, UV-VIS spectrophotometer, Shimadzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

สร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยการเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ที่มีความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 นำสารแขวนลอยเซลล์ดังกล่าวมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยกรองผ่านแผ่นกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.45 ไมครอน (ที่ทราบค่าน้ำหนักแห้ง) ด้วยปริมาตรที่เท่ากัน อบแผ่นกรองที่มีเซลล์ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นกรองที่มีเซลล์เก็บไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) จนแผ่นกรองที่มีเซลล์ลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักแผ่นกรองที่มีเซลล์ ลบค่าน้ำหนักที่ได้ด้วยน้ำหนักแห้งของแผ่นกรองก่อนที่กรองเซลล์ นำค่าที่ได้ไปสร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ของความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับน้ำหนักเซลล์แห้ง หาค่าความชันจากสมการ และจัดสมการให้อยู่ในรูป

น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) = Cell factor x (O.D.)

เมื่อ O.D. = ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

Cell factor = ค่าความชันที่ได้จากการคำนวณ

นำค่าความขุ่นที่วัดได้คูณกับสัดส่วนที่ใช้เจือจาง นำค่าที่ได้แทนค่าความขุ่นในสมการข้างต้นเพื่อหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

1.3 การสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณบีตา-กลูแคน

1.3.1 การสกัดบีตา-กลูแคนจากผนังเซลล์ของยีสต์ใช้ตามวิธีของ Dallies *et al.* (1998) ดังนี้

1.3.1.1 แยกเซลล์จากอาหารเหลว 4.5 มิลลิลิตร มาเก็บลงใน eppendorf (ขนาด 1.5 มิลลิลิตร) ตามวิธีในข้อ 9.1 จากนั้นเติม tris-HCl buffer pH 8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และใส่ลูกแก้วสำหรับบดเซลล์ 0.5 กรัม เขย่าด้วยเครื่อง mini-bead beater 20 วินาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง 20 วินาที แล้วจึงเขย่าอีกครั้ง (ทำซ้ำ 4 ครั้ง)

1.3.1.2 แยกลูกแก้วสำหรับบดเซลล์ออกจาก tris-HCl buffer ที่มีเศษเซลล์อยู่ ล้างลูกแก้วสำหรับบดเซลล์ด้วย tris-HCl buffer pH 8 นำ tris-Cl buffer ที่มีเศษเซลล์มารวมกันใช้เครื่องเซนตริฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกผนังเซลล์ออกมา

1.3.1.3 เติม trifluoroacetic acid 2 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับผนังเซลล์ จากนั้น ไฮโดรไลซ์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที นำ trifluoroacetic acid ที่ผสมกับผนังเซลล์มากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณบีตา-กลูแคนที่ถูกไฮโดรไลซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคส

1.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากข้อ 1.3.1

โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ด้วยเครื่อง HPLC (Agilent 1100 series, Hewlett packard) โดยใช้คอลัมน์ Ultron packed column (Shinwa chemical industries, Shimadzu, Japan) ใช้สารละลายกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารมาตรฐานปริมาตรตัวอย่าง (จากข้อ 9.11) ที่ใช้วิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร ใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมี milliQ water เป็นส่วนเคลื่อนที่ (mobile phase) อุณหภูมิคอลัมน์ 80 องศาเซลเซียส รายงานปริมาณบีตา-กลูแคนที่วิเคราะห์ได้ในรูปของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยรายงานเป็นค่าของบีตา-กลูแคนที่ผลิตได้ และบีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ (บีตา-กลูแคนที่ผนังเซลล์ไม่รายงานค่าในชั่วโมงที่ 0 และ 4 เนื่องจากปริมาณเซลล์ที่ใช้วิเคราะห์มีน้อย ค่าที่คำนวณได้มีโอกาสผิดพลาดสูง)

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

นำตัวอย่างอาหารจากข้อ 9.1 มาวิเคราะห์โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ด้วยเครื่อง HPLC (Agilent 1100 series, Hewlett packard) โดยใช้คอลัมน์ Ultron packed column (Shinwa chemical industries, Shimadzu, Japan) ใช้สารละลายกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ ฟรุกโทส 1 เปอร์เซ็นต์ และซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารมาตรฐาน ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร ใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมี deionized water เป็นส่วนเคลื่อนที่

(mobile phase) อุณหภูมิคอลัมน์ 80 องศาเซลเซียส รายงานปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้ในรูปผลรวมของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโทส และซูโครส (เปอร์เซ็นต์)

1.5 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

นำตัวอย่างอาหารจากข้อ 9.1 มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-9B, Shimadzu, Osaka, Japan) ติดตั้งคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ยาว 1 เมตร บรรจุด้วย PEG 20 โมลาร์ เคลือบบน Shimalite ใช้อุณหภูมิคอลัมน์ 70 องศาเซลเซียส อุณหภูมิหัวฉีดตัวอย่าง 120 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิตัวจับสัญญาณ (flame ionize detector: FID) 120 องศาเซลเซียส ใช้โพรพานอล 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารมาตรฐานภายใน (Internal standard) เพื่อคำนวณปริมาณเอทานอลผ่านเครื่องบันทึก (Chromatopac C-R3A, Shimadzu, Osaka, Japan) รายงาน ปริมาณเอทานอลในหน่วยเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

2. <u>การฆ่าเชื้อในอาหาร</u>

อาหารเหลวที่ใช้ในข้อ 2. ถึงข้อ 6.1 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีอาหารเหลวที่ใช้ในข้อ 6.2 ถึงข้อ 8 ฆ่าเชื้อด้วยการเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 200 ppm ลงในอาหารทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง จากนั้นให้อากาศ 0.75 vvm เพื่อไล่ซัลไฟด์เป็นเวลา 40 นาที