บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการเร่งการย่อยตัวเองของยีสต์ โดยยีสต์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นยีสต์สำหรับผลิตขนมปัง โดยศึกษาผลของอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง การเติมสารเคมี และเอนไซม์ต่อการเร่งการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ขนมปัง โดยวิเคราะห์และคำนวณหาปริมาณโปรตีนในออโตไลเสตเพื่อทำการเปรียบเทียบผลที่ได้จากภาวะต่างๆ

4.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยตัวเองของยีสต์

การย่อยตัวเองของยีสต์เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยอาศัยแอคติวิตีของเอนไซม์ต่างๆ ภายในเซลล์ยีสต์ ดังนั้นจึงต้องควบคุมอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นซึ่งมีผลโดยตรงต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ จึงทำการศึกษาผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่มีต่อการย่อยตัวเองของยีสต์เป็นปัจจัยแรก โดยแปรอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นให้อยู่ในช่วง 35 - 60 องศาเซลเซียส และ 3.0 - 6.0 ตามลำดับ พบว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.0 - 5.0 ให้ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสตมากกว่าช่วงอื่นที่ใช้ในการทดลอง และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.0 - 5.0 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.0 ให้ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสตสูงกว่าและมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นใกล้กับค่าความเป็นกรดด่างในสารละลายแขวนลอยยีสต์เริ่มต้น (ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของยีสต์อยู่ในช่วง 4.8 ถึง 5.3) ทำให้สะดวกและลดปริมาณของสารเคมีที่เติมเพื่อปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเมื่อขยายการทดลองในระดับสูง จึงเลือกค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นนี้ใช้ในการทดลองต่อไป ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสตที่ได้จากทดลองนี้ คือ 162.80 ± 0.54 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง คิดเป็น 35.96 ± 1.12 เปอร์เซ็นต์การย่อยตัวเองของยีสต์ จากผลการทดลองดังกล่าวเห็นได้ว่าอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างมีผลต่อการย่อยตัวเองของยีสต์ เนื่องจากในการย่อยตัวเองของยีสต์เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นจากการทำงานของระบบเอนไซม์ภายในเซลล์ยีสต์ ซึ่งมีเอนไซม์สำคัญอยู่ 2 กลุ่ม คือ เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ และ เอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ที่สำคัญคือ ได้แก่ กลูคาเนส และ แมนนาเนส ทำหน้าที่ย่อย กลูแคนและแมนแนน ตามลำดับ ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ยีสต์ ดังนั้นหากใช้ภาวะเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้โครงสร้างผนังเซลล์จะถูกทำลายและองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ยีสต์ออกมาภายนอกได้ ผลที่ได้จากการทดลองหาอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด

ด่างที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ในเซลล์ยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยตัวเองของ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าอยู่ในช่วงที่ Reed และ Nagodawithana (1991) Hough และ Maddox (1970) Sugimoto และคณะ (1976) เสนอไว้

