MRG5080211 ผศ.ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาสมบัติของแมนโนโปรตีนจากกากส่าและการประยุกต์ใช้ในอาหาร

Characterization of mannoprotein from spent yeast obtained from traditional liquor distillation and its application in food

โดย ผศ. ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์

กรกฎาคม 2552

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: **MRG5080211**

ชื่อโครงการ: **การศึกษาสมบัติของแมนโนโปรตีนจากกากส่าและการประยุกต์ใช้ในอาหาร**

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: **ผศ. ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์**

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

E-mail Address: **suppasil.m@psu.ac.th**

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

จากการศึกษาวิธีการสกัดแมนโนโปรตีนจากผนังเซลล์ยีสต์ที่ได้จากกากส่า การสกัดด้วยการใช้ความร้อนร่วมกับความดันโดยทำให้เป็นซัสเพนชั่นด้วยซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่เวลา 30 นาที ได้ปริมาณแมนโนโปรตีน 0.27 กรัม/ กรัมเซลล์เปียกของยีสต์ แมนโนโปรตีนที่ได้มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดอิมัลชั่น (critical emulsifier concentration) เท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และมีค่า emulsification index (E_{24},) กับน้ำมันปาล์มเท่ากับ 60.23 เปอร์เซ็นต์ แมนโนโปรตีนทำให้เกิดอิมัลชั่นแบบน้ำมันในน้ำ (oil in water) แมนโนโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 120 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับพูลลูแลน และ เมื่อหาองค์ประกอบของแมนโนโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ พบว่ามีโปรตีน 4 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาล 96 เปอร์เซ็นต์ แมนโนโปรตีนมีกิจกรรมในการเกิดอิมัลชั่นเหมือนกับอิมัลซิไฟด์เออร์ทางการค้าคือ เลซิทิน (lecithin) และกัมอะราบิก (gum arabic) แมนโนโปรตีนทำให้น้ำมันปาล์มเกิดอิมัลชั่นในช่วงพีเอชตั้งแต่ 3-12 แมนโนโปรตีนมีความคงตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-3 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์และแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-0.1 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ (63 องศาเซลเซียส 100 องศาเซลเซียส และ 121 องศาเซลเซียส) ไม่มีผลต่อกิจกรรมของแมนโนโปรตีนตัวอย่างน้ำสลัดที่เติมอิมัลซิไฟด์เออร์มีขนาดอนุภาคเล็กกว่าชุดควบคุมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตัวอย่างน้ำสลัดที่เติม mannoprotein ที่สกัดได้จากกากส่าที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์และ 0.6

เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ากิจกรรมการคงความเป็นอิมัลชั่นคือ 38.77 เปอร์เซ็นต์ และ 38.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแมนโนโปรตีนที่ได้จากกากส่ามีศักยภาพในการผลิตน้ำสลัด

คำหลัก: แมนโนโปรตีน กากส่า อิมัลซิไฟด์เออร์ อิมัลชั่น น้ำสลัด

Abstract

Project Code:	**MRG5080211**
Project Title:	**Characterization of mannoprotein from spent yeast obtained from traditional liquor distillation and its application in food**
Investigator:	**Asst. Prof. Dr. Suppasil Maneerat** **Department of Industrial Biotechnology** **Faculty of Agro-Industry** **Prince of Songkla University**
E-mail Address:	**suppasil.m@psu.ac.th**
Project Period:	**2 years**

Mannoprotein from spent yeast obtained from Thai traditional liquor distillation was extracted by autoclaving in a neutral citrate buffer for 30 min. The yield of mannoprotein was 0.27 g/g wet cells. The mannoprotein obtained was evaluated for chemical and physical stability to establish its potential use as a natural emulsifier in processed foods. The extracted mannoprotein exhibited emulsion of 60.23% towards palm oil as oil-in-water and had a critical emulsifier concentration of 20 g/l. The apparent molecular weight of mannoprotein when compared with pullulan standard was 120 kDa. The composition of the mannoprotein was 96% carbohydrate and 4% protein. The emulsion activity of the mannoprotein was similar to those of commercial emulsifiers (lecithin and gum arabic). The emulsion activity of mannoprotein towards palm oil was stable over a broad range of pH (3-12), temperature (63°C, 100°C, 121°C), NaCl concentrations of 0-3% (w/v), $CaCl_2$ and $MgCl_2$ concentrations of 0-0.1% (w/v). Temperature did not affect the emulsion activity of mannoprotein. Salad dressing containing emulsifiers exhibited emulsion smaller than salad dressing without emulsifier ($p<0.05$). Salad dressing added with 0.2% and 0.6% mannoprotein exhibited emulsification activity 38.77% and 38.58%, respectively. Preliminary

trials showed that the obtained mannoprotein had potential for use in salad dressing production.

Keywords: mannoprotein, spent yeast, emulsifier, emulsion, salad dressing

EXECUTIVE SUMMARY

Emulsifiers are widely used in the food industry but these are synthetic emulsifiers such as glycerol monosterate (GMS) and carboxymethylcellulose (CMC). Although they are very effective in their intended functions, these compounds are gradually losing favor. This is because of increasing pressure from consumers to reduce the use of "artificial" or chemically synthesized additives in food (Shepherd *et al.*, 1995). Thus, consumers have become interested in natural and healthy food ingredients. Natural emulsifiers are becoming increasingly important in the food industry rather than synthetic emulsifying agents, which may be potential health hazards for humans (Lukondeh *et al.*, 2003). Besides, some natural plant-derived food emulsifiers such as lecithin and gum arabic are already on the market. However, these suffer from limited functionality in many food products (Shepherd *et al.*, 1995).

Currently the Thai government promotes "One Tumbol-One Product, OTOP". Accordingly, one of the OTOP products is a traditional distilled spirit. Generally, producers directly distill palm sugar wine directly without using separate yeast cells to obtain spirit. After distillation a huge amount of waste containing yeast cells is discharged. This causes environmental problems because it has a high biological oxygen demand. *Saccharomyces cerevisiae* is normally used for alcohol fermentation. Mannoprotein extracted from *S. cerevisiae* has been shown to be an effective bioemulsifier (Cameron *et al.*, 1988). The presence of hydrophilic mannose polymers covalently attached to the protein backbone provides the mannoprotein with the amphiphilic structure common to surface active agents and effective emulsifiers (Cooper and Goldenberg, 1987). Mannoprotein is an emulsifier obtained as a by-product from the wine or brewing industry. It is readily availability, biodegradable, is not toxic, and large scale production is possible. It can make possible the producing of value-added by-products (Torabisadeh *et al.*, 1996). Since *S. cerevisiae* is edible and used in the manufacture of food and beverage products, it is assumed that a mannoprotein

bioemulsifier would be non-toxic and generally recognized as safe (GRAS) (Cameron *et al.*, 1988).

The objectives of this study were to extract and characterize mannoprotein from spent yeasts obtained from Thai traditional liquor distillation. The emulsifier property of mannoprotein was also compared with those of commercial bioemulsifiers, lecithin and gum arabic.

Mannoprotein from spent yeast obtained from Thai traditional liquor distillation was extracted by autoclaving in a neutral citrate buffer for 30 min. The yield of mannoprotein was 0.27 g/g wet cells. The mannoprotein obtained was evaluated for chemical and physical stability to establish its potential use as a natural emulsifier in processed foods. The extracted mannoprotein exhibited emulsion of 60.23% towards palm oil as oil-in-water and had a critical emulsifier concentration of 20 g/l. The apparent molecular weight of mannoprotein when compared with pullulan standard was 120 kDa. The composition of the mannoprotein was 96% carbohydrate and 4% protein. The emulsion activity of the mannoprotein was similar to those of commercial emulsifiers (lecithin and gum arabic). The emulsion activity of mannoprotein towards palm oil was stable over a broad range of pH (3-12), temperature (63°C, 100°C, 121°C), NaCl concentrations of 0-3% (w/v), $CaCl_2$ and $MgCl_2$ concentrations of 0-0.1% (w/v). Temperature did not affect the emulsion activity of mannoprotein. Salad dressing containing emulsifiers exhibited emulsion smaller than salad dressing without emulsifier ($p<0.05$). Salad dressing added with 0.2% and 0.6% mannoprotein exhibited emulsification activity 38.77% and 38.58%, respectively. Preliminary trials showed that the obtained mannoprotein had potential for use in salad dressing production.

สารบัญ

บทที่		หน้า
1.	บทนำ	1
	บทนำต้นเรื่อง	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	บทตรวจเอกสาร	2
2.	วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	12
	วัสดุ อุปกรณ์	12
	วิธีการทดลอง	12
3.	ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	18
	การแยกแมนโนโปรตีนของเซลล์ยีสต์ที่ได้จากกากส่า	18
	ศึกษาวิธีการสกัดแมนโนโปรตีนจากผนังเซลล์ยีสต์	18
	การทำบริสุทธิ์แมนโนโปรตีน	21
	ศึกษาคุณสมบัติของแมนโนโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้	22
	การประยุกต์ใช้แมนโนโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในการผลิตน้ำสลัด	27
4.	สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	30
เอกสารอ้างอิง		31
Output		34

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	การสกัดแมนโนโปรตีนจากกากตะกอนเซลล์ยีสต์ที่เหลือจากการกลั่นสุราพื้นบ้านด้วยวิธีการใช้ความร้อนร่วมกับความดัน (autoclave, 121 องศาเซลเซียส) ที่เวลาต่างๆ	19
2.	ค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ทำให้เกิดอิมัลชันของสารสกัดหยาบแมนโนโปรตีนที่ได้จากการสกัดโดยวิธีการใช้ความร้อนร่วมกับความดัน (autoclave, 121 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลาต่างๆ	19
3.	การสกัดแมนโนโปรตีนจากกากตะกอนเซลล์ยีสต์ที่เหลือจากการกลั่นสุราพื้นบ้านด้วยวิธีการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ	20
4.	ค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ทำให้เกิดอิมัลชันของสารสกัดหยาบแมนโนโปรตีนที่ได้จากการสกัดโดยวิธีการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ	20
5.	ค่า Emulsification activity (%) ของแมนโนโปรตีน gum arabic และ lecithin ต่อน้ำมันพืชชนิดต่างๆ	24
6.	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของแมนโนโปรตีน	25
7.	ค่าการกระจายตัวของขนาดอิมัลชั่นที่เกิดจากแมนโนโปรตีน gum arabic และ lecithin	26

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	โครงสร้างของไกลโคลิปิดที่ใช้ในอุตสาหกรรม	3
2.	โครงสร้างของ cyclic lipopeptides surfactin ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis*	4
3.	โครงสร้างของ phosphatidylethanolamine ผลิตจาก *Acinetobacter* sp. R1 and R2 คือ สายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน	4
4.	โครงสร้างของ emulsan ผลิตโดย *Acinetobacter calcoaceticus*	5
5.	ลำดับขั้นการแยกองค์ประกอบผนังเซลล์ด้วยการสกัดด้วยกรดและด่าง	9
6.	ลำดับขั้นการแยกองค์ประกอบผนังเซลล์ด้วยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์	10
7.	การทำบริสุทธิ์แมนโนโปรตีนโดยใช้ Sephadex G-100 ซึ่งใช้ Tris HCl 0.01 โมลาร์ พีเอช 7.3 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลาร์เป็นบัฟเฟอร์ และมีอัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตร/นาที	21
8.	ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของแมนโนโปรตีน	24
9.	ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของแมนโนโปรตีน	26
10.	ขนาดอนุภาคอิมัลชันของตัวอย่างน้ำสลัดที่เติมอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	28

บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

อิมัลซิไฟเออร์ชีวภาพ (bioemulsifier) จัดอยู่ในกลุ่มสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ประเภทหนึ่ง ซึ่งผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะจุลินทรีย์ มีคุณสมบัติเป็นตัวประสานให้ของเหลว 2 ชนิดซึ่งไม่สามารถละลายเข้ากันได้ เช่น น้ำกับน้ำมันกระจายตัวหรือผสมเข้ากันได้โดยให้อยู่ในสภาพอิมัลชั่น อิมัลซิไฟเออร์ชีวภาพประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ละลายน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ละลายในไขมัน (lipophilic) (Vance *et al.*, 2003) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด การใช้สารอิมัลซิไฟด์เออร์ในการทำให้เกิดอิมัลชั่นไม่เพียงแต่มีการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มเท่านั้น แต่ยังมีการใช้เพื่อกำจัดการปนเปื้อนของน้ำมันโดยชีววิธี (bioremediation) ในดินหรือในน้ำหรือใช้ทำความสะอาดท่อที่ปนเปื้อนน้ำมัน เป็นต้น (Bonilla *et al.*, 2005) โดยอิมัลซิไฟด์เออร์จะนำมาใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร แต่อิมัลซิไฟด์เออร์ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่เป็นอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เช่น glycerol monostearate (GMS) และ carboxymethylcellulose (CMC) แม้ว่าจะเป็นสารที่มีประสิทธิภาพแต่สารสังเคราะห์เหล่านี้ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคลดลง เนื่องจากปัจจุบันผู้บริโภคหันมาใส่ใจในสุขภาพกันมากขึ้น จึงพยายามที่จะหลีกเลี่ยงการใช้ผลิตภัณฑ์เทียม (artificial) หรือสารสังเคราะห์จากสารเคมีเติมลงไปในอาหาร (food additive) ซึ่งอาจมีผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค (Torabizadeh *et al.*,1996) ผู้บริโภคจึงหันมาสนใจและตระหนักถึงการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติกันมากขึ้นเนื่องจากราคาถูกและหาวัตถุดิบได้ง่าย ซึ่งในปัจจุบันผลิตภัณฑ์อิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่แยกได้จากพืชมีแพร่หลายตามท้องตลาด เช่น lecithin, gum Arabic, xanthan gum เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้ก็ยังใช้ได้จำกัดในอาหารบางชนิดเท่านั้น (Shepherd *et al.*, 1995) ปัจจุบันจึงมีความพยายามคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์เพราะข้อดีของอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ คือ ผลิตจากวัตถุดิบที่หาได้ง่าย เช่น by-product คือเซลล์ยีสต์จากอุตสาหกรรมการผลิตไวน์หรือเบียร์ เป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเศษเหลือ ย่อยสลายได้ง่ายตามธรรมชาติ มี

ความเป็นพิษต่ำ ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อมและยังสามารถขยายการผลิตสู่ระดับ อุตสาหกรรมได้ (Torabizadeh *et al.*, 1996)

เนื่องจากปัจจุบันรัฐบาลให้การสนับสนุนการผลิตสินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ (OTOP) มากขึ้น ซึ่งหนึ่งในผลิตภัณฑ์ OTOP ที่มีการผลิตมาก คือ สุรากลั่น โดยยีสต์สายพันธุ์ที่สำคัญในการหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าหลังจากกระบวนการกลั่นมีของเสียที่เกิดขึ้นซึ่งจะประกอบด้วยตัวเซลล์ยีสต์เป็นหลักและของเหลวที่เหลือจากการกลั่นที่มีเซลล์ยีสต์อยู่นี้ไม่ได้เอาไปใช้ประโยชน์อะไรต่อไปผู้ประกอบการจะปล่อยของเหลวที่เหลือจากการกลั่นนี้ทิ้งและทำให้เกิดปัญหากับสิ่งแวดล้อมในชุมชนได้ ผนังเซลล์ของยีสต์มีแมนโนโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งมีคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟด์เออร์ ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะศึกษาวิธีการสกัดแมนโนโปรตีนจากยีสต์ที่เหลือจากการกลั่นสุราและศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป โดยจะเป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือและลดปัญหาการกำจัดของเสียซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของชุมชนได้อีกทางหนึ่ง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

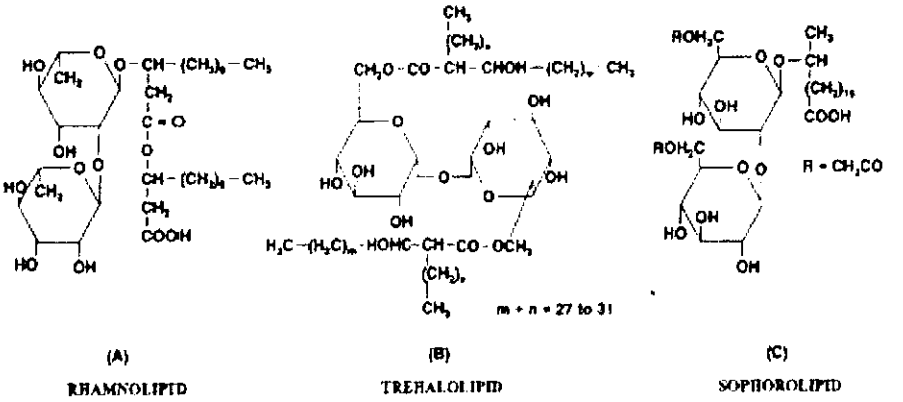
1. ศึกษาวิธีการสกัดและการทำบริสุทธิ์แมนโนโปรตีนจากผนังเซลล์ยีสต์ที่เหลือจากการกลั่นสุราพื้นบ้าน
2. ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลและองค์ประกอบของแมนโนโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์
3. ศึกษาสมบัติของแมนโนโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์
4. ศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้แมนโนโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในการผลิตน้ำสลัด

บทตรวจเอกสาร

อิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ (bioemulsifier) จัดอยู่ในกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) คือ สารที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตโดยอาจจะได้จากพืช สัตว์หรือจุลินทรีย์ โดยโครงสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ซึ่งสารประกอบนี้สามารถลดแรงตึงผิวระหว่างชั้นของเหลว

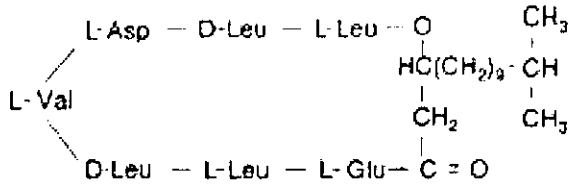
ของแข็งและแก๊ส ทำให้เกิดความคงตัวเป็นอิมัลชั่นในน้ำหรือของเหลวอื่น (Vance *et al.*, 2003) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติเด่น คือ มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวและ/หรือมีความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชั่น สามารถจัดจำแนกประเภทตามโครงสร้างได้ 4 ประเภทใหญ่ๆ คือ ไกลโคไลปิด (glycolipid) ไลโปเปปไทด์หรือไลโปโปรตีน (lipopeptide or lipoprotein) ฟอสฟอลิปิด (phospholipids and fatty acid) และ polymeric biosurfactant (Lin *et al.*, 1997)

ไกลโคไลปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เช่น sophorose rhamnose trehalose หรือ fructose ที่ต่อเชื่อมกับไขมันด้วยพันธะเอสเทอร์ (ภาพที่ 1) ไกลโคไลปิดหลักๆที่ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น rhamnolipids trehaloselipids sophorolipids (Janny *et al.*, 1991, Calvo *et al.*, 2004)



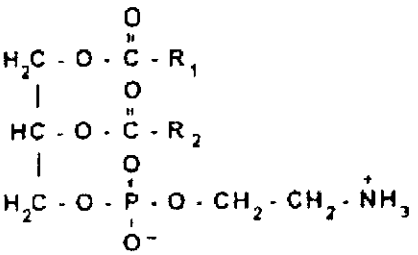
ภาพที่ 1 โครงสร้างของไกลโคลิปิดที่ใช้ในอุตสาหกรรม
ที่มา: (Desai and Banat, 1997)

ไลโปเปปไทด์หรือไลโปโปรตีนเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วย lipid ไม่มีประจุ จับกับสาย polypeptides ซึ่งมีประจุ ไลโปเปปไทด์ที่ศึกษากันมาก คือ surfactin เช่น surfactin ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* ATCC 21332 เป็น cyclic lipopeptides ที่ประกอบด้วย heptapeptide และ lipid β-hydroxy fatty acids มีความยาว 13-15 คาร์บอนอะตอม (ภาพที่ 2) ซึ่งจุดเด่นของ surfactin คือมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด (Kluge *et al.*,1988) เช่น decapeptide antibiotic (gramicidins), lipopeptide antibiotic (polymyxins) (Desai and Banat, 1997)



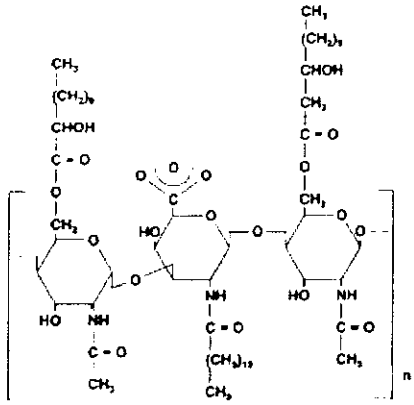
ภาพที่ 2 โครงสร้างของ cyclic lipopeptides surfactin ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis*
ที่มา: (Desai and Banat, 1997)

ฟอสฟอลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วย lipid และ phosphate โดยมีพันธะเอสเทอร์เกิดขึ้นระหว่าง alcohol group ของ lipid และ phosphate (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของ phosphatidylethanolamine ผลิตจาก *Acinetobacter* sp. R1 and R2 คือ สายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน
ที่มา: (Desai and Banat, 1997)

Polymeric biosurfactant เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติเป็นสารอิมัลซิไฟด์เออร์เป็นส่วนใหญ่นั่นคือมีความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชั่นได้ดีกว่าการลดแรงตึงผิว (Ron and Rosenberg, 2001) polymeric biosurfactant ที่มีการศึกษากันมาก คือ emulsan (ภาพที่ 4) liposan และ mannoprotein (Desai and Banat, 1997)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของ emulsan ผลิตโดย *Acinetobacter calcoaceticus*

ที่มา: (Desai and Banat, 1997)

การทำงานของอิมัลซิไฟด์เออร์ คือเมื่อเติมอิมัลซิไฟด์เออร์ลงไปในส่วนผสมของน้ำและน้ำมันสารอิมัลซิไฟด์เออร์จะถูกจัดเรียงอยู่ระหว่างชั้นน้ำและน้ำมัน โดยหันส่วนที่ชอบน้ำเข้าไปในชั้นน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าไปในชั้นของน้ำมัน อิมัลซิไฟด์เออร์จะเป็นตัวลดแรงตึงผิวระหว่างชั้นน้ำและชั้นของน้ำมัน ดังนั้นแรงในการแยกน้ำและน้ำมันจึงอ่อนลงเป็นผลให้ง่ายแก่การผสมน้ำและน้ำมันให้เข้ากัน คุณสมบัติของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ในการทำให้เกิดอิมัลชั่นขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำเรียกว่าค่า Hydrophilic lipophilic balance (HLB value) โดยมีลักษณะต่างกัน 2 ชนิด คือ lipophilic type มีค่า HLB ต่ำ และ hydrophilic type คือมีค่า HLB สูง ซึ่งค่า HLB value จะอยู่ในช่วง 0-20 ดังนั้นลักษณะและคุณสมบัติของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ในชั้นน้ำจึงแตกต่างกันไปตามค่า HLB โดยอิมัลซิไฟด์เออร์ที่มี lipophilicity สูง จะมีค่า HLB ต่ำ ในขณะที่อิมัลซิไฟด์เออร์ที่มี hydrophilicity สูงจะมีค่า HLB สูง ซึ่งสารประกอบที่มี hydrophilic และ lipophilic เป็นส่วนประกอบไม่จำเป็นเสมอไปว่าจะต้องมีคุณสมบัติเป็นสารอิมัลซิไฟด์เออร์ โดยค่า HLB value สามารถหาได้โดย (Oberbremer *et al.*, 1990)

HLB value = 20 × (น้ำหนักโมเลกุลของส่วน hydrophilic/ น้ำหนักโมเลกุลทั้งหมด)

ผนังเซลล์ของยีสต์จะแบ่งออกเป็น 2 ชั้นคือ ผนังเซลล์ชั้นนอก (inner layer) ประกอบด้วย mannoprotein และผนังเซลล์ชั้นใน (outer layer) ประกอบด้วย β-1,3-glucan β-1,6-glucan และ chitin ซึ่งมีความสามารถในการจำกัดความสามารถในการผ่านการเข้า-ออกของสาร ดังนั้นจึงเป็นเสมือนเกราะกำบังให้พลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) จากเอนไซม์ภายนอกและป้องกันการก่อกวนสารประกอบของเมมเบรน ปริมาณของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ซึ่งจับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ มีดังนี้ chitin 1-2 เปอร์เซ็นต์ β-1,3-glucan 25เปอร์เซ็นต์ β-1,3-glucan ที่จับกับ chitin 35เปอร์เซ็นต์ β-1,6-glucan 5เปอร์เซ็นต์ และ mannoprotein 35เปอร์เซ็นต์ (Feuillat, 2002)

แมนโนโปรตีนสกัดได้จากผนังเซลล์ของยีสต์ มีคุณสมบัติในการเป็นอิมัลซิไฟด์เออร์ซึ่งสามารถละลายน้ำได้อย่างอิสระ (Cameron *et al.*, 1988) ลักษณะโครงสร้างของแมนโนโปรตีนจะประกอบด้วยโปรตีนเป็นแกนหลักและต่ออยู่กับสายพอลิเมอร์ของน้ำตาลแมนโนส 2 ชนิด ชนิดที่หนึ่งเป็นพอลิเมอร์คาร์โบไฮเดรตที่มีลักษณะเป็นสายยาวและกิ่งก้านของน้ำตาลแมนแนน 40-100 หน่วย ด้วยพันธะ α-1,6-glycosodic α-1,2 และ α-1,3-glycosidic ในส่วนของกิ่งก้าน ซึ่งส่วนของพอลิแซ็คคาร์ไรด์สายยาวนี้จะจับกับโปรตีนด้วย N-linkages ที่ตำแหน่งของแอสพาราจีนและในส่วนโซ่ข้างอาจมีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบด้วย ชนิดที่สองของสายแมนแนนประกอบด้วยน้ำตาลแมนแนนเพียง 1-5 หน่วยเท่านั้นและไม่มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบซึ่งสายแมนแนนที่สั้นนี้จับกับโปรตีนด้วย O-linkages กับตำแหน่งของซีรีนหรือทรีโอนีน (Barriga *et al.*, 1999)

เนื่องจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม และคาดหวังว่าไม่มีพิษ (nontoxic) และมีความปลอดภัย (Generally Recognized As Safe, GRAS) จึงสามารถนำมาสกัดแมนโนโปรตีนเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางได้ แมนโนโปรตีนเป็นสารประกอบที่พบได้ในเซลล์ยีสต์โดยพบแมนโนโปรตีนได้ 2 แหล่งจากเซลล์ยีสต์ คือ เป็นส่วนที่สกัดได้จากผนังเซลล์ชั้นนอกซึ่งมีคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟด์เออร์ประกอบด้วย โปรตีน 10 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรต 90 เปอร์เซ็นต์ โดยประมาณ (Barriga *et al.*, 1999)และพบมากในส่วนของช่องว่าง periplasmic ซึ่งอยู่ระหว่างพลาสมาเมมเบรนและผนังเซลล์ คือ mannoenzyme ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส 50-70 เปอร์เซ็นต์ โดยประมาณส่วนที่เหลือเป็นโปรตีนซึ่งแมนโนโปรตีนจะรวมถึง invertase

glucosidase melibiase phosphatase และ proteases (Ballou *et al.*, 1976 อ้างโดย Cameron *et al.*, 1988)

Barriga และคณะ (1999) สกัดสารซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารอิมัลซิไฟด์เออร์จากผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งอิมัลซิไฟด์เออร์ที่แยกได้มีองค์ประกอบ 2 ชนิดหลักๆ คือสารที่ประกอบด้วยโปรตีนเป็นหลักและที่เหลือเป็นคาร์โบไฮเดรตซึ่งเรียกว่า phosphomannoprotein มีคุณสมบัติเป็นสารอิมัลซิไฟด์เออร์และสารชนิดที่สองคือ สารที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตและฟอสฟอรัส phosphomannan ไม่มีสมบัติเป็นสารอิมัลซิไฟด์เออร์ แต่เพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดอิมัลชั่นของสารชนิดแรก

Lukodeh และคณะ (2003) สกัดแมนโนโปรตีนจากผนังเซลล์ของเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากวัสดุเศษเหลือโรงงานอุตสาหกรรมประเภทที่มีน้ำตาลแลกโตสเป็นองค์ประกอบหรือจากหางนม พบว่าแมนโนโปรตีนที่ได้ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 90 เปอร์เซ็นต์ และ โปรตีน 4-6 เปอร์เซ็นต์ โดยแมนโนโปรตีนที่ได้มีองค์ประกอบคล้ายกับที่สกัดได้จากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และพบว่าเป็นอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ทำให้เกิดอิมัลชั่นที่มีความคงตัวนานถึง 3 เดือน สามารถทำงานได้ในพีเอชช่วงกว้าง (3-11) และสามารถทำงานได้ในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง (2-50 g/l)

อิมัลซิไฟด์เออร์ไม่เพียงแต่ทำให้เกิดอิมัลชั่นเท่านั้นแต่ยังมีคุณสมบัติในการทำให้เกิดการกระจายตัว (dispersion) เช่น ในช็อคโกแล็ตหรือเครื่องดื่มโกโก้ โดยการทำช็อคโกแล็ตมีส่วนผสมของอนุภาคหลายชนิด เช่น น้ำตาล นมและผงโกโก้ ซึ่งลักษณะการไหลของอนุภาคแขวนลอยเป็นผลมาจากการเติมสารอิมัลซิไฟด์เออร์ลงไปนอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติการเกิดโฟมหรือฟอง เช่น ในเค้ก ขนมหวาน ทำให้เกิดความคงตัวของโฟมทำให้ผลิตภัณฑ์มีเนื้อสัมผัสนุ่มนวลและรักษารูปร่าง (Babin *et al.*,2005)

Torabizadeh และคณะ (1996) สกัดแมนโนโปรตีนจากผนังเซลล์ยีสต์โดยสารที่ได้ประกอบด้วย โปรตีน 380-410 g/kg และคาร์โบไฮเดรต 210 g/kg ซึ่งแมนโนโปรตีนที่ได้มีคุณสมบัติคล้ายกับ sodium caseinate โดยแมนโนโปรตีน และ sodium caseinate ทำให้เกิดอิมัลชั่นได้ 79เปอร์เซ็นต์ และ 77เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และหลังจากเก็บอิมัลชั่นไว้ 1 เดือนที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่าอิมัลชั่นยังคงตัวอยู่โดยมีอิมัลชั่น 78 เปอร์เซ็นต์ และ 75 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแมนโนโปรตีนและ sodium caseinate ตามลำดับ เมื่อทดลองนำแมนโนโปรตีนมาใช้ใน

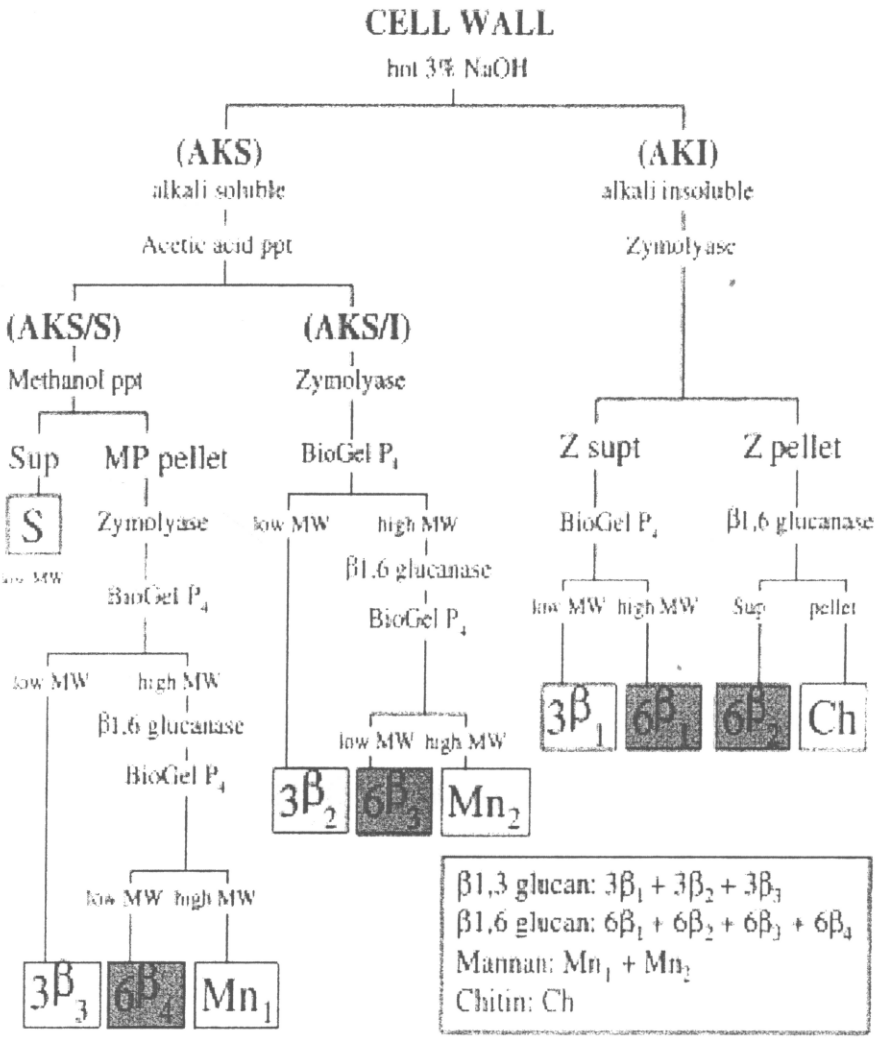
การผลิตมายองเนส พบว่า แมนโนโปรตีนสามารถใช้ร่วมกับ carboxymethyl cellulose (CMC) ได้ และสามารถใช้แทน xanthan gum ได้

Cameron และคณะ (1988) สกัดแมนโนโปรตีนจากผนังเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ด้วย 2 วิธี คือ สกัดด้วยความร้อน โดยการนำเซลล์ยีสต์ละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชเป็นกลางแล้วให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และวิธีย่อยด้วยเอนไซม์โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ zymolase และ β-1,3-glucanase จากนั้นผ่านการทำบริสุทธิ์โดยการทำ ultrafiltration พบว่าแมนโนโปรตีนประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต (mannose) 44 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 17 เปอร์เซ็นต์

Alexandre และคณะ (2000) ใช้เซลล์ยีสต์ 2 กรัม ละลายใน 10 mM Tris-HCl พีเอช 7 ที่ประกอบด้วย 1 mM phenyl methyl sulfonide และทำให้เซลล์แตกด้วยเม็ด beads ขนาด 0.45 nm และใช้ homoginiser นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วยบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM dithiothreitol 4 ครั้ง ทำการกวน 45 นาที ที่ 28 องศาเซลเซียส แล้วปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ 4000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างส่วนของตะกอน 3 ครั้งด้วยบัฟเฟอร์ แล้วละลายตะกอนในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 400 U/ml ของ β-1,3-glucanase เพื่อย่อยส่วนของแมนโนโปรตีนออกจากผนังเซลล์ และเก็บส่วนใสที่ได้ ตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลที่ได้ด้วยการทำ SDS-PAGE และ western blotting ด้วย concanavalin A-mediated peroxidase staining และ lebel ด้วย biotin พบว่าได้แมนโนโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 49 kDa และผ่านการทำบริสุทธิ์โดยใช้ HPLC ซึ่งใช้ anion exchange column โดยแมนโนโปรตีนถูกชะออกด้วย การทำ gradient ของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ความเข้มข้น 0-1 M ในเวลา 50 นาที

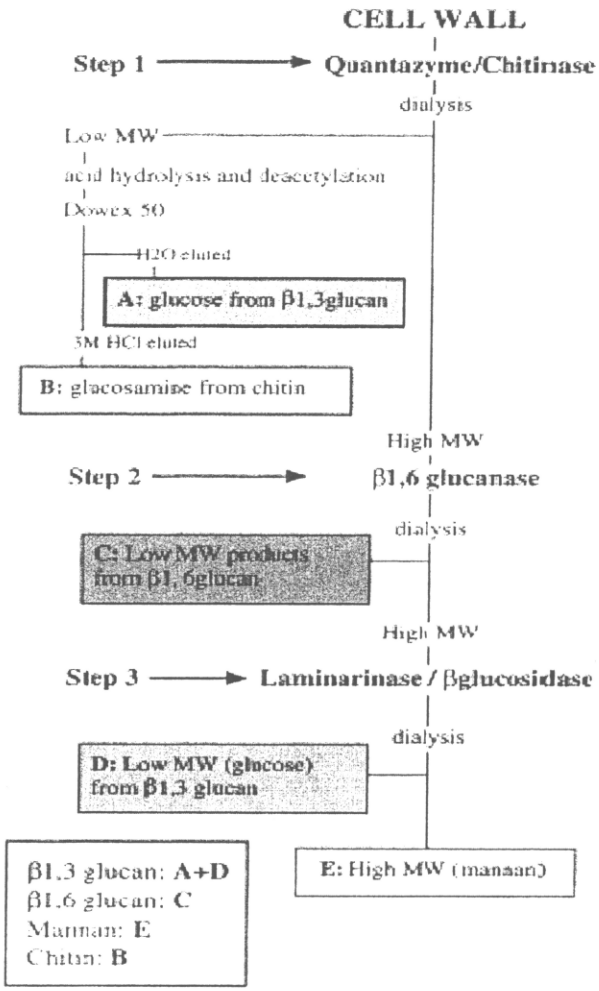
Magnelli และคณะ (2002) ศึกษาวิธีการแยกองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้วิธีการสกัดด้วยด่าง 3เปอร์เซ็นต์ NaOH ที่ร้อนและกรด acetic acid ที่เย็น สามารถแยกผลผลิตที่ได้เป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่หนึ่ง alkali-insoluble fraction (AKI) ซึ่งประกอบด้วย chitin และ β-glucan ส่วนที่สอง คือ alkali-soluble/acid-insoluble (AKS/I) ประกอบด้วย β-glucans และ แมนโนโปรตีนบางส่วน ส่วนที่สาม คือ alkali-soluble/acid-soluble (AKS/S) ประกอบด้วยแมนโนโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ และ β-glucan เล็กน้อย (ภาพที่ 5) ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการใหม่ คือ serial enzymatic digestions ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (ภาพที่ 6) คือ ขั้นที่ 1 ใช้เอนไซม์ Quantazyme/chitinase ขั้นตอนนี้จะได้ β-1,3-glucan 60-65 เปอร์เซ็นต์

และได้ chitin (N-acetylglucosamine) ขั้นที่ 2 ใช้เอนไซม์ β-1,6-glucanase ย่อยจะได้ β-1,6-glucan และขั้นที่ 3 ใช้เอนไซม์ Laminarinase/β-glucosidase ทำให้ได้ β-1,3-glucan แยกออกจาก mannan ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูง



ภาพที่ 5 ลำดับขั้นการแยกองค์ประกอบผนังเซลล์ด้วยการสกัดด้วยกรดและด่าง

ที่มา: Magnelli และคณะ (2002)



ภาพที่ 6 ลำดับขั้นการแยกองค์ประกอบผนังเซลล์ด้วยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์
ที่มา: Magnelli และคณะ (2002)

Freimund และคณะ (2003) พัฒนากระบวนการแยกกลูแคนออกจากผนังเซลล์ยีสต์ด้วยขั้นตอนการสกัดที่ไม่รุนแรง โดยใช้น้ำร้อนและตัวทำละลายอินทรีย์ร่วมกับเอนไซม์ซึ่งเป็นกระบวนการที่ง่าย รวดเร็วและเหมาะสมในการขยายสู่ระดับอุตสาหกรรม ซึ่งคุณภาพสารที่สกัดได้ขึ้นกับวัสดุเศษเหลือยีสต์ที่นำมาใช้ ซึ่งในกระบวนการจะได้ by-product ได้ที่มีประโยชน์ คือ แมนโนโปรตีน โดยสามารถสกัดแมนโนโปรตีนจากผนังเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยการใช้น้ำโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วย NaOH ทำให้ suspension เย็นลงที่ 45 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกนำส่วนใสไปตกตะกอนแมนโนโปรตีนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 5 องศาเซลเซียส นำไป

กรองแล้วล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลและทำให้แห้งที่ 70 องศาเซลเซียส จะได้แมนโนโปรตีนที่มีลักษณะใสไม่มีสี ซึ่งประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต 83 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 15 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคสเล็กน้อย

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. กากส่ายีสต์ได้จากเศษเหลือที่ได้จากการกลั่นสุราหมักพื้นบ้านในอำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา
2. น้ำมันพืช (น้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันปาล์ม,น้ำมันข้าวโพด,น้ำมันมะกอก, น้ำมันดอกทานตะวัน, น้ำมันรำข้าว และน้ำมันงา) ซื้อจากซุปเปอร์มาเก็ต
3. เลซิทิน (lecithin) และกัมอะราบิก (gum arabic) จากบริษัท Fluka (USA) และบริษัท Nacalai tesgue (Kyoto, Japan)

การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของแมนโนโปรตีน

- Emulsion test (Barriga *et al.*, 1999) โดยใช้น้ำมันถั่วเหลือง 4 มิลลิลิตร กับส่วนใสที่สกัดได้ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer นาน 3 นาที ตั้งหลอดทิ้งไว้ 30 นาที , 1 ชั่วโมง, 1.5 ชั่วโมง, 3 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง แล้วคำนวณความสามารถในการเกิดอิมัลชันโดย

$$\text{Emulsion activity (\%)} = \frac{\text{ความสูงของน้ำมันถั่วเหลืองหลังผสม} \times 100}{\text{ความสูงของน้ำมันถั่วเหลืองก่อนผสม}}$$

- ความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ทำให้เกิดอิมัลชัน (Critical emulsifier concentration) (Barriga *et al.*, 1999) โดยละลาย crude emulsifier ที่ได้จากการทำแห้งให้มีความเข้มข้นต่างๆ แล้วทดสอบเช่นเดียวกับ emulsion test

วิธีการทดลอง

1. การแยกแมนโนโปรตีนของเซลล์ยีสต์ที่ได้จากกากส่า

ตรวจสอบปริมาณแมนโนโปรตีนจากตัวเซลล์และส่วนใส โดยการนำของเหลวที่เหลือจากการกลั่นสุราพื้นบ้านมาเหวี่ยงแยกเซลล์และส่วนใสออกจากกันด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนแมนโนโปรตีนด้วยเอธานอลให้ได้ความ

เข้มข้นสุดท้ายของเอธานอลคือ 70 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วหาน้ำหนักของ crude mannoprotein ที่ได้

สำหรับตัวเซลล์ นำมาสกัดแมนโนโปรตีนด้วยวิธีการใช้ความร้อนร่วมกับความดัน (Barriga *et al.*, 1999) โดยละลายเซลล์ยีสต์ 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M potassium citrate และ 0.02 M potassium metabisulfite แล้วปรับพีเอชของซัสเพนชันให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไป autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเหวี่ยงแยกเอากากตะกอนออกที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนด้วยเอธานอล ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอธานอลคือ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน กรองตะกอนที่ได้และล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล แล้วนำตะกอนที่ได้ไปหาน้ำหนักของ crude mannoprotein ที่ได้และหาค่ากิจกรรมของแมนโนโปรตีนตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1

เปรียบเทียบน้ำหนักของ crude mannoprotein ที่ได้จากทั้งส่วนใสและตัวเซลล์ และให้ค่า emulsion activity สูงสุดแต่ให้ค่า critical emulsifier concentration ต่ำสุด โดยละลายตัวอย่าง crude mannoprotein ที่ได้ในน้ำกลั่นให้มีปริมาณเท่ากันแล้ววัดกิจกรรมของแมนโนโปรตีนที่สกัดได้ กรณีที่พบแมนโนโปรตีนจากเฉพาะตัวเซลล์หรือพบจากส่วนใสเพียงเล็กน้อย ดำเนินการสกัดแมนโนโปรตีนจากตัวเซลล์ด้วยวิธีการที่จะกล่าวถึงต่อไป แต่ถ้าพบแมนโนโปรตีนทั้งสองส่วนในปริมาณที่เท่าๆกัน ให้นำทั้งสองส่วนของ crude mannoprotein ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลมารวมกัน

2. ศึกษาวิธีการสกัดแมนโนโปรตีนจากผนังเซลล์ยีสต์

นำของเหลวที่เหลือจากการกลั่นสุราพื้นบ้านมาเหวี่ยงแยกเซลล์และส่วนใสออกจากกันด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้งเพื่อล้างเซลล์ให้สะอาด หลังจากนั้นทำการสกัดแมนโนโปรตีนจากผนังเซลล์ยีสต์ 2 วิธี คือ

- สกัดด้วยความร้อนร่วมกับความดัน (Barriga *et al.*, 1999) ละลายเซลล์ยีสต์ 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M potassium citrate และ 0.02 M potassium metabisulfite แล้วปรับพีเอชของซัสเพนชันให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไป autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 1.5 และ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเหวี่ยงแยกเอา

กากตะกอนออกที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใส ที่ได้จากทั้ง 3 ช่วงเวลาไปตกตะกอนด้วยเอธานอลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่เลือกได้จากข้อ 2 แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน กรองตะกอนที่ได้และล้างตะกอนด้วย เอธานอลเท่ากับความเข้มข้นที่ใช้ในการตกตะกอน และทำแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส ภายใต้ สภาวะสุญญากาศ (Freimund *et al.*, 2003) แล้วนำไปหาน้ำหนักของ crude mannoprotein ที่ได้

- สกัดด้วยความร้อน (Freimund *et al.*, 2003) ละลายเซลล์ยีสต์ 20 เปอร์เซ็นต์ ใน บัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M potassium citrate และ 0.02 M potassium metabisulfite ในแล้ว ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปให้ความร้อนใน oil bath ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส และมีการคนตลอดเวลาเป็นเวลา 3 4 และ 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นเหวี่ยงแยกเอา กากตะกอนออกที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ ได้จากการสกัดทั้ง 3 ช่วงเวลาไปตกตะกอนด้วยเอธานอล ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่เลือกได้จาก ข้อ 2 แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน กรองตะกอนที่ได้และล้างตะกอน ด้วยเอธานอลเท่ากับความเข้มข้นที่ใช้ในการตกตะกอน และทำแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส ภายใต้ สภาวะสุญญากาศ (Freimund *et al.*, 2003) แล้วนำไปหาน้ำหนักของ crude mannoprotein ที่ได้

เลือกช่วงเวลาในการสกัดจากทั้งสองวิธีที่ให้น้ำหนักของ crude mannoprotein สูงสุด และให้ค่า emulsion activity สูงสุดแต่ให้ค่า critical emulsifier concentration ต่ำสุด เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. การทำบริสุทธิ์แมนโนโปรตีน

ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีในการกำจัดสารปนเปื้อนที่ไม่ใช่แมนโนโปรตีนออกจาก crude mannoprotein ที่สกัดได้โดยอาจจะใช้ anion exchange chromatography (Alexandre *et al.*, 2000) และ/หรือ gel filtration chromatography (Nakajima and Ichishima, 1994) และคำนวณหาปริมาณ yield ที่ได้หลังจากผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว

ตรวจสอบความบริสุทธิ์และขนาดน้ำหนักโมเลกุลของแมนโนโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE และเจลฟิลเตรชั่น (Torabizadeh *et al.*, 1996) และวิเคราะห์องค์ประกอบของแมนโนโปรตีนที่ผ่าน การทำบริสุทธิ์โดยนำแมนโนโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้มาทำการวิเคราะห์

- วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน: ใช้วิธี Bradford โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็น สารมาตรฐาน (Bradford *et al.*, 1974 อ้างโดย Cameron *et al.*, 1988)

- วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต: ใช้วิธี phenol-sulfuric acid โดยใช้ D–mannose เป็นสารมาตรฐาน (Gerhardt *et al.*,1981 อ้างโดย Barriga *et al.*, 1999)

- วิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต: โดยใช้วิธี Ames ใช้ sodium phosphate เป็นสารมาตรฐาน (Ames *et al.*,1966 อ้างโดย Barriga *et al.*, 1999)

4. ศึกษาคุณสมบัติของแมนโนโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้

4.1 ศึกษาความจำเพาะของแมนโนโปรตีนต่อน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

นำแมนโนโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาทำให้แห้งแล้วละลายในน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ตามความเข้มข้นที่หาได้จาก critical emulsifier concentration ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำมันชนิดต่างๆ 4 มิลลิลิตร ได้แก่ น้ำมันข้าวโพด น้ำมันงา น้ำมันมะพร้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะกอก น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน น้ำมันรำข้าว แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer นาน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที 1 ชั่วโมง 1.5 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง แล้วคำนวณค่าตามความสามารถในการเกิดอิมัลชันตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1 และตั้งตัวอย่างที่เกิดอิมัลชันทั้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาหาค่า Emulsification index หรือ E_{24} (Cooper and Goldenberg, 1987) โดย

$$\text{Emulsification index } (E_{24}) = \frac{\text{ความสูงของอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง}}{\text{ความสูงของน้ำมันก่อนผสม}} \times 100$$

เลือกใช้น้ำมันที่ให้ค่า Emulsification index สูงสุดในการทดสอบในการทดลองขั้นต่อไป และเปรียบเทียบกับอิมัลซิไฟด์เออร์ทางการค้าคือ gum arabic และ lecithin

4.2 ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของแมนโนโปรตีน

ละลายแมนโนโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นตามความเข้มข้นที่หาได้จาก critical emulsifier concentration แล้วปรับพีเอชของตัวอย่างให้มีค่า 3 4 5 6 7 8 9 10 11 และ 12 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วทดสอบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันตามวิธีข้อ 5.1

4.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของแมนโนโปรตีน

ละลายแมนโนโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นตามความเข้มข้นที่หาได้จาก critical emulsifier concentration แล้วบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

,100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันเช่นเดียวกับข้อ 5.1

4.4 ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของแมนโนโปรตีน

ละลายแมนโนโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นแล้วเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0 1 2 และ 3 ตรวจสอบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันเช่นเดียวกับข้อ 5.1

4.5 ศึกษาลักษณะการเกิดอิมัลชันของแมนโนโปรตีน

- ใช้เทคนิค filter paper test และ dilution test ในการตรวจสอบชนิดของอิมัลชั่นที่เกิดขึ้นว่าเป็นแบบน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) หรือน้ำมันในน้ำ (oil in water emulsion) (Rieger, 1986)
- หาขนาดของอิมัลชั่นโดยการใช้วิธี droplet size distribution (DSD) โดยใช้ laser diffraction method (Hayati *et al.*, 2007) และเปรียบเทียบกับอิมัลซิไฟด์เออร์ทางการค้าคือ gum arabic และ lecithin

5. การประยุกต์ใช้แมนโนโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในการผลิตน้ำสลัด

ส่วนผสมการทำน้ำสลัดมีดังนี้ น้ำส้มสายชู 1/2 ถ้วยตวง น้ำมันถั่วเหลือง 1/4 ถ้วยตวง น้ำตาลทราย 2 ช้อนโต๊ะ เกลือป่น 1 ช้อนชา พริกไทยป่น 1 ช้อนชา และมัสตาร์ด 1/2 ช้อนชา โดยผสมน้ำส้มสายชู น้ำตาลทราย เกลือ ใส่หม้อตั้งไฟคนให้ละลาย รอจนเย็น จึงใส่น้ำมันถั่วเหลืองลงไปคนเร็วๆ จากนั้นใส่พริกไทยป่นและมัสตาร์ดแล้วแบ่งการทดลองออกเป็นสามชุด การทดลองคือ

ชุดควบคุมที่ 1 คือ น้ำสลัดสูตรปกติที่ไม่เติมสารสกัดแมนโนโปรตีน

ชุดควบคุมที่ 2 คือ น้ำสลัดสูตรปกติที่เติมสารสกัดแมนโนโปรตีนปริมาณ 0.2 0.4 0.6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

ชุดควบคุมที่ 3 คือ น้ำสลัดสูตรปกติที่เติมสารอิมัลซิไฟด์ทางการค้า คือ gum arabic และ lecithin ปริมาณ 0.2 0.4 0.6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

เขย่าน้ำสลัดแล้วทำการเปรียบเทียบ

- ขนาดของของอนุภาคอิมัลชัน: ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีสเกลติดอยู่

- ลักษณะการแยกชั้นที่เกิดขึ้นหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 30 60 นาที

บทที่ 3
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกแมนโนโปรตีนของเซลล์ยีสต์ที่ได้จากกากส่า

จากการนำกากส่าที่เหลือจากการกลั่นสุราพื้นบ้านมาสกัดแมนโนโปรตีนพบว่า มีแมนโนโปรตีนอยู่ในทั้งส่วนใสของกากส่า (2.31 กรัม/ลิตร) และในกากส่า (12.88 กรัม/ลิตร) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากน้ำหนักแห้งของ crude mannoprotein ในขั้นตอนต่อไป จึงสกัดแมนโนโปรตีนจากกากส่า

2. ศึกษาวิธีการสกัดแมนโนโปรตีนจากผนังเซลล์ยีสต์

เมื่อนำกากตะกอนเซลล์ยีสต์ที่เหลือจากการกลั่นสุราพื้นบ้านปริมาณ 50 กรัม (เซลล์เปียก) มาทำการสกัดแมนโนโปรตีนโดยวิธีการใช้ความร้อนร่วมกับความดัน (autoclave, 121 องศาเซลเซียส) ที่เวลาต่างๆ พบว่า เมื่อระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นสารสกัดหยาบแมนโนโปรตีนที่ได้จะเพิ่มขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามปริมาณแมนโนโปรตีนที่ได้จากการสกัดที่เวลา 15 30 และ 60 นาทีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดเป็น 90 และ 120 นาทีปริมาณสารสกัดหยาบแมนโนโปรตีนที่ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) แต่เมื่อพิจารณาถึงค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ทำให้เกิดอิมัลชันพบว่า การสกัดโดยวิธีการใช้ความร้อนร่วมกับความดันที่เวลา 15 30 และ 60 นาที จะมีค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ทำให้เกิดอิมัลชันเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร ในขณะที่การสกัดที่เวลา 90 และ 120 นาที ค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ทำให้เกิดอิมัลชันจะเพิ่มขึ้นเป็น 30 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาจากค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ทำให้เกิดอิมัลชันสามารถสรุปได้ว่าระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดด้วยวิธีความร้อนร่วมกับความดันคือ 30 นาที ถึงแม้การสกัดที่ระยะเวลา 15 30 และ 60 นาทีจะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การสกัดที่ระยะเวลา 30 นาที อิมัลชันที่ได้มีความคงตัวที่อุณหภูมิห้องมากกว่าการสกัดที่เวลา 15 นาที

การใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียวในการสกัดแมนโนโปรตีนจากผนังเซลล์ยีสต์ถึงแม้จะเพิ่มระยะเวลาในการให้ความร้อนแต่ผลผลิตที่ได้ไม่ได้เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3) และเมื่อทดสอบค่า

ความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ทำให้เกิดอิมัลชันพบว่า การสกัดโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงมีค่า 20 กรัม/ลิตร ในขณะที่การสกัดที่เวลา 4 และ 5 ชั่วโมงมีค่าเท่ากันคือ 30 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 การสกัดแมนโนโปรตีนจากกากตะกอนเซลล์ยีสต์ที่เหลือจากการกลั่นสุราพื้นบ้านด้วยวิธีการใช้ความร้อนร่วมกับความดัน (autoclave, 121 องศาเซลเซียส) ที่เวลาต่างๆ

ระยะเวลาในการสกัด (นาที)	ปริมาณสารสกัดหยาบแมนโนโปรตีน (กรัม/50 กรัม เซลล์เปียก)
15	13.21 ± 0.11b
30	13.48 ± 0.22b
60	13.56 ± 0.06b
90	14.36 ± 0.52a
120	14.56 ± 0.31a

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ทำให้เกิดอิมัลชันของสารสกัดหยาบแมนโนโปรตีนที่ได้จากการสกัดโดยวิธีการใช้ความร้อนร่วมกับความดัน (autoclave, 121 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลาต่างๆ

ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	การเกิดอิมัลชัน (%)				
	ระยะเวลาในการสกัด (นาที)				
	15	30	60	90	120
70	64.06 ± 1.26ab	63.33 ± 0.00a	64.38 ± 1.26a	64.69 ± 0.72a	64.69 ± 0.72a
60	65.17 ± 1.70a	63.33 ± 0.00a	65.11 ± 0.72a	63.40 ± 0.76a	62.65 ± 1.80ab
50	62.91 ± 0.773ab	2.22 ± 1.92ab	64.69 ± 0.72a	63.40 ± 0.76a	61.46 ± 1.30b
40	62.49 ± 0.73ab	61.80 ± 1.68ab	63.84 ± 0.76a	61.73 ± 2.14a	62.21 ± 1.30ab
30	61.16 ± 0.78bc	61.38 ± 1.20ab	62.17 ± 2.60a	**60.50 ± 1.15a**	**60.27 ± 2.93bc**
20	**60.71 ± 3.57bc**	**60.23 ± 1.74b**	**60.78 ± 1.32a**	52.52 ± 5.27b	58.03 ± 2.14c
10	59.28 ± 2.58c	53.33 ± 0.00c	53.70 ± 6.42b	47.62 ± 5.45b	0.00 ± 0.00d

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คุณหลิงหลง อรรถกระวีสุนทร

ตารางที่ 3 การสกัดแมนโนโปรตีนจากกากตะกอนเซลล์ยีสต์ที่เหลือจากการกลั่นสุราพื้นบ้านด้วยวิธีการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ

ระยะเวลาในการสกัด (ชั่วโมง)	ปริมาณสารสกัดหยาบแมนโนโปรตีน (กรัม/50 กรัม เซลล์เปียก)
3	12.63 ± 0.41a
4	12.73 ± 0.41a
5	13.14 ± 0.45a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ทำให้เกิดอิมัลชันของสารสกัดหยาบแมนโนโปรตีนที่ได้จากการสกัดโดยวิธีการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ

ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	การเกิดอิมัลชัน (%)		
	ระยะเวลาในการสกัด (ชั่วโมง)		
	3	4	5
70	58.03 ± 2.14a	54.42 ± 0.99a	56.61 ± 0.91a
60	57.32 ± 0.32a	53.85 ± 0.00ab	57.50 ± 1.86a
50	56.09 ± 0.91ab	54.32 ± 2.14ab	55.56 ± 0.00a
40	56.09 ± 0.91ab	56.66 ± 2.88ab	56.75 ± 2.73a
30	53.09 ± 2.14bc	**51.19 ± 4.37b**	**54.99 ± 0.99a**
20	**51.23 ± 2.97c**	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00b
10	0.00 ± 0.00d	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00b

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

การสกัดผนังเซลล์ยีสต์ด้วยความร้อนร่วมกับความดันและการใช้ความร้อนเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นจะได้สารสกัดหยาบแมนโนโปรตีนเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามสารที่เพิ่มขึ้นมานั้นไม่ใช่ แมนโนโปรตีนหรืออิมัลซิไฟด์เออร์เนื่องจากอาจจะมีส่วนประกอบอื่นๆ ของ ผนังเซลล์ยีสต์ถูกสกัดออกมามากขึ้นด้วย ซึ่งสามารถสังเกตได้จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดอิมัลชั่น

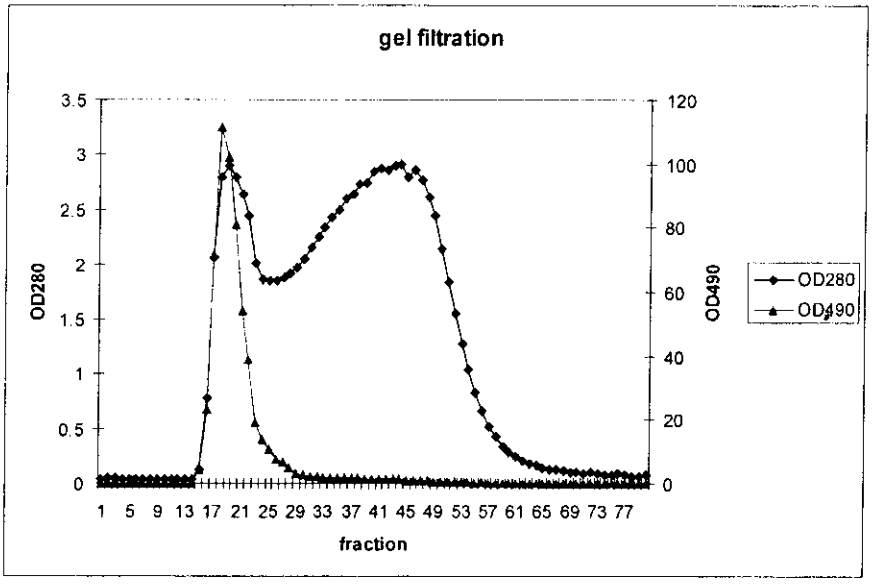
เพิ่มขึ้น (Torabizadeh *et al.*, 1996; Lukondeh *et al.*, 2003) ถึงแม้ว่าการสกัดด้วยความร้อนที่เวลา 3 ชั่วโมงจะให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดอิมัลชันเท่ากัน แต่เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์การเกิดอิมัลชันจะพบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยความร้อนร่วมกับความดันจะมีค่าการเกิดอิมัลชันที่สูงกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการสกัดด้วยความร้อนร่วมกับความดันเป็นเวลา 30 นาทีในการสกัดแมนโนโปรตีนจากผนังเซลล์ของยีสต์

3. การทำบริสุทธิ์แมนโนโปรตีน

สารที่ได้จากการสกัดและตกตะกอนมีสัญญาณปรากฏจากการตรวจสอบด้วย GPC 4 น้ำหนักโมเลกุล คือ 201,223 ดาลตัน 27,498 ดาลตัน 2,686 ดาลตัน และ 613 ดาลตัน เมื่อนำสารที่ตกตะกอนได้ไปทำไดอะไลซิสที่มี molecular weight cut-off 8,500 ดาลตัน เพื่อกำจัดสารที่มีโมเลกุลที่ต่ำกว่า 8,500 ดาลตันออกไป เนื่องจากแมนโนโปรตีนส่วนใหญ่ที่ได้จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงโดยส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 14,000 ดาลตัน ขึ้นกับสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ (Kononova *et al.*, 1993; Mormeneo *et al.*, 1994; Nakajima and Ichishima, 1994; Torabizadeh *et al.*, 1996; Alexandre *et al.*, 2000) นอกจากนี้เมื่อนำตัวอย่างที่อยู่ในถุงไดอะไลซิสมาหากิจกรรมการอิมัลซิไฟด์ พบว่า ตัวอย่างที่อยู่ในถุงไดอะไลซิสมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันถั่วเหลือง 61.53 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการใช้ gel filtration chromatography พบว่าสามารถแยกโปรตีนออกเป็น 2 ช่วง อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจปริมาณน้ำตาลของโปรตีนทั้งสองช่วงนั้น พบว่า เฉพาะตัวอย่างโปรตีนของช่วงแรกเท่านั้นที่มีน้ำตาล (ภาพที่ 7) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างช่วงแรกตั้งแต่หลอดที่ 13-23 คือแมนโนโปรตีนเพราะมีส่วนประกอบทั้งที่เป็นโปรตีนและน้ำตาลและเมื่อทดสอบกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์ พบว่า ตัวอย่างจากหลอดที่ 13-23 สามารถอิมัลซิไฟด์น้ำมันถั่วเหลืองได้โดยมีกิจกรรม 60 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมที่ลดลงของแมนโนโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้อาจจะเนื่องมาจากมีการกำจัดโปรตีนอื่นๆ ออกไป เพราะโปรตีนมีคุณสมบัติในการเป็นอิมัลซิไฟด์เออร์เช่นกัน (Garti, 1999) ส่วนตัวอย่าง โปรตีนในช่วงที่สองตั้งแต่หลอดที่ 24-77 ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบแสดงว่าไม่ใช่แมนโนโปรตีน (ภาพที่ 7)

เมื่อนำตัวอย่างแมนโนโปรตีนที่เก็บรวบรวมได้จากหลอดที่ 13-23 ไปตรวจสอบด้วย GPC อีกครั้งหนึ่งพบว่ามีเพียง 1 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 120 กิโลดาลตัน และมีโปรตีน 35.3 มิลลิกรัม (3.8 เปอร์เซ็นต์) และน้ำตาล 886.7 มิลลิกรัม (96.2 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสัดส่วนของปริมาณโปรตีนและน้ำตาลของแมนโนโปรตีนที่ได้ใกล้เคียงกับแมนโนโปรตีนที่ได้จาก *Saccharomyces*

cerevisiae ที่มีโปรตีนประมาณ 14 -15 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลประมาณ 81-83 เปอร์เซ็นต์ (Freimund *et al.*, 2003) หรือแมนโนโปรตีนที่ได้จาก *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรท 90 เปอร์เซ็นต์ และมีโปรตีน 4-6 เปอร์เซ็นต์ (Lukondeh *et al.*, 2003)



ภาพที่ 7 การทำบริสุทธิ์แมนโนโปรตีนโดยใช้ Sephadex G-100 ซึ่งใช้ Tris HCl 0.01 โมลาร์ พีเอช 7.3 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลาร์เป็นบัฟเฟอร์และมีอัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตร/นาที

4. ศึกษาคุณสมบัติของแมนโนโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้

4.1 ศึกษาความจำเพาะของแมนโนโปรตีนต่อน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

เมื่อนำแมนโนโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ gum arabic และ lecithin ที่ระดับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชั่น (critical emulsifier concentration) คือ 20 กรัม/ลิตร มาหาความจำเพาะกับน้ำมันแต่ละชนิด พบว่าแมนโนโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้สามารถอิมัลซิไฟด์น้ำมันพืชทั้ง 7 ชนิดที่นำมาทดสอบได้ โดยแมนโนโปรตีนสามารถอิมัลซิไฟด์น้ำมันมะกอกได้สูงที่สุด อย่างไรก็ตามค่า emulsification activity ที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับน้ำมันปาล์ม น้ำมันข้าวโพดและน้ำมันดอกทานตะวัน (ตารางที่ 5) ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้น้ำมันปาล์มในการทดสอบกิจกรรมของแมนโนโปรตีนในการวิจัยครั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับสารอิมัลซิไฟด์เออร์ทางการค้าคือ gum arabic และ lecithin พบว่า gum arabic ไม่สามารถอิมัลซิไฟด์น้ำมัน

ปาล์มและน้ำมันงาได้ ส่วน gum arabic ไม่สามารถอิมัลซิไฟด์น้ำมันงาและน้ำมันข้าวโพดได้ และค่า emulsification activity ของแมนโนโปรตีนและ gum arabic มีค่าไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และมีค่ากิจกรรมโดยส่วนใหญ่สูงกว่า lecithin ($p<0.05$) น้ำมันพืชทุกชนิดที่นำมาทดสอบประกอบด้วยกรดไขมัน 3 ตัวหลักคือ กรดโอเลอิก (oleic aicd) กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) และกรดปามมิติก (palmitic acid) (Patil and Chopade 2001) น้ำมันมะกอกมีกรดโอเลอิก ($C_{18:1}$) สูงจึงอาจจะเป็นสาเหตุให้มีการอิมัลซิไฟด์ได้ดีกับแมนโนโปรตีน

ความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชั่นจะขึ้นกับองค์ประกอบของน้ำมันและองค์ประกอบของอิมัลซิไฟด์เออร์ (Driscoll *et al.*, 2001) แมนโนโปรตีนมีโครงสร้างคล้ายกับ gum arabic มากกว่า lecithin โดยโครงสร้างของ gum arabic ประกอบด้วยกิ่งก้านของน้ำตาลกาแลกโตส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลแรมโนสและ กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) และยังประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) (McNamee *et al.*, 1998) ส่วน lecithin ประกอบด้วย phospholipid ซึ่งมีกลีเซอรอล กรดไขมัน 2 โมเลกุล มีฟอสเฟตและสารประกอบไนโตรเจน ดังนั้น emulsification activity ของแมนโนโปรตีนจึงมีความคล้ายคลึงกับ gum arabic มากกว่า lecithin

ตารางที่ 5 ค่า Emulsification activity (%) ของแมนโนโปรตีน gum arabic และ lecithin ต่อน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

Oil type	Mannoprotein*	Gum arabic	Lecithin
Olive oil	$62.67 \pm 1.77^{A**a***}$	65.52 ± 0.00^{Aa}	54.28 ± 2.67^{Cb}
Soybean oil	58.17 ± 2.80^{CDa}	61.38 ± 1.20^{Ba}	59.52 ± 2.06^{Ba}
Palm oil	60.74 ± 1.96^{ABCb}	0.00 ± 0.00^{Cc}	64.20 ± 2.14^{Aa}
Rice bran oil	58.55 ± 1.22^{BCDa}	58.13 ± 3.55^{Ba}	61.42 ± 2.59^{ABa}
Sesame oil	55.83 ± 1.14^{Da}	0.00 ± 0.00^{Cb}	0.00 ± 0.00^{Db}
Corn oil	62.03 ± 1.31^{Aa}	61.64 ± 2.62^{Ba}	0.00 ± 0.00^{Db}
Sunflower oil	61.62 ± 0.78^{ABa}	60.01 ± 1.21^{Ba}	55.52 ± 1.64^{Cb}

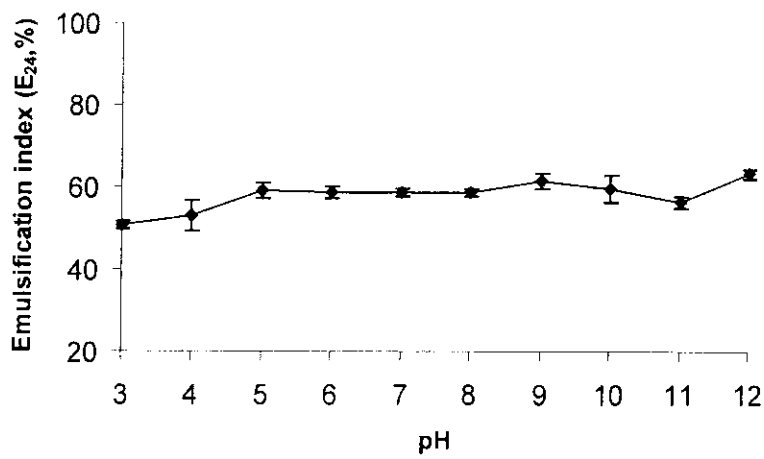
* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

** Different capital letters in the same column indicate significant differences ($p<0.05$).

*** Different letters in the same row indicate significant differences ($p<0.05$).

4.2 ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของแมนโนโปรตีน

พีเอชมีผลต่อกิจกรรมของแมนโนโปรตีน โดยกิจกรรมของแมนโนโปรตีนจะลดลงที่พีเอชต่ำกว่า 5 (ภาพที่ 8) อย่างไรก็ตามที่พีเอชตั้งแต่ 5-12 กิจกรรมของแมมนโนโปรตีนไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 8 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของแมนโนโปรตีน

4.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของแมนโนโปรตีน

หลังจากนำแมนโนโปรตีนไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเฉพาะอุณหภูมิที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น พาสเจอไรส์ ต้มเดือด และการฆ่าเชื้อ แล้วนำมาหาค่ากิจกรรมของแมนโนโปรตีน พบว่า ความร้อนไม่มีผลต่อกิจกรรมของแมนโนโปรตีน (ตารางที่ 6) ซึ่งการทนต่อความร้อนของแมนโนโปรตีนทำให้สามารถประยุกต์ใช้แมนโนโปรตีนที่ได้กับอุตสาหกรรมอาหารที่ต้องมีการให้ความร้อนหรือฆ่าเชื้ออาหารได้โดยไม่ทำให้กิจกรรมของแมนโนโปรตีนเสียไป (Gutierrez *et al.* 2008)

ตารางที่ 6 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของแมนโนโปรตีน

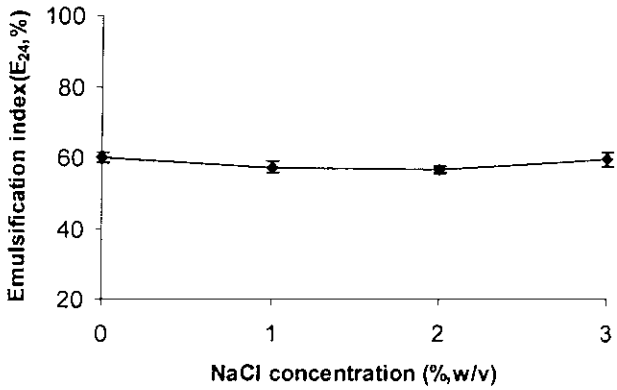
Temperature (°C)	Emulsification index* (E_{24}, %)
63	60.98 ± 1.86[a**]
100	59.50 ± 1.94[a]
121	60.26 ± 2.22[a]

* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

** Different letter in the same column indicate significant differences ($p<0.05$).

4.4 ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของแมนโนโปรตีน

โซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อกิจกรรมของแมนโนโปรตีน (ภาพที่ 9) การมีโซเดียมคลอไรด์ 1-3 เปอร์เซ็นต์ทำให้กิจกรรมการเกิดอิมัลชั่นของแมนโนโปรตีนลดลงเล็กน้อย ($p<0.05$) แมนโนโปรตีนที่สกัดได้จาก *Sachharomyces cerevisiae* และ *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 สามารถมีกิจกรรมได้ในช่วงพีเอช อุณหภูมิที่กว้าง และเกลือที่ความเข้มข้นสูง (Torabizadeh *et al.* 1996; Lukondeh *et al.* 2003)



ภาพที่ 9 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของแมนโนโปรตีน

4.5 ศึกษาลักษณะการเกิดอิมัลชันของแมนโนโปรตีน

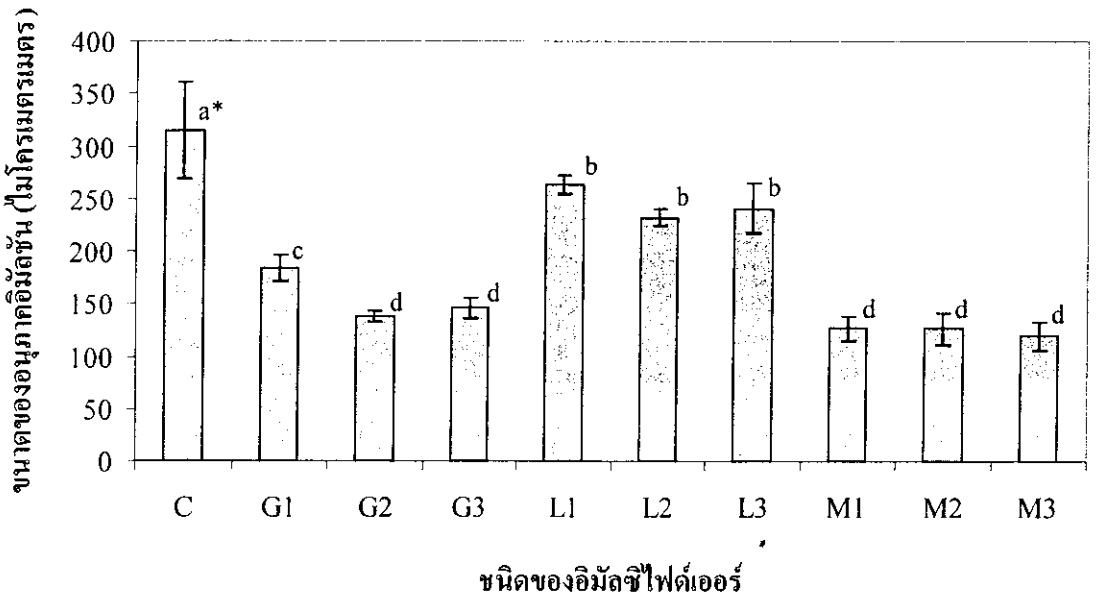
แมนโนโปรตีนทำให้น้ำมันปาล์มเกิดอิมัลชั่นแบบน้ำมันในน้ำ เนื่องจากอิมัลชั่นจะกระจายตัวไปอย่างรวดเร็วบนกระดาษกรองและคงเหลืออนุภาคของน้ำมันไว้ และเมื่อหาขนาดอนุภาคของอิมัลชั่นโดยจะเปรียบเทียบกับอิมัลชั่นที่เกิดจาก gum arabic และ lecithin โดยหาค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคอิมัลชั่น (droplet size distribiution) ที่เกิดขึ้น ซึ่งจะมี 4 ค่า คือ d(10), d(50) และ d(90) และค่า Span ดังแสดงในตารางที่ 7 อิมัลชั่นที่เกิดจากแมนโนโปรตีนมีขนาดเล็กกว่า 30 ไมโครเมตร 110 ไมโครเมตร และ 224 ไมโครเมตร มีจำนวน 10 เปอร์เซ็นต์ 50 เปอร์เซ็นต์ และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ lecithin มีความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชั่นที่มีขนาดเล็กที่สุดอิมัลชั่นมีความคงตัวมากที่สุดเมื่อพิจารณาจากค่า Span (Palazolo *et al.*, 2004) เนื่องจากอิมัลชั่นจะมีความคงตัวสูงเมื่อขนาดอนุภาคอิมัลชั่นยิ่งเล็ก (McClements, 1999)

ตารางที่ 7 ค่าการกระจายตัวของขนาดอิมัลชั่นที่เกิดจากแมนโนโปรตีน gum arabic และ lecithin

Samples	d(10) μm	d(50) μm	d(90) μm	Span
Mannoprotein	30.897	110.836	224.124	1.74
Gum arabic	35.676	105.670	189.049	1.45
Lecithin	26.449	86.464	170.747	1.67

5. การประยุกต์ใช้แมนโนโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในการผลิตน้ำสลัด

จากการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชั่นในน้ำสลัดโดยการใช้แมนโนโปรตีนที่แยกได้จากกากส่าเปรียบเทียบกับอิมัลซิไฟด์เออร์ทางการค้าสองชนิดคือ gum arabic และ lecithin ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลังจากการเขย่าเป็นเวลา 3 นาที พบว่า น้ำสลัดในแต่ละชุดการทดลองจะมีขนาดอนุภาคอิมัลชั่นแตกต่างกันตั้งแต่ 119.52-315.24 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 10 โดยตัวอย่างน้ำสลัดในชุดควบคุม (ไม่มีการเติมอิมัลซิไฟด์เออร์) มีขนาดอนุภาคของอิมัลชั่นใหญ่ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เติมอิมัลซิไฟด์เออร์ ($p>0.05$) และเมื่อพิจารณาชุดการทดลองที่เติมอิมัลซิไฟด์เออร์พบว่า ตัวอย่างน้ำสลัดที่เติมแมนโนโปรตีนที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และชุดการทดลองที่เติม gum arabic ที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดอนุภาคอิมัลชันไม่แตกต่างกัน ($p<0.05$) แต่ทั้ง 5 ชุดการทดลองข้างต้นมีขนาดอนุภาคอิมัลชันเล็กกว่าตัวอย่างน้ำสลัดที่เติมอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ความเข้มข้นอื่น ($p>0.05$)



ภาพที่ 10 ขนาดอนุภาคอิมัลชันของตัวอย่างน้ำสลัดที่เติมอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (C : control, G1 : gum arabic 0.2%, G2 : gum arabic 0.4%, G3 : gum arabic 0.6%, L1 : lecithin 0.2%, L2 : lecithin 0.4%, L3 : lecithin 0.6%, M1 : Mannoprotein from spent yeast 0.2%, M2 : Mannoprotein from spent yeast 0.4%, M3 : Mannoprotein from spent yeast 0.6%)

* ตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

gum arabic เป็นอิมัลซิไฟด์เออร์ที่มีประสิทธิภาพซึ่งจากการทดลองนี้จะพบว่า ตัวอย่างน้ำสลัดที่เติม gum arabic มีขนาดอนุภาคที่เล็กกว่าตัวอย่างที่เติม lecithin และเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เติมแมนโนโปรตีนพบว่า ตัวอย่างที่เติม แมนโนโปรตีนมีขนาดอนุภาคของอิมัลชั่นที่เล็กกว่าตัวอย่างที่เติม lecithin เช่นกัน นอกจากนี้ยังมีขนาดเล็กว่าตัวอย่างน้ำสลัดที่เติม gum arabic ที่ความเข้มข้นต่ำ และมีขนาดอนุภาคใกล้เคียงกับตัวอย่างน้ำสลัดที่เติม gum arabic ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น จึงแสดงให้เห็นว่า แมนโนโปรตีนที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีประสิทธิภาพสูงกว่า lecithin และมีประสิทธิภาพดีเทียบเท่าหรือสูงกว่า gum arabic ซึ่งเป็นสารที่ใช้กันแพร่หลายและมีจำหน่ายทางการค้า Nakauma และคณะ (2008) ศึกษาผลของ gum arabic ที่มีต่อคุณสมบัติการเกิดอิมัลชันในอาหารโดยใช้ triglyceride(MCT) เป็นแหล่งของน้ำมันและปรับพีเอชของตัวอย่างเป็น 3 ตลอดการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ gum arabic ขนาดอนุภาคของ

อิมัลชันเมื่อวัดด้วยค่า $d_{3,2}$ ($d_{3,2}$ value) จะลดลง และจะคงตัวที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีขนาดอนุภาคประมาณ 0.82 ไมโครเมตร ในการศึกษาครั้งนี้ขนาดอนุภาคที่วัดได้และความละเอียดของการวัดมีความแตกต่างจากการทดลองของ Nakauma และคณะ (2008) ค่อนข้างมาก ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะที่ต่างกันของตัวอย่างและที่สำคัญคือวิธีการวัดซึ่งจากการทดลองนี้วัดขนาดอิมัลชั่นโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีสเกลติดอยู่ทำให้ความคลาดเคลื่อนในการวัดมีสูงกว่าการใช้เครื่องมือวัดโดยเฉพาะที่คำนวณด้วยคอมพิวเตอร์

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

การสกัดแมนโนโปรตีนจากกากส่าโดยใช้ความร้อนร่วมกับความดันให้ปริมาณของแมนโนโปรตีนสูงกว่าการสกัดโดยใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียว โดยการสกัดด้วยการใช้ความร้อนร่วมกับความดันที่เวลา 30 นาที ได้ปริมาณแมนโนโปรตีน 13.48 กรัม/50 กรัมเซลล์เปียกของยีสต์ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดอิมัลชั่น (critical emulsifier concentration) เท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และมีค่า emulsification index (E_{24}) เท่ากับ 60.23 เปอร์เซ็นต์ อิมัลชั่นที่เกิดขึ้นเป็นแบบน้ำมันในน้ำ แมนโนโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 120 กิโลดาลตัน โดยมีองค์ประกอบคือ โปรตีน 4 เปอร์เซ็นต์และน้ำตาล 96 เปอร์เซ็นต์ แมนโนโปรตีนมีกิจกรรมในช่วงพีเอชตั้งแต่ 3-12 อุณหภูมิและโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-3 เปอร์เซ็นต์ไม่มีผลต่อกิจกรรมของแมนโนโปรตีน แมนโนโปรตีนมีศักยภาพในการนำไปผลิตสลัดน้ำใส โดยมีกิจกรรมไม่แตกต่างจากอิมัลซิไฟด์เออร์ทางการค้า คือ gum arabic และ lecithin อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาการประยุกต์ใช้แมนโนโปรตีนในด้านอื่นๆ อีก

เอกสารอ้างอิง

Alexandre, H., Blanchet, S. and Charpentier, C. 2000. Identification of a 49-kDa hydrophobic cell wall mannoprotein present in velum yeast which may be implicated in velum formation. FEMS Microbiol. 185: 147-150.

Babin, H., Dickinson, E., Chrisholm, H. and Beckett, S. 2005. Interactions in dispersions of sugar particles in food oils: influence of emulsifier. Food Hydrocolloid. 19: 513-520.

Barriga, A.T., Cooper, D.G., Idziak, E.S. and Cameron, D.R. 1999. Components of the bioemulsifier from *S.cerevisiae*. Enzyme Microb. Tech. 25: 96-102.

Bonilla, M., Olivaro, C., Corona, M., Vazquez, A. and Soubes, M. 2005. Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. J. Appl. Microbiol. 98: 456-463.

Calvo, C., Toledo, F.L., Pozo, C., Martinez, M.V. and Gonzalez, J. 2004. Biotechnology of bioemulsifiers produced by micro-organisms. J. Food Agri. Environ. 2: 238-243.

Cameron, D.R., Cooper, D.G. and Neufeld, R.J. 1988. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1420-1425.

Cooper, D.D. and Goldenberg, B.G. 1987. Surface active agents from to *Bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol. 53: 224-229.

Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol . Mol. Biol. Rev. 61: 47-64.

Driscoll, D.F., Giampietro, K., Wichelhaus, D.P., Peterss, H., Nehne, J., Niemann, W. and Bistrian, B.R. 2001. Physicochemical stability assessments on lipid emulsions of varying oil composition. Clin. Nutr. 20: 151-157.

Feuillat, M. 2002. Yeast macromolecules: origin, composition, and enological interest. J. Enol. Vitic. 54:3.

Freimund, S., Sauter, M., Kappeli, O. and Dutler, H. 2003. A new non-degrading isolation process for 1,3-β-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Carbohydr. Polym. 54: 159-171.

Garti, N. 1999. What can nature offer from an emulsifier point of view: trends and progress?. Colloid. Surface. A. 152: 125-146.

Gutierrez, T, Leo, V.V., Walker, G.M, and Green D.H. 2008. Emulsifying properties of a glycoprotein extract produced by a marine *Flexibacter* species strain TG382, Enzyme Microb. Technol doi:10.1016/j.enzmictec.2009.04.001

Hayati, I.N., Man, Y.B.C., Tan, C.P. and Aini, I.N. 2007. Stability and rheology of concentrated O/W emulsions based on soybean oil/palm kernel olein blends. Food Res. Int. 40: 1051-1061.

Janny, K., Kappeli, O. and Fiechter, A. 1991. Biosurfactant from *Bacillus linheniformis*: structure analysis and characterization. Appli. Microbiol. Biotechnol. 36: 5-13.

Kononova, S.V., Tsiomenko, A.B. and Golubev, W.I. 1993. Extracellular glycoprotein specific for *Saccharomyces sensu strict.* FEMS Microbiol. Lett. 113: 77-80.

Lin, S.C. and Jiang, H.J. 1997. Recovery and purification of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus subtilis* by ultrafiltration. Biotechnol. Tech. 11: 413-416.

Lukondeh, T., Ashbolt, N. J. and Rogers, P. L. 2003. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 715-720.

Magnelli, P., Cipollo, J.F. and Abeijon, C. 2002. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and β-1,6-Glucan fine structure. Anal. Biochem. 301: 136-150.

McClements, D.J. 1999. Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques (pp. 235-266). Boca Raton, FL: CRC Press.

McNamee, B.F., O'riordan, E.D. and O'sullivan, M. 1998. Emulsification and microencapsulation properties of gum arabic. J. Agric. Food Chem. 46: 4551-4555.

Mormeneo, S., Marcilla, A., Iranzo, M. and Sentandreu, R. 1994. Structural mannoproteins released by β-elimination from *Candida albicans* cell walls. FEMS Microbiol. Lett. 123: 131-136.

Nakajima, T. and Ichishima, E. 1994. Chemical structure of galactomannan moiety in the cell wall glycoproteins of *Aspergillus oryzae*. J. Fermen. Bioeng. 6: 472-475.

Nakauma, M., Funami, T., Noda, S., Ishihara, S., Al-Assaf, S., Nishinari, K. and Phillips, G. O. 2008. Comparison of sugar beet pectin, soybean soluble polysaccharide, and gum arabic as food emulsifiers. 1. Effect of concentration, pH, and salts on the emulsifying properties. Food Hydrocolloid. 22:1254-1267.

Oberbremer, A., Muller-Hurtig, R. and Wagner, F. 1990. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. Microbiol. Biotechnol. 32: 485-489.

Palazolo, G.G., Sorgentini, D.A. and Wagner, J.R. 2004. Emulsifying properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other proteins. Creaming stability of oilin-water emulsions. J. Am. Oil Chem. Soc. 81: 625-632.

Patil, J.R. and Chopade, B.A. 2001. Studies on bioemulsifier production by *Acinetobacter* strains isolated from healthy human skin. J. Appl. Microbiol. 91: 290-298.

Rieger, M.M. 1986. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. (L. Lachman, H.A. Lieberman and J.L. Kanig, eds) Lea and Febiger, Philadelphia.

Ron, E.Z. and Rosenberg, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. Environ. Microbiol. 3: 229-236.

Shepherd, R., Rockey, J., Sutherland, I. W. and Roller, S. 1995. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. J. Biotechnol. 40: 207-217.

Torabizadeh, H., Shojaosadati, S.A. and Tehrani, H.A. 1996. Preparation and characterisation of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products. Lebensm-Wiss. Technol. 29: 734-737.

Vance, M.H., Gusmao, N.B. and Campos, G.M. 2003. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. J. Microbiol. 34: 120-123.

Output

International Journal:

Maneerat, S., Dikit, P. and H-Kittikun, A. Mannoprotein from spent yeast obtained from Thai traditional liquor distillation: extraction and characterization. J. Food Process Eng. (submitted).

Title: MANNOPROTEIN FROM SPENT YEAST OBTAINED FROM THAI TRADITIONAL LIQUOR DISTILLATION: EXTRACTION AND CHARACTERIZATION

Authors: SUPPASIL MANEERAT*, PAWEENA DIKIT and ARAN H-KITTIKUN

Affiliation: Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand

*corresponding author: suppasil.m@psu.ac.th, Tel.: +66 74286379, Fax: + 66 74212889

Potential reviewers:

- Tredwell Lukondeh, e-mail: t.lukondeh@unsw.edu.au
- Stefan Freimund, e-mail: freimund@tech.chem.ethz.ch

ABSTRACT

Mannoprotein from spent yeast obtained from Thai traditional liquor distillation was extracted by autoclaving in a neutral citrate buffer for 30 min. The yield of mannoprotein was 0.27 g/g wet cells. The mannoprotein obtained was evaluated for chemical and physical stability to establish its potential use as a natural emulsifier in processed foods. The extracted mannoprotein exhibited emulsion of 60.23% towards palm oil as oil-in-water and had a critical emulsifier concentration of 20 g/l. The composition of the mannoprotein was 96% carbohydrate and 4% protein. The emulsion activity of the mannoprotein was similar to those of commercial emulsifiers (lecithin and gum arabic). The emulsion activity of mannoprotein towards palm oil was stable over a broad range of pH (3-12), NaCl concentrations of 0-3% (w/v), $CaCl_2$ and $MgCl_2$ concentrations of 0-0.1% (w/v). Temperature did not affect the emulsion activity of mannoprotein. Mannoprotein from spent yeast could be developed as a source of bioemulsifier for use in the food industry.

PRACTICAL APPLICATIONS

Mannoprotein from spent yeast obtained from Thai traditional liquor distillation is considered to have an activity similar to the commercial emulsifiers, lecithin and gum arabic. It could be developed as a source of bioemulsifier for use in the food industry. The production of the bioemulsifier would be economically advantageous, since the process converts a low-value waste into a high-value product.

Keywords: mannoprotein, bioemulsifier, spent yeast, liquor distillation

INTRODUCTION

Emulsifiers are widely used in the food industry but these are synthetic emulsifiers such as glycerol monosterate (GMS) and carboxymethylcellulose (CMC). Although they are very effective in their intended functions, these compounds are gradually losing favor. This is because of increasing pressure from consumers to reduce the use of "artificial" or chemically synthesized additives in food (Shepherd *et al.* 1995). Thus, consumers have become interested in natural and healthy food ingredients. Natural emulsifiers are becoming increasingly important in the food industry rather than synthetic emulsifying agents, which may be potential health hazards for humans (Lukondeh *et al.* 2003). Besides, some natural plant-derived food emulsifiers such as lecithin and gum arabic are already on the market. However, these suffer from limited functionality in many food products (Shepherd *et al.* 1995).

Currently the Thai government promotes "One Tumbol-One Product, OTOP". Accordingly, one of the OTOP products is a traditional distilled spirit. Generally, producers directly distill palm sugar wine directly without using separate yeast cells to obtain spirit. After distillation a huge amount of waste containing yeast cells is discharged. This causes environmental problems because it has a high biological oxygen demand. *Saccharomyces cerevisiae* is normally used for alcohol fermentation. Mannoprotein extracted from *S. cerevisiae* has been shown to be an effective bioemulsifier (Cameron *et al.* 1988). The presence of hydrophilic mannose polymers covalently attached to the protein backbone provides the mannoprotein with the amphiphilic structure common to surface active agents and effective emulsifiers (Cooper and Goldenberg 1987). Mannoprotein is an emulsifier obtained as a by-product from the wine or brewing industry. It is readily availability, biodegradable, is not toxic, and large scale production is possible. It can make possible the producing of

value-added by-products (Torabisadeh *et al.* 1996). Since *S. cerevisiae* is edible and used in the manufacture of food and beverage products, it is assumed that a mannoprotein bioemulsifier would be non-toxic and generally recognized as safe (GRAS) (Cameron *et al.* 1988).

The objectives of this study were to extract and characterize mannoprotein from spent yeasts obtained from Thai traditional liquor distillation. The emulsifier property of mannoprotein was also compared with those of commercial bioemulsifiers, lecithin and gum arabic.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Commercial vegetable oils (soybean oil, palm oil, corn oil, olive oil, sunflower oil, rice bran oil and sesame oil) were purchased from a supermarket. Gum arabic was purchased from Nacalai tesgue (Kyoto, Japan). Lecithin was obtained from Fluka (USA). All other chemicals used were analytical grade.

Extraction and partial purification of mannoprotein

Distillate obtained from local distiller in Songkhla Province, Thailand was centrifuged at 8,000 rpm for 10 min at 4°C. Cells pellet were washed twice in normal saline. Twenty percent (w/v) yeast cells were suspended in distilled water containing 0.1 M potassium citrate and 0.02 M potassium metabisulfite. The pH of the suspension was adjusted to 7 with 1 M NaOH. The cell suspension was autoclaved (121°C) for 15, 30, 60, 90 and 120 min. The resulting suspensions were centrifuged at 8,000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant was retained and mixed with five volume of chilled ethanol, incubated overnight at 4°C for complete precipitation. The suspension was centrifuged at 8,000 rpm for 10 min at 4°C. After centrifugation, the

supernatant was discarded and the precipitate was washed twice with chilled ethanol. The precipitate was dried by a rotary evaporator and freeze dried (Barriga *et al.* 1999).

Determination of type of emulsion formed

Filter paper wetting test and dilution test (Rieger 1986) were used to determine the type of emulsion formed.

Determination of droplet size distribution

The droplet size distributions (DSD) for fresh emulsions were measured approximately 1 h after the preparation by a laser diffraction method as described by Hayati *et al.* (2007). Distilled water was used as the dispersant for the determination of the emulsion lipid globule size distribution. The software used a reflective index of dispersant RI 1.33 (water) to calculate the Dispersion Index (Span) by span = d(90)-d(10)/d(50). The d(10), d(50) and d(90) values are size values corresponding to the cumulative distribution at 10%, 50% and 90%, respectively. Thus, the d(10) represents a size value below which 10% of the cumulative distribution is present. Drops of emulsion were introduced into the sample presentation unit until the concentration reached the optimum one, as indicated by the instrument.

Stability of mannoprotein

The mannoprotein (20 g/l) was prepared in distilled water. To investigate the effects of pH, salts concentration (NaCl, $CaCl_2$ and $MgCl_2$) and temperature on emulsification activity of mannoprotein, the mannoprotein solution was adjusted with 1 N HCl or NaOH to obtain the pHs of 3-12. NaCl was added to the sample to obtain the final concentrations of 0-3% (w/v). $CaCl_2$ and $MgCl_2$ were also added to the samples to obtain the final concentrations of 0-0.1% (w/v). For thermal stability study, the mannoprotein solution was incubated at 63°C for 30 min, 100°C for 15 min and 121°C for 15 min and cooled to 30°C. The remaining activity was then determined.

125 Commercial bioemulsifiers (lecithin and gum arabic) at the same concentrations were
126 also subjected to stability study.

127 **Analytical method**

128 The total carbohydrate was determined colorimetrically by the method of
129 Dubois *et al.* (1956) with mannose used as the standard. Protein was estimated by the
130 dye-binding assay (Bradford 1976) with bovine serum albumin used as the standard.
131 Emulsification activity was measured according to the method of Cameron *et al.*
132 (1988) with a slight modification. To 1 ml of mannoprotein suspension, 1 ml of
133 vegetable oil was added and vortexed at high speed for 3 min. The mixture was
134 allowed to stand for 1 h (%EA) and 24 h (emulsification index, E_{24}) prior to
135 measurement. Emulsification activity (%EA) is defined as the height of the emulsion
136 layer divided by the total height and expressed as percentage. The experiments were
137 done in triplicate and results were reported as the average from triplicate
138 determinations.

139 **Statistical analysis**

140 Data were subjected to analysis of variance (ANOVA). A comparison of
141 means was carried out by Duncan's multiple-range test. Statistical analysis was
142 performed using the Statistical Package for Science (SPSS 10.0 for Windows, SPSS
143 Inc., Chicago, IL).

144 **RESULTS AND DISCUSSION**

145 The effect of the extraction time on the mannoprotein yield, emulsification
146 index (E_{24}) and critical emulsifier concentration of mannoprotein are summarized in
147 Table 1. It was found that the yield of mannoprotein increased with increasing the
148 time in the autoclave. However, every extraction time had E_{24} at about 60%. Critical
149 emulsifier concentrations were 20 g/l and 30 g/l when autoclaved for 15-60 min and

150 90-120 min, respectively. The effectiveness of the bioemulsifier is evident from its
151 low critical micelle concentration (Mohana *et al.* 2009). Although autoclaving for 15
152 min also gave the least critical emulsifier concentration and exhibited the same
153 emulsification activity value, it gave less stability of emulsion after being left to stand
154 at room temperature for many days (data not shown). Accordingly, autoclaving for 30
155 min was the best condition for mannoprotein extraction from spent yeast obtained
156 from traditional liquor distillation. In the present study extraction time was shorter
157 than that of Torabizadeh *et al.* (1996) who found that the optimum time for *S.*
158 *cerevisiae* bioemulsifier extraction was 120 min at 121°C. This might be due to the
159 effect of heating during the liquor distillation process. The distillers boil the palm
160 wine for a long time to obtain distilled spirit. Therefore, for spent yeast obtained from
161 the waste of traditional liquor distillation it was not necessary to spend as long a time
162 for extraction as with fresh yeast cells. It was found that mannoprotein obtained from
163 spent yeast consisted of a minor proportion of 4% proteins which was covalently
164 linked to the major proportion of 96% carbohydrates. The carbohydrate and protein
165 content in this study was consistent with the report of Lukondeh *et al.* (2003) who
166 found that mannoprotein was composed of 90% carbohydrate (mannose) and 4-6 %
167 protein.

168 Mannoprotein, gum arabic and lecithin at the critical emulsifier concentration
169 (20 g/l) was checked for the specificity of vegetable oil emulsion. Mannoprotein
170 extracted from spent yeast emulsified all the vegetable oil tested (Table 2). The
171 maximum emulsifying activity was observed with olive oil, corn oil, sunflower oil
172 and palm oil. However, the emulsification index of crude mannoprotein towards these
173 vegetable oils was not significantly different ($p< 0.05$). All the oils tested were
174 comprised mainly of three fatty acids, oleic acid, linoleic acid and palmitic acid, in

varying proportions. Oleic acid and linoleic acid are unsaturated fatty acids, whereas palmitic acid and stearic acid are saturated fatty acids (Patil and Chopade 2001). Accordingly, olive oil, corn oil and sunflower oil display a higher degree of unsaturation as compared with palm oil, and have the least degree of unsaturation. Olive oil is rich in unsaturated oleic acid ($C_{18:1}$), suggesting a high emulsification specificity with mannoprotein.

Mannoprotein exhibited emulsification activity higher than the commercial emulsifiers gum arabic and lecithin. Gum arabic could not emulsify palm oil and sesame oil. Lecithin could not emulsify sesame oil and corn oil. The stability of the emulsions will be affected by the composition of the oil dispersed phase as found by Driscoll *et al.* (2001). Moreover, structure of the three compounds (mannoprotein, gum arabic and lecithin) was also considered. The structure of gum arabic is more similar to mannoprotein than lecithin. The structure of gum arabic is composed of a highly branched arrangement of the simple sugars galactose, arabinose, rhamnose, and glucuronic acids. It also contains a protein component (about 2 percent, w/w) covalently bound within its molecular arrangement (McNamee *et al.* 1998). Thus, gum arabic consisted of carbohydrate and a small amount of protein like mannoprotein. On the other hand, lecithin contains phospholipids. It is composed of glycerol, two fatty acid, phosphate and has a nitrogenous base. Therefore, the emulsification activity of mannoprotein was much more similar to gum arabic than lecithin.

Mannoprotein promoted the formation of oil-in-water emulsions. This was because it was found that emulsions dispersed rapidly on filter paper and dispersed cloudily in water, and remained a droplet in oil.

199 The droplet mean diameters of d(10), d(50), d(90) and Span are summarized in
200 Table 3. It is generally important that emulsion droplets are made as small as possible.
201 A convenient way to evaluate the relative effectiveness of an emulsifier is to
202 determine droplet size distribution. The droplet size of mannoprotein was compared
203 with commercial emulsifiers (gum arabic and lacithin). There were 3 pieces of
204 information on distribution. d(10), d(50) and d(90) showed that there are about 10%,
205 50% and 90% of smaller droplets (μm) in the distribution, respectively.

206 The span indicates the width of the distribution regardless of the median size
207 (Palazolo *et al.* 2004). Vegetable oil, which gives the highest emulsion with each
208 emulsifier, was used for the investigation. The particle size where the cumulative
209 distribution is 50% is known as the median droplet diameter ($d_{v,0.5}$). All the emulsions
210 showed a monomodal distribution of droplets. Emulsion from mannoprotein had a
211 $d_{v,0.5}$ with 50% of the particles under 110.836 μm, compared with emulsion from gum
212 arabic and lecithin which had 105.670 μm and 86.464, μm respectively. It revealed
213 that the emulsion from lecithin had the smallest particle size. The span of lecithin
214 emulsion was the lowest; it indicated that emulsion from lecithin had the lowest
215 polydispersity of the emulsion. It showed more stability of emulsion than others.
216 Particle size distribution is a key characteristic, as it contributes to the physical
217 stability property of the emulsion. The stability of an emulsion can be enhanced by
218 reducing the droplet size. As a rule, large globules tend to coalesce faster than small
219 ones (McClements 1999). Thus, obtaining an emulsion with a uniformly smaller
220 droplet size becomes essential to achieve a stable emulsion system.

221 The effects of various pHs (3-12) on the activity of mannoprotein are
222 presented in Figure 1. The emulsification activity of mannoprotein decreased clearly

223 with decreasing pH below 5. However, no changes in activity were noticeable in the
224 pH range of pH 5-12.

225 After the mannoprotein was incubated at temperatures which are usually used
226 in food processing such as pasteurization, cooking and food thermal processing, the
227 residual activity was determined (Table 4). All the temperatures tested did not show
228 any influence on the emulsification activity towards palm oil of mannoprotein. This
229 characteristic of mannoprotein may be attributed to certain chemical groups that
230 endow it with protection from hydrolytic degradation. This is a useful property for
231 many commercial applications that involve surface-active or emulsifying agents in
232 formulations subjected to high temperature treatments (Gutierrez *et al.* 2008).

233 The effect of salts on the emulsification activity of mannoprotein is illustrated
234 in Fig. 2. NaCl and $MgCl_2$ had no effect on the emulsification activity of
235 mannoprotein. A slight decrease in activity of mannoprotein was observed when
236 $CaCl_2$ was added.

237 Mannoprotein extracted from spent yeast obtained from traditional liquor
238 distillation was stable over a wide range of physical and chemical conditions. The
239 results were in accordance with previous studies that found that mannoproteins from
240 *S. cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 were stable in a wide rang of
241 pHs, temperatures and salts (Torabizadeh *et al.* 1996; Lukondeh *et al.* 2003).

242 **CONCLUSION**

243 The spent yeast produced as a waste from the local liquor distillation could
244 provide a source of raw material for the mass production of mannoprotein emulsifier.
245 This could eliminate the need to grow the yeast specifically for the production of
246 emulsifier. It is also good for the environment waste discharge from local distillers
247 would be reduced. In addition, the production of the bioemulsifier would be

248 economically advantageous, since the process converts a low-value waste into a high-
249 value product.

250 **REFERENCES**

251 BARRIGA, A. T., COOPER, D. G., IDZIAK, E. S. and CAMERON, D. R. 1999.
252 Components of the bioemulsifier from *S.cerevisiae.* Enzyme Microb. Technol.
253 *25*, 96-102.

254 BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of
255 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
256 Anal. Biochem. *72*, 248-254.

257 CAMERON, D. R., COOPER, D.G. and NEUFIELD, R.J. 1988. The mannoprotein of
258 *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. Appl. Environ.
259 Microbiol. *54*, 1420-1425.

260 COOPER, D.D. and GOLDENBERG, B.G. 1987. Surface active agents from to
261 *Bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol. *53*, 224-229.

262 DRISCOLL, D.F., GIAMPIETRO, K., WICHELHAUS, D.P., PETERSS, H.,
263 NEHNE, J., NIEMANN, W. and BISTRIAN, B.R. 2001. Physicochemical
264 stability assessments on lipid emulsions of varying oil composition. Clin. Nutr.
265 *20*, 151-157.

266 DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. and SMITH, F.
267 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances.
268 Anal. Chem. *28*, 152-181.

269 GUTI'ERREZ T, LEO V.V., WALKER G.M, and GREEN D.H. 2008. Emulsifying
270 properties of a glycoprotein extract produced by a marine *Flexibacter* species
271 strain TG382, Enzyme Microb. Technol doi:10.1016/j.enzmictec.2009.04.001

272 HAYATI, I.N., MAN, Y.B.C., TAN, C.P. and AINI, I.N. 2007. Stability and rheology
273 of concentrated O/W emulsions based on soybean oil/palm kernel olein blends.
274 Food Res. Int. *40*, 1051-1061.
275 LUKONDEH, T., ASHBOLT, N.J. and ROGERS, P.L. 2003. Evaluation of
276 *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a
277 source of a natural bioemulsifier. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. *30*, 715-720.
278 McNAMEE, B.F., O'RIORDAN, E.D. and O'SULLIVAN, M. 1998. Emulsification
279 and microencapsulation properties of gum arabic. J. Agric. Food Chem. *46*,
280 4551-4555.
281 McCLEMENTS, D.J. 1999. Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques
282 (pp. 235–266). Boca Raton, FL: CRC Press.
283 MOHANA, S., ACHARYA, B.K. and MADAMWAR, D. 2009. Distillery spent wash:
284 Treatment technologies and potential applications. J. Hazard. Mater. *163*, 12-25.
285 PALAZOLO, G.G., SORGENTINI, D.A. and WAGNER, J.R. 2004. Emulsifying
286 properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in
287 comparison with other proteins. Creaming stability of oilin-water emulsions. J.
288 Am. Oil Chem. Soc. *81*, 625-632.
289 PATIL, J.R. and CHOPADE, B.A. 2001. Studies on bioemulsifier production by
290 *Acinetobacter* strains isolated from healthy human skin. J. Appl. Microbiol. *91*,
291 290-298.
292 RIEGER, M.M. 1986. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, (L. Lachman,
293 H.A. Lieberman and J.L. Kanig, eds) Lea and Febiger, Philadelphia.
294 SHEPHERD, R., ROCKEYU, J., SUTHERLAND, I.W. and ROLLER, S. 1995.
295 Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. J. Biotechnol. *40*,
296 207-217.

297 TORABIZADEH, H., SHOJAOSADATI, S.A. and TEHRANI, H.A. 1996.
298 Preparation and characterisation of bioemulsifier from *Saccharomyces*
299 *cerevisiae* and its application in food products. Lebensm-Wiss. Technol. *29*,
300 734-737.

ACKNOELEDGEMENTS

I would like to thank the Commission on Higher Education, Thailand for supporting by grant fund under the program Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Ph.D. Program Thai Doctoral degree for this research. This research was also funded by The Thailand Research Fund and The Commission on Higher Education for Project No. MRG5080211.

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1 EFFECT OF pH ON EMULSIFICATION ACTIVITY OF MANNOPROTEIN. BARS REPRESENT THE STANDARD DEVIATION FROM TRIPLICATE DETERMINATIONS

Fig.2 EFFECTS OF NaCl (a), $CaCl_2$ (b) AND $MgCl_2$ (c) CONCENTRATION ON EMULSIFICATION ACTIVITY OF MANNOPROTEIN. BARS REPRESENT THE STANDARD DEVIATION FROM TRIPLICATE DETERMINATIONS

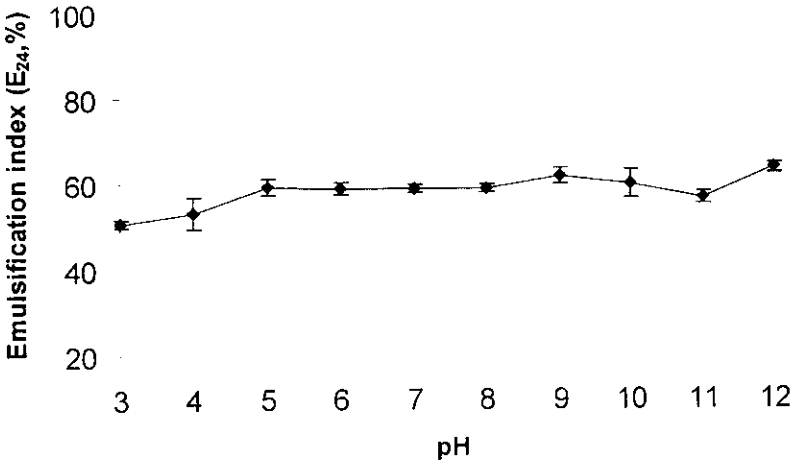
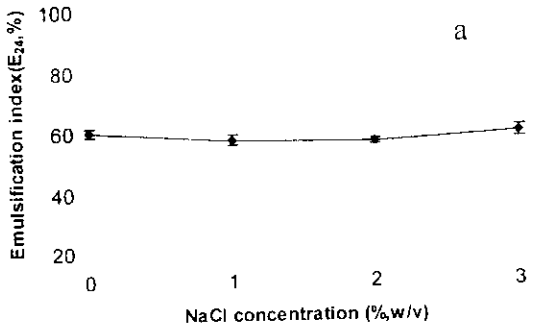
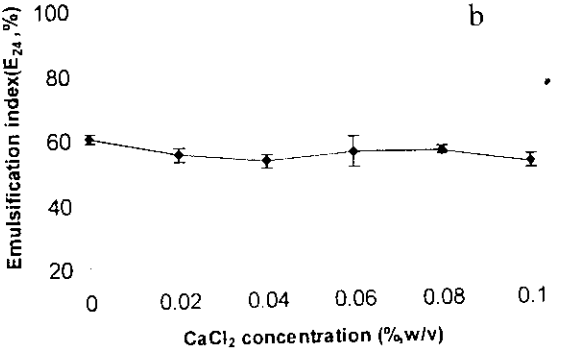


Figure 1

Maneerat *et al.*





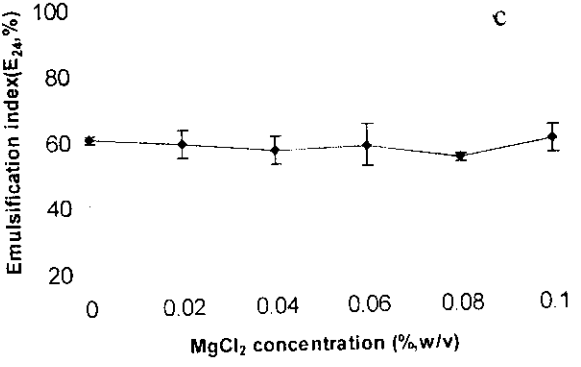


Figure 2

Maneerat *et al.*

Table 1.

EFFECT OF EXTRACTION TIME ON MANNOPROTIEN YIELD, EMULSIFICATION INDEX (E_{24}) AND CRITICAL EMULSIFIER CONCENTRATION

Extraction time (min)	Bioemulsifier yield* (g/ 50 g cell yeast)	Emulsification index (E_{24}, %)	Critical emulsifier concentration (g/l)
15	$13.21 \pm 0.11^{b**}$	60.71 ± 3.57^{a}	20
30	13.48 ± 0.22^{b}	60.23 ± 1.74^{a}	20
60	13.56 ± 0.06^{b}	60.78 ± 1.32^{a}	20
90	14.36 ± 0.52^{a}	60.50 ± 1.15^{a}	30
120	14.56 ± 0.31^{a}	60.27 ± 2.93^{a}	30

* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

** Different letter in the same column indicate significant differences ($p<0.05$).

Table 2.

VEVETABLE OIL EMULSIFICATION BY MANNOPROTEIN, GUM ARABIC AND LECITHIN

Oil type	Mannoprotein*	Gum arabic	Lecithin
Olive oil	$62.67 \pm 1.77^{A**a***}$	65.52 ± 0.00^{Aa}	54.28 ± 2.67^{Cb}
Soybean oil	58.17 ± 2.80^{CDa}	61.38 ± 1.20^{Ba}	59.52 ± 2.06^{Ba}
Palm oil	60.74 ± 1.96^{ABCb}	0.00 ± 0.00^{Cc}	64.20 ± 2.14^{Aa}
Rice bran oil	58.55 ± 1.22^{BCDa}	58.13 ± 3.55^{Ba}	61.42 ± 2.59^{ABa}
Sesame oil	55.83 ± 1.14^{Da}	0.00 ± 0.00^{Cb}	0.00 ± 0.00^{Db}
Corn oil	62.03 ± 1.31^{Aa}	61.64 ± 2.62^{Ba}	0.00 ± 0.00^{Db}
Sunflower oil	61.62 ± 0.78^{ABa}	60.01 ± 1.21^{Ba}	55.52 ± 1.64^{Cb}

* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

** Different capital letters in the same column indicate significant differences ($p<0.05$).

*** Different letters in the same row indicate significant differences ($p<0.05$).

Table 3.

DROPLET MEAN DIAMETERS AND DISPERSITY INDEX (SPAN) OF EMULSIONS

Samples	d(10) μm	d(50) μm	d(90) μm	Span
Mannoprotein	30.897	110.836	224.124	1.74
Gum arabic	35.676	105.670	189.049	1.45
Lecithin	26.449	86.464	170.747	1.67

Table 4.

THE EFFECT OF TEMPERATURE ON ACTIVITY OF THE CRUDE MANNOPRTEIN

Temperature (°C)	Emulsification index* (E_{24}, %)
63	$60.98 \pm 1.86^{a**}$
100	59.50 ± 1.94^{a}
121	60.26 ± 2.22^{a}

* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

** Different letter in the same column indicate significant differences ($p<0.05$).