4.2 ศึกษาผลของสารเคมีต่อการเร่งการย่อยตัวเองของยีสต์

การย่อยตัวเองของยีสต์โดยอาศัยแอคติวิตีของเอนไซม์ภายในเซลล์เพียงอย่างเดียวนั้น ต้องใช้เวลานานกว่าการย่อยสลายจะเกิดขึ้น ดังนั้นจึงศึกษาผลของการใช้สารเคมีที่มีผลต่อการย่อยสลายเพื่อลดระยะเวลาในการผลิตยีสต์ออโตไลเสต จากการทดลองเติมสารเคมี Titron X-100 โพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ เอทานอล ในระดับต่างๆ ร่วมกับควบคุมอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมต่อการย่อยตัวเองของยีสต์ พบว่าการเติม Titron X -100 2.5 % โซเดียมคลอไรด์ 7.5 % หรือเอทานอล 7.5 % ทำให้ได้ปริมาณโปรตีน 46.34 43.92 ± 0.70 และ 56.79 ± 0.19 เปอร์เซ็นต์การย่อยตัวเองของยีสต์ ตามลำดับ แม้ว่าการเติม Titron X – 100 2.5 % ให้ผลของปริมาณโปรตีนในออโตไลเสตมากกว่าที่ได้จากการเติมโซเดียมคลอไรด์ 7.5 % เพียง 2.42 เปอร์เซ็นต์การย่อยตัวเองของยีสต์ ซึ่ง Titron X – 100 มีคุณสมบัติเป็นดีเทอร์เจนต์ซึ่งมีความเป็นพิษต่อผู้บริโภค และมีราคาแพงกว่าโซเดียมคลอไรด์มาก ดังนั้นจึงทดลองหาอิทธิพลร่วมระหว่างโซเดียมคลอไรด์ และเอทานอล พบว่าภาวะที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ร่วมกับเอทานอลอย่างละ 7.5 % ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนสูงขึ้นเป็น 59.00 ± 0.47 เปอร์เซ็นต์การย่อยตัวเองของยีสต์ การเติมเอทานอลอาจมีผลต่อสารชีวโมเลกุลที่บริเวณผนังเซลล์ยีสต์ จึงเกิดความเปลี่ยนแปลงและสูญเสียความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารผ่านผนังเซลล์ (Breddam และ Beenfeldt, 1991) รวมทั้งอาจเพิ่มความสามารถในการละลายของสารภายในเซลล์ให้ละลายออกมานอกเซลล์ได้มากขึ้น การเติมโซเดียมคลอไรด์ มีผลทำให้เซลล์สูญเสียน้ำภายในเซลล์เพื่อรักษาสมดุลของแรงดันออสโมติก ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ (Sugimoto และคณะ, 1976) ทำให้พลาสมาเมมเบรนแตกในที่สุด องค์ประกอบภายในเซลล์จึงออกมาภายนอกเซลล์ รวมทั้งยังช่วยลดการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อน (Chao และ คณะ, 1980 ; Reed และ Nagodawithana, 1991) ผลจากการเติมเอทานอล 7.5 % ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ 7.5 % ทำให้ปริมาณโปรตีนสูงขึ้นเพียงเล็กน้อย จึงใช้ผลของการวิเคราะห์เชิงสถิติ โดยวิธี Yate's method สรุปได้ว่า การเติมเอทานอล และการเติมโซเดียมคลอไรด์ เพียงอย่างเดียว มีผลต่อการเร่งการย่อยตัวเองของยีสต์ ซึ่งเป็นไปตาม Sugimoto และคณะ (1976) เสนอไว้ แต่การเติมเอทานอลร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ ไม่มีผลร่วมต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีน เมื่อเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้จากการเติมเอทานอลเพียงอย่างเดียว อาจเนื่องจากเอทานอลและโซเดียมคลอไรด์มีหน้าที่เหมือนกัน

คือ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ทำให้โปรตีนในเซลล์ออกมานอกเซลล์ ซึ่งเอทานอลมีอิทธิพลมากกว่าโซเดียมคลอไรด์ จึงได้ปริมาณโปรตีนมากกว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์

4.3 ภาวะที่เหมาะสมในการเร่งการย่อยตัวเองของยีสต์โดยเติมเอนไซม์พาเพน (Rohm GmbH) พาเพน (BDH) เฟลเวอร์ไซม์ และนิวเทรส

การเติมเอนไซม์จำพวกโปรติเอสเพื่อเร่งการย่อยตัวเองของยีสต์ เป็นการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ภายในเซลล์ยีสต์และเอนไซม์จากภายนอก งานวิจัยนี้ได้หาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ยีสต์ โดยค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ พาเพน (BDH) พาเพน (Rohm GmbH) เฟลเวอร์ไซม์ และนิวเทรส อยู่ในช่วง 6.0-6.5 จากนั้นทำการหาแอคติวิตีในการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด และทำการเร่งการย่อยตัวเองของยีสต์โดยเติมเอนไซม์ 1,000 ยูนิตต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง เปรียบเทียบผลการทดลองจากการเติมเอนไซม์ พาเพน (BDH) และ พาเพน (Rohm GmbH) พบว่าการเติมพาเพน (BDH)ได้ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสตมากกว่าการใช้พาเพน (Rohm GmbH) โดยมีปริมาณโปรตีนในออโตไลเสต 147.94 ± 0.22 และ 122.47 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง ตามลำดับ ทำการทดลองโดยใช้เอนไซม์ เฟลเวอร์ไซม์ และนิวเทรส เร่งการย่อยสลายโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในการทดลอง พบว่าได้ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสต 120.15 ± 2.05 และ 137.75 ± 0.24 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง ตามลำดับ จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการเติมเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณออโตไลเสต อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนในออโตไลเสตที่ได้จากภาวะที่มีการเติมเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด โดยมีบัฟเฟอร์เป็นสารแขวนลอยได้ปริมาณโปรตีนน้อยกว่าปริมาณโปรตีนที่ได้จากภาวะที่ไม่มีการเติมสารเร่งการย่อยสลาย (ตารางที่ 3.13) เนื่องจาก ภาวะที่เติมเอนไซม์ได้ปรับภาวะให้เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เติมแต่เป็นภาวะไม่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ในเซลล์ และภาวะที่ไม่มีการเติมสารเร่งการย่อยสลายเป็นภาวะที่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ในเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ภายในเซลล์ยีสต์มีผลต่อการย่อยตัวเองของยีสต์มากกว่าการเติมเอนไซม์แต่ละชนิดเมื่อใช้บัฟเฟอร์เป็นสารแขวนลอยยีสต์ จึงได้ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสตมากกว่า อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่วัดได้ระหว่างการทดลองมีค่าไม่คงที่ จึงทำการทดลองเพื่อให้ค่าความเป็นกรดด่างคงที่ตลอดการทดลอง โดยการใช้เอนไซม์พาเพน(BDH)ในการทดลองเนื่องจากปริมาณโปรตีนในออโตไลเสตที่ได้มีปริมาณมากที่สุด และทำการแปรชนิดและความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่างซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และอะซิเตตบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของพาเพน คือ 6.5 ทำการทดลองโดยเติมเอนไซม์พาเพน (BDH) 1,000

ยูนิตต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าการเปลี่ยนชนิดของบัฟเฟอร์ ทั้ง 3 ชนิด ไม่สามารถควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้คงที่ได้ จึงทำการเพิ่มความเข้มข้นของอะซิเตตบัฟเฟอร์เป็น 0.15 โมลาร์ โดยทดลองในภาวะที่ไม่มีการเติมเอนไซม์และวัดค่าความเป็นกรดด่างตลอดการทดลอง พบว่าความเป็นกรดด่างระหว่างการทดลองไม่คงที่ ดังนั้นจึงทดลองใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นสารแขวนลอยยีสต์ ในการเร่งการย่อยตัวเองของยีสต์ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้จากการทดลอง พบว่าได้ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสตมากกว่าการเร่งการย่อยตัวเองของยีสต์โดยใช้บัฟเฟอร์ในการแขวนลอย ซึ่งได้ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสต 185.67 ± 1.33 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ยีสต์แห้ง คิดเป็น 41.00 ± 0.29 เปอร์เซ็นต์การย่อยตัวเองของยีสต์ จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า การใช้เอนไซม์พาเพนมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนในออโตไลเสตที่ได้จากการย่อยตัวเองของยีสต์ ซึ่งเป็นไปตามที่ Chao และคณะ (1980) และ Verduyn และ คณะ (1999) เสนอไว้ ซึ่งอาจเป็นเพราะเอนไซม์โปรติเอสที่เติมนั้นมีความสามารถในการย่อยโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ผนังเซลล์ยีสต์ ทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลาย ส่งผลให้องค์ประกอบภายในเซลล์ออกมาข้างนอกเซลล์ได้ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนในสารสกัดจากยีสต์เพิ่มมากขึ้น (Chao และ คณะ, 1980) และจาก ผลการทดลองของค่าความเป็นกรดด่างระหว่างการบ่มเมื่อทำการเร่งการย่อยตัวเองของยีสต์ในภาวะที่ใช้บัฟเฟอร์และน้ำปราศจากไอออนเป็นสารแขวนลอย พบว่าสามารถควบคุมค่าความเป็นกรดด่างได้ ภายใน 24 ชั่วโมงแรก ซึ่งหลังจากนั้นพบว่าไม่สามารถควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้คงที่ระหว่างการบ่มได้ แม้จะใช้บัฟเฟอร์เป็นสารแขวนลอย ซึ่งอาจเกิดจากการสลายตัวของโปรตีนและแอมโมเนีย โดยในระหว่างการทดลองสังเกตพบว่าเริ่มมีกลิ่นของแอมโมเนีย ตั้งแต่ระยะเวลาการบ่มที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งทำให้ค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้น แม้ว่าปริมาณโปรตีนที่ได้ในช่วงดังกล่าวเริ่มคงที่ (ตารางที่ 3.30 3.32 3.33 3.34 และ 3.36) ดังนั้น ภาวะที่ได้ปริมาณโปรตีนสูงอาจไม่ใช่ภาวะที่ให้ปริมาณโปรตีนดีที่สุด เนื่องจากอาจมีการสลายตัวของโปรตีนเป็นแอมโมเนียในระหว่างการทดลอง

ทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในออโตไลเสตที่ได้จากการเร่งการย่อยตัวเองของยีสต์ พบว่าภาวะที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 7.5 % ร่วมกับเอทานอล 7.5 % ได้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุด จึงเลือกใช้ภาวะนี้ในการทดลองขนาด 4.5 ลิตร

4.4 ผลการทดลองเร่งการย่อยตัวเองของยีสต์ในการทดลองขนาด 4.5 ลิตร

ทำการทดลองขนาด 4.5 ลิตร ใช้ภาวะทดลองเหมือนกับการทดลองในขวดเขย่า พบว่าได้ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสตใกล้เคียงกัน คือ 58.55 และ 59.00 ± 0.47 % ของน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง ตามลำดับ โดยภาวะที่เติมสารเร่งการย่อยสลายมีปริมาณกรดอะมิโนสูงกว่าที่ไม่เติมสารเร่งการย่อยสลาย และออโตไลเสตที่ได้มีปริมาณกรดกลูตามิกและกรดแอสปาร์ติก คิดเป็น

3.20 และ 5.55 % ออโตไลเสต ตามลำดับ ซึ่งจากการเติมสารเร่งการย่อยสลายทำให้ได้ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสตมากกว่าภาวะที่ไม่เติมสารเร่งการย่อยสลายประมาณ 2 เท่า ซึ่งในทำนองเดียวกัน ปริมาณกรดอะมิโนในภาวะที่เติมสารเร่งการย่อยสลายมีปริมาณกรดอะมิโนมากกว่าภาวะที่ไม่เติมสารเร่งการย่อยสลายประมาณ 2 เท่าด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 3.41) ซึ่งกรดกลูตามิกเป็นกรดอะมิโนที่สำคัญของสารประกอบในกลุ่มสารเพิ่มรส คือ โมโนโซเดียมกลูตาเมท ดังนั้นสารสกัดจากยีสต์ที่ได้จากการทดลองนี้เหมาะกับการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของสารเพิ่มรสต่อไป จากนั้นนำออโตไลเสตมาอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) ได้สารสกัดจากยีสต์ 376.43 กรัม โดยมีสารสกัดจากยีสต์บางส่วนสูญเสียไประหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาหาค่าการละลาย พบว่าได้สารละลายสีเหลืองใสที่ 4 % ของสารสกัดจากยีสต์ในน้ำปราศจากไอออน ค่าความเป็นกรดด่าง 5.7 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเมื่อนำสารสกัดจากยีสต์หาปริมาณเกลือ พบว่ามีปริมาณเกลือ 55 % ต่อน้ำหนักสารสกัดจากยีสต์ และคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดจากยีสต์ได้ 61.11 % ของสารประกอบของแข็งในสารสกัดจากยีสต์เมื่อหักปริมาณเกลือออกแล้ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย