การเลียนแบบกลิ่นรสเนื้อโดยใช้ยีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัติ

นายธีรวุฒิ ฤทธิ์เดชา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544
ISBN 974-17-0193-4
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IMITATION MEAT FLAVOR BY YEAST AUTOLYSATE FOR VEGETARIAN FOOD

Mr. Thirawut Ritdecha

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Food Technology

Department of Food Technology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2001
ISBN 974-17-0193-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเลียนแบบกลิ่นรสเนื้อโดยใช้ยีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัติ
โดย	นายธีรวุฒิ ฤทธิ์เดชา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... รองคณบดีฝ่ายบริหาร
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิพัฒน์ การเที่ยง) รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พัชรี ปานกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นินนาท ชินประหัษฐ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ธีรวุฒิ ฤทธิ์เดชา : การเลียนแบบกลิ่นรสเนื้อโดยใช้ยีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัติ. (Imitation Meat Flavor by Yeast Autolysate for Vegetarian Food). อ.ที่ปรึกษา : อ. ดร.รมณี สงวนดีกุล, 221 หน้า. ISBN 974-17-0193-4.

ยีสต์ออโตไลเสทเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของยีสต์ สามารถใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร (food flavor) ที่ให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อสัตว์ และใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรส (flavor enhancer) ในอาหารได้ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิตยีสต์ออโตไลเสทจากยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces carlsbergensis* ที่แยกได้จากตะกอนเบียร์ โดยนำยีสต์มาผ่านการกำจัดสารประกอบที่ให้รสขม (bitter substance) จากฮอพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.0%(w/v) ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 50°C ระยะเวลา 20, 30 และ 40 นาที พบว่าการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 2.0% ที่อุณหภูมิ 25°C ระยะเวลา 20 นาที สามารถลดค่าความขมได้ 90.8% โดยยีสต์จะเหลือค่าความขม (bitterness unit) 12.65 และมีการสูญเสียยีสต์ 14.94% จากนั้นปรับปรุงกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทโดยการเติมกลูเต็นข้าวสาลี โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และกากถั่วเหลืองปริมาณ 0, 10 และ 20%(w/v) ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L และ Flavourzyme® 1000L. ปริมาณ 0, 1.0 และ 2.0%(v/v) ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์นาน 18, 20 และ 24 ชั่วโมง จะทำให้ปริมาณออโตไลเสทโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ของยีสต์ออโตไลเสทที่ได้เพิ่มสูงขึ้น การเติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% (w/v) ร่วมกับ Flavourzyme®1000L 1.0%(v/v) ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 20 ชั่วโมง จะได้ยีสต์ออโตไลเสทที่มีปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุด คือ 70.72%, 27.53 mg./ml. และ 12.17 mg/ml ตามลำดับ เมื่อนำยีสต์ออโตไลเสทที่ได้มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 100°C จนมีความชื้น 3-5% และบดเป็นผง จากนั้นทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท โดยการเติมลงในน้ำซุปผักปริมาณ 0.05% (w/v) พบว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ได้จากภาวะดังกล่าวจะให้ค่าการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อที่สูง การศึกษาการย่อยสลาย RNA และการเกิดสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ โดยการเติมเอนไซม์ 5'-Phosphodiesterase RP®-1 (PDE) ปริมาณ 0.2, 0.5 และ 1.0%(w/v) ในยีสต์ ออโตไลเสทที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 45, 55 และ 65°C ระยะเวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง พบว่าการเติม PDE 0.2% ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี และยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองแล้วย่อยสลายที่อุณหภูมิ 55°C ระยะเวลา 2 ชั่วโมง จะมีปริมาณ 5'GMP, 5'AMP และ 5'IMP เป็น 71.76, 361.51 และ 21.60 μg./ml. และ 67.40, 416.06 และ 10.97 μg./ml. ตามลำดับ เมื่อนำยีสต์ออโตไลเสทที่ได้มาเติมซิสเตอีน 0.1-0.3 เมทไธโอนีน 0.1-0.3 และไทอามีน 0.1-0.2 ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้น พบว่าการเติมซิสเตอีน 0.3 เมทไธโอนีน 0.2 และไทอามีน 0.1 ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี และการเติมซิสเตอีน 0.1 เมทไธโอนีน 0.1 และไทอามีน 0.1 ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองก่อนทำให้เข้มข้นและอบแห้ง เมื่อนำมาทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อโดยการเติมลงในซุปผัก จะมีคะแนนการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อที่สูงเหมาะสมต่อการใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสเพื่อให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อในอาหาร เมื่อทดสอบการใช้ยีสต์ออโตไลเสทที่ได้ในการเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสคล้ายเนื้อในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นมังสวิรัติ โดยการเติมยีสต์ออโตไลเสทปริมาณ 1.0, 2.0 และ 3.0%(w/w) ของน้ำหนักวัตถุดิบหลัก พบว่าการเติมยีสต์ออโตไลเสทปริมาณ 0.2% จะให้คะแนนด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อที่สูงและมีคะแนนการยอมรับด้านกลิ่นรสสูงที่สุด

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2544.....

##4172310623 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY
KEY WORD: YEAST AUTOLYSATE/ MEAT LIKE FLAVOR/ FOOD FLAVOR/ 5'-NUCLEOTIDE
THIRAWUT RITDECHA ; IMITATION MEAT FLAVOR BY YEAST AUTOLYSATE FOR VEGETARIAN FOOD. THESIS ADVISOR ; ROMANEE SANGUANDEEKUL, Ph.D., 221 pp. ISBN 974-17-0193-4.

Yeast autolysate is a product from self-digestion of yeast cells. It can be used as meat like flavor and flavor enhancer in food. In this study, yeast autolysate was made from spent brewer's yeast (*Saccharomyces carlsbergensis*) by first reducing the bitterness with alkaline washing and then improving the meat like flavor of yeast autolysate by adding non yeast protein; *i.e*. wheat gluten, soy protein isolate and soy bean meal; along with the addition of exogenous enzymes, *i.e*. Neutrase® 0.5L or Flavourzyme® 1000L, in the autolysis process. Alkaline washing with 2% sodium carbonate at 25°C for 20 minutes reduced the bitterness of yeast 90.8% which gave the final bitterness in the bitterness unit of 12.65 and the yeast loss of 14.94% Addition of non-yeast protein and exogenous enzymes in the autolysis process increased the yield, protein content and carbohydrate content of yeast autolysate. The addition of 10%(w/v) wheat gluten and 1.0%(v/v) Flavourzyme® 1000L at 45°C and pH 5.5 with autolysis time of 20 hours gave the highest yield, protein content and carbohydrate content at 70.72%, 27.53 mg./ml. and 12.17 mg./ml., respectively. The yeast autolysate was dried at 100°C to the moisture content of 3-5%. Addition of 0.05%(w/v) of the dried yeast autolysate to the vegetable soup stock resulted in soup with the high score in meat like flavor. The production of yeast autolysate which contained high 5'-nucleotides was prepared by hydrolysing RNA in the mixture of yeast autolysate and non-yeast protein with phosphodiesterase. Incubation of 0.2% (w/v) 5'-Phosphodiesterase RP®-1 (PDE) with the yeast autolysate plus wheat gluten at pH 6.5 and 55°C for 2 hours gave the high content of 5'-GMP, 5'-AMP and 5'-IMP at 71.76, 361.51 and 21.60 μg./ml., respectively. While incubation of 0.2% (w/v) 5'-Phosphodiesterase RP®-1 with the yeast autolysate plus soy bean meal at the same condition gave the high content of 5'-GMP, 5'-AMP and 5'-IMP at 67.40, 416.06 and 10.97 μg./ml., respectively. Improvement of meat like flavor was done with the addition of cysteine, methionine and thiamine at 0.3, 0.2 and 0.1 part per thousand of the dry matter content in the case of the concentrated yeast autolysate plus wheat gluten or the addition of cysteine, methionine and thiamine at 0.1, 0.1 and 0.1 part per thousand of the dry matter content in the case of the concentrated yeast autolysate plus soy bean meal. Addition of 0.05%(w/v) of the dried yeast autolysate mixture to the vegetable soup stock resulted in soup with the high score in meat like flavor. Using yeast autolysate mixture powder as food flavor in vegetarian meat ball was performed at the level of 1.0, 2.0 and 3.0%(w/w) of the main ingredient used. The best result was 2.0%.

Department.....Food Technology..... Student's signature.....
Field of study.....Food Technology..... Advisor's signature.....
Academic year.....2001.....

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำงานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อ.ดร.รมณี สงวนดีกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ข้อมูลความรู้ทางวิชาการ และการช่วยเหลือในด้านการทำวิจัย รวมทั้งการตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร.พัชรี ปานกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ. ดร.นินนาท ชินประหัษฐ์ และ ผศ.ดร.สุเมธ ตันตระเธียร กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งได้ให้ข้อแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณ บริษัท ไทยอมฤตบริวเวอรี่ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ตะกอนเบียร์ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในงานวิจัย และคุณประสิทธิ์ แจ่มประเสริฐ ที่ให้การช่วยเหลือในการเก็บตะกอนเบียร์

ขอขอบพระคุณ บริษัท อีสต์เอเชียติก (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์ Neutrase® 0.5L. และเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L. ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ บริษัท แอบบรา คอร์ปอเรชั่น จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ กลูเต็นข้าวสาลี และโปรตีนถั่วเหลืองสกัด เพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ บริษัท ไทยเทพรสผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ กากถั่วเหลือง เพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ บริษัท ไมท์ตี้อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ ยีสต์สกัด และยีสต์ออโตไลเสททางการค้า และขอขอบพระคุณ Dr. Ming Tzao Chen ที่ให้ความอนุเคราะห์กลิ่นรสเนื้อสัตว์ที่ใช้ในการปรุงแต่งอาหาร เพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ Mr. Satoshi Yosuda บริษัท Amano enzyme ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์ 5'-Phosphodiesterase RP®-1 เพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนเงินทุนบางส่วนในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและการแนะนำในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ และขอบคุณเพื่อนๆ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย รวมถึงอาจารย์สำนักวิชาวิทยาศาสตร์การกีฬา และน้องๆชมรมลีลาศ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้กำลังใจในการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์

และสุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณยาย คุณย่า น้องสาว และคนพิเศษ ที่คอยให้ความรัก กำลังใจ และสนับสนุนทางด้านการศึกษาตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญรูป.....ฌ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. วารสารปริทัศน์.....3
3. วิธีการทดลอง.....53
4. ผลการทดลอง.....64
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....116
6. สรุปผลการทดลอง.....132
รายการอ้างอิง.....137
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก.....147
ภาคผนวก ข.....151
ภาคผนวก ค.....183
ภาคผนวก ง.....187
ภาคผนวก จ.....204
ภาคผนวก ฉ.....205
ภาคผนวก ช.....208
ภาคผนวก ซ.....210
ภาคผนวก ญ.....211
ภาคผนวก ด.....213
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....221

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 คุณลักษณะของเอนไซม์โปรตีเอสในยีสต์.....13
2.2 องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์เบียร์แห้ง.....17
2.3 ปริมาณวิตามินบีในยีสต์.....17
2.4 ปริมาณกรดอะมิโนในยีสต์.....18
2.5 สารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาของกลิ่นรสอาหารคาว.....26
2.6 ชนิดของสารประกอบที่ให้กลิ่นรสในเนื้อวัว
และเนื้อไก่ที่ผ่านการให้ความร้อน.....27
2.7 องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสท.....28
2.8 ปริมาณของวิตามินในยีสต์ออโตไลเสท.....28
2.9 ปริมาณของกรดอะมิโนที่มีในยีสต์ออโตไลเสท.....29
2.10 สารประกอบระเหยได้ที่สำคัญในยีสต์สกัดทางการค้า.....33
2.11 ปริมาณเฉลี่ยของยีสต์ออโตไลเสทหรือยีสต์สกัด
ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร.....50
2.12 ปริมาณการผลิตโดยประมาณของสารปรุงแต่งอาหารบางชนิด.....52
4.1 องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ.....64
4.2 การกำจัดสารให้รสขมโดยการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียม
ไฮดรอกไซด์.....66
4.3 การกำจัดสารให้รสขมโดยการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียม
คาร์บอเนต.....68
4.4 การเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการล้างในวิธีต่างๆ.....70
4.5 องค์ประกอบทางเคมีของกลูเต็นข้าวสาลี
โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และกากถั่วเหลือง.....71
4.7 การเติมกลูเต็นข้าวสาลีและเอนไซม์ Neutrase® 0.5L
ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 73
4.8 ค่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ
ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับ
เอนไซม์ Neutrase® 0.5L.....75

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.9 การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (SPI) และเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 77
4.10 ค่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L.....78
4.11 การเติมกากถั่วเหลือง (SBM) และเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 80
4.12 ค่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L.....81
4.13 การเติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์.....83
4.14 ค่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท ที่เติม กลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 85
4.15 การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (SPI) ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์.....87
4.16 ค่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท ที่เติม โปรตีนถั่วเหลืองสกัดร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L.....89
4.17 การเติมกากถั่วเหลือง (SBM) ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์.....92

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.18 ค่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของ
ยีสต์ออโตไลเสท ที่เติม กากถั่วเหลืองร่วมกับ
เอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 93
4.19 การเปรียบเทียบผลทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสทที่เติม
กลูเต็นข้าวสาลี โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และกากถั่วเหลือง ร่วมกับ
การเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L และ Flavourzyme® 1000L.....95
4.20 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของ
ยีสต์ออโตไลเสทที่เติม กลูเต็นข้าวสาลี โปรตีนถั่วเหลืองสกัด
และกากถั่วเหลือง ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L
และ Flavourzyme® 1000L.....96
4.21 ปริมาณของ RNA ในยีสต์ออโตไลไลเสทที่เติมโปรตีนพืช
และไม่เติมโปรตีนพืช.....98
4.22 ปริมาณ RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี เมื่อผ่าน
การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ PDE ปริมาณ 0.2, 0.5 และ 1.0%
ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 65°C ระยะเวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง.....99
4.23 ปริมาณ RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี เมื่อผ่าน
การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ PDE ปริมาณ 0.2, 0.5 และ 1.0%
ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 65°C ระยะเวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง.....100
4.24 ปริมาณ RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง เมื่อผ่าน
การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ PDE ปริมาณ 0.2, 0.5 และ 1.0%
ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 65°C ระยะเวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง.....101
4.25 ปริมาณ RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง เมื่อผ่าน
การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ PDE ปริมาณ 0.2, 0.5 และ 1.0%
ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 65°C ระยะเวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง.....102

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.26 ปริมาณสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี หรือกากถั่วเหลือง เมื่อเติมเอนไซม์ PDE ปริมาณ 0.2% อุณหภูมิ 55°C ระยะเวลา 2 ชั่วโมง……103

4.27 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทที่เติม กลูเต็นข้าวสาลี 10% Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 20 ชั่วโมง ร่วมกับการเติม ซิสเตอีน เมทไธโอนีน และไทอามีนที่ระดับต่างๆ ……105

4.28 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง 20% Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 18 ชั่วโมง ร่วมกับการเติม ซิสเตอีน เมทไธโอนีน และไทอามีนที่ระดับต่างๆ……..106

4.29 องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนพืช……107

4.30. การเปรียบเทียบระยะเวลาของโครมาโตแกรมยีสต์ออโตไลเสทที่เติม กลูเต็นข้าวสาลีและกากถั่วเหลือง กับยีสต์ออโตไลเสททางการค้าและ กลิ่นรสที่มีจำหน่ายทางการค้า……109

4.31 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี หรือกากถั่วเหลือง……112

4.32 ปริมาณจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในยีสต์ออโตไลเสท……..113

4.33 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ และความยอมรับของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นมังสวิรัติที่เติมยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี……...114

4.34 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ และความยอมรับของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นมังสวิรัติที่เติมยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง……..115

ง1. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าความขม ในการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์……...187

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ง2. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าการสูญเสียยีสต์ ในการล้างยีสต์
ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์.....187
ง3. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าความขม ในการล้างยีสต์
ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต.....188
ง4. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าการสูญเสียยีสต์ ในการล้างยีสต์
ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต.....188
ง5. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าความขม และค่าความสูญเสียของ
ยีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายด่าง น้ำกลั่น และยีสต์ที่ไม่ผ่านการล้าง.....189
ง6. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณออโตไลเสท โปรตีน
และคาร์โบไฮเดรต ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี
ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L.....190
ง7. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณออโตไลเสท โปรตีน
และคาร์โบไฮเดรต ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด
ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L.....191
ง8. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณออโตไลเสท โปรตีน
และคาร์โบไฮเดรต ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง
ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L.....192
ง9. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณออโตไลเสท โปรตีน
และคาร์โบไฮเดรต ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี
ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L.....193
ง10. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณออโตไลเสท โปรตีน
และคาร์โบไฮเดรต ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด
ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L.....194

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ง11. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L.....195
ง12. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L.....196
ง13. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L.....196
ง14. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L.....197
ง15. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L.....197
ง16. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเลืองสกัด ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 198
ง17. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L.....198
ง18. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนพืชร่วมกับ เอนไซม์จากภายนอก ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์.....199

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ง19. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้านการทดสอบกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนพืชร่วมกับเอนไซม์จากภายนอกในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์.....199

ง20. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณ RNA เมื่อเติมเอนไซม์ PDE ที่ปริมาณ อุณหภูมิ และระยะเวลาต่างๆ ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี.....200

ง21. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณ RNA เมื่อเติมเอนไซม์ PDE ที่ปริมาณ อุณหภูมิ และระยะเวลาต่างๆ ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง.....200

ง22. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ที่มีในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมและไม่เติมเอนไซม์ PDE.....201

ง23. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อเมื่อเติม เมทไธโอนีน ซิสเตอีน และไทอามีน ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L.....201

ง24. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อเมื่อเติม เมทไธโอนีน ซิสเตอีน และไทอามีน ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L.....202

ง25. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อและความยอมรับของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นมังสวิรัติ เมื่อเติมยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L.....202

ง26. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อและความยอมรับของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นมังสวิรัติ เมื่อเติมยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L.....203

ฉ1. ปริมาณ RNA ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี เมื่อเติมเอนไซม์ PDE 205

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ฉ2. ปริมาณ RNA ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง เมื่อเติม
เอนไซม์ PDE 206
ฉ3. ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และ RNA ในยีสต์ออโตไลเสท
หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C นาน 2 ชั่วโมง.....207
ช1. ค่าระดับการย่อยสลายของสารละลาย BSA เมื่อเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L
หรือ Flavourzyme® 1000L.....209
ซ1. ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในโปรตีนถั่วเหลืองสกัด กลูเต็นข้าวสาลี
และกากถั่วเหลือง.....210

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 การพลาสโมไลซ์เซลล์ยีสต์.....8
2.2 การไฮโดรไลซิสโปรตีนด้วยกรดไฮโดรคลอริก.....10
2.3 ลักษณะของเซลล์ยีสต์เมื่อเกิดการออโตไลซิสในช่วงต่างๆ.....12
2.4 ลักษณะของการย่อยสลายผนังเซลล์ยีสต์.....14
2.5 โครงสร้างของกรดแอลฟา กรดเบต้า กรดไอโซแอลฟา และฮิวลูโพน.....20
2.6 กระบวนการผลิตยีสต์สกัดทางการค้า.....22
2.7 การเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด.....31
2.8 โครงสร้าง 3 รูปแบบ ของสารประกอบนิวคลีโอไทด์.....39
2.9 ตำแหน่งของ receptor site ของสารประกอบ 5'-purine nucleotide.....40
2.10 กระบวนการผลิตสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ทางการค้า.....42
2.11 การเกิดสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ จากการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ PDE.....44
2.12 การเปลี่ยนสารประกอบ 5'-AMP เป็น 5'-IMP จากการทำงาน ของเอนไซม์ adenylic deaminase.....45
2.13 รูปแบบของหม้อปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องที่ใช้ในการผลิต สารประกอบ 5'-IMP และ 5'-GMP จาก RNA ของยีสต์.....46
2.14 ค่าประมาณการปริมาณความต้องการบริโภคยีสต์ออโตไลเสท ระหว่างปี ค.ศ. 1970-2000.....52
ข1. โครมาโตแกรมของสารประกอบ 5'-GMP, 5'-IMP และ 5'-AMP.....157
ข2. โครมาโตแกรมสารประกอบ 5'-GMP, 5'-IMP และ 5'-AMP ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี.....158
ข3. โครมาโตแกรมสารประกอบ 5'-GMP, 5'-IMP และ 5'-AMP ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง.....159
ข4. โครมาโตแกรมของ Chicken flavor snack.....161

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ข5. โครมาโตแกรมของ Yeast extract (BBL)……...162
ข6. โครมาโตแกรมของ Dry autolysed yeast 2000 powder without salt……163
ข7. โครมาโตแกรมของ Yeast extract (Merck)……164
ข8. โครมาโตแกรมของ Protibel yeast extract……165
ข9. โครมาโตแกรมของ Maxacrome yeast extract (Gistbrocades)……166
ข10. โครมาโตแกรมของ Yeast extract standard 36 powder……167
ข11. โครมาโตแกรมของ Vegamite concentrated yeast extract ……...168
ข12. โครมาโตแกรมของ Baker's yeast extract……169
ข13. โครมาโตแกรมของ ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี……170
ข14. โครมาโตแกรมของ Dry food yeast spray dried VS2000……...171
ข15. โครมาโตแกรมของ Springarom roasted meat flavour……...172
ข16. โครมาโตแกรมของ ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง……173
ข17. โครมาโตแกรมของ Vegetarian chicken flavor……174
ข18. โครมาโตแกรมของ Pork flavor……...175
ข19. โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี……179
ข20. โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง……..180
ญ1. ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L (A) และยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L (B)……...211
ญ2. ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ที่ผ่านการอบแห้ง (A) และยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ที่ผ่านการอบแห้ง (B)……..212

บทที่ 1

บทนำ

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มนุษย์รู้จักนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในหลายๆด้าน เช่น การแพทย์ เภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหาร การเกษตร และสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในด้านอุตสาหกรรมอาหารนั้นนับว่ามีบทบาทสำคัญมาก มีการใช้ยีสต์หลายรูปแบบ เช่น ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) ใช้ในการหมักเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (wine yeast , brewer's yeast และ distiller's yeast) ใช้ทำขนมปัง (Baker's yeast) ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์นมบางประเภท และใช้ผลิตเป็นอาหารสัตว์เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์อื่นที่เป็นผลผลิตจากยีสต์ (yeast derived product) เช่น สารให้สี สารปรุงแต่งกลิ่นรส วิตามินบี เอนไซม์ ยา และเครื่องสำอาง เป็นต้น (เชิดชัย เชี่ยวธีรกุล, 2537)

สำหรับการนำยีสต์มาผลิตเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสในอุตสาหกรรมอาหาร นับเป็นทางเลือกที่น่าสนใจยิ่ง เนื่องจากสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารมีการใช้งานกันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน สารปรุงแต่งกลิ่นรสสามารถช่วยปรับปรุงกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ ช่วยเพิ่มความหลากหลายของผลิตภัณฑ์ เสริมความยอมรับผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภค และลดต้นทุนในการใช้วัตถุดิบที่ให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ (วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2535) ยีสต์ออโตไลเสท (yeast autolysate) เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารที่ให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อ นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารคาว (savory food) เนื่องจากส่วนประกอบสำคัญของยีสต์ออโตไลเสทคือกรดอะมิโน การใช้ยีสต์ออโตไลเสทเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารได้รับการตรวจสอบและยอมรับแล้วว่าปลอดภัย (General Recognized as Safe : GRAS) จากองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration : FDA) (Nagodawithana, 1992)

ผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้ยีสต์ออโตไลเสทเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส เช่น น้ำซุป ขนมขบเคี้ยว ไส้พายเนื้อ น้ำเกรวี่ ซอส แฮม ไส้กรอก ผลิตภัณฑ์ปลาและสัตว์ปีก น้ำซอสบาร์บีคิว น้ำสตูว์ น้ำซอสผสมในผักบรรจุกระป๋องแช่แข็ง และแครกเกอร์ เป็นต้น (Hough และ Maddox , 1970 ; Dziezak, 1987)

วัตถุดิบในการผลิตยีสต์ออโตไลเสท ได้แก่ยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) และยีสต์จากกระบวนการผลิตเบียร์ (Brewer's yeast) (Reed และ Peppler, 1973; Reed และ Nagodawithana, 1991) โดยเฉพาะยีสต์ที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ เนื่องจากกระบวนการผลิตเบียร์จะมีกากเบียร์เป็นวัสดุเหลือทิ้ง (waste) ซึ่งมีปริมาณมากและหากกำจัดไม่เหมาะสม

จะก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม การนำยีสต์ที่ได้จากกากเบียร์มาผลิตเป็นยีสต์ออโตไลเสทเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการกำจัดโดยไม่สูญเสียประโยชน์ไป

ความต้องการยีสต์ออโตไลเสทในตลาดโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในทุกปี โดยในปี ค.ศ. 1992 มีการบริโภค 35,000 ตัน ปี ค.ศ. 1994 มีการบริโภค 45,000ตัน และปี ค.ศ.2000 มีการบริโภค 70,000 ตัน (Keenan, 1994)

ประเทศไทยมีโรงงานผลิตยีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารเพียงแห่งเดียว และเป็นโรงงานผลิตยีสต์ออโตไลเสทจากยีสต์ขนมปังซึ่งยังไม่เพียงพอแก่ความต้องการ จึงต้องมีการนำเข้ายีสต์ออโตไลเสทจากต่างประเทศ โดยในปี พ.ศ. 2541 ประเทศไทยนำเข้าน้ำซุป น้ำซอส และผงปรุงรส เป็นมูลค่าถึง 192,952,173 บาท และ ในปี พ.ศ. 2542 มีมูลค่าการนำเข้า 206,313,568 บาท (กรมศุลกากร, 2541 ; กรมศุลกากร, 2542) ดังนั้นจึงควรการศึกษากรรมวิธีการผลิตยีสต์ออโตไลเสท เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาและผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

ปัจจุบันความต้องการสารที่ให้กลิ่นรสจากธรรมชาติมีมากขึ้น วิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพที่ผลิตสารประกอบให้กลิ่นรสต่างๆที่ได้จากจุลินทรีย์และเอนไซม์ จึงเป็นกระบวนการผลิตที่น่าสนใจ การนำยีสต์มาผลิตเป็นยีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสในอุตสาหกรรมอาหาร นับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการผลิตสารให้กลิ่นรสที่ได้จากธรรมชาติ

2.1 สารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร

สารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร มีการใช้งานกันอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากสารปรุงแต่งกลิ่นรสสามารถช่วยปรับปรุงกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ ช่วยเพิ่มความหลากหลายของผลิตภัณฑ์ ช่วยลดต้นทุนการผลิตโดยใช้สารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารแทนวัตถุดิบราคาแพงที่ต้องใช้เพื่อให้กลิ่นรสแก่ผลิตภัณฑ์ และเป็นสิ่งที่ช่วยเสริมความยอมรับผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภค (วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2535) สารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารที่มีจำหน่ายสามารถแบ่งได้เป็น

- สารปรุงแต่งกลิ่นรสสังเคราะห์ เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี
- สารปรุงแต่งกลิ่นรสธรรมชาติ เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสที่ได้มาจากการทำโปรตีนไฮโดรไลเสทของพืชและสัตว์โดยนำมาปรุงแต่งกับองค์ประกอบอื่นเพื่อให้ได้กลิ่นรสตามต้องการ

โปรตีนไฮโดรไลเสท (protein hydrolysate) นิยมนำมาใช้เป็นส่วนผสมอาหาร (food ingredient) และสารให้กลิ่นรส (flavoring agent) โดยเฉพาะโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพืช (hydorlyzed vegetable protein; HVP) จัดเป็นส่วนผสมที่สำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตกลิ่นรส โดยเฉพาะการผลิตสารให้กลิ่นรสเนื้อ เพราะโปรตีนพืชไฮโดรไลเสทสามารถให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อ (meat-like flavor) กับผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพืชจะมีปริมาณของโปรตีนและกรดอะมิโนสูง ซึ่งจะเกิดเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ในระหว่างกระบวนการผลิต แต่การไฮโดรไลซ์โปรตีนพืชด้วยกรดไฮโดร-คลอริก (hydrochloric acid) จะก่อให้เกิดสารประกอบ chloropropanals, monochloropropanal (MCPs) และ dichloropropanal (DCPs) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (Nagodawithana,1995)

สารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารอีกประเภทหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจคือสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารจากยีสต์ ผลิตภัณฑ์ปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารจากยีสต์โดยทั่วไปสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด (วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2535 ; สายสนม ประดิษฐ์ดวง, 2543) ได้แก่

- ผลิตภัณฑ์ยีสต์ผงผสมให้กลิ่นรส (yeast flavor blend) เป็นผงยีสต์ที่ได้จากการทำแห้ง เมื่อใส่ในผลิตภัณฑ์อาหารจะทำหน้าที่เป็น carrier อย่างดีของกลิ่นรสอาหารเนื่องจากมีสมบัติในการดูดซับกลิ่นรสของอาหารและสามารถกระจายตัวในอาหารได้ดี ทำให้อาหารคงกลิ่นรสได้ค่อนข้างนานและสม่ำเสมอ และเมื่อนำผงยีสต์ดังกล่าวมาผ่านการรมควันจะให้กลิ่นรสคล้ายเบคอน

- ยีสต์สกัด (yeast extract) หรือยีสต์ออโตไลเสท (yeast autolysate) เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารที่สามารถให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อแก่ผลิตภัณฑ์ และช่วยกลบกลิ่นรสที่ไม่ต้องการของผลิตภัณฑ์ได้

เนื่องจากข้อจำกัดของโปรตีนพืชไฮโดรไลเสทดังกล่าวข้างต้น จึงมีการศึกษาการใช้ยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสทแทน เพราะส่วนประกอบสำคัญของยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสท คือ กรดอะมิโนและโปรตีน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ เช่น น้ำตาลรีดิวซ์ และแอมโมเนีย หรือเกิดการสลายตัวเมื่อได้รับความร้อน ได้เป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อสัตว์ (Nagodawithana, 1992) นอกจากนี้สารประกอบนิวคลีโอไทด์ในยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสท เช่น inosine-5'-monophosphate (5'-IMP) และ guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) มีสมบัติเป็นสารเพิ่มกลิ่นรส (flavor enhancer) ของผลิตภัณฑ์อาหาร นับเป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถใช้ทดแทนผงชูรส (monosodium glutamate ;MSG) เนื่องจากผงชูรสจะก่อให้เกิดอาการแพ้ในผู้บริโภคบางคนได้ (Nagodawithana,1994)

ยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสทจะมีสารประกอบพิวรีน (purine) มาก ทั้งนี้เพราะยีสต์จะมีปริมาณของกรดนิวคลีอิกสูงคือประมาณ 8-10 % (โดยน้ำหนักแห้ง) นับเป็นข้อจำกัดในการใช้ยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสท เพราะถ้าร่างกายได้รับพิวรีนในปริมาณมากและขับออกจากร่างกายไม่ทัน จะทำให้มีปริมาณของกรดยูริคในกระแสเลือดสูงกว่าปกติและเกิดเป็นโรคเกาท์ได้

2.2 **ยีสต์สกัด** (yeast extract) **และยีสต์ออโตไลเสท** (yeast autolysate)

2.2.1 **ยีสต์สกัด**

ยีสต์สกัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการย่อย ประกอบด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรตที่ละลาย และกรดนิวคลีอิก ยีสต์สกัดที่มีจำหน่ายทางการค้าอาจอยู่ในรูปผงหรือในรูปของเหลวข้น มีขนาดอนุภาค สี องค์ประกอบ และกลิ่นรสแตกต่างกันไป

ยีสต์สกัดเป็นแหล่งของ กรดอะมิโน เปปไทด์ น้ำตาล นิวคลีโอไทด์ ไขมัน และวิตามินบี ซึ่งสารเหล่านี้สามารถเป็นสารตั้งต้นของสารให้กลิ่นรสเนื้อ (Nagodawithana, 1994; Olsen, 1995) โดยสารประกอบต่างๆเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์และวิธีการผลิตยีสต์สกัด

ยีสต์สกัดจะมีกลิ่นรสใกล้เคียงกับกลิ่นรสของเนื้อสกัด (meat extract) จึงใช้เป็นสารให้กลิ่นรสและเพิ่มกลิ่นรสเนื้อ องค์ประกอบสำคัญที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ กรดอะมิโนโดยเฉพาะกรดกลูตามิก และนิวคลีโอไทด์ นอกจากความสามารถในการให้กลิ่นรสเนื้อ ยีสต์สกัดยังสามารถให้กลิ่นรสคล้ายซุป โดยที่ไม่เกิดกลิ่นรสแปลกปลอม (off-flavor) เช่น รสขม กลิ่นไหม้ และกลิ่นกรด เป็นต้น และละลายในน้ำร้อนได้เป็นสารละลายใส ในการปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์สกัดอาจมีการเติมคาราเมล ผักเข้มข้น (vegetable concentrate) เครื่องเทศ โมโนโซเดียมกลูตาเมต และ 5'-นิวคลีโอไทด์ ทำให้ได้ยีสต์สกัดที่มีกลิ่นรสแตกต่างกันสามารถนำไปใช้ในอาหารได้หลากหลายชนิดและเป็นที่ต้องการของตลาดมากขึ้น (Peppler, 1970 ; Dziezak, 1987)

2.2.2 **ยีสต์ออโตไลเสท**

ยีสต์ออโตไลเสทเป็นยีสต์สกัดประเภทหนึ่ง ได้จากการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของยีสต์ (Hough และ Maddox, 1970) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเซลล์ที่ย่อยสลาย โปรตีนที่ละลายได้ และผนังเซลล์ ส่วนของผนังเซลล์จะทำให้เวลาใช้งานจะได้สารละลายที่ขุ่น ในกระบวนการผลิตสามารถแยกเอาส่วนของผนังเซลล์ที่ไม่ละลายออกได้ด้วยการกรอง ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านการแยกเอาผนังเซลล์ออกอาจเรียกว่า ออโตไลซ์ยีสต์ (autolyzed yeast) ซึ่งประกอบด้วยผนังเซลล์ 50% ของปริมาณของแข็งทั้งหมด ส่วนผลิตภัณฑ์ที่แยกเอาผนังเซลล์ออกแล้วเรียกว่า autolyzed yeast extract (Dziezak,1987) กลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทจะอ่อนกว่ากลิ่นรสของยีสต์สกัดเมื่อเปรียบเทียบที่ปริมาณเท่ากัน เนื่องจากในยีสต์ออโตไลเสทจะมีผนังเซลล์อยู่ด้วย (Reed และ Nagodawithana, 1991)

2.2.3 **วิธีการผลิตยีสต์สกัดและยีสต์ออโตไลเสท**

ยีสต์ที่สามารถผลิตเป็นยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสท ได้แก่ ยีสต์ในสกุล *Candida*, *Saccharomyces, Kluyveromyces, Torula, Zymomonas* และ *Pichia* (Potman และ Wesdrop, 1994)

การผลิตยีสต์สกัดสามารถทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 3 วิธี คือ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ

2.2.3.1. วิธีทางกายภาพ เป็นการทำลายเซลล์ยีสต์ด้วยวิธีทางกล โดยใช้เครื่องโฮโมจีไนซ์ที่มีความดันสูงประมาณ 20,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทั้งชนิด French Press, Eaton Press และ Gualin homogenizer โดยจำนวนครั้งที่ผ่านเครื่องสามารถเลือกเพื่อให้ได้ตามความต้องการที่จะทำให้เซลล์แตก (Jazwinski, 1990) ตัวเครื่องประกอบด้วยปั๊มผลักดัน (positive displacement pump) เป็นตัวขับดันส่วนของเหลวข้นของยีสต์ผ่านช่องเล็กๆ ทำให้เกิดแรงเฉือนและเซลล์เกิดการแตกหรือฉีกขาดสารต่างๆภายในเซลล์จะถูกปลดปล่อยออกมา ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีส่วนผสมของโปรตีน กรดนิวคลีอิก และชิ้นส่วนของผนังเซลล์ แต่การใช้วิธีนี้จะมีข้อเสียในเรื่องการแยกชิ้นส่วนของเซลล์ออกจากของเหลว เพราะกรดนิวคลีอิกที่ปล่อยออกมาจะทำให้ความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้น (Asenjo และ Andrews, 1990)

Brookman (1974) ได้ผลิตยีสต์สกัดจากยีสต์ขนมปังโดยผ่านเครื่องโฮโมจีไนซ์ที่ความดัน 25,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ยีสต์เข้มข้น 10-80% (โดยน้ำหนักแห้ง) หรือ 35-240 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าระดับความเข้มข้นของยีสต์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนต่อการแยกโปรตีนที่ได้ ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 120-125 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง

Cunningham, Cater และ Mattil (1975) ทดลองใช้เครื่องโฮโมจีไนซ์ระดับห้องปฏิบัติการผลิตยีสต์สกัดที่ได้จากยีสต์ที่เลี้ยงจากแหล่งคาร์บอนปิโตรเลียม โดยใช้ความดัน 10,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว พบว่าการโฮโมจีไนซ์เซลล์ยีสต์สามครั้ง ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นสามเท่า เมื่อเทียบกับตัวอย่างยีสต์ที่ไม่ผ่านการโฮโมจีไนซ์

Newell, Suley และ Robbins (1975) สกัดโปรตีนจากยีสต์สายพันธุ์ *Candida utillis* ที่เพาะเลี้ยงจากกากน้ำตาล โดยใช้เซลล์ยีสต์ 35 แกลลอน มีมวลยีสต์ 22.2 ปอนด์ โปรตีน 11.0 ปอนด์ และ RNA 1.5 ปอนด์ ผ่านการโฮโมจีไนซ์สามครั้งที่ความดัน 8,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็นปริมาตร 60 แกลลอน ปรับค่า pH เป็น 9.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพิ่มอุณหภูมิเป็น 140°F นาน 15 นาที เหวี่ยงแยกเอาส่วนของเหลวออกได้ 14.2 ปอนด์ ปรับ pH เป็น 4.5 ด้วยกรดฟอสฟอริก ให้ความร้อนที่ 140°F 15 นาที เหวี่ยงแยกส่วนของเหลวได้ 6.6 ปอนด์ และตะกอนโปรตีน 7.0 ปอนด์ นำส่วนของโปรตีนมาปรับปริมาตรเป็นสองเท่าปรับ pH เป็น 5.5-6.0 ทำแห้งด้วยเครื่อง spray dryer วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนยีสต์ที่ได้คือ ความชื้น 6.9% โปรตีน 72% RNA 10.2% ไขมัน 6.7% เถ้า 4.7% คาร์โบไฮเดรต 9.6% และเส้นใย 0.1%

Otero และคณะ (1996) ได้นำยีสต์ขนมปัง 15% (w/v) ผ่านเครื่องโฮโมจีไนซ์สองครั้งที่ความดัน 55 MPa แล้วเจือจางด้วยน้ำอัตราส่วน 2:1 ก่อนเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 5,300g ส่วนของเหลวที่ได้ล้างด้วยสารละลายด่างเพื่อกำจัดผนังเซลล์ออกไป ซึ่งพบว่าจะทำให้เหลือผนังเซลล์ไม่เกิน 1% ปรับ pH เป็น 6.0 ด้วย 85%กรดฟอสฟอริก ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 60 นาที เพื่อ

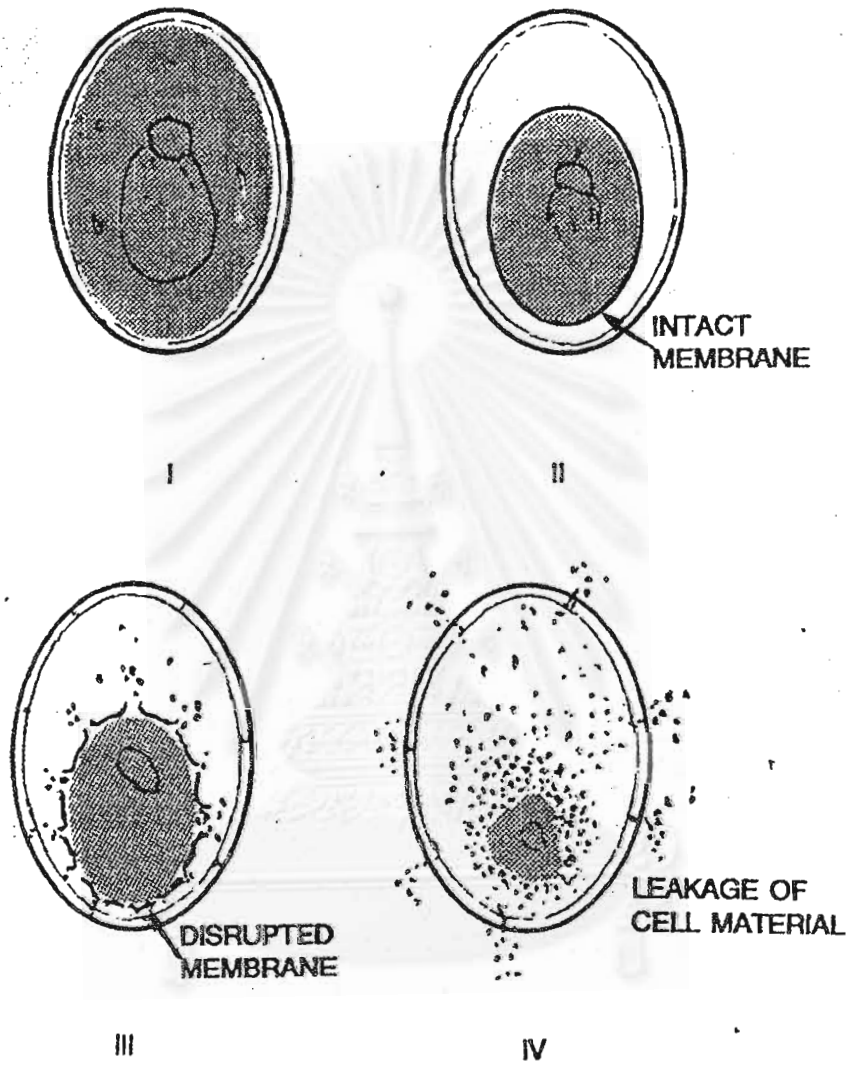
ให้เอนไซม์นิวคลีเอสทำงานย่อยกรดนิวคลีอิกและตกตะกอนโปรตีนบางส่วน จากนั้นจะลดอุณหภูมิลงและปรับ pH เป็น 4.5 เพื่อตกตะกอนโปรตีนที่ pI เหวี่ยงแยกได้เป็นส่วนของแข็งและส่วนสารละลาย ส่วนของแข็งจะล้างน้ำและทำแห้งด้วยเครื่อง spray dryer ได้เป็นโปรตีนยีสต์เข้มข้น (yeast protein concentrate) ส่วนสารละลายจะระเหยด้วย falling film evaporator ที่ 50°C จนมีปริมาณของแข็ง 20-40 %(w/v) ได้เป็นยีสต์สกัด องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนยีสต์เข้มข้น คือ ความชื้น 5% โปรตีน 72% ไขมัน 4% คาร์โบไฮเดรต 15.3% และกรดนิวคลีอิก 3%(w/v) ส่วนยีสต์สกัดที่ได้มีความชื้น 30% โปรตีน 36% ไขมัน 1% คาร์โบไฮเดรต 8.8% และกรดนิวคลีอิก 13.9%(w/v)

Verduyn, Suksomcheep และ Supantharika (1999) ศึกษาการใช้โฮโมจีไนซ์เซอร์ในการผลิตยีสต์สกัดจากยีสต์ขนมปัง *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าเมื่อทำการโฮโมจีไนซ์ที่ความดัน 600 และ 1000 บาร์ พบว่าปริมาณ yield ต่างๆเพิ่มขึ้นมากกว่าการไม่โฮโมจีไนซ์ การโฮโมจีไนซ์ที่ความดัน 600 บาร์ จะทำให้ได้ปริมาณของแข็งเพิ่มขึ้นจาก 6.80% เป็น 11.10%(w/v) ปริมาณ Total nitrogen เพิ่มขึ้นจาก 0.422% เป็น 1.052%(w/v) และปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้นจาก 9.4% เป็น17.7%(w/v) ส่วนการโฮโมจีไนซ์ที่ความดัน 1000 บาร์ ปริมาณของแข็งเพิ่มขึ้นจาก 6.80% เป็น 15.38%(w/v) ปริมาณ Total nitrogen เพิ่มขึ้นจาก 0.422% เป็น 1.836%(w/v) และปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้นจาก 9.4% เป็น18.8%(w/v) ส่วนปริมาณโปรตีนไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก

2.2.3.2. วิธีทางเคมีเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการผลิตยีสต์สกัดทางการค้า แบ่งออกเป็น

2.2.3.2.1 พลาสโมไลซิส (plasmolysis) เป็นการสกัดส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ยีสต์ด้วยสารละลายอินทรีย์หรือเกลือ เช่น คลอโรฟอร์ม โทลูอีน อีเทอร์ แอลกอฮอล์ เกลือแกง น้ำตาล และอะซีเตทเอสเทอร์ (เช่น เอทิลอะซีเตท และเอมิลอะซีเตท) ที่ความเข้มข้นสูงโดยไม่มีการทำงานของเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง (Kelly, 1983; Sugimoto, 1974) ซึ่งในภาวะที่สารเหล่านี้มีความเข้มข้นสูงจะมีผลต่อแรงดันออสโมติกของเซลล์ยีสต์ ทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลของน้ำในเซลล์ ทำให้ยีสต์ตายและเกิดการย่อยตัวเองของยีสต์ขึ้นดังรูปที่ 2.1 (Reed และ Nagodawithana, 1991)

การผลิตยีสต์สกัดด้วยวิธีพลาสโมไลซิสนี้จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ เรียกว่า ยีสต์พลาส-โมไลเสท (yeast plasmolysate) แต่ยีสต์สกัดที่ได้จากการพลาสโมไลซ์ด้วยเกลือจะมีปริมาณเกลือสูง ทำให้เกิดข้อจำกัดเกี่ยวกับปริมาณการใช้ในสูตรอาหาร



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.1 การพลาสโมไลซิสเซลล์ยีสต์ (Reed และ Nagodawithana, 1991)

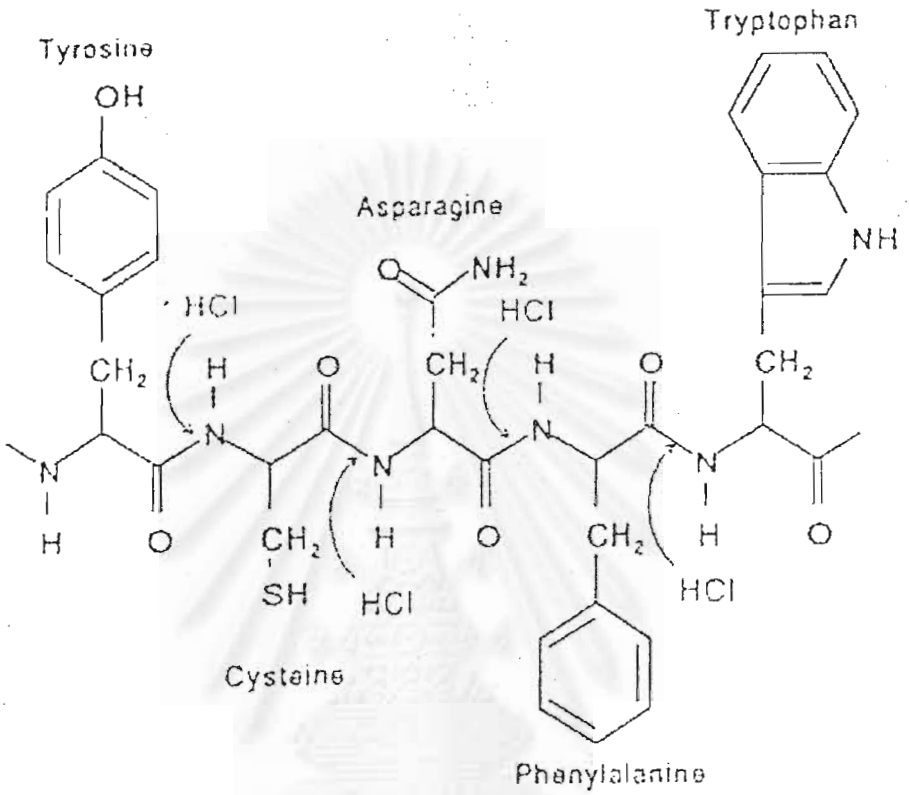
การพลาสโมไลซิสเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการทำลายเซลล์ เช่น การใช้เกลือหรือเอทิลอะซีเตต หรือไอโซโพรพานอลเป็นสารพลาสโมไลซ์ ใช้ระยะเวลาประมาณ 5-8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50-60°C (Olsen, 1995) การใช้เกลือเป็นสารพลาสโมไลซ์ไม่เพียงแต่ช่วยในการละลายยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆได้ แต่ปัจจุบันไม่เป็นที่นิยมเพราะผู้บริโภคมีความต้องการผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณของเกลือโซเดียมต่ำ (Nagodawithana, 1995)

Peppler (1970) รายงานถึงกรรมวิธีการผลิตยีสต์ออโตไลเสท โดยพลาสโมไลซ์ยีสต์ที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดประมาณ 15-18% ด้วยเกลือ คลอโรฟอร์ม หรือเอทิลอะซีเตตประมาณ 3-5% แล้วปรับอุณหภูมิเป็น 45-50°C นาน 12-24 ชั่วโมง จนได้ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนตามต้องการ จากนั้นพาสเจอร์ไรส์ที่ 80-90°C ทำให้เย็นแล้วกรอง ระเหยจนได้ของแข็ง 70-80% หรือทำแห้งจนได้ความชื้นประมาณ 3-5%

Sugimoto (1974) ทดลองใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2-5% และเอทานอลบริสุทธิ์ 5-9% เป็นตัวเร่งในการย่อยตัวเองของยีสต์ขนมปัง ทำให้สามารถผลิตยีสต์สกัดที่ใช้กับอาหารได้ ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีคือ ความชื้น 20.7% ไนโตรเจน 6.81% คาร์โบไฮเดรต 7.20% ไขมัน 0.40% เกลือ 18.1% และเถ้า 2.69% คิดเป็นปริมาณผลผลิต 62.1% ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวทดลองทางกลิ่นรสแล้วให้กลิ่นรสดีไม่มีรสขม

Verduyn, Niemthanorm, และ Supantharika, (1997) ศึกษาการใช้โซเดียมคลอไรด์ช่วยในการเพิ่ม yield ของยีสต์สกัด พบว่าในการเติมโซเดียมคลอไรด์ 5% (w/v) ปริมาณของแข็งที่ได้เพิ่มขึ้นจาก 27% เป็น 39% ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 51% เป็น 74% และปริมาณของ Total nitrogen (TN) จะเพิ่มขึ้นสูงมาก ส่วนค่าของ AN/TN ratio (AN; Amino nitrogen) จะลดลงเนื่องจากปริมาณของอะมิโนไนโตรเจนมีน้อย เพราะมีการย่อยโปรตีนเกิดขึ้นน้อย แต่จะมีปริมาณของเกลือโซเดียมคลอไรด์มากในผลิตภัณฑ์

2.2.3.2.2 การไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เป็นการย่อยเซลล์ยีสต์โดยใช้กรดแก่ร่วมกับการใช้ความร้อน ในการย่อยสารโมเลกุลใหญ่ในเซลล์ยีสต์ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิก ให้อยู่ในรูปสารโมเลกุลเล็กที่ละลายได้ วิธีการผลิตจะเริ่มจากเตรียมยีสต์เข้มข้น 65-85% เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วให้ความร้อนที่ 100°C (Reed และ Peppler,1973) ปล่อยให้เกิดการไฮโดรไลซิส ทั้งนี้ระยะเวลาในการไฮโดรไลซิสจะขึ้นกับความเข้มข้นของกรดที่ใช้ โดยทั่วไปการไฮโดรไลซ์จะทำจนกระทั่งปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดถูกเปลี่ยนไปเป็นแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนประมาณ 50-60 % ก่อนทำให้เป็นกลาง (neutralize) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโซเดียมคาร์บอเนตปรับ pH เป็น 5-6 แล้วจึงกรองแยกส่วนสารละลายมาทำให้เข้มข้นจนมีความชื้นสุดท้าย 3-5% ผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจเรียกว่า ยีสต์ไฮโดรไลเสท (yeast hydrolysate) ในการผลิตนี้จะ



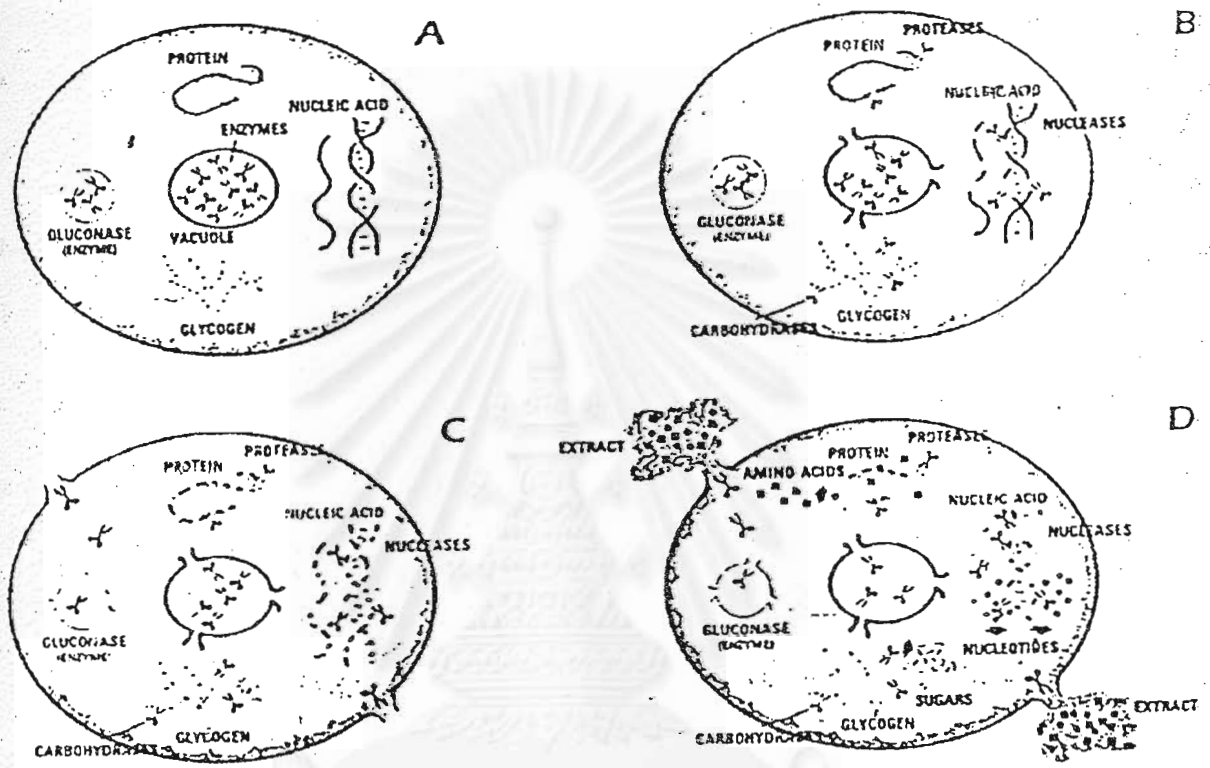
รูปที่ 2.2 การไฮโดรไลซิสโปรตีนด้วยกรดไฮโดรคลอริก (Nagodawithana, 1995)

เกิดเกลือในปริมาณที่สูง การใช้กรดซัลฟูริกในการไฮโดรไลซิสแล้วทำให้เป็นกลางด้วยปูนขาว (lime) และกรองแยกเกลือแคลเซียมซัลเฟตออกด้วยการกรองจะทำให้มีเกลือในไฮโดรไลเสทปริมาณต่ำ อย่างไรก็ดีในทางอุตสาหกรรมจะใช้กรดไฮโดรคลอริกในการทำไฮโดรไลเสท

แม้ว่าการผลิตยีสต์สกัดโดยวิธีนี้จะให้ปริมาณการผลิตสูง แต่จะมีข้อจำกัดในเรื่องของอุปกรณ์ที่ใช้ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับกรด และกรดที่ใช้อาจทำลายกรดอะมิโนและวิตามินที่มีอยู่ด้วย ยีสต์ไฮโดรไลเสทที่ได้จะมีสมบัติเหมือนโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพืชแต่มีราคาถูกกว่า จึงไม่ได้รับความนิยมเท่าที่ควร นอกจากนี้อาจเกิดสารประกอบ 3-chloropropanediol ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งขึ้นได้ และมีเกลือโซเดียมในปริมาณที่สูง (Nagodawithana, 1995) ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่นิยมนำมาผลิตเป็นยีสต์สกัดเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Reed และ Nagodawithana, 1991)

2.2.3.3. วิธีทางชีวภาพคือการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ (autolysis) จากการทำงานของเอนไซม์ที่มีในเซลล์ยีสต์เอง เป็นวิธีที่ให้ยีสต์สกัดที่มีคุณภาพและกลิ่นรสที่ใกล้เคียงเนื้อสัตว์ที่สุด กระบวนการนี้เกิดจากการควบคุมอุณหภูมิ pH ระยะเวลา และสารบางชนิดที่เติม ภายใต้ภาวะที่ทำให้เซลล์ยีสต์ตายแต่ไม่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย (degradative enzyme) ที่มีอยู่ภายในเซลล์ยีสต์ (Hough และ Maddox, 1970 ; Reed และ Nagodawithana, 1991) เช่นที่ภาวะ pH 5.5 อุณหภูมิ 55°C ระยะเวลา 20 ชั่วโมง (Kelly, 1983) หรือที่ 45-50°C นาน 24-36 ชั่วโมง (Reed และ Nagodawithana, 1991) หรือจนจนกระทั่งปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดถูกเปลี่ยนไปเป็นแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนประมาณ 50% อาจทำการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 80-90°C เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์

หลังจากเซลล์ตายภายใต้ภาวะที่กำหนด เอนไซม์ภายในเซลล์ยีสต์จะเป็นอิสระและทำการย่อยสลายสับเสตรท เอนไซม์จะเริ่มย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ภายในเซลล์ก่อน ผนังเซลล์จะบางลงและสูญเสียสมบัติของเยื่อเลือกผ่าน (semi-permeable membrane) จนกระทั่งเซลล์แตก ปลดปล่อยสารต่างๆภายในเซลล์ออกมาดังรูปที่ 2.3 เอนไซม์ในการย่อยตัวเองของยีสต์จะมีลำดับการทำงานคือ ขั้นแรกเอนไซม์โปรตีเอส (protease) จะทำการย่อยเนื้อเยื่อโปรตีนและแมนแนน ชั้นนอกและปลดปล่อยโปรตีนออกมาก่อน (Liu, Prokopakis และ Asenjo, 1988) ต่อมาเอนไซม์ในกลุ่มกลูคาเนส (glucanase) จะจับกับสายกลูแคนที่ด้านในผนังเซลล์ ทำการย่อยกลูแคนให้มีขนาดเล็กลงและละลายได้ เมื่อเอนไซม์กลูคาเนสทำงานร่วมกับโปรตีเอสจะย่อยผนังเซลล์ให้บางลงจนเหลือแต่พลาสมาเมมเบรน เมื่อพลาสมาเมมเบรนแตกออกของเหลวภายในเซลล์จะถูกปล่อยออกมา ชิ้นส่วนของผนังเซลล์และคาร์โบไฮเดรตจะถูกย่อยจากเอนไซม์ กลูคาเนส และไคตีเนส (chitinase) โปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสได้เป็นเปปไทด์



รูปที่ 2.3 ลักษณะของเซลล์ยีสต์เมื่อเกิดการออโตไลซิสในช่วงต่างๆ (Nagodawithana, 1995)

และกรดอะมิโน (Hunter และ Asenjo, 1988)นอกจากนี้ยังมีการทำงานของเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) จะย่อยสลาย RNA และ DNA ได้เป็นสารประกอบโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) โมโนนิวคลีโอไทด์ (mononucleotide) และนิวคลีโอไซด์ (Reed และ Nagodawithana, 1991)

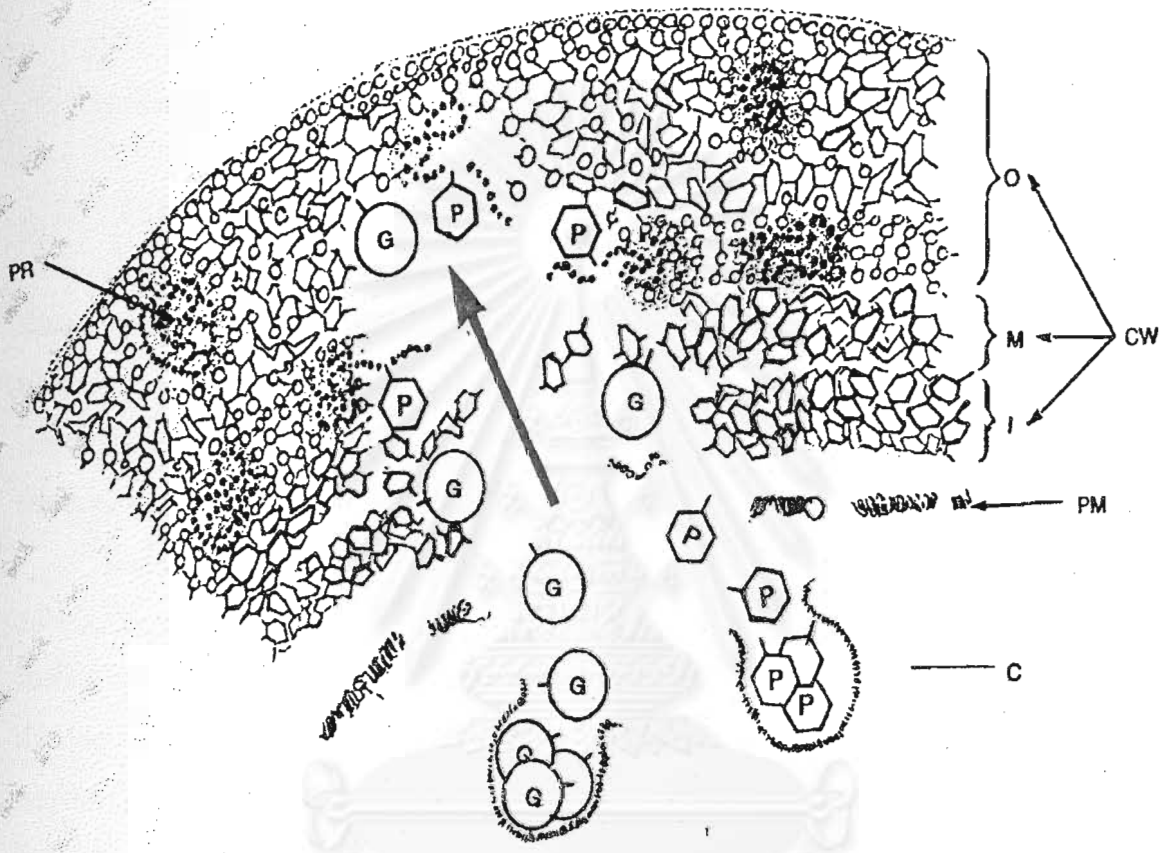
ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีเอนไซม์ย่อยโปรตีน 4 ชนิด คือ Proteinase ysc A, Proteinase ysc B, Carboxypeptidase Y และ Carboxypeptidase S (Reed และ Nagodawithana, 1991) โดยเอนไซม์เหล่านี้มีภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณลักษณะของเอนไซม์โปรตีเอสในยีสต์

	Proteinase ysc A	Proteinase ysc B	Carboxypeptidase Y	Carboxypeptidase S
Type	Acid endopeptidase	Serine endopeptidase	Serine exopeptidase	Metallo exopeptidase (Zn^{2+})
Optimum pH	2.0-6.0	6.0-7.0	4.0-7.0	7.0
Optimum T (^{o}C)*	35-40	45-55	45-55	60
Cell location	vacuole	vacuole	vacuole	vacuole
Solubility	soluble	soluble	soluble	soluble
Molecular weight	60,000	32,000-44,000	61,000	not determined
Isoeletric point	3.8	5.8	3.6	
Inhibitor	protein I_3^A Pepstatin	protein I_2^{13} Chimostatin	protein I^E Hg^{2+}	EDTA
Cellular role	Protein degradation	Protein degradation	Protein Degradation	Protein degradation

ที่มา : Reed และ Nagodawithana (1991); *Hough และ Maddox (1970)

สุพจน์ บุญแรง (2540) ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ขนมปังที่อุณหภูมิ 54^{o}C pH 5.2 ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์โปรตีเนสและกลูคาเนสมีกิจกรรมสูงสุดที่ช่วงเวลาใกล้เคียงกัน ในชั่วโมงที่ 4-8 และเอนไซม์คาร์บอกซีเปปทิเดสมีค่ากิจกรรมสูงสุดภายหลังชั่วโมงที่ 12



รูปที่ 2.4 ลักษณะของการย่อยสลายผนังเซลล์ยีสต์ เมื่อ C = cytoplasm, CW = cell wall, I = inner alkaline insoluble glucan, M = middle alkaline soluble glucan layer, O = outer glycoprotein layer, P = protease, G = glucanase, PM = plama membrane และ PR = protein (Reed และ Nagodawithana, 1991)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผนังเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของสารไบโอโพลีเมอร์หลายชนิดมาเชื่อมต่อกัน ได้แก่ กลูแคน (glucan) โปรตีน แมนแนน (mannan) และไคติน (chitin) ดังรูปที่ 2.4 กลูแคนเป็นโพลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β(1-3) และ β(1-6) สำหรับแมนแนนกับโปรตีนมักพบอยู่ด้วยกันและมีพันธะต่อกัน โดยแมนแนนอยู่ส่วนนอกของผนังเซลล์จับกับโปรตีนด้านกรดอะมิโนแอสพาราจีน (asparagine) เป็นโครงสร้างร่างแห

2.3. การผลิตยีสต์ออโตไลเสท

2.3.1 ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตยีสต์ออโตไลเสท

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญประเภทหนึ่ง ทั้งในด้านการใช้เป็นอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ นับแต่อดีตมนุษย์รู้จักการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ เช่น ในการหมัก และการทำขนมอบ อีกทั้งยีสต์ยังเป็นแหล่งสำคัญของ โปรตีน กรดนิวคลีอิก ไขมัน โพลีแซกคาไรด์ และผลิตภัณฑ์ยาบางประเภท ในอุตสาหกรรมอาหารยีสต์และผลิตภัณฑ์จากยีสต์ (yeast derived product) ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย (Dziezak, 1987)

ยีสต์ 4 สายพันธุ์ที่นิยมใช้ในอาหารได้แก่ *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* และ *Kluyveromyces marxianus* (Reed, 1981) *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ใช้ในการทำขนมอบอาจเรียกเป็นยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) และใช้ในการหมักเบียร์จัดเป็น top fermenting yeast ส่วน *S. uvarum* นิยมใช้ในการผลิตเบียร์เช่นกันแต่จะเป็น bottom fermenting yeast ยีสต์ทั้ง 2 ชนิดจะใช้ในการผลิตอาหารเสริมสุขภาพ ในรูปของยีสต์ผงหรือยีสต์อัดเม็ด และใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหาร (food additive) ในอาหารบางชนิด เช่น อาหารทารก ซุป น้ำเกรวี่ อาหารอบ เป็นต้น ยีสต์ *Saccharomyces* สามารถเลี้ยงและเจริญได้ในกากน้ำตาล (molasses) *C. utilis* (torula yeast) สามารถผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียว และนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ *C. utilis* เจริญได้ในอาหารที่มีซัลไฟด์ *K. marxianus* .ใช้ผลิตเป็นอาหารสัตว์ เจริญได้ในน้ำเวย์จากการผลิตเนยแข็ง (cheese whey) ยีสต์ที่นิยมนำมาผลิตเป็นยีสต์ออโตไลเสท ได้แก่ *S. cerevisiae*, *S. uvarum* และ *K. marxianus* (Dziezak, 1987 ; Reed และ Nagodawithana, 1991)

แหล่งที่มาของยีสต์มีความสำคัญต่อปริมาณ yield ที่สกัดได้ ในการผลิตยีสต์ออโตไลเสท วัตถุดิบที่ใช้อาจเป็น primary grown yeast คือยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*) หรือเป็น secondary yeast คือ ยีสต์ *S. uvarum* ที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ (spent brewer's yeast) ในยุโรปจะนิยมใช้ยีสต์ขนมปังมากกว่า เพราะจะให้ปริมาณโปรตีนสูงกว่ายีสต์อื่นๆและสามารถเลี้ยงได้ใน

กากน้ำตาล ส่วนยีสต์จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์จะนำมาผลิตเป็นยีสต์ออโตไลเสทในบางประเทศ เช่น อังกฤษและสหรัฐอเมริกา

ปัจจัยที่มีผลต่อการเลือกวัตถุดิบในกระบวนการผลิต ได้แก่ ราคา คุณค่าของยีสต์ คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ต้องการ เช่น ลักษณะกลิ่นรส และสี เป็นต้น โดยทั่วไปจะใช้ primary grown yeast มากกว่ายีสต์ที่ได้จากอุตสาหกรรมเบียร์ การทำยีสต์ออโตไลเสทเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับยีสต์วัตถุดิบ และยีสต์ที่นำมาใช้ผลิตยีสต์ออโตไลเสททั้ง 2 แหล่งได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (GRAS) (Niumthanorm, 1997)

โปรตีนยีสต์อยู่ในรูปของเซลล์ยีสต์ โดยยีสต์ขนมปังมักจะอยู่ในรูปที่เป็นยีสต์แห้งหรืออาจอยู่ในรูปอื่น ส่วนยีสต์จากอุตสาหกรรมเบียร์อาจอยู่ในรูปของ slurry ที่แยกได้จากเบียร์ (Hobson และ Anderson, 1995) ปัจจุบันมีการศึกษาการพัฒนายีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ไม่ว่าจะเป็นยีสต์ขนมปัง ยีสต์จากการผลิตเบียร์ และ torula yeast ให้มีความสามารถในการเป็นสารให้กลิ่นรสเนื้อแก่ผลิตภัณฑ์

2.3.2 **ยีสต์จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์** (spent brewer's yeast)

ยีสต์จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ (*S. uvarum*) เป็นผลพลอยได้ (by-product) จากกรรมวิธีในการผลิตเบียร์ อาจอยู่ในรูปของ yeast cream หรือ slurry ที่มีปริมาณของแข็งประมาณ 15-20% ในการผลิตเบียร์จะมียีสต์ที่เหลือจากการหมักจะถูกแยกออกในขั้นสุดท้าย ในรูปของกากเบียร์ซึ่งจัดเป็นของเหลือทิ้ง (waste) จากอุตสาหกรรมเบียร์ กากเบียร์นี้จะถูกขายให้กับโรงงานผลิตอาหารสัตว์ในรูป paste หรือผ่านการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้ง นอกจากนี้อาจนำกากเบียร์ไปใส่ในพื้นที่การเกษตรเพื่อใช้เป็นปุ๋ย การนำยีสต์จากกากเบียร์ไปใช้ในการผลิตอาหารมนุษย์ควรจะแยกสารประกอบฮอพ (hop substance) ออกจากเซลล์ยีสต์ ก่อนการนำไปใช้

การแยกยีสต์เบียร์สามารถทำได้โดยการตกตะกอนและการเหวี่ยงแยก yeast slurry ที่ได้ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เพราะแม้แต่ที่อุณหภูมิ 4°C ยีสต์ยังมีการหายใจและใช้คาร์โบไฮเดรตอยู่ (Reed และ Nagodawithana,1991) อาจเก็บในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 4°C และเขย่า 2 ชั่วโมงต่อวัน (Steckley และคณะ, 1979)

องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์เบียร์แห้งที่ได้เป็นดังตารางที่ 2.2 จะเห็นว่ายีสต์เบียร์เป็นแหล่งของโปรตีนที่ดี (Dziezak, 1987) ยีสต์เป็นแหล่งของวิตามินบีโดยเฉพาะ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 และไนอาซิน ดังแสดงในตาราง 2.3 นอกจากนี้โปรตีนยีสต์ยังประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) ในปริมาณที่สูง (ตารางที่ 2.4) แต่ยีสต์จะมีปริมาณของกรดนิวคลีอิกสูง ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการใช้ในอาหาร

ยีสต์จากการผลิตเบียร์จัดเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมที่สำคัญ เป็นแหล่งของสารอาหาร และมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ประโยชน์ ตัวอย่าง เช่น โปรตีนและวิตามินปริมาณสูงในยีสต์เบียร์สามารถใช้เพิ่มสารอาหารในผลิตภัณฑ์อาหารและอาหารสัตว์ ยีสต์เบียร์แห้งใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ผลิตเป็นยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสเนื้อ และผลิตเป็นยีสต์อัดเม็ดเพื่อใช้เลี้ยงสัตว์ แต่การนำยีสต์จากการผลิตเบียร์มาใช้จะมีรสขมของสารประกอบฮอพ (hop) ซึ่งต้องกำจัดออกก่อนการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์เบียร์แห้ง

องค์ประกอบทางเคมี	% (dry matter)
โปรตีน	48
คาร์โบไฮเดรต	36
เถ้า	8
ไขมัน	1
ความชื้น	7

ที่มา : Thornton (1992)

ตารางที่ 2.3 ปริมาณวิตามินบีในยีสต์

วิตามิน	ยีสต์แห้ง (μg/g)
ไทอามีน (บี 1)	120
ไรโบฟลาวิน (บี 2)	40
ไนอาซิน	300
ไพริดอกซิน (บี 6)	28
กรดแพนโทธีนิค	70
ไบโอติน	1.3
กรดโฟลิค	13
วิตามินบี 12	0.001

ที่มา : Reed และ Nagodawithana (1991)

ตารางที่ 2.4 ปริมาณกรดอะมิโนในยีสต์

กรดอะมิโน	ปริมาณ (ร้อยละของยีสต์โปรตีน)				
	S. cerevisiae[a]	*S. cerevisiae*[b]	*K. marxianus*[c]	*C. rugosa*[d]	*C. utilis*[e]
Alanine	9.1	-	-	7.6	5.5
Arginine	-	5.0	-	4.7	5.4
Aspartic acid	-	-	-	10.4	8.8
Cysteine	1.8	1.6	-	1.3	0.4
Glutamic acid	21.0	-	-	15.4	14.6
Glycine	5.8	-	-	5.4	4.5
Histidine	3.5	4.0	2.1	2.2	2.1
Isoleucine *	5.8	5.5	4.0	4.4	4.5
Leucine *	9.0	7.9	6.1	7.7	7.1
Lysine*	9.4	8.2	6.9	7.4	6.6
Methionine *	-	2.5	1.9	1.7	1.4
Phenylalanine*	-	4.5	2.8	3.7	4.1
Proline	5.5	-	-	9.4	3.4
Serine	5.6	-	-	5.4	4.7
Threonine *	5.8	4.8	5.8	5.4	5.5
Tryptophan *	1.2	1.2	1.4	-	1.2
Tyrosine	5.4	5.0	2.4	3.7	3.3
Valine *	7.4	5.5	5.4	4.7	5.7

* กรดอะมิโนจำเป็น

a : Reed และ Nagodawithana (1991)

b : Reed และ Peppler (1973)

c : Bernstein และ Plantz (1977)

d : Lee และ Lee (1996)

e : Amoco Food Co. (1985)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.3 สารประกอบที่ให้รสขมในยีสต์จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์

ปกติยีสต์สกัดที่ได้จากยีสต์ในอุตสาหกรรมเบียร์มักจะมีรสขม เนื่องจากสารประกอบจากฮอพ (hop substance) ในขั้นตอนการต้มน้ำเวอร์ท (wort) กับฮอพระหว่างการผลิตเบียร์ โดยจะดูดซับอยู่ที่ผิวเซลล์ยีสต์ (McMurrough และ Medigan,1996) สารประกอบฮอพ ได้แก่ กรดแอลฟา (α-acid) กรดเบต้า (β-acid) กรดไอโซแอลฟา (iso-α-acid) และ ฮิวลูโพน (hulupone) ปกติจะอยู่ในรูปยาง (resin) ที่ไม่ละลายน้ำในภาวะกรดแต่จะละลายน้ำได้ในภาวะด่าง โครงสร้างของสารประกอบเหล่านี้แสดงในรูปที่ 2.5

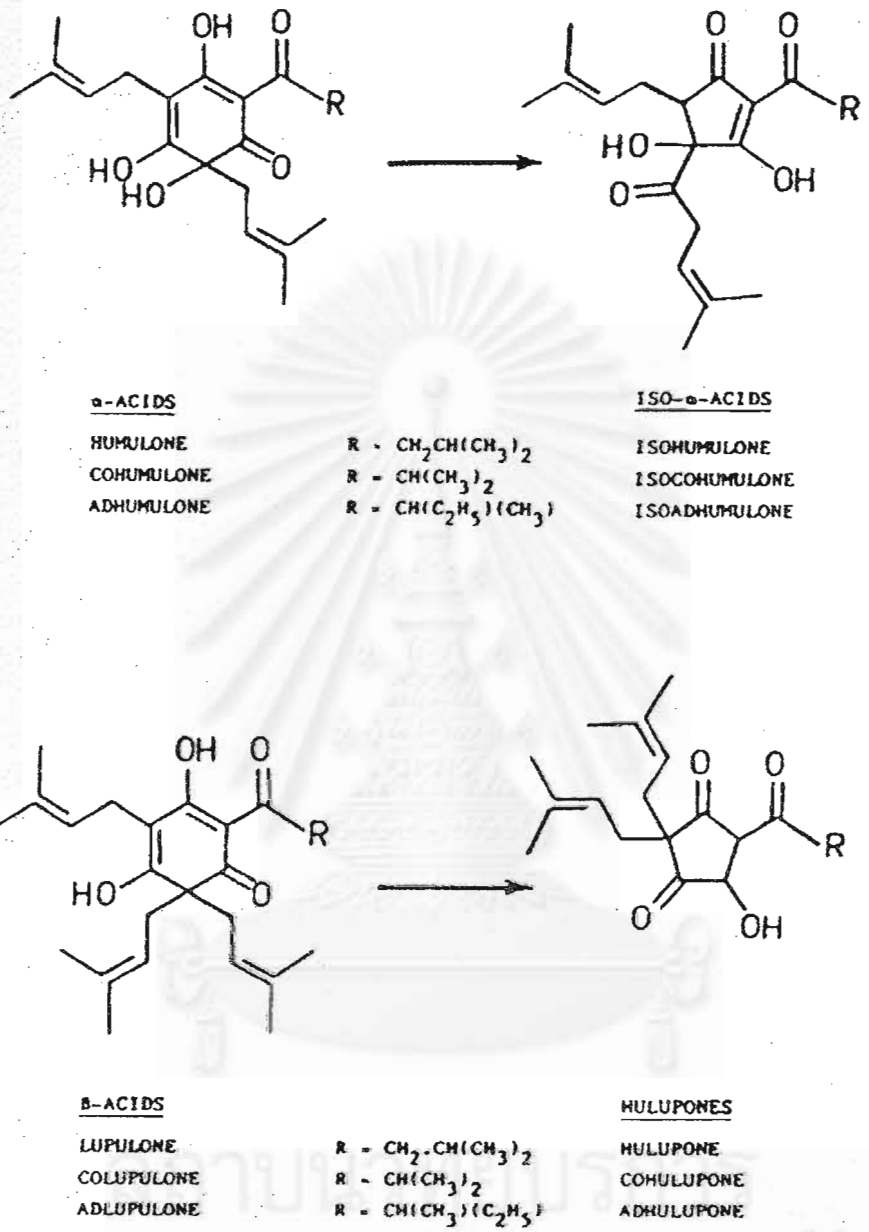
ในการผลิตยีสต์สกัดสารประกอบที่จะมีผลต่อรสขมของผลิตภัณฑ์ คือ กรดแอลฟาและกรดไอโซแอลฟา โดยเฉพาะฮิวมูโลน (humulone) และไอโซฮิวมูโลน (iso-humulone) ซึ่งจะจับกับผนังเซลล์ของยีสต์ (Lewis และ Young, 1995) กรดไอโซแอลฟาจะเกิดพันธะกับผนังเซลล์อาจเป็นพันธะไฮโดรเจนหรือพันธะเคมีอื่นที่มีแรงอ่อน (weak force)

โดยทั่วไปกรดแอลฟาจะมีรสขมน้อยมาก แต่เมื่อต้มฮอพกับน้ำเวอร์ทจะทำให้เกิดการไอโซเมอไรเซชั่น (isomerization) ของกรดแอลฟาได้เป็นกรดไอโซแอลฟาซึ่งมีรสขมมาก (Keukeleire และคณะ, 1992) ปฏิกิริยาของสารประกอบฮอพจะเป็นดังรูปที่ 2.5

จากการผลิตเบียร์จะมียีสต์เหลือทิ้งจำนวนมากและราคาถูก สารประกอบฮอพจะเกาะกับเซลล์ยีสต์และของแข็งที่เหลือจากการผลิต การควบคุมระดับสารที่ให้รสขมเหล่านี้ขึ้นกับการทำความสะอาดยีสต์ที่ได้จากกากเบียร์ การล้างยีสต์ด้วยสารละลายด่างเป็นวิธีที่ลดสารเหล่านี้ได้ดีเป็นที่ยอมรับในการผลิตยีสต์สกัด (Reed และ Nagodawithana, 1991) การกำจัดกรดไอโซแอลฟาทำได้โดยการใช้สารละลายด่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ ยูเรีย ไทโอยูเรีย แอมโมเนียมคาร์บอเนต และโปแทสเซียมไทโอไซยาเนท เป็นต้น

การเลือกยีสต์จากกากเบียร์ที่นำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตยีสต์สกัด ควรเลือกใช้ในช่วงที่ยีสต์มีปริมาณมาก (ในกระบวนการผลิตยีสต์) นอกจากนี้ควรมีปริมาณของจุลินทรีย์ปนเปื้อนยางฮอพ และอนุภาคของแข็งต่ำ นำยีสต์มาแยกของแข็งที่ไม่ละลายออกโดยใช้ตะแกรงร่อนขนาด 150-200 ไมครอน จากนั้นจึงล้างเซลล์ยีสต์เพื่อกำจัดยางฮอพออก เนื่องจากถ้าไม่มีการล้างเซลล์ยีสต์สารประกอบที่ให้รสขมจะหลุดออกจากเซลล์ยีสต์ ในระหว่างการเกิดการย่อยตัวเองของยีสต์ทำให้มีรสขมในผลิตภัณฑ์สุดท้าย

การกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมนอกจากการล้างยีสต์ด้วยสารละลายด่างแล้ว ยังมีการศึกษาวิธีกำจัดสารให้รสขมด้วยวิธีอื่นเช่น การทำ ion exchange การใช้ผงคาร์บอน (activated carbon) การใช้ organic polymer adsorbent และ การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) (Reed และ Nagodawithana, 1991)



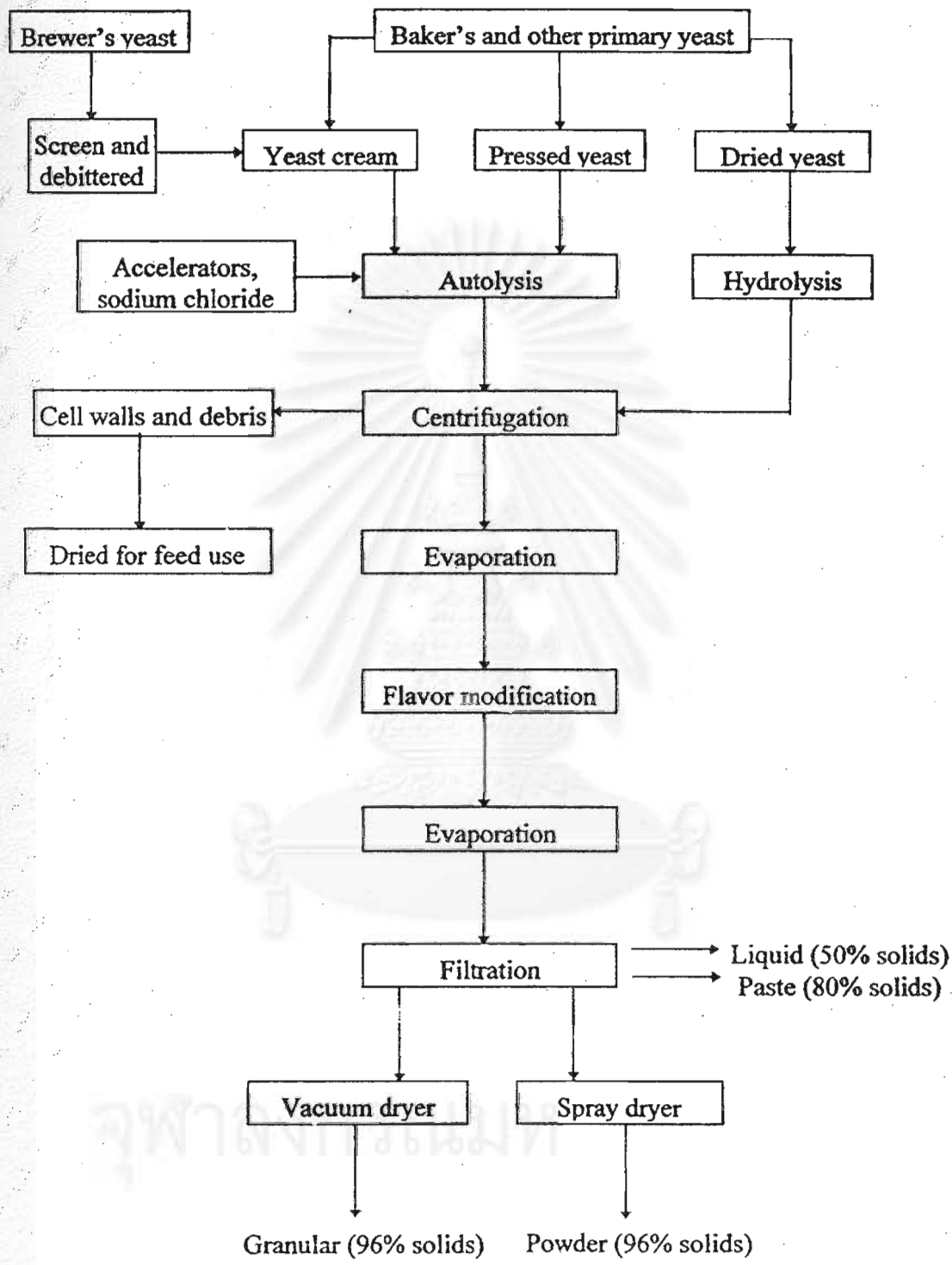
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของกรดแอลฟา กรดเบต้า กรดไอโซแอลฟา และฮิวลูโพน (McMurrough และ Medigan,1996)

Hyoky, Sarkki, และ Tylli (1996) กล่าวถึงการใช้ polymeric adsorbent ในการกำจัดสารประกอบที่ให้รสขม โดย non-ionic macroporous polymeric adsorbent หรือ slightly basic macroporous polymeric adsorbent จะให้ผลดีในการกำจัดสารประกอบที่ให้รสขม ขนาดของรูพรุน (pore size) จะอยู่ในช่วง 2.5-100 nm. พื้นที่ผิวของ polymeric adsorbent ประมาณ 150-1500 ตารางเมตรต่อกรัม ตัวอย่างของ polymeric adsorbent เช่น Amberlite XAD-16 (ทำจาก polystyrene และdivinylbenzene) Amberlite XAD-7 (ทำจาก acryl และ divinylbenzene) และ Amberlite XAD-765 (ทำจาก phenolformaldehyde) อุณหภูมิที่ใช้ในการกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมประมาณ 10-25°C pH 4.0-6.0 ความเข้มข้นยีสต์ 2-6% อัตราการไหล 10-20 RV/h (resin volume/hour) และจะกระตุ้น adsorbent ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

Niumthanorm (1997) ได้ทำการทดลองล้างกำจัดสารที่ให้รสขมในการผลิตยีสต์สกัดโดยนำยีสต์เข้มข้น 15% ล้างด้วยสารละลายด่าง 2% Na_2CO_3 และ 0.5% NaOH ที่ pH 10 สามารถกำจัดความขมให้ลดน้อยลงได้ เมื่อนำยีสต์เข้มข้น 30% มากำจัดสารให้รสขมด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายด้วย n-hexane ในอัตราส่วน 1:5 พบว่าสามารถลดความขมของผลิตภัณฑ์ได้ส่วนหนึ่ง และไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพและลักษณะปรากฏของยีสต์สกัดที่ได้มากนัก เมื่อนำยีสต์ที่ได้ไปผลิตเป็นยีสต์สกัด จะมีปริมาณของแข็งและปริมาณโปรตีนน้อยกว่ายีสต์ที่ไม่ผ่านการล้างกำจัดความขม

2.3.4 กระบวนการผลิตยีสต์ออโตไลเสท

การผลิตยีสต์ออโตไลเสทเป็นวิธีการผลิตยีสต์สกัดที่ให้ปริมาณเกลือโซเดียมต่ำ เป็นที่ยอมรับกันในอุตสาหกรรมอาหาร (Reed และ Nagodawithana, 1991) กระบวนการผลิตยีสต์ออโตไลเสทเป็นดังรูปที่ 2.6 เริ่มจากเตรียมยีสต์ครีม (yeast cream) หรือ slurry ที่มียีสต์เซลล์ 15-20 % พลาสโมไลซ์ด้วยเกลือ 2-5% ปรับอุณหภูมิเป็น 45-60°C ระยะเวลา 12-36 ชั่วโมง หรือจนกระทั่ง pH สารละลายลดลงเป็น 5.0-5.5 นำยีสต์ออโตไลเสทที่ได้มาพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 80-100°C ลดอุณหภูมิ แยกส่วนของเซลล์ที่ไม่ละลาย (cell debris) ออกโดยการเหวี่ยงแยกหรือการกรอง ของเหลวที่ได้จะทำให้เข้มข้นจนมีปริมาณของแข็งเป็น 70-80% หรือทำเป็นผงแห้งที่มีความชื้น 3-5% นอกจากนี้อาจทำยีสต์ออโตไลเสทผงโดยที่ไม่มีการแยกเซลล์ยีสต์ที่ไม่ละลายออกจากผลิตภัณฑ์ ยีสต์ออโตไลเสทที่ได้จากวิธีการผลิตทั้งสองชนิดจะมี องค์ประกอบทางเคมี กลิ่นรส และการใช้ประโยชน์แตกต่างกัน (Nagodawithana, 1994 ; Albercht และ Deindoerfer, 1996 ; Chao, McCarthy และ McConaphy,1980)



รูปที่ 2.6 กระบวนการผลิตยีสต์สกัดทางการค้า (Peppler,1982)

2.3.5 การพัฒนาการผลิตยีสต์ออโตไลเสท

จากกระบวนการผลิตยีสต์ออโตไลเสทจะมีข้อเสียคือใช้ระยะเวลานานในการเกิดการย่อยตัวเอง เช่น อาจต้องใช้ระยะเวลานานถึง 48 ชั่วโมง ถ้าใช้อุณหภูมิ 30-70°C นอกจากนี้อาจมีปริมาณผลได้ (yield) ต่ำ และมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ จึงมีการศึกษาเพื่อที่จะแก้ไขปัญหาต่างๆเหล่านี้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้เทคนิคผสมในการผลิตยีสต์ออโตไลเสท เช่น การใช้วิธีทางเคมีร่วมกับวิธีทางกายภาพ การใช้วิธีทางเคมีร่วมกับการเติมเอนไซม์ เป็นต้น

การเร่งอัตราการย่อยสลายตัวเองของยีสต์อาจทำได้โดยการเติมเอนไซม์จากภายนอกลงไป เช่นการนำเอนไซม์โปรตีเอสในกลุ่มของซัลไฟดริลโปรตีเอส ได้แก่ ปาเปน โบรมีเลน และ ฟิซิน

Knorr และคณะ (1979) ศึกษาการย่อยสลายยีสต์โดยใช้เอนไซม์ไซโมไลเอสและไลโซไซม์ที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 37°C ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ไซโมไลเอสสามารถย่อยผนังเซลล์ยีสต์และปลดปล่อยคาร์โบไฮเดรต เมื่อปรับ pH เป็น 9.5 พบว่า ไนโตรเจน 80% ของโปรตีนยีสต์ สามารถปล่อยออกมาในเวลา 90 นาที และไซโมไลเอสทำงานได้ดีกว่าไลโซไซม์

Chao และคณะ (1980) ใช้เอนไซม์จากภายนอกช่วยในการผลิตยีสต์สกัดจาก *C. utilis* โดยนำยีสต์ที่มีปริมาณของแข็ง 15% มาเติมเอทธิลอะซีเตตและเอนไซม์ต่างๆ ให้เกิดการย่อยตัวเองที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 55°C นาน 24 ชั่วโมง พบว่าการเติมเอนไซม์จากภายนอกจะช่วยให้การย่อยตัวเองของยีสต์เร็วขึ้น โดยเอนไซม์ในกลุ่มซัลไฟดริลโปรตีเอสจะให้ผลดีที่สุด เอนไซม์เหล่านี้ได้แก่ ปาเปน โบรมีเลน และฟิซิน ในปริมาณ 0.01-0.1% โดยเฉพาะปาเปนช่วยย่อยสลายยีสต์และลดระยะเวลาการย่อยตัวเองของยีสต์ได้ดีที่สุด

Akin และ Murphy (1981) รายงานถึงการเติมไทอามีน (thiamine) และไพรีดอกซิน (pyridoxine) ปริมาณ 0.01% (w/w) ในการผลิตยีสต์ออโตไลเสท และเมื่อค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายยีสต์จนกระทั่งถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ อัตราการย่อยสลายตัวเองของยีสต์จะเพิ่มขึ้นสูงในช่วง 20-180 นาที และจะลดระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ลง

จตุพร เหมสุวรรณ์ (2531) ได้นำเอนไซม์โบรมีเลนและปาเปนมาใช้เร่งการย่อยยีสต์ในการผลิตยีสต์สกัด โดยการใช้เอนไซม์ทั้งสองปริมาณ 0.1% นาน 12 ชั่วโมง จะช่วยเร่งการย่อยยีสต์ได้ดีที่สุด เมื่อทดลองใช้ไทอามีนและไพรีดอกซินในการเร่งการย่อยยีสต์ พบว่าไม่แตกต่างกับการไม่เติมวิตามินทั้งสองชนิด ซึ่งจะค้านกับผลการทดลองของ Akin และ Murphy (1981)

วิวัฒน์ หวังเจริญ (2535) ศึกษาวิธีการผลิตยีสต์ออโตไลเสทจากยีสต์ *S. carlbergensis* ที่ใช้ในกระบวนการผลิตเบียร์ พบว่าภาวะที่ให้ปริมาณออโตไลเสทสูงสุดคือ ปริมาณของแข็งเริ่มต้น 15% (w/v) ที่อุณหภูมิ 45°C pH 5.5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง การใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ 1% เป็น plasmolyzing agent จะช่วยเร่งการย่อยตัวเองของยีสต์ได้ดีกว่าการใช้ 95% เอทานอลและกลูโคส

เมื่อใช้เอนไซม์ Neutrase® 0.5 L. ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าโซเดียมคลอไรด์จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว และการใช้เอนไซม์นี้ 0.1% (v/v) ในการผลิตยีสต์ออโตไลเสทจะเหมาะสมที่สุด นอกจากนี้การแช่แข็งยีสต์ก่อนการย่อยและเขย่ายีสต์ขณะย่อยมีผลต่อการย่อยตัวเองของยีสต์ด้วย ยีสต์ออโตไลเสทที่ได้จะทำให้เข้มข้นจนมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 70°บริกซ์ อบแห้งที่อุณหภูมิ 100°C จนมีความชื้นประมาณ 5% การเติมกลูโคส 1% (w/v) ก่อนการทำให้เข้มข้นและอบแห้งจะให้กลิ่นรสของยีสต์ ออโตไลเสทดีที่สุด

สุพจน์ บุญแรง (2540) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายยีสต์ขนมปัง พบว่าอุณหภูมิ 54°C pH 5.2 และความเข้มข้นยีสต์ 13% (w/v) เป็นภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย การเติมเอทานอล 5% (w/v) และเกลือ 5% (w/w) ให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุดเฉลี่ย 61.90% การโฮโมจีไนซ์ที่ความดัน 8000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 2 ครั้ง จะให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุด 42.45% ส่วนการเติมเอนไซม์ปาเปน 0.1% จะทำให้ได้ปริมาณออโตไลเสทสูงที่สุดประมาณ 46.53% และทดสอบด้านกลิ่นรสโดยนำมาผลิตเป็นน้ำซุปก๋วยเตี๋ยว พบว่าไม่มีความแตกต่างด้านกลิ่นรสเมื่อเทียบกับยีสต์สกัดที่มีขายทางการค้า

Koller, Sturrdik และ Farkas (1991) รายงานถึงอิทธิพลของยีสต์ออโตไลเสทสด (fresh autolysate) ต่อการย่อยสลายเซลล์ยีสต์ เมื่อสังเกตการย่อยสลายตัวเองของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ พบว่าการเติมยีสต์ออโตไลเสทสดจะช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพในการเกิดการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ การใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ร่วมกับเอทานอลและยีสต์ออโตไลเสทสด จะช่วยให้ผลิตยีสต์ออโตไลเสทได้มากขึ้น รวมถึงการเติมเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนบางชนิดด้วย เช่น เอนไซม์ปาเปน เป็นต้น

Origane และ Sato (1993) ได้ทดลองผลิตยีสต์สกัดโดยเติมไคโตซานเป็นตัวเร่งการย่อยตัวเองของยีสต์ เทียบกับการใช้โทลูอีน 2% พบว่าปริมาณไคโตซานที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.02-2% จะช่วยเร่งให้เกิดการย่อยตัวเองได้และทำให้ผลผลิตที่ได้สูงขึ้น แต่ยังไม่ทราบกลไกในการเร่ง และการทำหน้าที่เป็นเหมือนวัตถุดิบของไคโตซาน

Belousova, Gordienko และ Eroshin (1995) ศึกษาผลของการใช้เอนไซม์ macerate และคลอโรฟอร์มในการผลิตยีสต์ออโตไลเสทจากยีสต์ *S. cerevisiae* RCM-Y-2656, *S. cerevisiae* RCM-Y-2465 และยีสต์ขนมปัง *S. cerevisiae* r. L2 โดยการใช้เอนไซม์ macerate ปริมาณ 140-160 mg./g.ยีสต์ ในการผลิตยีสต์ออโตไลเสทจากยีสต์ *S. cerevisiae* RCM-Y-2656, *S. cerevisiae* RCM-Y-2465 จะช่วยให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระของยีสต์ออโตไลเสทที่ได้สูงกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมเอนไซม์แต่ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตจะลดลง การใช้คลอโรฟอร์มจะทำให้ปริมาณกรดอะมิโนในยีสต์ออโตไลเสทจากยีสต์ขนมปัง *S. cerevisiae* r. L2 เพิ่มขึ้น

Verduyn และคณะ. (1997) ศึกษาการใช้ปาเปนและโซเดียมคลอไรด์ช่วยในการเพิ่ม yield ของยีสต์สกัด โดยการเติมปาเปน พบว่าการเติมปาเปน 1.0% จะทำให้ปริมาณของแข็งที่ได้เพิ่มขึ้นจาก 28% เป็น 52% และการเติมปาเปนปริมาณมากกว่า 0.25% จะช่วยเพิ่มปริมาณของ Total nitrogen (TN) และค่าของ AN/TN ratio (AN; Amino nitrogen) แต่ปริมาณโปรตีนจะลดลงจาก 58% เป็น 45% เมื่อมีการเติมปาเปนลงในการผลิตเนื่องจากปาเปนจะไปย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน เมื่อทำการศึกษาการเติมปาเปนปริมาณ 0.25 % และ 0.5 % ร่วมกับการใช้โซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 2% จะพบว่าการเติมปาเปนร่วมกับโซเดียมคลอไรด์จะทำให้ได้ปริมาณของแข็ง ปริมาณ TN ปริมาณ AN และปริมาณโปรตีนมากกว่าการใช้ปาเปนหรือโซเดียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียว ปริมาณของแข็งที่เกิดจากการใช้ปาเปนร่วมกับโซเดียมคลอไรด์จะเพิ่มขึ้นจาก 25.2% เป็น 45.9% และ 48% ส่วนปริมาณ TN เพิ่มขึ้นจาก 35.9% เป็น 66.9% และ 71.9%

Verduyn และคณะ. (1999) ศึกษาการใช้เอนไซม์ปาเปนและการโฮโมจีไนซ์ในการผลิตยีสต์สกัดจากยีสต์ขนมปัง *S. cerevisiae* เพื่อเพิ่มปริมาณ yield พบว่าการเติมปาเปนปริมาณ 0.25% จะทำให้ได้ปริมาณของแข็งเพิ่มขึ้นจาก 6.80% เป็น 10.78%(w/v) ปริมาณ Total nitrogen เพิ่มขึ้นจาก 0.422% เป็น 0.995%(w/v) และเมื่อทำการโฮโมจีไนซ์ร่วมกับการใช้ปาเปนที่ความดัน 600 และ 1000 บาร์ พบว่าปริมาณ yield ต่างๆเพิ่มขึ้นมากกว่าการไม่โฮโมจีไนซ์ โดยปริมาณของแข็งของยีสต์สกัดที่ผ่านความดัน 600 และ 1000 บาร์ เพิ่มขึ้นเป็น 11.10% และ 15.38% เมื่อไม่เติมปาเปน และ 10.95% และ 14.66% เมื่อเติมปาเปน

2.4 **กลิ่นรสของเนื้อสัตว์** (meat flavor)

กลิ่นรสของอาหารจากเนื้อสัตว์จะเกิดขึ้นในระหว่างการประกอบอาหาร หรือหลังจากการได้รับความร้อนประกอบไปด้วยสารประกอบ 2 ชนิด (Shahidi, 1994) คือ

2.4.1 สารประกอบที่ระเหยไม่ได้ (non-volatile component) ได้แก่ กรดอะมิโน เปปไทด์ น้ำตาลรีดิวซ์ วิตามิน และนิวคลีโอไทด์ ซึ่งสารเหล่านี้สามารถเกิดปฏิกิริยา หรืออาจเกิดการแตกสลายของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา เกิดเป็นสารตัวกลางและ/หรือเกิดเป็นสารประกอบให้กลิ่นรสเนื้อและปลดปล่อยกลิ่นในระหว่างกระบวนการให้ความร้อน

2.4.2 สารประกอบที่ระเหยได้ (volatile component) จากการศึกษาและแยกองค์ประกอบของสารประกอบที่ระเหยได้ในเนื้อวัว เนื้อไก่ เนื้อหมู และเนื้อแกะ พบว่ามีสารประกอบมากมายหลายร้อยชนิดประกอบไปด้วยสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ เช่น ไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์

แอลดีไฮด์ (aldehyde) คีโตน (ketone) กรดคาร์บอกซิลิก เอสเทอร์ (ester) แลกโทน (lactone) อีเธอร์ (ether) ฟูแรน (furan) ไพริดีน (pyridine) ไพราซีน (pyrazine) ไพโรล (pyrrole) โอซาโซล (oxazole) โอซาโซลลีน (oxazoline) ไทอาโซล (thiazole) ไทอาโซลีน (thiazoline) ไทโอฟีน (thiophene) และสารประกอบซัลเฟอร์และฮาโลเจน

ในการเกิดกลิ่นรสเนื้อของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์นั้นปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสารประกอบที่ให้กลิ่นรสสามารถแบ่งได้เป็นสามปฏิกิริยาหลักๆ ได้แก่

- ปฏิกิริยาการแตกสลาย (degradation) ของวิตามินโดยเฉพาะ ไทอามีน
- การแตกสลายด้วยความร้อน (thermal degradation) ของคาร์โบไฮเดรต และ เอมีน
- การเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด

สารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาของกลิ่นรสเนื้อ แสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 สารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาของกลิ่นรสอาหารคาว

Amino acids	Cysteine , glutamic acid , valine , glycine , hydrolyzed vegetable protein (HVP) , yeast extract , hydrolyzed animal protein , etc.
Reducing sugars	Glucose , xylose , ribose , ribose-5-phosphate
Vitamin	Thiamine
Sulfur compounds	Furanones , sulfides , thioles (cystein, thiamine)
Nucleotides	Inosine 5'-monophosphate , guanosine 5'-monophosphate
Acids	Latic acid , aliphatic carboxylic acid , acetic acid ,etc.

ที่มา : Nagodawithana (1994)

ในการศึกษาสารประกอบที่ให้กลิ่นรสในเนื้อวัวและเนื้อไก่ที่ผ่านการให้ความร้อน จะพบว่ามีสารประกอบนับร้อยชนิด และแบ่งเป็นกลุ่มได้ประมาณ 12 กลุ่ม (ตารางที่ 2.6) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้พบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารทั่วไป แต่จะมีปริมาณแตกต่างกันไปตามกรรมวิธีการผลิต

ตารางที่ 2.6 ชนิดของสารประกอบที่ให้กลิ่นรสในเนื้อวัวและเนื้อไก่ที่ผ่านการให้ความร้อน

Alcohols	Lactones
Aldehydes	Pyrazine
Acids	Pyrroles and Pyridines
Esters	Hydrocarbon
Furans	Aliphatic sulfur compounds
Ketones	Heterocyclic sulfur compounds

ที่มา : Nagodawithana (1995)

2.5 กลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท

2.5.1 องค์ประกอบของยีสต์ออโตไลเสท

การใช้ยีสต์ออโตไลเสทในอาหารเพื่อเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสหรือสารให้กลิ่นรส (flavor) และสารเพิ่มกลิ่นรสอาหาร (flavor enhancer) ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท คือ องค์ประกอบต่างๆของยีสต์ออโตไลเสท ยีสต์ออโตไลเสทเป็นแหล่งของ โปรตีน กรดอะมิโน เปปไทด์ น้ำตาล นิวคลีโอไทด์ และวิตามินบี องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสทแสดงอยู่ในตารางที่ 2.7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.7 องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสท

องค์ประกอบทางเคมี	g./100g.ยีสต์ออโตไลเสท
โปรตีน (crude protein)	67.9
ไขมัน	น้อยกว่า 0.1
คาร์โบไฮเดรต	17.6
เส้นใย (dietary fiber)	4.14
น้ำตาล (total sugar)	4.3
เถ้า	8.37
ความชื้น	4.0
พลังงาน	327 cal./100 g.

ที่มา : Nagodawithana (1995)

ปริมาณองค์ประกอบของยีสต์ออโตไลเสทจะขึ้นอยู่กับกรรมวิธีการผลิต ปริมาณเกลือที่เติม ระดับการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ (degree of autolysis) การเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมท และการเติมสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ (Reed และ Peppler, 1973)

ปริมาณของวิตามินบีในยีสต์ออโตไลเสทเป็นดังตารางที่ 2.8 โดยจะพบว่ายีสต์ออโตไลเสทจะมีปริมาณของวิตามินบี 1 วิตามินบี 2 ไนอาซิน และกรดแพนโทธีนิคสูง

ตารางที่ 2.8 ปริมาณของวิตามินในยีสต์ออโตไลเสท

วิตามิน	ปริมาณ (mg./100g.)
ไทอามีน	7.36
ไรโบฟลาวิน	5.61
ไนอาซิน	7.68
กรดแพนโทธีนิค	21.9
ไบโอติน	0.05
ไพริดอกซิน	2.97
กรดโฟลิค	2.81
วิตามินบี 12	น้อยกว่า 0.001

ที่มา : Nagodawithana (1995)

โดยทั่วไปยีสต์จะมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 35-60% ส่วนยีสต์ออโตไลเสทจะมีปริมาณโปรตีน 50-70% (วิเคราะห์โดยวิธี Kjeldahl nitrogen) คาร์โบไฮเดรตและไขมันส่วนใหญ่จะเสียไปในขั้นตอนการแยกผนังเซลล์และชิ้นส่วนของเซลล์ของการผลิตยีสต์ออโตไลเสท ยีสต์ออโตไลเสทจะมีปริมาณ RNA ประมาณ 5-10% ส่วนปริมาณของกรดอะมิโนในยีสต์ออโตไลเสทเป็นดังตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 ปริมาณของกรดอะมิโนที่มีในยีสต์ออโตไลเสท

กรดอะมิโน	g./100g.
Alanine	4.35
Arginine	3.20
Aspartic acid	6.41
Cysteine	0.68
Glutamic acid	10.66
Glycine	2.83
Histidine	1.37
Isoleucine *	3.01
Leucine *	4.37
Lysine*	4.98
Methionine *	0.93
Phenylalanine*	2.64
Proline	2.23
Serine	2.85
Threonine *	2.96
Tryptophan *	0.64
Tyrosine	2.29
Valine *	3.38

* กรดอะมิโนจำเป็น

ที่มา : Thornton (1992)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5.2 การเกิดกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท

กลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทเกิดจากสาเหตุสามประการใหญ่ๆ คือ การเกิดสารประกอบจากการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ในเซลล์ยีสต์ การรวมตัวของสารต่างๆภายในเซลล์ยีสต์ ขณะที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายตัวเอง และการเกิดสารประกอบจากปฏิกิริยาที่เกิดจากการได้รับความร้อนในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ การทำให้เข้มข้น และการทำแห้งยีสต์ออโตไลเสท ซึ่งส่งผลให้เกิดสารประกอบที่ระเหยได้จำนวนมาก (Nagodawithana, 1995) ยีสต์ออโตไลเสทสามารถให้กลิ่นรสอาหารคาว (savory flavor) เช่น กลิ่นรสเนื้อ (meaty) และกลิ่นเนยแข็ง (cheesy) ปฏิกิริยาที่สำคัญในการเกิดกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท ได้แก่

2.5.2.1 ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (non enzymatic browning reaction) หรือปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Nagodawithana, 1992) เกิดจากการควบแน่นของน้ำตาลรีดิวซ์กับกรดอะมิโน เปปไทด์ หรือโปรตีนได้เป็นสารให้กลิ่นรสและสีน้ำตาลในอาหารหลายชนิด โดยในภาวะที่เป็นกรดและมีความชื้นต่ำจะเกิด Schiff base ของหมู่คาร์บอนิลกับหมู่อะมิโนเป็น glycosamine จากนั้นผ่าน Amadori rearrangment (รูปที่ 2.7) เกิดเป็น 1-amino-1-deoxy-2-ketose ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้อีกสองแบบคือ

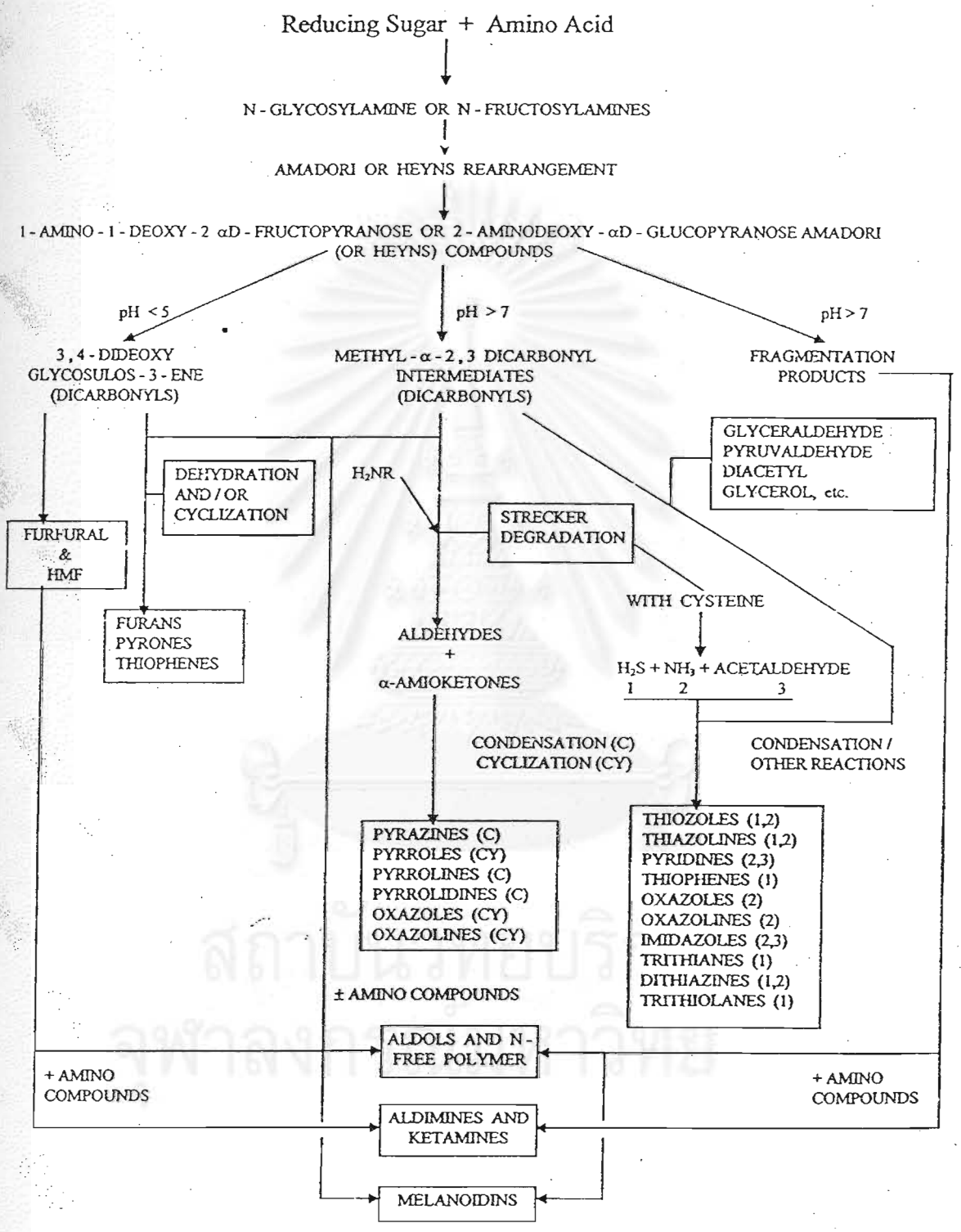
2.5.2.1.1 เกิด 2,3 enolization ได้ methyl dicarbornyl intermediate จากนั้น enolization อีกครั้งเป็น unsaturated dicarbonyl แล้วเกิด hydrolytic fission เป็น dicarbonyl และ reductone หรือเกิด cyclization ได้เป็น o-heterocyclic compound พวก furanone ซึ่งให้กลิ่นคาราเมล

2.5.2.1.2 เกิด enolization และ hydrolysis เป็น 3-deoxyglycosulose จากนั้นเกิด dehydration และ cyclodehydration ได้เป็น hydroxymethyl furfural เมื่อทำปฏิกิริยากับเอมีนได้เป็น melanoidin

2.5.2.2 ปฏิกิริยา Strecker degradation เกิดจากสารประกอบ dicarbonyl จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด ทำปฏิกิริยากับหมู่แอลฟาอะมิโนเกิด Schiff base และ enolization ได้ enaminol ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาได้อีกสองกรณี คือ

2.5.2.2.1 เกิด self condensation ได้เป็น browning polymer

2.5.2.2.2 เกิดไฮโดรไลซิสได้เป็นอัลดีไฮด์ของกรดอะมิโนและเอมีน และเกิด cyclization หรือ condensation สารประกอบที่ให้กลิ่นรสจากปฏิกิริยานี้ คือ ไพราซีน และ ไพโรล (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 การเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Nagodawithana,1995)

2.5.3.3. ปฏิกิริยาการสลายตัวเนื่องจากความร้อน (thermal degradation) เป็นปฏิกิริยาจากการสลายตัวขององค์ประกอบต่างๆในยีสต์ออโตไลเสท ที่สำคัญคือกรดอะมิโนและไทอามีน กรดอะมิโนพวก ซีสเตอีนและซิสตีน จะสลายตัวเป็น แอลดีไฮด์ แอมโมเนีย และไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ acetoin จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด เกิดเป็น ไทอาโซลีน (thiazoline) ที่ให้กลิ่นรสเนื้อ

ไทอามีนจะสลายตัวเกิดเป็นสารประกอบที่ระเหยได้ เช่น กรดฟอร์มิก, 2-methylfuran, 2-ethylfuran-3-thiol, 2-methyltetrahydrothiophen-3-one , 2-methylthiophene , 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethyl pyrimidine และ 4-methyl-5-(β-hydroxyethyl) thiazole

นอกจากปฏิกิริยาดังกล่าวแล้วผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยายังสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้เป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสเฉพาะตัวอื่นๆอีก

ปฏิกิริยาของ 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone หรือ HMF ซึ่งเป็นสารประกอบตั้งต้น (precusor) ของกลิ่นรสเนื้อที่พบมากในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์กับไฮโดรเจนซัลไฟด์ ได้เป็น mercapto substituted furans และ thiophene เช่น 4-mercapto-2-methylfuran, 3-mercapto-2-methyl-4,5-dihydrofuran และ 3-mercapto-2-methyl-thiophene ที่ให้กลิ่นรสเนื้อเป็นต้น

Ames และ MacLeod (1985) ได้วิเคราะห์สารประกอบระเหยที่ให้กลิ่นของยีสต์สกัดด้วยเครื่อง GC-MS พบว่ามีสารประกอบประมาณ 100 ตัว ที่แยกออกมาได้ ซึ่งสารประกอบที่ได้บางส่วนเกิดจากการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biosynthesis) ของยีสต์ จากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาการสลายตัวของไทอามีน และจากปฏิกิริยาการออกซิเดชั่น หรือการสลายตัวจากความร้อนของน้ำมัน นอกจากนี้ยังได้กล่าวถึงการเกิดปฏิกิริยาของ 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone กับไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้เป็นสารระเหยที่ให้กลิ่นรสของเนื้อสัตว์

ตัวอย่างสารประกอบระเหยที่แยกได้และมีสมบัติในการให้กลิ่นรสเนื้อของยีสต์สกัด แสดงในตารางที่ 2.10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.10 สารประกอบระเหยได้ที่สำคัญในยีสต์สกัดทางการค้า

Component	t_R (min)	RPA	Ordor quality
Methanethiol	6.02	0.75	Faecal , rotten cabbage
Methylpropanal	6.32	2.50	Cereal, grassy, slight caramel
2-methylfuran	6.47	0.10	Meat extract
3-methylbutanal	6.83	35.50	Estery, fruity
butanedione	7.42	0.50	Sweet, creamy , buttery
4-methylpentan-2one	8.25	0.10	Estery , chemical solvent
pentane-2,3-dione	9.72	1.50	caramel , meaty , slightly roasted
dimethyl disulfide	9.72	0.50	meat extract
α-terpinene	15.55	0.10	weak , sweet, buttery
limonene	17.35	0.10	garden mint
thiazole	20.52	0.01	meaty
methylpyrazine	20.93	0.25	meaty
2-methylfuranthiol	22.27	0.20	
2,5-dimethylpyrazine	26.83	0.75	peanut butter, estery
ethylpyrazine	27.82	0.25	
2-methyl-(methylthio)furan	28.65	0.02	
dimethyl trisulfide	30.28	0.10	buttery, burnt
2-ethyl-5-methylpyrazine	32.45	0.50	nutty, rancid, nuts
trimethylpyrazine	33.43	1.00	roasted nut
furfuryl thiol	35.22	0.02	
2,5-dimethyl-3-ethylpyrazine	36.72	1.25	smoky , burn
tetramethylpyrazine	39.63	0.10	nutty
benzaldehyde	41.88	1.50	almonds, nutty
5-methyl-2-furaldehyde	47.18	0.01	meat extract , roasted fat
2-methyl-(methyldithio)-furan	51.50	0.25	meaty
sesquiterpene hydrocarbon	55.35	0.10	canned soup

RPA values related to isolate and have been corrected as follows; >5% quoted to nearest 0.5%; 0.25-5% quoted to nearest 0.25%; <0.25% quoted as 0.25, 0.20, 0.10, 0.05, 0.02 and 0.01%

ที่มา : Ames และ MacLeod (1985)

ความเป็นกรดด่างของยีสต์ออโตไลเสทมีผลต่อกลิ่นรสเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท เนื่องจากความเป็นกรดด่างจะมีผลโดยตรงต่อทิศทางของปฏิกิริยาเมลลาร์ด โดยที่ความเป็นกรดด่างต่ำๆจะเกิดสารประกอบพวกฟูแรนไทออล (furanthiol) และไดซัลไฟด์ (disulfide) ซึ่งจะให้กลิ่นรสเนื้อเพิ่มขึ้นจำนวนมาก ถ้าความเป็นกรดด่างสูงกว่า 5.0 ขึ้นไป จะเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้หลายทางเกิดสารประกอบขึ้นจำนวนมากรวมทั้งเมลานอยดิน (melanoidins) ซึ่งเป็นสารประกอบสีน้ำตาล (Mottram, 1994)

วิวัฒน์ หวังเจริญ และ วัลยา โมราสุข (2539) ผลิตยีสต์ออโตไลเสทจากยีสต์ขนมปัง โดยนำยีสต์ขนมปัง 15% (w/v) pH 4.0 ระยะเวลาการย่อยสลายตัวเอง 24 ชั่วโมง เมื่อปรับค่า pH ยีสต์ออโตไลเสทเป็น 3.0 ก่อนการทำเข้มข้นและอบแห้งจะให้ยีสต์ออโตไลเสทที่ให้กลิ่นรสเนื้อดีที่สุด

Mottram และ Whitfield (1994) ได้รายงานถึงการศึกษาปฏิกิริยาของ 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone กับซิสเตอีน ที่ pH 4.5-6.5 พบว่าสารประกอบไพราซีนจะเกิดขึ้นที่ pH 5.5 ส่วน 2-methyl-3-furanthiol และ 2-furfurylmethanethiol จะไม่พบที่ pH สูง โดยที่ pH 4.5 สารประกอบหลักที่พบเป็นพวก mercaptoketone , furan และ thiophenthiol เช่น 2-methyltetrahydrophenone และ 3,5-dimethyl-1,2-dithiolan-4-one เป็นต้น

2.6 การปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท

ยีสต์ออโตไลเสทสามารถใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร กลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทเกิดจากการรวมตัวของสารภายในเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการย่อยสลาย หรือเกิดจากการได้รับความร้อน ปฏิกิริยาที่สำคัญคือปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่ใช้เอนไซม์ หรือปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากน้ำตาลรีดิวซ์และกรดอะมิโนในยีสต์ออโตไลเสท ได้เป็นสารให้กลิ่นรสและสีน้ำตาลในอาหารหลายชนิดและปฏิกิริยา Strecker degradation สารประกอบที่ให้กลิ่นรสจากปฏิกิริยานี้ เช่น ไพราซีน, ไพโรล, ไธโอโซล และ โอซาโซล เป็นต้น (Nagodawithana, 1992)

การปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสททำได้โดย อาศัยปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสารประกอบที่ให้กลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท ได้แก่ ปฏิกิริยาการสลายตัวของสารประกอบบางชนิด เช่น ไทอามีน และปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล นอกจากนี้ยังมีการเติมเอนไซม์บางชนิด เช่น คาเทปซิน (cathepsin) และแลคเตท (lactate) การเติมเอนไซม์จากเนื้อสัตว์ (Gasser, 1972) การเติมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โปรตีนพืชไฮโดรไลเสท และไขมัน เพื่อปรับปรุงกลิ่นรสเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท (Gasser และ Huster, 1978 ; Poiger และ Huster, 1980)

Gasser (1972) ได้ผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสเนื้อ โดยการนำยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้น 25% เติมน้ำตาล hexose 1.5% (ปริมาณยีสต์ออโตไลเสทต้องมากกว่าน้ำตาล 15 เท่า) และเอนไซม์ที่

สกัดได้จากเนื้อสด 3-5% (โดยเตรียมจากเนื้อที่ผ่านการฆ่าไม่เกิน 24 ชั่วโมง และยังคงมีแอคทิวิตีของเอนไซม์อยู่) ปรับ pH เป็น 4-6 ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 37°C หรือที่ pH 6-7 อุณหภูมิต่ำกว่า 15°C ระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เข้มข้นจนมีปริมาณของแข็ง 65% ปรับ pH เป็น 6.0 นำมาให้ความร้อน 90-100°C อย่างน้อย 15 นาที จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นคล้ายเนื้อออบจากการทำงานของเอนไซม์ที่เติม เอนไซม์ที่สกัดได้จากเนื้อสดจะประกอบด้วย cathepsin ที่ย่อยสลายโปรตีน เอนไซม์ ATPase ที่ย่อยสลาย นิวคลีโอไทด์ และเอนไซม์ที่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตให้เป็น hexose phosphate, pentose phosphate และ lactate

Gasser และ Huster (1978) ผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสเนื้อจากยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้น โดยนำยีสต์ออโตไลเสทมาเจือจางด้วยน้ำอัตราส่วน 1:2 ปรับ pH เป็น 7-8 ให้ความร้อนที่ 92-98°C นาน 8-15 นาที ปล่อยให้เย็นลงและกรองแยกส่วนของแข็งออก นำสารละลายที่ได้มาให้ความร้อนที่ 92-98°C จากนั้นกลั่นด้วยไอน้ำในคอลัมน์แบบสวนทาง (countercurrent) โดยสารละลายจะเข้าทางด้านบนและไอน้ำจะเข้าทางด้านล่างของคอลัมน์ ในอัตราส่วนไอน้ำต่อสารละลายเป็น 1:1-2 ทำให้เข้มข้นจนมีปริมาณของแข็ง 78-85% เติมไขมันพืช (hydrogenated vegetable fat) หรือไขมันวัว น้ำตาลกลูโคส และนิวคลีโอไทด์ ปรับ pH เป็น 6.2-6.4 ให้ความร้อนที่ 92-98°C พร้อมทั้งกวนตลอดเวลานาน 10-30 นาที ทำให้เข้มข้นเป็น 80-85% ทำแห้งจนมีความชื้นเพียง 0.5-4% จะได้สารปรุงแต่งกลิ่นรสเนื้อ

Poiger และ Huster (1980) นำยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้น 75-85% ปริมาณ 60-80% มาเติมโปรตีนพืชไฮโดรไลเสท 15-30% น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 1-3% และสารประกอบซัลไฟด์ 1-3%(w/w) ให้ความร้อนที่ 110-150°C นาน 1-3 นาที ในเครื่องนวดผสมแบบสองชั้น (heating jacket) ทำแห้งจนผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีความชื้น 0.5-4% จะได้ยีสต์ออโตไลเสทที่มีกลิ่นรสเนื้อ

Izzo และ Ho (1991) ศึกษาการใช้เอ็กซ์ทรูเดอร์ (extruder) ช่วยในการปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์สกัดจากยีสต์ขนมอบ (*S. cerevisiae*) โดยทำการเอ็กซ์ทรูด (extrude) ยีสต์สกัดด้วยเครื่องเอ็กซ์ทรูเดอร์แบบ single screw แล้ววิเคราะห์สารประกอบกลิ่นรสของยีสต์สกัดที่ผ่านและไม่ผ่านการเอ็กซ์ทรูดด้วยเครื่อง GC/MS พบว่ายีสต์สกัดที่ผ่านการเอ็กซ์ทรูด (extruded-autolyzed yeast extract) จะมีสารประกอบที่ให้กลิ่นรสเพิ่มขึ้นมากกว่ายีสต์สกัดที่ไม่ผ่านการเอ็กซ์ทรูด (unextruded-autolyzed yeast extract) โดยสารประกอบให้กลิ่นรสที่แยกได้ แบ่งเป็นสารประกอบระเหยได้ที่มีซัลเฟอร์ (sulfur bearing volatile) สารประกอบจากการสลายตัวของน้ำตาล (sugar degradation) สารประกอบที่เป็น non-pyrazine nitrogen compound และสารประกอบไพราซีน ยีสต์สกัดที่ผ่านการเอ็กซ์ทรูดจะมีสารประกอบกลิ่นรสเกิดขึ้นมากกว่ายีสต์สกัดที่ไม่ผ่านการเอ็กซ์ทรูด เช่น methylpyrazine, 2,3-dimethylpyrazine, 2,3-dimethyl-5-ethylpyrazine และ 2,5-dimethyl-3-ethylpyrazine เป็นต้น

การนำยีสต์สกัดไปผ่านการเอ็กซ์ทรูดจะช่วยปรับปรุงกลิ่นรสเนื้อ และกลิ่นของปิ้งหรือย่าง (roast) ให้ดีขึ้น เนื่องจากความร้อนจากการเอ็กซ์ทรูดที่ให้กับยีสต์สกัดจะช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยความร้อน และปฏิกิริยาเมลลาร์ดในยีสต์สกัดมากขึ้น โดย Izzo และ Ho (1991) แนะนำให้ใช้เครื่อง HTST Extruder เพื่อช่วยลดระยะเวลาในการเกิดกลิ่นรสและการผลิต

Izzo และ Ho (1992) ได้ศึกษาผลของการเติมแอมโมเนียมไบคาร์บอเนตและน้ำตาลกลูโคสลงในยีสต์ออโตไลเสทและติดตามปริมาณสารประกอบไพราซีน โดยเติมแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต 2% และ กลูโคส 5% ลงในยีสต์ออโตไลเสทแล้วเอ็กซ์ทรูดด้วยเครื่องเอ็กซ์ทรูเดอร์แบบ single screw วิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นด้วยเครื่อง GC/MS พบว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ผ่านการเอ็กซ์ทรูดจะเกิดสารประกอบไพราซีน มากกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ไม่ผ่านการเอ็กซ์ทรูดและยีสต์ออโตไลเสทที่เติมแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต การเติมกลูโคสและการเติมกลูโคสร่วมกับการเติมแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต จะทำให้เกิดสารประกอบไพราซีนเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะ methylpyrazine, ethylpyrazine, 2-ethyl-6-methylpyrazine, 6-methyl-2-vinylpyrazine, 2,5-dimethyl-3-ethylpyrazine ปริมาณของไพราซีนทั้งหมด (total pyrazine) ในยีสต์ออโตไลเสทที่ผ่านการเอ็กซ์ทรูดจะเพิ่มขึ้น การเติมกลูโคสจะช่วยเพิ่มปริมาณไพราซีนทั้งหมด แต่เมื่อเติมแอมโมเนียมไบคาร์บอเนตและเติมแอมโมเนียมไบคาร์บอเนตร่วมกับกลูโคสจะทำให้ปริมาณไพราซีนทั้งหมดลดลง เนื่องจากแอมโมเนียมจะไปขัดขวางการเกิดไพราซีน

การเติมโปรตีนจากแหล่งอื่นลงไปในขั้นตอนการย่อยตัวเองของยีสต์ จะช่วยในการเพิ่มผลผลิตและปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทที่ได้ โดยปริมาณผลผลิตที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการที่โปรตีเอสย่อยโปรตีนจากแหล่งอื่นที่เติมลงไปด้วย

Hobson และ Anderson (1995) ทดลองเติม เวย์ กลูเต็นข้าวโพด กลูเต็นข้าวสาลี กลูเต็นข้าว เลือดอบแห้ง รำข้าวโอ๊ต กากถั่วเหลืองและรำข้าวสาลี ปริมาณ 5-50% ร่วมกับเอนไซม์จากภายนอกในการผลิตยีสต์ออโตไลเสท บ่มที่อุณหภูมิ 40-50°C เป็นระยะเวลา 5-15 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 55-65°C นาน 1-5 ชั่วโมง และทำให้เข้มข้น พบว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ได้จะประกอบด้วยโปรตีนยีสต์และโปรตีนพืชไฮโดรไลซิส ทำให้มีปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้นและได้ยีสต์สกัดที่มีกลิ่นรสดีขึ้น แต่กลไกและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นยังไม่ทราบแน่ชัด โดยต้นทุนในการผลิตยีสต์สกัดที่มีการเติมโปรตีนจากแหล่งอื่นนี้จะใกล้เคียงกับการใช้ยีสต์เพียงอย่างเดียว

ยีสต์ออโตไลเสทนอกจากใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารแล้ว ยังมีสมบัติในด้านการเป็นสารเพิ่มกลิ่นรสอาหารอีกด้วย

2.6.1 **สารเพิ่มกลิ่นรสอาหาร** (flavor enhancer)

สารเพิ่มกลิ่นรสอาหาร (flavor enhancer หรือ flavor potentiator) เป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) ที่ใช้ในการปรับปรุงสมบัติด้านประสาทสัมผัสของอาหารชนิดต่างๆ โดยจะมีพื้นฐานในการใช้งานเช่นเดียวกับการใช้เครื่องเทศหรือสารปรุงแต่งกลิ่นรส จากการศึกษาเกี่ยวกับสารเพิ่มกลิ่นรสอาหารพบว่ามีสารประกอบบางชนิดที่มีรสชาติในตัวเองน้อยมาก แต่จะให้ผลต่อการรับรสชาติพื้นฐานของอาหาร

การศึกษาสารเพิ่มกลิ่นรสอาหารนี้ เริ่มตั้งแต่การพบสารประกอบ โมโนโซเดียมกลูตาเมท ในสาหร่ายทะเลญี่ปุ่นที่เรียกว่า คอมบุ (Kombu; *Laminaria japonica*) (Ikeda, 1909) และการพบ 5'-GMP ในเห็ดดำ (black mushroom) และเห็ดชิตาเกะ (Shiitake; *Lentinus edodus*) (Kuninaka,1960)

สารเพิ่มกลิ่นรสอาหารที่เป็นที่รู้จักและใช้งานกันอย่างกว้างขวางได้แก่ ผงชูรส หรือโมโนโซเดียมกลูตาเมท (MSG) ซึ่งในปัจจุบันนี้จะไม่นิยมใช้เท่าที่ควร เนื่องจากผงชูรสจะก่อให้เกิดอาการแพ้ในผู้บริโภคบางกลุ่มจึงได้มีการหาสารประกอบอื่นเพื่อมาใช้แทนผงชูรส สารประกอบที่สามารถให้สมบัติในการเพิ่มกลิ่นรสอาหารนี้ คือ สารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ (5'-nucleotides) ได้แก่ 5'-GMP (guanosine-5'-monophsphate) และ 5'-IMP (inosine-5'-monophosphate) ซึ่งสารประกอบทั้งสองชนิดนี้อาจรู้จักในรูปของ disodium-5'-guanylate และ disodium-5'-inosine ตามลำดับ

ทั้ง MSG และ 5'-นิวคลีโอไทด์ เป็นสารประกอบที่ได้จากธรรมชาติ และสามารถผลิตได้ทางการค้า ทำให้มีการศึกษาการผลิตสารประกอบเหล่านี้โดยใช้เทคโนโลยีการหมักเข้ามาช่วย เพื่อที่จะให้สามารถผลิตได้โดยใช้ต้นทุนต่ำ

2.6.1.1 **รสอร่อย** (umami taste)

ในการศึกษาเกี่ยวกับรสชาติพื้นฐานทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ รสหวาน เค็ม เปรี้ยว และขม พบว่ายังมีรสชาติบางชนิดที่ไม่สามารถอธิบายได้อย่างสมบูรณ์ โดยการใช้รสทั้งสี่ที่เป็นพื้นฐานในการอธิบาย ดังเช่น MSG และ สารประกอบ 5'-nucleotide โดยเฉพาะ 5'-GMP และ 5'-IMP ที่มีรายงานว่าสามารถให้รสคาวและรสชาติที่อร่อยแก่อาหาร นอกเหนือจากการอธิบายด้วยรสพื้นฐานทั้งสี่ซึ่งรสที่แตกต่างออกไปนี้เรียกว่า "umami" ซึ่งเป็นภาษาญี่ปุ่นหมายความว่า "อร่อย" (Ikeda, 1909; Schiffman และ Gill,1987)

ผลการทดลองต่อกลไกการรับรสของ umami substance ในสัตว์ทดลองแสดงถึงบริเวณรับรส (receptor sites) ของรส umami จะเป็นอิสระจากบริเวณรับรสที่เฉพาะสำหรับรสพื้นฐานทั้งสี่ จากข้อมูลชี้ให้เห็นว่าช่วงของรสจะกว้างและรส umami จะพิจารณาได้เหมือนรสพื้นฐาน

อื่นๆ ทำให้มีการศึกษาผลของ umami substance ต่อการเพิ่มกลิ่นรสของอาหารชนิดต่างๆ อย่างกว้างขวาง (Hanson, Brushway และ Lineweaver,1960)

2.6.1.2 **การเสริมรสชาติ** (taste synergism)

Libbey และ Kuninaka, 1967 สังเกตพบการเสริมฤทธิ์ระหว่าง L-glutamate กับ 5'-GMP และ 5'-IMP ซึ่งการเสริมฤทธิ์กันนี้จะส่งผลถึงกลิ่นรสที่ได้ การเสริมฤทธิ์กันระหว่าง MSG และสารประกอบนิวคลีโอไทด์จะเกี่ยวข้องกับการจับกันทางโมเลกุล โดยยังไม่ทราบกลไกการเสริมฤทธิ์ในการรับรสชาติ แต่มีการตั้งสมมติฐานว่าอาจจะเป็นผลจาก การรับรสของกลูตาเมทเป็น allosteric transition เนื่องจากการจับของ 5'-GMP และ 5'-IMP เป็น subunit ที่พอเหมาะการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของการจับกันของกลูตาเมทกับบริเวณจับของโปรตีน ทำให้เพิ่มการตอบรับรส

ในทางการค้าได้มีการผสม MSG และ 5'-GMP และ/หรือ 5'-IMP เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยทั่วไปจะผสม MSG และสารประกอบนิวคลีโอไทด์ในอัตราส่วน 95:5 การใช้สารประกอบทั้งสองชนิดผสมกันจะเพิ่มประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์ ทำให้สามารถใช้สารเพิ่มกลิ่นรสอาหารปริมาณต่ำในสูตรอาหาร และส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตต่ำลง (Nagodawithana, 1995)

2.6.2 **กรดนิวคลีอิกและสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ในยีสต์ออโตไลเสท**

2.6.2.1 **กรดนิวคลีอิกในยีสต์ออโตไลเสท**

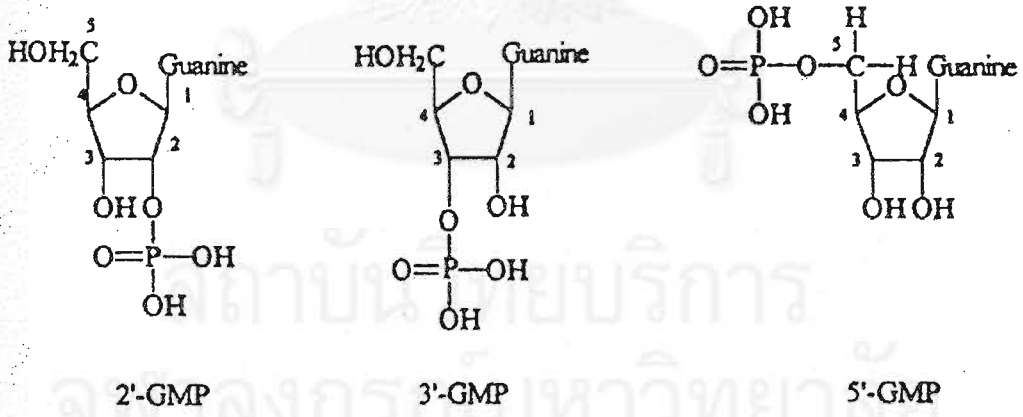
ยีสต์เป็นแหล่งของกรดนิวคลีอิก เนื่องจากยีสต์จะมีปริมาณกรดนิวคลีอิกประมาณ 8-15% ของไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ของยีสต์ โดยที่พบมากที่สุดจะได้แก่กรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid ; RNA) (Reed และ Nagodawithana, 1991) การย่อยสลายของกรดนิวคลีอิกจะเกิดในภาวะที่มีเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) โดยเฉพาะเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย RNA ของยีสต์ สารประกอบที่สำคัญที่ได้จากการย่อยสลาย RNA ของยีสต์ได้แก่ 5'-GMP (guanosine-5'-monophosphate), 5'-IMP (inosine-5'-monophosphate) และ 5'-AMP (adenosine-5'-monophosphate) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ช่วยเสริมกับกรดกลูตามิก (glutamic acid) ในการเพิ่มกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์อาหาร และมีการนำสารประกอบนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการย่อยสลาย RNA ของยีสต์มาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารแทนการใช้ผงชูรส (MSG) (Nagodawithana, 1992)

ปริมาณของ RNA ของยีสต์จะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของยีสต์ และช่วงอายุของยีสต์ที่ทำการเก็บ โดยปริมาณของ RNA ของยีสต์ในช่วง growth phase จะต่ำกว่าในช่วง stationary phase กรดนิวคลีอิกในยีสต์นอกจาก RNA ซึ่งมีเป็นจำนวนมากแล้วยังมี DNA อยู่ปริมาณเล็กน้อยด้วย

ในยีสต์ *C. utilis* จะมีปริมาณ RNA สูงประมาณ 10-15% ต่อน้ำหนักแห้ง ส่วนยีสต์ขนมปังจะมีปริมาณ RNA ต่ำกว่า คือ ประมาณ 8-11% แต่จะนิยมนำมาผลิตสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ มากกว่า *C. utilis* (Reed และ Nagodawithana, 1991)

2.6.2.2 สารประกอบนิวคลีโอไทด์ในยีสต์ออโตไลเสท

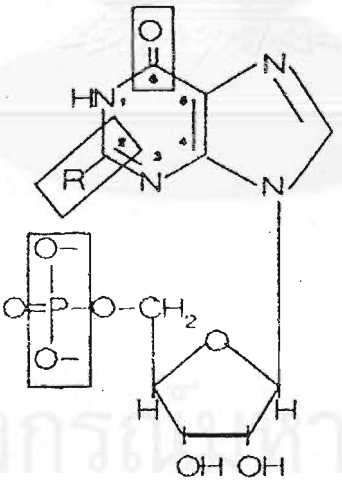
ในการศึกษาความสัมพันธ์ของกลิ่นรสและโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ พบว่าสารประกอบนิวคลีโอไทด์จะมีโครงสร้างเป็น 3 แบบ คือ 2'-, 3'- และ 5'-นิวคลีโอไทด์ ดังรูปที่ 2.8 แต่จะมีเพียงสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ที่ให้สมบัติเป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในอาหาร (Nagodawithana, 1995)



รูปที่ 2.8 โครงสร้าง 3 รูปแบบ ของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ (Nagodawithana, 1995)

สารประกอบนิวคลีโอไทด์ที่สามารถให้รส umami จะเป็นสารประกอบนิ วคลีโอไทด์ที่มี เบสพิวรีน (purine) และหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) หรือหมู่คีโต (keto group) ที่ตำแหน่งที่ 6 และน้ำตาลไรโบสที่เกิดการเอสเทอร์ (esterification) กับกรดฟอสฟอริกที่ตำแหน่งที่ 5 ตำแหน่งที่ 2 ของเบสพิวรีน (5'IMP) จะมีอะตอมของไฮโดรเจน ซึ่งสามารถแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิลได้เป็นสารประกอบ 5'-XMP (Xanthosine-5'-monophosphate) หรือหมู่อะมิโนได้เป็น 5'-GMP โดยไม่มีผลกระทบต่อสมบัติในการเป็นสารเพิ่มกลิ่นรส แต่สารประกอบ 5'-XMP จะให้รส umami อ่อนที่สุด จึงมีความสำคัญน้อยกว่าสารประกอบ 5'-IMP และ 5'-GMP โดยเฉพาะสารประกอบ 5'-GMP จะมีสมบัติในการเป็นสารเพิ่มกลิ่นรสอาหารสูงที่สุด (Nagodawithana, 1994)

นอกจากนี้จุดสำคัญต่อความแรงของรส umami คือหมู่ไฮดรอกซิลทั้ง 2 ตำแหน่งที่ฟอสฟอรัสของโมเลกุลสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ที่มีเบสพิวรีน ซึ่งจะทำให้ลำดับความแรงของรสเป็น GMP > IMP > XMP ส่วน AMP (adenosine monophosphate) จะไม่มีผล สารประกอบนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสไพริมิดีน (pyrimidine) จะไม่มีรส umami การที่สารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ มีสมบัติเป็นสารเพิ่มกลิ่นรสอาหาร เพราะเมื่อดูจากโครงสร้างของสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ดังรูปที่ 2.9 จะพบว่ามีตำแหน่งรับ (receptor site) อย่างน้อย 3 ตำแหน่ง ใน receptor domain สำหรับการจับที่พบในเบสพิวรีน ของสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ เท่านั้น



GMP: R represents NH_2; IMP: R represents H; XMP: R represents OH

รูปที่ 2.9 ตำแหน่งของ receptor site ของสารประกอบ 5'-purine nucleotide (Nagodawithana, 1995)

การผลิตสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ เพื่อใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสอาหารเกิดขึ้นในช่วงปี ค.ศ.1950 โดยการใช้เทคโนโลยีการหมักในการผลิตทำให้ได้เป็นสารประกอบ 5'-inosinic และ 5'-guanylic และได้มีการปรับปรุงวิธีการผลิตสารเพิ่มกลิ่นรสอาหารอีกหลายวิธี ได้แก่

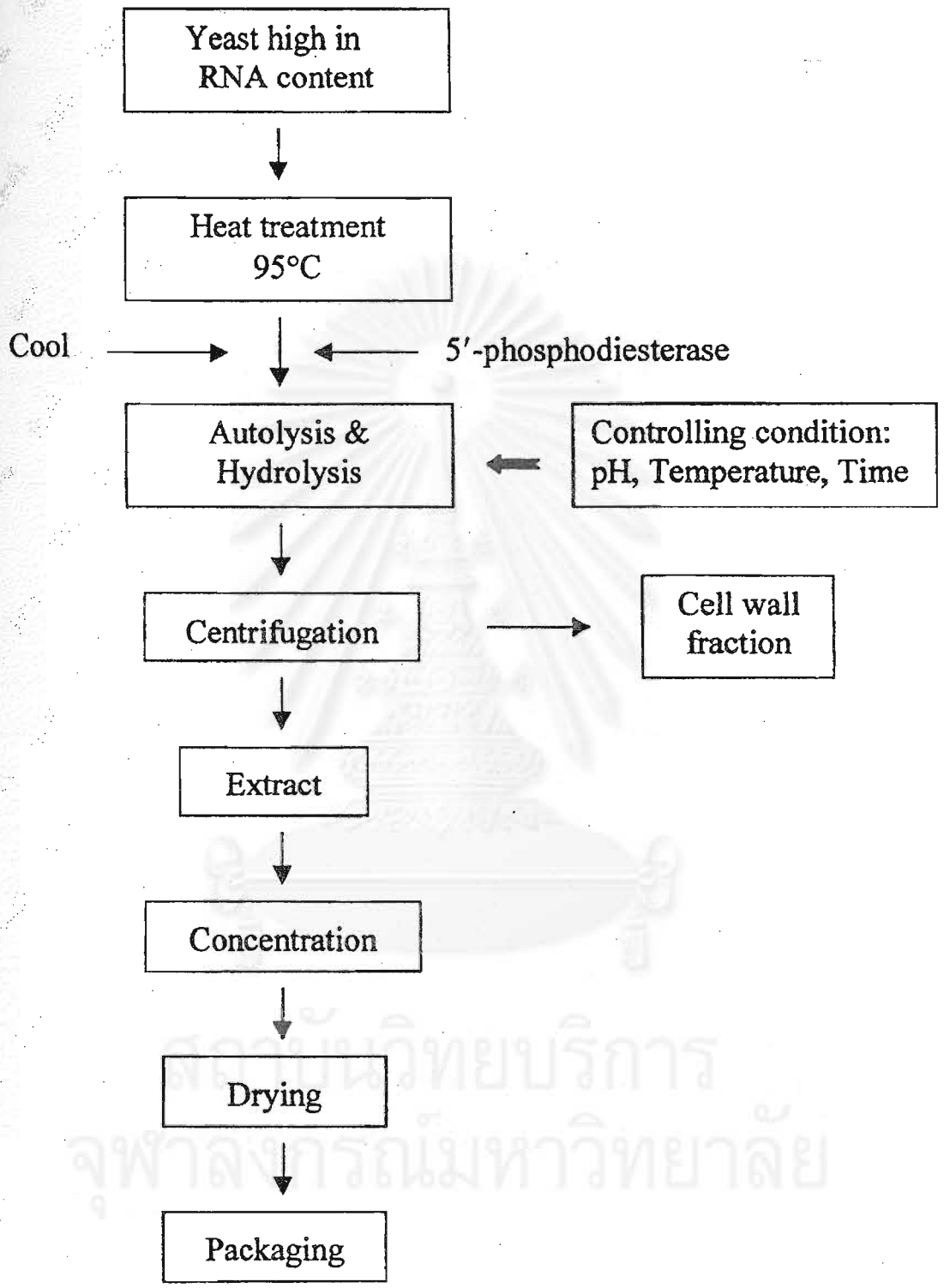
- การเลี้ยงยีสต์จากกากน้ำตาลเพื่อแยก 5'-GMP และ 5'-IMP (Furuya และ Kodaira, 1973)
- การใช้ปฏิกิริยา phosphorylation เพื่อให้ได้สารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ (Peppler, Nakao และ Perlman,1979)
- การย่อยสาย RNA ของเชื้อจุลินทรีย์ให้ได้สารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ โดยใช้เอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (5'-phospsodiesterase) และเปลี่ยนสารประกอบ 5'-AMP เป็น 5'-IMP ด้วยเอนไซม์อะดีนิลดีอะมิเนส (adenyl deaminase) (Kuninaka, 1957; Kamatsu, 1972; Belem, Gibbs และ Lee, 1997)

นอกจากนี้ยังอาจใช้วิธีดังกล่าวร่วมกันในการผลิต โดยส่วนมากแล้วการผลิต 5'-GMP และ5'IMP ให้มีความบริสุทธิ์สูงจะใช้เทคโนโลยีการหมักในการผลิตทางการค้า

2.6.3 การผลิตยีสต์ออโตไลเสทที่มีปริมาณ 5'-นิวคลีโอไทด์สูง

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่ายีสต์จะมีปริมาณของ RNA สูง คือประมาณ 2.5-15% (Tamura, Nakamura และ Okai, 1992) สามารถใช้เป็นแหล่งผลิตสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์เพื่อใช้เป็นสารปรับปรุงกลิ่นรสในทางการค้า สามารถเลี้ยงยีสต์ที่ให้ปริมาณ RNA สูงเป็นจำนวนมากได้ ปริมาณ RNA จะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของยีสต์ ยีสต์ *C. utilis* จะมีปริมาณ RNA สูงที่สุดคือ 10-15% ยีสต์ขนมปัง (*S. cerevisiae*) จะมีปริมาณ RNA ต่ำกว่าคือ 8-11% แต่จะนิยมนำมาผลิตเป็นยีสต์ออโตไลเสทที่มีสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ สูงมากกว่า การเก็บยีสต์ในช่วงที่มีการสังเคราะห์โปรตีนสูงที่สุดจะให้ปริมาณ RNA ที่สูงสุดด้วย

กระบวนการย่อยสลาย RNA เพื่อผลิตสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ จะเป็นดังรูปที่ 2.10 จุดสำคัญในการผลิตสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ คือ การทำให้ RNA ในเซลล์ยีสต์ออกมาสู่สารละลายภายนอก และการใช้เอนไซม์เปลี่ยน RNA เป็น 5'-นิวคลีโอไทด์ (Nagodawithana, 1994)



รูปที่ 2.10 กระบวนการผลิตสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ทางการค้า (Nagodawithana, 1994)

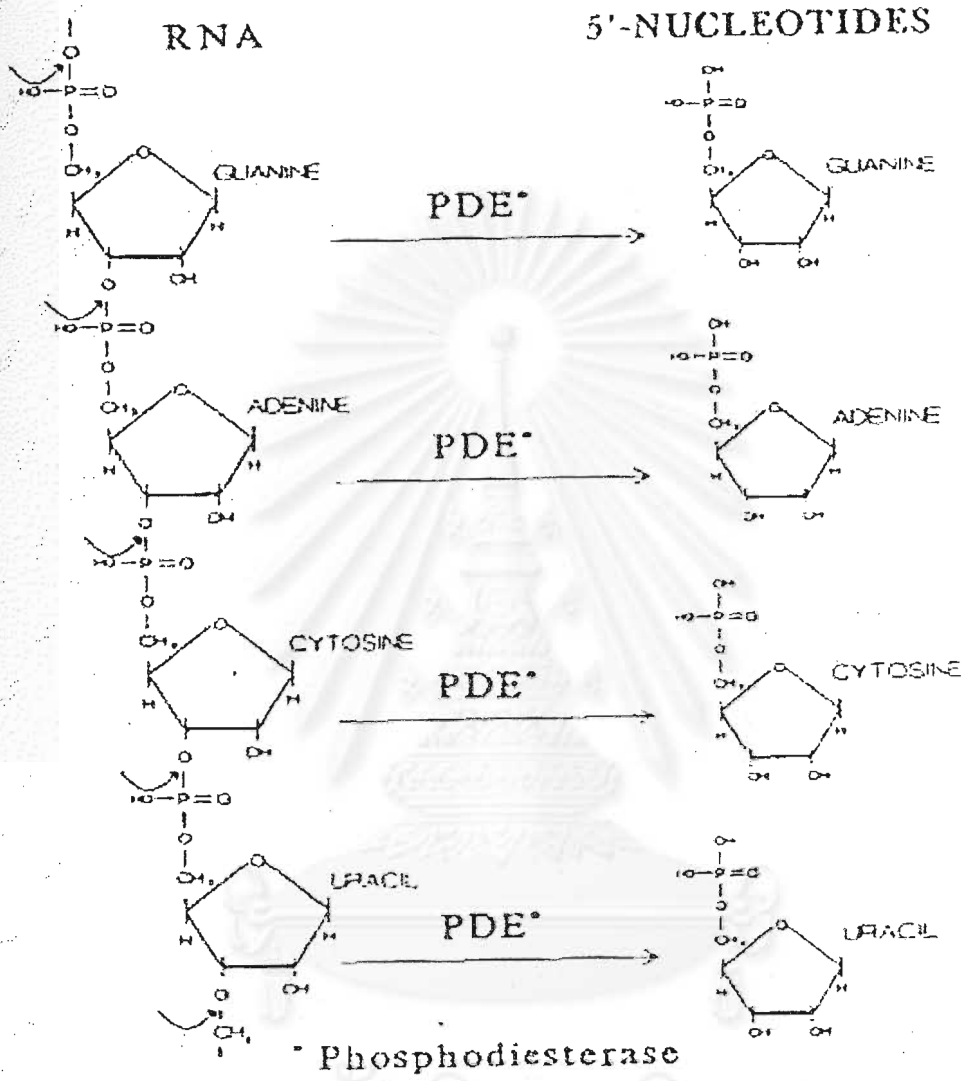
การสกัด RNA จากเซลล์ยีสต์สามารถทำได้ด้วยการให้ความร้อนต่อสารละลายยีสต์ที่อุณหภูมิ 90-100°C pH 6.0-6.6 เป็นระยะเวลา 1-3 ชั่วโมง เพื่อแยก RNA ออกจากเซลล์ยีสต์ (Reed และ Nagodawithana, 1991; Nagodawithana, 1992) และที่ภาวะนี้จะทำลายเอนไซม์นิวคลีเอสที่มีในยีสต์ด้วย เพื่อไม่ให้เอนไซม์นิวคลีเอสจะเปลี่ยน RNA เป็นสารประกอบ 2'-นิวคลีโอไทด์ และ 3'-นิวคลีโอไทด์ ที่ไม่มีผลเป็นสารเพิ่มรสชาติอาหาร ทำให้ RNA ที่มีในยีสต์สามารถเปลี่ยนเป็นสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ที่เป็นสารเพิ่มรสชาติอาหารได้เมื่อเติมเอนไซม์ PDE

หลังจากการให้ความร้อนเพื่อสกัด RNA แล้วจะลดอุณหภูมิของสารละลาย RNA ที่ได้เป็น 50-60°C ปรับ pH เป็น 6.5 จากนั้นจะเติมเอนไซม์ 5'-phosphodiesterase (PDE) เนื่องจาก PDE หรือเอนไซม์ที่ให้สารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ที่พบในยีสต์ปกติจะมีความเข้มข้นต่ำมากและถูกบดบังด้วยเอนไซม์นิวคลีเอสที่เปลี่ยนกรดนิวคลีอิกเป็นสารประกอบนิวคลีโอไทด์อื่น ที่ไม่ใช่สารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ เอนไซม์ PDE ที่ใช้จะได้จากแหล่งอื่น เช่น เอนไซม์ PDE ที่สกัดได้จากเชื้อ *Penicillium citrinum* และ *Streptomyces aureus*

อย่างไรก็ดี PDE จากเชื้อ *P. citrinum* ได้รับการยอมรับจากกระทรวงสาธารณสุขประเทศญี่ปุ่นให้ใช้ในอาหารได้ แต่เอนไซม์ PDE ที่ได้จากเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ยังไม่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยในสหรัฐอเมริกาจึงยังไม่มีการนำมาใช้งาน (Tandkawa และคณะ, 1981) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ PDE ที่ได้จากรากข้าวมอลล์และจาก cereal germ ที่สามารถนำมาใช้ผลิตสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ โดยได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยในสหรัฐอเมริกา

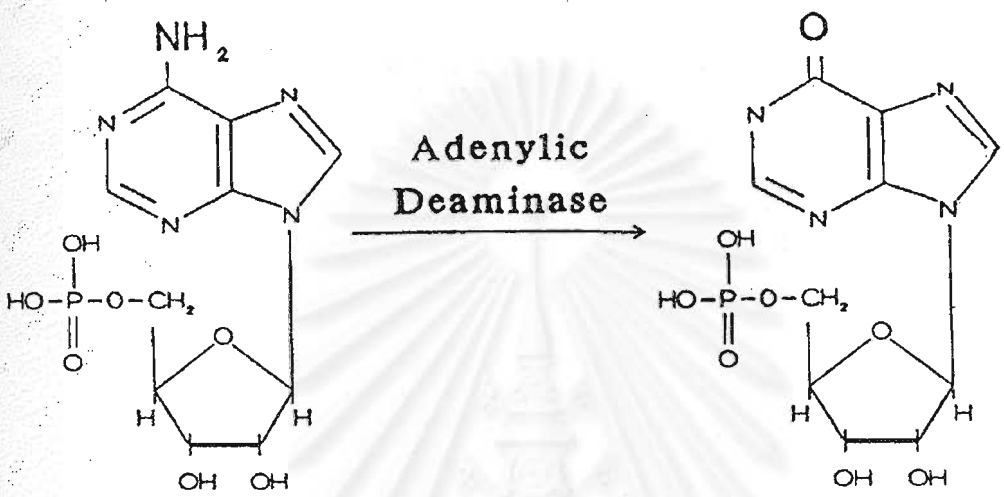
สารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ PDE จะมี 4 ชนิด คือ 5'-GMP, 5'-UMP (5'-uridine monophosphate), 5'-CMP (5'-cytidine monophosphate) และ 5'-AMP แต่จะมีเพียง 5'-GMP ที่ให้สมบัติด้านกลิ่นรส ปฏิกิริยาของการเกิดสารประกอบนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด เป็นดังรูปที่ 2.11

สารประกอบ 5'-AMP จะมีผลต่อการเป็นสารเพิ่มกลิ่นรสอาหารได้ เนื่องจาก 5'-AMP จะเป็นสารตั้งต้นของสารประกอบ 5'-IMP (Reed และ Nagodawithana, 1991) การผลิตสารเพิ่มกลิ่นรสอาหารที่มี 5'-GMP และ 5'-IMP ปริมาณสูงจะใช้การทำงานของเอนไซม์ PDE และเอนไซม์ adenyl deaminase ตามลำดับ (Potman และ Wesdrop,1994) โดยเอนไซม์ PDE จะย่อยสลาย RNA เป็นสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ดังรูปที่ 2.11 จากนั้นเอนไซม์ adenyl deaminase จะเปลี่ยนสารประกอบ 5'-AMP เป็นสารประกอบ 5'-IMP ดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.11 การเกิดสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ จากการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ PDE (Reed และ Nagodawithana, 1991)

สารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ อีกสองชนิด ได้แก่ 5'-CMP และ 5'-UMP จะไม่มีผลเป็นสารเพิ่มกลิ่นรสอาหาร แต่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยาสำหรับผลิตเป็นยา antiviral และใช้ในการผลิตเครื่องสำอาง



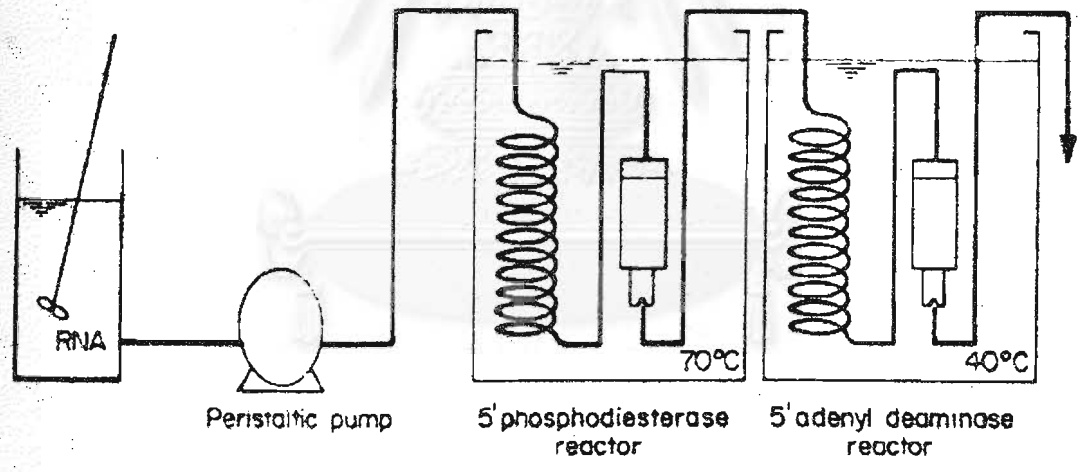
รูปที่ 2.12 การเปลี่ยนสารประกอบ 5'-AMP เป็น 5'-IMP จากการทำงานของเอนไซม์ adenyl deaminase (Reed และ Nagodawithana, 1991)

Potman และ Wesdrop (1994) ได้ผลิตยีสต์ออโตไลเสทโดยการเติมเอนไซม์โปรตีเอสต่างๆร่วมกับการใช้เอนไซม์ phosphodiesterase ที่สามารถย่อยสาย RNA เป็นสารประกอบ 5'-ไรโบนิวคลีโอไทด์ ซึ่งได้แก่ 5'-GMP พบว่าการใช้เอนไซม์โปรตีเอสช่วยย่อยสลายเซลล์ยีสต์ในภาวะไม่มีออกซิเจน จะทำให้ได้ยีสต์ออโตไลเสทที่มีผลผลิตสูงประมาณ 60% และมีปริมาณ 5'-GMP 1.8% เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายยีสต์ 18 ชั่วโมง แต่เมื่อทำการย่อย RNA ในภาวะที่มีออกซิเจนจะทำให้ได้ยีสต์สกัดที่มี yield 46%และมีปริมาณ 5 '-GMP สูงประมาณ 3.9 % ในการผลิตยีสต์ออโตไลเสทสามารถใช้ระบบการผลิตเป็น 2 แบบ คือ

- แบบ single step จะนำยีสต์มาย่อยด้วยเอนไซม์ในภาวะที่มีออกซิเจนผลที่ได้จะทำให้ได้ยีสต์ออโตไลเสทที่มีปริมาณ 5'-GMP สูง และมีปริมาณ yield ปานกลาง

- แบบ two step วิธีนี้จะย่อยสลายยีสต์ด้วยเอนไซม์ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนก่อน จากนั้นจะย่อยสลาย RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่ได้ในภาวะที่มีออกซิเจน จะทำให้ได้ยีสต์ออโตไลเสทที่มีปริมาณ yield และ 5'-GMP ปริมาณสูง

Olmedo และคณะ. (1994) ผลิตสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ จาก RNA ของยีสต์ด้วยเอนไซม์ PDE และเอนไซม์ 5'-adenyl deaminase (5'-AD) โดยตรึงรูปเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด บน acrylic resin ปริมาณ 15 U/g.(เรซิน) ในหม้อปฏิกรณ์แบบ continuous packed-bed 2 ตัว ค่า Km ของ 5'-AD ตรึงรูปเป็น 20 μM. ส่วน Km ของ PDE เป็น 4.85 mg. RNA/ml. หม้อปฏิกรณ์ตัวแรกจะเติมเอนไซม์ PDE ตรึงรูป 10.89 U/g. อุณหภูมิ 70°C หม้อปฏิกรณ์ตัวที่สองเติมเอนไซม์ 5'-AD ตรึงรูป 25 U/g. อุณหภูมิ 40°C ค่า pH ของระบบ 5.5 ป้อนสารละลายยีสต์ RNA ปริมาณ 15 กรัม/ลิตร อัตราเร็วการป้อน 0.4 ลูกบาศก์เซนติเมตร/นาที รูปแบบของหม้อปฏิกรณ์ที่ใช้ในการผลิตสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ เป็นดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 รูปแบบของหม้อปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องที่ใช้ในการผลิตสารประกอบ 5'-IMP และ 5'-GMP จาก RNA ของยีสต์ (Olmedo และคณะ,1994)

Belem และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตนิวคลีโอไทด์จากยีสต์ออโตไลเสทที่ได้จาก *Kluyveromyces marxianus* โดยนำยีสต์มาทำการย่อยสลายตัวเองแล้วนำยีสต์ออโตไลเสทที่ได้มาปรับ pH เป็น 6.5 เติมเอนไซม์ 5'-phosphodiesterase (PDE) 0.2-1.0%(w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นปรับ pH เป็น 5.5 เติมเอนไซม์ adenyl deaminase 0.5-1.0% ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์สารประกอบนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง reversed phase HPLC (RP-HPLC) และเครื่อง liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) โดย RP-HPLC ใช้ Novopak C18 column ส่วน LC ใช้ Vydac ODS column พบว่าในการย่อยตัวเองของยีสต์ *K. marxianus* จะพบว่าอุณหภูมิ 50° pH 6.5 มีผลต่อปริมาณของ 5'-นิวคลีโอไทด์มากที่สุด โดยจะได้ปริมาณของ 5'-AMP 592.62 μg/g และ 5'-GMP 463.05 μg/g ส่วนปริมาณของ 5'-IMP เป็น 133.04 μg/g นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใช้เวลาในการออโตไลเสทเพิ่มขึ้นจาก 6 ชั่วโมง เป็น 12 ชั่วโมง จะทำให้ปริมาณ 5'-IMP เพิ่มขึ้นถึง 3 เท่า

เมื่อเติมเอนไซม์ PDE ลงในยีสต์ออโตไลเสท พบว่าปริมาณของ 5'-GMPและ ไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) เพิ่มสูงขึ้น โดยที่ปริมาณเอนไซม์ PDE 1% จะให้ปริมาณของ 5'-GMP เพิ่มขึ้นเป็น 800 μg/g และปริมาณไฮโปแซนทีนเป็น 12000 μg/g ซึ่งมีการรายงานว่าไฮโปแซนทีนไม่มีผลเกี่ยวข้องกับรสชาติของอาหาร อย่างไรก็ตามเอนไซม์นิวคลีเอสในเซลล์ยีสต์เอง หรือเอนไซม์ PDE ที่เติม ไม่สามารถย่อย RNA ให้เปลี่ยนเป็น 5'-นิวคลีโอไทด์ได้ทั้งหมด เมื่อให้ความร้อน 80°C นาน 15 นาที หลังจากการย่อย RNA ในยีสต์ออโตไลเสทด้วยเอนไซม์ PDE พบว่าสารประกอบนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นมากกว่าการไม่ให้ความร้อน เนื่องจากความร้อนจะทำให้เกิดการไฮโดรไลซ์พันธะของฟอสเฟตและไนโตรเจน

Sombutyanuchit, Suphantharika และ Verduyn (2001) ศึกษาการผลิตยีสต์ออโตไลเสทที่มีปริมาณ 5'-GMP สูงด้วยเอนไซม์ PDE ที่สกัดจากรากข้าวมอลท์แห้ง โดยนำรากข้าวมอลท์แห้งมา สกัด และตกตะกอนเอนไซม์ PDE ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 40 และ 80% ยีสต์ออโตไลเสทได้จากการย่อยสลายตัวเองที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 50°C นาน 8-12 ชั่วโมง ปริมาณของแข็งยีสต์ 15%(w/v) ปรับ pH 6.2-6.4 บ่มที่ 95°C นาน 2 ชั่วโมงเพื่อสกัด RNA จากนั้นเติมเอนไซม์ PDE ที่ได้สกัดได้ในปริมาณ 100 unit/100 ml.ของยีสต์ออโตไลเสท ที่ pH 6.2-6.4 อุณหภูมิ 60°C นาน 0-26 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์ออโตไลเสทที่ได้จะมีปริมาณ 5'-GMP สูงขึ้น

2.7 กฎหมายและความปลอดภัยของการใช้สารปรุงแต่งกลิ่นรสและสารเพิ่มกลิ่นรสอาหาร

ในปี ค.ศ.1958 FFD&C (Food Additive Amendment to the Federal, Food, Drug and Cosmetic Act) กำหนดให้กรดกลูตามิค (L-glutamic acid) โปรตีนพืชไฮโดรไลซ์ที่มีกรดกลูตามิค และยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสท เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการตรวจสอบและยอมรับแล้วว่าปลอดภัย (GRAS) เมื่อวันที่ 21 มิถุนายน ค.ศ.1991 องค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกาประกาศว่าไม่จำเป็นต้องบ่งบอกว่ามีการเติมผงชูรส (MSG) ลงบนฉลากเมื่อมีการเติมโปรตีนไฮโดรไลเสทลงในอาหาร (Office of the Fedral Register, 1991) แต่ในปัจจุบันการเติม ผงชูรส (MSG) ในอาหารต้องระบุว่ามีการเติม “monosodium glutamate” ลงบนฉลากผลิตภัณฑ์อาหารชนิดนั้น ส่วนยีสต์ออโตไลเสทหรือยีสต์สกัดจะมีคำจำกัดความว่าเป็น “natural flavoring (สารปรุงแต่งกลิ่นรสธรรมชาติ)” โดยกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกาประกาศให้ต้องระบุชื่อสามัญ หรือใช้ “yeast extract (ยีสต์สกัด)” บนฉลาก ทั้ง 5’-GMP และ 5’IMP ได้รับการยอมรับในการใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารจากองค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา โดยต้องระบุชื่อสามัญลงบนฉลากอาหาร

2.7.1 ผงชูรส (MSG)

ผงชูรสจัดเป็นสารเพิ่มกลิ่นรสอาหารนิยมใช้เติมลงในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ โดยจะให้ผลดีในอาหารที่มีปริมาณกรดกลูตามิคต่ำ (ต่ำกว่า 0.02%) องค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration; FDA) ของสหรัฐอเมริกา กล่าวว่าประชาชนบางส่วน (ประมาณ 1-2% ของกลุ่มสำรวจ) จะมีอาการแพ้ที่ไม่รุนแรงนักเมื่อบริโภคผงชูรส (MSG) ที่เติมลงในอาหาร อาการแพ้ที่เกิดขึ้น คือ ผิวเป็นสีแดง ขากรรไกรค้าง แน่นหน้าอก ตัวร้อนหรือรู้สึกซู่ซ่าบริเวณ หน้า คอ และศีรษะ ปวดศีรษะ คลื่นไส้ หน้าตึง บวม และกระหายน้ำเป็นต้น ซึ่งอาการเหล่านี้เรียกว่า “Chinese restaurant syndrome” หรือ “Kwok’s disease” (Schaumburg และคณะ, 1969) โดยอาการที่เกิดขึ้นจะหายไปภายใน 25-30 นาที อาการและระยะเวลาที่เกิดจะผันแปรตามปริมาณผงชูรสที่ร่างกายได้รับ

ปริมาณของกลูตาเมททั้งหมด (total glutamate) และกลูตาเมทอิสระ (free glutamate) ที่ร่างกายได้รับแต่ละวันเป็น 23 กรัม และ 0.7 กรัม ตามลำดับ ปริมาณผงชูรสที่มีในอาหารที่ร่างกายได้รับต่อวันจะประมาณ 0.55 กรัม หรือ 0.008 กรัม/กิโลกรัมร่างกาย ทั้งนี้ผู้บริโภคในประเทศทางตะวันออกจะนิยมบริโภคผงชูรสประมาณ 4 กรัมต่อวัน โดยจะมากกว่าผู้บริโภคในประเทศทางตะวันตกที่บริโภคผงชูรสน้อยกว่า 1 กรัมต่อวัน แต่ก็ไม่แน่นอนเสมอไปเพราะยังมีคนบางกลุ่มที่บริโภคผงชูรสปริมาณสูง (extreme consumer) เช่นในสหราชอาณาจักรมีผู้บริโภคผงชูรสสูงถึง 2.3 กรัมต่อวัน (Rhodes และคณะ, 1991)

2.7.2 กรดนิวคลีอิก

ยีสต์มีกรดนิวคลีอิก (RNA) ประมาณ 8-15% ดังนั้นในกระบวนการผลิตยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสทจะได้กรดนิวคลีอิกผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์ด้วย ถ้าร่างกายได้รับกรดนิวคลีอิกโดยเฉพาะพิวรีน (purine) ในปริมาณมากจะขับออกไม่ทัน ทำให้มีปริมาณกรดยูริกในกระแสเลือดสูงกว่าปกติ ซึ่งจะตกผลึกสะสมตามข้อกระดูกหรือเนื้อเยื่อเป็นสาเหตุของโรคเกาท์ การใช้ยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสทที่มีปริมาณกรดนิวคลีอิกสูงมากเกินไปจึงเป็นสิ่งที่ควรระมัดระวัง ปกติร่างกายสามารถรับกรดนิวคลีอิกได้ไม่เกินวันละ 4 กรัม หรือ 2 กรัมจากยีสต์โดยน้ำหนักแห้ง (Reed และ Nagodawithana, 1991) ดังนั้นการย่อยสลาย RNA ในยีสต์ออโตไลเสทจึงเป็นแนวทางในการลดปริมาณ RNA ลงได้

2.8 การใช้ยีสต์ออโตไลเสทเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสและสารเพิ่มกลิ่นรสของอาหาร

ยีสต์ออโตไลเสทหรือยีสต์สกัดสามารถใช้งานได้กว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมการหมัก อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และการทำเครื่องสำอาง (Reed และ Nagodawithana, 1991) ยีสต์ออโตไลเสทจะประกอบด้วยโปรตีนและสารสกัดจากภายในเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ ยีสต์ออโตไลเสทมีการใช้งานเป็นสารเจือปนอาหาร โดยทั่วไปยีสต์ออโตไลเสทที่ใช้จะอยู่ในรูปผงแห้ง และของเหลวข้นทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการใช้งาน

ยีสต์ออโตไลเสทเป็นวัตถุดิบที่ดีในการเพิ่มกลิ่นรสของซุป ผลิตภัณฑ์เนื้อ น้ำเกรวี่ มาการีน อาหารทอด เครื่องดื่ม ขนมอบ เนยแข็ง และลูกกวาด (Olsen, 1995) นอกจากนี้ยีสต์ออโตไลเสทยังมีลักษณะกลิ่นและกลิ่นรสเฉพาะตัว (Schoenberg, 1992) กลิ่นรสเฉพาะของยีสต์ออโตไลเสทขึ้นอยู่กับแหล่งของวัตถุดิบ ภาวะในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ และภาวะอื่นๆในการผลิต ยีสต์ออโตไลเสทที่ได้จากยีสต์ขนมปังปฐมภูมิ (primary baker's yeast) จะมีกลิ่นรสที่อ่อนแบบน้ำซุปจนถึงเข้มแบบกลิ่นเนื้ออบ ส่วนยีสต์ออโตไลเสทที่ได้จากยีสต์จากการผลิตเบียร์จะมีกลิ่นรสที่แรงกว่า ปริมาณยีสต์ออโตไลเสทที่ใช้ขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะและชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการใช้งาน โดยทั่วไปมักจะอยู่ในช่วง 0.1-0.5% (w/w) ดังตารางที่ 2.11

ผลิตภัณฑ์ซุป เกรวี่ และซอส เป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมเติมยีสต์ออโตไลเสทมากที่สุด ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์โดยเฉพาะไส้กรอก อาหารสัตว์ และ savory spread มักจะนิยมใช้ยีสต์ออโตไลเสทจากยีสต์อุตสาหกรรมเบียร์ อาหารพร้อมทาน อาหารแช่แข็ง และ อาหารเด็ก เป็นผลิตภัณฑ์ที่เติมยีสต์ออโตไลเสทแล้วจะให้รสชาติดีขึ้น ส่วนการเติมยีสต์ออโตไลเสทลงในผลิตภัณฑ์ขนมขบเคี้ยวนอกจากให้รสชาติดีแล้วยังเป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษาต่อด้วย (Thornton, 1992)

ตารางที่ 2.11 ปริมาณเฉลี่ยของยีสต์ออโตไลเสทหรือยีสต์สกัดที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

ผลิตภัณฑ์อาหาร	ปริมาณการเติม (ร้อยละโดยน้ำหนักอาหาร)	
	A	B
Soup	0.5-1.6	0.1-1.5
Concentrate soup	0.5-1.3	-
Dried soup	0.3-1.0	-
Sauces and gravy	0.5-1.0	0.2-1.5
Meat broth (seasoning powders)	-	5.0-20.0
Meat products	0.7-1.3	0.05-0.4
Canned meat	0.7-1.6	-
Frozen meat	0.7-1.6	-
Stew	0.5-1.3	-
Poultry products	0.3-1.0	-
Sea food	0.2-0.6	-
Vegetable	0.1-0.5	-
Breading and batter	1.0-2.5	-
Ready to serve dishes	-	0.1-0.5
Pickled products	-	0.02-0.5
Dietary products	-	0.2-5.0
Fish (marinade)	-	0.1-0.3
Snack products	0.2-0.8	0.1-5.0
Pet food products	-	0.02-0.2
Vinegar and mustard	-	0.05-0.5
Instant drinks and desserts	-	0.02-0.08
Biotechnology (as substrate)	-	0.1-0.3

ที่มา A : Albrecht และ Deindoefer (1966)

B : Sommer (1989)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ยีสต์ออโตไลเสทสามารถใช้งานเป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยจะช่วยเพิ่มหรือปรับปรุงกลิ่นรสพื้นฐานของอาหาร ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณกรดกลูตามิคหรือสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ การใช้ยีสต์ออโตไลเสทสามารถช่วยกลุ่มผู้บริโภคที่มีข้อจำกัดต่อปริมาณเกลือโซเดียมได้ เพราะยีสต์ออโตไลเสทจะช่วยลดปริมาณเกลือที่ต้องใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร ช่วยให้กลิ่นรสและกระตุ้นการรับรู้รสเค็ม ยีสต์ออโตไลเสทที่มีปริมาณกรดกลูตามิคสูงสามารถใช้แทนผงชูรสในสูตรอาหาร สารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ในยีสต์ออโตไลเสทสามารถลดปริมาณผงชูรสในสูตรอาหารได้ เพราะการเสริมฤทธิ์กันของกรดกลูตามิคและสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ที่มีในยีสต์ออโตไลเสท (Schoenberg, 1992; Berggruen, Nagodawithana และ Schoenberg, 1990)

เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพืชมีข้อเสียจากการที่มีปริมาณเกลือสูง มีสารประกอบโมโนคลอโรโพรพานอล (monochloropropanol) และไดคลอโรโพรพานอล (dichloropropanol) ที่เป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นการใช้ยีสต์ออโตไลเสทจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง การใช้ยีสต์ออโตไลเสทสามารถลดต้นทุนในการใช้เนยแข็ง สารสกัดจากเนื้อ หรือสารให้กลิ่นรสธรรมชาติที่ราคาแพง

นอกจากการใช้งานดังกล่าวข้างต้น ยีสต์ออโตไลเสทสามารถนำมาเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งนี้เพราะยีสต์ออโตไลเสทเป็นแหล่งของกรดอะมิโน เปปไทด์ วิตามินที่ละลายน้ำ กรดนิวคลีอิก และคาร์โบไฮเดรต ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ยีสต์ออโตไลเสทที่นำมาทำอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Difco, Merck, Oxoid และ BBL โดยทั่วไปยีสต์ออโตไลเสทที่ใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อจะแตกต่างจากยีสต์ออโตไลเสทที่ใช้กับอาหารมนุษย์ตรงที่จะไม่มีเกลืออยู่เลย เพราะเกลือจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิดได้ ยีสต์ออโตไลเสทยังเป็นแหล่งของอะมิโนไนโตรเจนอิสระ (free amino nitrogen; FAN) ซึ่งมีผลกระตุ้นต่อการใช้น้ำตาลและการผลิตเอทานอล ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมเบียร์ สามารถใช้เป็นทางเลือกใหม่ในการปรับปรุงกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์เชื้อเพลิงได้ (Jones และ Ingledew, 1994)

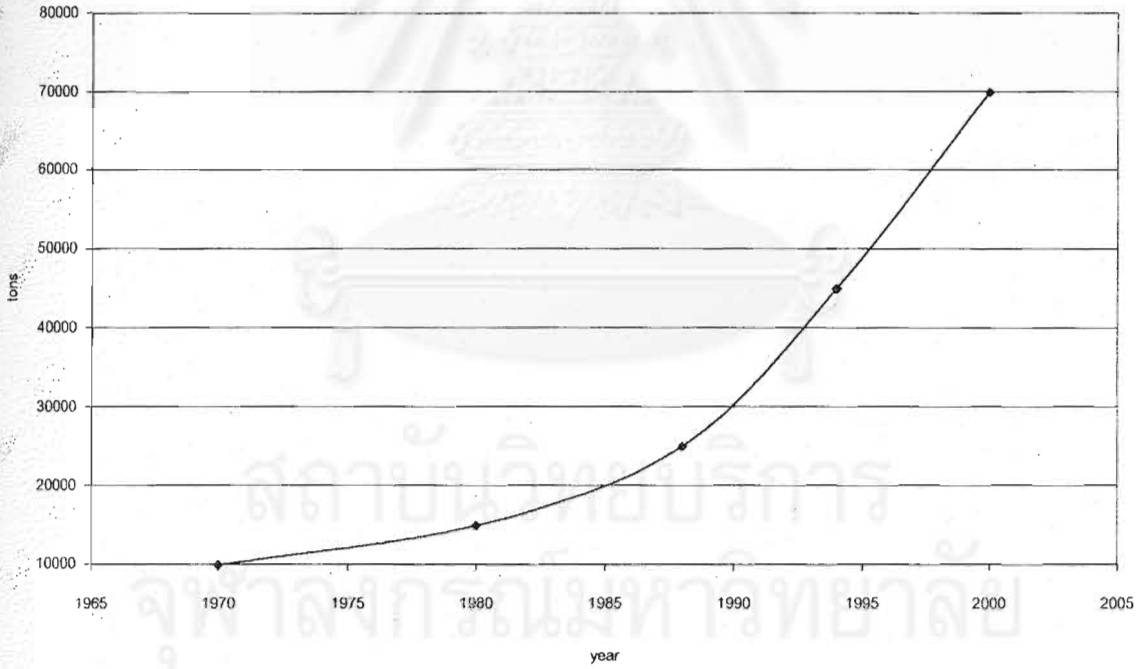
ในปี ค.ศ.1994 มีการผลิตยีสต์ออโตไลเสทหรือยีสต์สกัดประมาณ 53,000 ตัน ซึ่งเป็นการผลิตจากยีสต์ขนมปังประมาณ 45,000 ตัน และยีสต์จากอุตสาหกรรมเบียร์ 8,000 ตัน (Keenan, 1994) ปริมาณการผลิตของยีสต์ออโตไลเสทจะต่ำกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพืชและซอสถั่วเหลือง ซึ่งเป็นโปรตีนพืชไฮโดรไลเสทที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร แต่จะสูงกว่าการใช้สารสกัดจากเนื้อสัตว์และปลา ดังตารางที่ 2.12 เมื่อประมาณการผลิตยีสต์ออโตไลเสทในช่วงปี ค.ศ. 1970-2000 จะพบว่าตลาดมีความต้องการบริโภคยีสต์ออโตไลเสทสูงขึ้น ดังรูปที่ 2.14

แหล่งผลิตยีสต์ออโตไลเสทที่ใหญ่จะอยู่ในยุโรปและสหรัฐอเมริกา เช่น Gist Brocades, Red Star และ Bio-springer ซึ่งบริษัทเหล่านี้จะเป็นแหล่งผลิตยีสต์ออโตไลเสทที่ใหญ่ของโลก ตัวอย่างของชื่อผลิตภัณฑ์ เช่น Amberex, Barmene, Gistex, Maggi, Maxarome, Springarome, Tureen, Vegamite, Yeastor, Yeatex และ Zyest เป็นต้น (Peppler, 1982)

ตารางที่ 2.12 ปริมาณการผลิตโดยประมาณของสารปรุงแต่งอาหารบางชนิด

สารปรุงแต่งอาหาร	ปริมาณการผลิต (ตัน)
Baker's yeast extract	45,000
Brewer's yeast extract	8,000
Hydrolysed vegetable protein	97,000
Soy sauce	4,210,000
Meat extract	41,000
Fish extract	22,000
Monosodium glutamate	820,000

ดัดแปลงจาก : Keenan (1994).



รูปที่ 2.14 ค่าประมาณการปริมาณความต้องการบริโภคยีสต์ออโตไลเสทระหว่างปี ค.ศ. 1970-2000 (Keenan, 1994)

บทที่ 3

วิธีทดลอง

อุปกรณ์

1 เครื่องเหวี่ยง J2-21 Centrifuge และ JA-14 rotor ของบริษัท Beckman, USA.
2 เครื่องเหวี่ยง Medifuge ของบริษัท Heraeus instruments
3 เครื่อง UV-Vis. Spectrophotometer รุ่น V530 PC. ของบริษัท Jasco
4 Rotary evaporator รุ่น Rotavapor R114 ของบริษัท Buchi Switzerland
5 Hot air oven รุ่น ED ของบริษัท Binder
6 Muffle furnance รุ่น isotemp ของบริษัท Fisher Scientific
7 ชุดวิเคราะห์โปรตีน Kjeldatherm KT35 และ Vapodes 1 ของบริษัท Gerhardt
8 ชุดวิเคราะห์ไขมัน Soxtherm Automatic S-166 ของบริษัท Gerhardt
9 ชุดวิเคราะห์เส้นใยอาหาร รุ่น Fiwe ของบริษัท Velp Scientifica
10 ตะแกรงร่อน ขนาด 150 และ 200 เมช ของบริษัท Retsch
11 Incubator รุ่น B6 ของบริษัท Heraeus instruments
12 Incubator shaker ของบริษัท Lab line instruments
13 pH meter รุ่น CG 825 ของบริษัท SCHOTT
14 เครื่องชั่ง รุ่น RP 310S ของบริษัท Sartorius
15 เครื่องวัด water activity รุ่น Aw Sprint Th500 ของบริษัท Novasina
16 High-performance liquid chromatography รุ่น Waters 510 ของบริษัท Waters Co.,Ltd.
17 High-performance liquid chromatography รุ่น Waters 2690 separation module ของบริษัท Waters Co.,Ltd.
18 Gas chromatography 5890 series II ของ Hewlett Packard
19 Water bath shaker รุ่น SW23 ของบริษัท Julabo
20 Water bath รุ่น DT1 ของบริษัท Heto Lab Equipment

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทั่วไป

1. Boric acid (A.R.)
2. Copper sulphate (A.R.)
3. D-glucose (A.R.)
4. Ethanol (A.R.)
5. Folin-Ciocalteau reagent (A.R.)
6. Ferric chloride (A.R.)
7. Hydrochloric acid (A.R.)
8. Isooctane (A.R.)
9. Orcinol reagent (A.R.)
10. Phenol (A.R.)
11. Plate count agar (A.R.)
12. Potassium sulphate (A.R.)
13. Potassium tartrate (A.R.)
14. Silver nitrate (A.R.)
15. Sodium carbonate (A.R.)
16. Sodium chloride (A.R.)
17. Sodium hydroxide (A.R.)
18. Sulfuric acid (A.R.)

สารเคมีมาตรฐาน (Standard reagent)

1. Adenosine-5'-monophosphate ของบริษัท Sigma
2. Bovine serum albumin ของบริษัท Fluka
3. Guanosine-5'-monophosphate ของบริษัท Sigma
4. Inosine-5'-monophosphate ของบริษัท Sigma

ตัวอย่างยีสต์ออโตไลเสทและกลิ่นรสที่มีจำหน่ายทางการค้า

1. Chicken flavor snack ของบริษัท Haarm & Reiner
2. Dry autolysed yeast 2000 powder without salt ของบริษัท Bio-springer

3. Dry food yeast spray dried VS2000 ของบริษัท Bio-springer
4. Gistex standard AGGL ของ Gist Brocades
5. Pork flavor 8816 ของบริษัท Chance Well Enterprises Co., Ltd.
6. Springarom roasted meat flavour ของบริษัท Bio-springer
7. Vegamite concentrated yeast extract ของบริษัท Kraft Foods, Ltd. Australia
8. Vegetarian chicken flavor ของบริษัท Chance Well Enterprises Co., Ltd.
9. Yeast extract ของบริษัท Protibel
10. Yeast extract standard 36 powder ของบริษัท Bio-springer
11. Yeast extract ของบริษัท BBL
12. Yeast extract ของบริษัท Merck

วัตถุดิบ

- ยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* จาก บริษัทไทยอมฤตบริวเวอรี่ จำกัด จังหวัดปทุมธานี
- กลูเต็นข้าวสาลี (wheat gluten) จากบริษัท ABBRA Co., Ltd.
- โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (soy protein isolate) ชื่อทางการค้า Supro® EX33 จากบริษัท ABBRA Co., Ltd.
- กากถั่วเหลือง (soy bean meal) ที่สกัดไขมันแล้ว จากบริษัท ไทยเทพรสผลิตภัณฑ์อาหารจำกัด

เอนไซม์

Neutrase® 0.5 L จากบริษัท อีสต์เอเชียติกประเทศไทย จำกัด เป็น metallo protease (Zn^{2+}) และ endo-protease ที่แยกได้จากเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 5.0-7.5 อุณหภูมิ 40-55°C มี activity 0.5 AU/g. (ภาคผนวก ด.)

Flavourzyme® 1000L จากบริษัท อีสต์เอเชียติกประเทศไทย จำกัด เป็น acid protease complex คือเป็นทั้ง exo-protease และ endo-protease แยกได้จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 5.0-7.0 อุณหภูมิ 40-60°C มี activity 1,000 LAPU/g. (ภาคผนวก ด.)

5'-Phosphodiesterase RP®-1 จากบริษัท Amano Enzyme ประเทศญี่ปุ่น เป็นเอนไซม์ Phosphodiesterase ที่แยกได้จากเชื้อ *Penicillium citrinum* สามารถทำงานได้ในช่วง pH 4.0-7.0 อุณหภูมิ 50-70°C มี activity 13,000 units/mg. (ภาคผนวก ด.)

การเตรียมวัตถุดิบ

นำตะกอนเบียร์มากรองแยกของแข็งขนาดใหญ่ออกโดยใช้ตะแกรงขนาด 150-200 เมช ปั่นแยกที่ความเร็ว 10000g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที แยกส่วนของเหลวออก นำยีสต์ที่ได้แช่แข็งที่ –15 ± 1°C (วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2535)

วิธีการทดลอง

3.1 การวิเคราะห์วัตถุดิบ

นำวัตถุดิบ ได้แก่ ยีสต์จากตะกอนเบียร์ โปรตีนถั่วเหลืองสกัด กลูเต็นข้าวสาลีและกากถั่วเหลือง มาวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีน ไขมัน เถ้า เส้นใย ความชื้น ตามวิธี AOAC (1990) และคาร์โบไฮเดรตโดยวิธีหักลบ (ภาคผนวก ก.)

3.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดสารที่ให้รสขมจากฮอพ

3.2.1 การล้างยีสต์ด้วยน้ำ (water washing)

เตรียม yeast slurry 15 % (w/v) ปริมาณ 100 ml. ล้างด้วยน้ำกลั่น 100 ml. 5 ครั้ง (แต่ละครั้งคน 20 นาที) แล้วปั่นแยกเซลล์ยีสต์ออก ใช้เป็นชุดเปรียบเทียบ

3.2.2 การล้างยีสต์ด้วยสารละลายด่าง (alkaline washing)

3.2.2.1 การล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

เตรียม yeast slurry 15% (w/v) ล้างยีสต์ด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1.0,1.5 และ 2.0% ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 20, 30 และ 40 นาที อุณหภูมิ 4 , 25 และ 50(C หลังจากนี้ปั่นแยกที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 (C ล้างด้วยน้ำกลั่นจนมี pH ประมาณ 7.0 ปั่นแยกอีกครั้ง วิเคราะห์ค่า bitterness unit (Moll ,1987) และค่าการสูญเสียของยีสต์ (Niumthanorm, 1997)

วางแผนการทดลองแบบ Factorial completely randomized design ขนาด3x3x3 ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS 7.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple

Range Test (Cochran และ Cox, 1957) เลือกภาวะที่ให้ค่า bitterness และค่าการสูญเสียของยีสต์ต่ำเพื่อใช้ทดลองต่อไป

3.2.2.2 การล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

เตรียม yeast slurry 15% (w/v) ล้างยีสต์ด้วยสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 1.0 ,1.5 และ 2.0 % ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 20, 30 และ 40 นาที อุณหภูมิ 4 , 25 และ 50°C หลังจากนี้ปั่นแยกที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 °C ล้างด้วยน้ำกลั่นจนมี pH ประมาณ 7.0 ปั่นแยกอีกครั้ง วิเคราะห์ค่า bitterness unit (Moll ,1987) และค่าการสูญเสียของยีสต์ (Niumthanorm, 1997)

วางแผนการทดลองแบบ Factorial completely randomized design ขนาด 3x3x3 ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS 7.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957) เลือกภาวะที่ให้ค่า bitterness และค่าการสูญเสียของยีสต์ต่ำเพื่อใช้ทดลองต่อไป

3.2.3 เปรียบเทียบวิธีการล้างยีสต์เพื่อกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมจากฮอพ

เปรียบเทียบผลของการล้างยีสต์ด้วยน้ำ สารละลาย NaOH สารละลาย Na_2CO_3 ตามภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3.2.2 และยีสต์ที่ไม่ผ่านการล้าง วิเคราะห์ค่า bitterness unit (Moll, 1987) และค่าการสูญเสียของยีสต์ (Niumthanorm, 1997) วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS 7.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957) เลือกภาวะที่ให้ค่า bitterness และค่าการสูญเสียของยีสต์ต่ำเพื่อใช้ทดลองต่อไป

3.3 การปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท

3.3.1 การใช้เอนไซม์ Neutrase® 0.5L ร่วมกับโปรตีนพืช

3.3.1.1 การเติมกลูเต็นข้าวสาลี

นำยีสต์ที่ผ่านการล้างตามภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3.2.3 เตรียมเป็น yeast slurry 15% (w/v) เติมกลูเต็นข้าวสาลี ในปริมาณ 0, 10 และ 20% และเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ปริมาณ 0, 1 และ 2% ปล่อยให้เกิดการย่อยตัวเองของยีสต์ที่ pH 5.5 อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 18 , 20 และ 24 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที (วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2535) นำไป

เหวี่ยงแยกของเหลวออกมาวิเคราะห์ปริมาณออโตไลเสต (Hill, 1981) ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลาวรี และปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยวิธี ฟีนอล-ซัลฟูริก (Herbert, Phipps และ Strange, 1971)

วางแผนการทดลองแบบ Factorial completely randomized design ขนาด 3x3x3 ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS 7.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957)

- การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท

นำยีสต์ออโตไลเสทที่เลือกได้จากข้อ 3.3.1.1 เติมกลูโคส 1% ทำให้เข้มข้นจนมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 80° บริกซ์ อบแห้งที่อุณหภูมิ 100°C จนมีความชื้น 3-5% และบดให้เป็นผง (วิวัฒน์ หวังเจริญ และวัลยา โมราสุข, 2539) ประเมินผลทางประสาทสัมผัสแบบ Scoring test โดยเติมยีสต์ออโตไลเสทปริมาณ 0.05%(w/v) ในน้ำซุปผัก (ภาคผนวก ค.) ทดสอบด้วยผู้ชิมที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน

วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS 7.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957) เลือกยีสต์ออโตไลเสทที่ได้รับคะแนนการทดสอบสูงสุดไว้ทดสอบต่อไป

3.3.1.2 การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1 โดยใช้ โปรตีนถั่วเหลืองสกัดในปริมาณ 0 ,10 และ 20% แทนกลูเต็นข้าวสาลีวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1

ประเมินผลด้านกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1

3.3.1.3 การเติมกากถั่วเหลือง

ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1 โดยใช้กากถั่วเหลืองที่ผ่านการเตรียม (ภาคผนวก จ.) ในปริมาณ 0,10 และ 20% แทนกลูเต็นข้าวสาลี วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1

ประเมินผลด้านกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1

3.3.2 การใช้เอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ร่วมกับโปรตีนพืช

3.3.2.1 การเติมกลูเต็นข้าวสาลี

นำยีสต์ที่ผ่านการล้างตามภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3.2.3 เตรียมเป็น yeast slurry 15% (w/v) เติมกลูเต็นข้าวสาลี ในปริมาณ 0, 10 และ 20% และเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ปริมาณ 0, 1 และ 2%(v/v) ปล่อยให้เกิดการย่อยตัวเองของยีสต์ที่ pH 5.5 อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 18 , 20 และ 24 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที (วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2535) นำไปเหวี่ยงแยกของเหลวออกมาวิเคราะห์ ปริมาณออโตไลเสต (Hill, 1981) ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลาวรี และปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Herbert และคณะ, 1971)

วางแผนการทดลองแบบ Factorial completely randomize design ขนาด 3x3x3 ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS 7.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957)

-การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท

นำยีสต์ออโตไลเสทที่เลือกได้จากข้อ 3.3.2.1 เติมกลูโคส 1% ทำให้เข้มข้นจนมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 80° บริกซ์ อบแห้งที่อุณหภูมิ 100°C จนมีความชื้น 3-5% และบดให้เป็นผง (วิวัฒน์ หวังเจริญ และ วัลยา โมราสุข, 2539) ประเมินผลทางประสาทสัมผัสแบบ Scoring test โดยเติมยีสต์ออโตไลเสทปริมาณ 0.05%(w/v) ในน้ำซุปผัก (ภาคผนวก ค.) ทดสอบด้วยผู้ชิมที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน

วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS 7.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957) เลือกยีสต์ออโตไลเสทที่ได้รับคะแนนการทดสอบสูงสุดไว้ทดสอบต่อไป

3.3.2.2 การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1 โดยใช้โปรตีนถั่วเหลืองสกัดในปริมาณ 0,10 และ 20% แทนกลูเต็นข้าวสาลี วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1

ประเมินผลด้านกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1

3.3.2.3 การเติมกากถั่วเหลือง

ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1 โดยใช้กากถั่วเหลืองที่ผ่านการเตรียม (ภาคผนวก จ.) ในปริมาณ 0,10 และ 20% แทนกลูเต็นข้าวสาลี วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1

ประเมินผลด้านกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1

3.3.3 การเปรียบเทียบการเติมโปรตีนพืชร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L และ

Flavourzyme® 1000L.

3.3.3.1 การเปรียบเทียบค่าการทดลองด้านเคมีของยีสต์ออโตไลเสท

เตรียมยีสต์ออโตไลเสทตามภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3.3.1 และ 3.3.2 มาทดลองวิเคราะห์ค่าปริมาณออโตไลเสต (Hill, 1981) ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลาวรี และปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Herbert และคณะ, 1971)

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS 7.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957)

3.3.3.2 เปรียบเทียบการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท

เตรียมยีสต์ออโตไลเสทตามภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3.3.1 และ 3.3.2 ทดสอบกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสททางประสาทสัมผัสโดยเติมกลูโคส 1% ทำให้เข้มข้นจนมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 80° บริกซ์ อบแห้งที่อุณหภูมิ 100°C จนมีความชื้น 3-5% และบดให้เป็นผง (วิวัฒน์ หวังเจริญ และ วัลยา โมราสุข, 2539) ประเมินผลทางประสาทสัมผัสแบบ Scoring test โดยเติมยีสต์ออโตไลเสทปริมาณ 0.05% (w/v) ในน้ำซุปผัก (ภาคผนวก ค.) ทดสอบด้วยผู้ชิมที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน

วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS 7.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957) เลือกยีสต์ออโตไลเสทที่ได้รับคะแนนการทดสอบสูงสุดไว้ทดสอบต่อไป

3.4 การเพิ่มปริมาณ 5'-นิวคลีโอไทด์ ในยีสต์ออโตไลเสท

3.4.1 ปริมาณ RNA ในยีสต์ออโตไลเสท

เตรียมยีสต์ออโตไลเสทตามภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3.3.3 และยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่มีการเติมโปรตีนพืช มาปรับ pH เป็น 6.5 ให้ความร้อนที่ 90°C เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อสกัด RNA (Nagodawithana, 1992) วิเคราะห์ปริมาณ RNA (Herbert และคณะ, 1971)

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS 7.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957)

3.4.2 การย่อยสลาย RNA

เตรียมยีสต์ออโตไลเสทตามภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3.3.3 มาปรับ pH เป็น 6.5 ให้ความร้อนที่ 90°C เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อสกัด RNA (Nagodawithana, 1992) จากนั้นเติมเอนไซม์ 5'-Phosphodiesterase RP®-1 (PDE) ปริมาณ 0.2, 0.5 และ 1.0% ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 65° C เป็นเวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง วัดปริมาณ RNA (Herbert และคณะ, 1971)

วางแผนการทดลองแบบ Factorial completely randomized design ขนาด 3x3x3 ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS 7.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957) เลือกชุดการทดลองที่มีปริมาณ RNA ต่ำ

3.4.3 การวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์

เตรียมยีสต์ออโตไลเสทตามภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3.4.1 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ได้แก่ 5'-GMP, 5'-AMP และ 5'-IMP ด้วยเครื่อง HPLC (Sombutyanuchit, Supantharika และ Verduyn, 2001) เปรียบเทียบกับยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมเอนไซม์ phosphodiesterase และยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืชร่วมกับเอนไซม์จากภายนอก

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized block design ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS 7.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957)

3.5 การปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทโดยเติมซิสเตอีน (Cysteine) เมทไทโอนีน (Methionine) และไทอามีน (Thiamine)

เตรียมยีสต์ออโตไลเสทตามภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3.4 ทำเป็นสารละลายเข้มข้น 20 % เติมกลูโคส 1% ปรับ pH เป็น 5.0 ให้ความร้อน 55°C ในภาวะสุญญากาศ จนเข้มข้นเป็น 60% เติมซิสเตอีน และเมทไทโอนีน โดยแปรปริมาณ 0.1, 0.2 และ 0.3 ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้น และเติมไทอามีน ปริมาณ 0.1 และ 0.2 ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้น เก็บที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Gasser, 1972) จากนั้นทำให้ยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้นจนมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 80° บริกซ์ อบแห้งที่อุณหภูมิ 100°C จนมีความชื้น 3-5% และบดให้เป็นผง ประเมินผลทางประสาทสัมผัสแบบ Scoring test โดยเติมยีสต์ออโตไลเสทปริมาณ 0.05% (w/v) ในน้ำซุปผัก ทดสอบด้วยผู้ชิมที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน

วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS 7.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957) เลือกยีสต์ออโตไลเสทที่ได้รับคะแนนการทดสอบสูงสุด

3.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสทที่ผ่านการปรับปรุงกลิ่นรส

3.6.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

หาปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใย และเถ้าตามวิธีของ AOAC (1990) และคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยการหักลบ (ภาคผนวก ก.)

3.6.2 การวิเคราะห์กรดอะมิโนอิสระ

นำยีสต์ออโตไลเสทที่ได้มาวิเคราะห์ชนิด และปริมาณกรดอะมิโนอิสระด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีของ Waters (ภาคผนวก ข.)

3.6.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่นรส

นำยีสต์ออโตไลเสทที่ได้มาวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่นรส เปรียบเทียบกับยีสต์ออโตไลเสท ยีสต์สกัด และสารปรุงแต่งกลิ่นรสที่มีจำหน่ายทางการค้า ด้วยเครื่อง Gas chromatography (ภาคผนวก ข.)

3.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และราที่มีในยีสต์ออโตไลเสทตามวิธีของ ICMSF(International Commission of Microbiology Specification for Food) (1974)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 การใช้ยีสต์ออโตไลเสทเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสคล้ายเนื้อในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นมังสวิรัติ

นำผลิตภัณฑ์ยีสต์ออโตไลเสทผงที่ได้มาใช้ในการผลิตลูกชิ้นมังสวิรัติ (ภาคผนวก ค.) โดยแปรปริมาณยีสต์ออโตไลเสทเป็น 1.0, 2.0 และ 3.0%(w/w) ของน้ำหนักวัตถุดิบหลัก ประเมินผลทางด้านประสาทสัมผัสแบบ Scoring test โดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน

วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design. ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS 7.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ยีสต์ที่ได้จากการผลิตเบียร์เป็นวัตถุดิบในการผลิตยีสต์ออโตไลเสทจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ที่ได้จากการผลิตเบียร์ พบว่ายีสต์ที่แยกได้จากกากเบียร์มีองค์ประกอบทางเคมี คือ ความชื้น 64.15% โปรตีน 21.74% ไขมัน 2.14% เถ้า 1.70% เส้นใย 1.05% และคาร์โบไฮเดรต 9.22% (ตารางที่ 4.1) ส่วนค่า pH ของยีสต์ประมาณ 5.8 (ค่าที่ได้ไม่ได้แสดงในตาราง)

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ที่ได้จากการผลิตเบียร์

องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ
ความชื้น	64.15 ± 0.65
โปรตีน	21.74 ± 0.76
คาร์โบไฮเดรต	9.22 ± 1.79
ไขมัน	2.14 ± 0.32
เถ้า	1.70 ± 0.02
เส้นใย	1.05 ± 0.04

เมื่อ : ทดลอง 3 ซ้ำ และรายงานค่าเป็นร้อยละโดยน้ำหนักเปียก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดสารให้รสขมจากฮอพ

ในการผลิตเบียร์เมื่อเหวี่ยงแยกยีสต์ออกจากน้ำเบียร์แล้ว ยีสต์ที่ได้จะมีสารประกอบที่ให้รสขมจากฮอพเกาะอยู่กับเซลล์ยีสต์ การกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมเหล่านี้ออกจากเซลล์ยีสต์มีหลายวิธี แต่วิธีที่ง่ายในการกำจัดคือการล้างเซลล์ยีสต์ด้วยสารละลายด่าง

4.2.1 ผลของการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

การศึกษาการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ในการกำจัดสารประกอบฮอพออกจากเซลล์ยีสต์ เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการลดระดับความขมที่มีในยีสต์ โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0 , 1.5 และ 2.0% ที่อุณหภูมิ 4 , 25 และ 50°C เป็นระยะเวลา 20 , 30 และ 40 นาที ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2

จากการทดลองพบว่าสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงสามารถลดระดับความขมได้มากกว่าสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เข้มข้นต่ำกว่า โดยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2% จะลดระดับความขมได้มากกว่าสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.5% และ 1% ส่วนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1% จะลดระดับความขมได้น้อยที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการลดระดับความขม ที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาเดียวกัน พบว่าความสามารถในการลดระดับความขมของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิ 50°C จะมากที่สุดรองลงมาคืออุณหภูมิ 25°C และ 4°C ตามลำดับ

เมื่อใช้ระยะเวลาในการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์นานขึ้น ที่อุณหภูมิ 4°C และ 25°C จะสามารถลดระดับความขมได้มากขึ้น แต่ที่อุณหภูมิ 50°C ระยะเวลาในการล้างที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าความขมเพิ่มขึ้น

ภาวะที่ในการล้างเซลล์ยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ลดระดับความขมได้มากที่สุด คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2% อุณหภูมิ 50°C ระยะเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 การกำจัดสารให้รสขมโดยการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

NaOH (%)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	Bitter unit (B.U.)	ค่าการสูญเสียของยีสต์ที่ผ่านการล้าง (%)
1.0	4.0	20	43.93 ± 0.91^{a}	17.10 ± 0.98^{hi}
1.0	4.0	30	19.75 ± 1.91^{c}	$15.36 \pm 2.44^{i.}$
1.0	4.0	40	6.08 ± 0.57^{ghijk}	30.88 ± 0.90^{bcd}
1.0	25.0	20	25.84 ± 2.35^{b}	24.99 ± 0.93^{defg}
1.0	25.0	30	12.68 ± 0.88^{de}	24.30 ± 0.42^{efg}
1.0	25.0	40	7.87 ± 0.55^{fgh}	32.18 ± 0.53^{bc}
1.0	50.0	20	13.40 ± 0.79^{de}	28.72 ± 1.14^{bcdefg}
1.0	50.0	30	12.59 ± 2.17^{de}	43.39 ± 2.26^{a}
1.0	50.0	40	24.77 ± 0.79^{b}	45.28 ± 2.88^{a}
1.5	4.0	20	24.27 ± 0.75^{b}	22.30 ± 0.86^{gh}
1.5	4.0	30	10.10 ± 0.39^{ef}	25.50 ± 2.53^{defg}
1.5	4.0	40	4.94 ± 2.76^{hijk}	30.41 ± 0.20^{bcde}
1.5	25.0	20	14.55 ± 0.60^{d}	27.94 ± 0.37^{bcdefg}
1.5	25.0	30	7.38 ± 1.08^{fghi}	26.96 ± 2.17^{cdefg}
1.5	25.0	40	7.20 ± 0.71^{fghij}	33.10 ± 0.54^{bc}
1.5	50.0	20	8.86 ± 2.98^{fg}	23.40 ± 2.24^{fg}
1.5	50.0	30	12.66 ± 0.29^{de}	40.28 ± 1.12^{a}
1.5	50.0	40	23.36 ± 0.73^{b}	45.79 ± 0.65^{a}
2.0	4.0	20	14.60 ± 2.17^{d}	22.94 ± 1.23^{g}
2.0	4.0	30	7.35 ± 0.59^{fghi}	33.96 ± 2.56^{b}
2.0	4.0	40	3.86 ± 0.97^{ijk}	27.52 ± 2.49^{bcdefg}
2.0	25.0	20	13.44 ± 0.79^{de}	33.93 ± 0.99^{b}
2.0	25.0	30	7.68 ± 0.49^{fgh}	29.76 ± 2.51^{bcdef}
2.0	25.0	40	3.74 ± 0.72^{jk}	40.90 ± 2.47^{a}
2.0	50.0	20	3.24 ± 0.68^{k}	25.39 ± 2.32^{defg}
2.0	50.0	30	7.98 ± 2.36^{fgh}	44.58 ± 2.98^{a}
2.0	50.0	40	12.98 ± 1.47^{de}	46.50 ± 0.26^{a}

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อค่าความขมในยีสต์ที่ไม่ผ่านการล้าง 138.98 ± 14.23

เมื่อวิเคราะห์การสูญเสียของปริมาณยีสต์ที่เกิดขึ้น ในการล้างเซลล์ยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อลดระดับความขม พบว่าการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นสูง และระยะเวลาในการล้างยีสต์นานขึ้น จะมีค่าการสูญเสียยีสต์มากกว่าการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่ำและระยะเวลาน้อย การล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2% จะมีการสูญเสียยีสต์มากกว่าการล้างด้วยสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.5% และ 1%

ผลของอุณหภูมิในการล้างเซลล์ยีสต์ต่อปริมาณการสูญเสียของยีสต์ ที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาเดียวกัน การใช้อุณหภูมิสูงจะมีการสูญเสียยีสต์ในการล้างมากกว่าอุณหภูมิต่ำ และระยะเวลาในการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้มีการสูญเสียยีสต์ในการล้างมากขึ้น ภาวะที่ในการล้างเซลล์ยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีการสูญเสียยีสต์น้อยที่สุด คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ 1% อุณหภูมิ 4°C ระยะเวลา 30 นาที

เมื่อเปรียบเทียบผลของการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อการกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมและการสูญเสียยีสต์ในการล้าง พบว่าการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ 2% อุณหภูมิ 50°C ระยะเวลา 20 นาที สามารถลดระดับความขมได้มากที่สุด และมีการสูญเสียยีสต์ในขั้นตอนการล้างน้อย

4.2.2 ผลของการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

การศึกษาการใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ในการกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมจากฮอพออกจากเซลล์ยีสต์ เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการลดระดับความขมที่มีในยีสต์ โดยใช้ภาวะการทดลองเช่นเดียวกับการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ คือ สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1.0 , 1.5 และ 2.0% ที่อุณหภูมิ 4 , 25 และ 50°C เป็นระยะเวลา 20 , 30 และ 40 นาที ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3

จากการทดลองการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นสูง สามารถลดระดับความขมได้มากกว่าการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นต่ำ การล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 2% จะลดระดับความขมได้มากกว่าสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.5% และ 1%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 การกำจัดสารให้รสขมโดยการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

Na_2CO_3 (%)	อุณหภูมิ ($^{\circ}C$)	เวลา (นาที)	Bitter unit (B.U.)	ค่าการสูญเสียของยีสต์ที่ผ่านการล้าง (%)
1.0	4.0	20	19.61 ± 1.30^{efg}	11.29 ± 1.47^{f}
1.0	4.0	30	15.44 ± 1.28^{fghijk}	12.92 ± 2.89^{ef}
1.0	4.0	40	22.70 ± 1.13^{def}	18.26 ± 1.34^{bcdef}
1.0	25.0	20	18.55 ± 4.32^{cde}	23.87 ± 3.79^{abcdef}
1.0	25.0	30	19.39 ± 5.09^{efgh}	22.92 ± 3.87^{abcdef}
1.0	25.0	40	28.51 ± 1.97^{bcd}	25.06 ± 3.24^{abcdef}
1.0	50.0	20	32.97 ± 2.36^{b}	24.94 ± 4.14^{abcdef}
1.0	50.0	30	17.88 ± 0.91^{efghi}	26.68 ± 4.51^{abcdef}
1.0	50.0	40	46.83 ± 7.74^{a}	30.28 ± 4.86^{ab}
1.5	4.0	20	20.38 ± 0.93^{efghi}	15.60 ± 2.74^{abcd}
1.5	4.0	30	17.75 ± 0.71^{ijkl}	16.88 ± 4.74^{def}
1.5	4.0	40	32.68 ± 1.06^{efghi}	20.66 ± 3.88^{cdef}
1.5	25.0	20	17.42 ± 0.46^{jkl}	20.78 ± 2.42^{bcdef}
1.5	25.0	30	11.72 ± 1.58^{ghijkl}	24.06 ± 4.84^{bcdef}
1.5	25.0	40	18.80 ± 1.64^{cde}	27.52 ± 2.54^{abcdef}
1.5	50.0	20	22.95 ± 2.10^{cdef}	19.65 ± 2.83^{bcdef}
1.5	50.0	30	11.86 ± 5.25^{hijkl}	30.73 ± 6.65^{ab}
1.5	50.0	40	29.93 ± 6.11^{bc}	34.22 ± 3.94^{a}
2.0	4.0	20	14.73 ± 2.25^{ghijkl}	16.14 ± 2.53^{cdef}
2.0	4.0	30	9.22 ± 0.69^{jkl}	19.88 ± 1.35^{bcdef}
2.0	4.0	40	16.97 ± 1.00^{efghi}	17.24 ± 6.63^{cdef}
2.0	25.0	20	11.84 ± 0.30^{hijkl}	13.13 ± 3.79^{ef}
2.0	25.0	30	7.27 ± 0.34^{l}	29.06 ± 5.24^{abc}
2.0	25.0	40	11.66 ± 0.39^{ijkl}	25.04 ± 1.74^{abcdef}
2.0	50.0	20	16.18 ± 0.44^{fghij}	29.04 ± 6.18^{abc}
2.0	50.0	30	9.04 ± 2.05^{jkl}	30.79 ± 1.17^{ab}
2.0	50.0	40	22.12 ± 3.08^{defg}	35.80 ± 3.29^{a}

a, b, c,… ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อค่าความขมในยีสต์ที่ไม่ผ่านการล้าง 138.98 ± 14.23

อุณหภูมิในการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต มีผลต่อการลดระดับความขมโดยที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตและระยะเวลาเดียวกัน การล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 25°C จะลดระดับความขมได้มากกว่าการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 4°C และ 50°C

การล้างยีสต์ที่ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 50°C จะทำให้ค่าความขมของยีสต์เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับการล้างยีสต์ที่อุณหภูมิ 4°C และ 25°C

ในการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เมื่อใช้ระยะเวลาในการล้างยีสต์นานขึ้นจะสามารถลดระดับความขมได้มากขึ้น แต่ถ้าระยะเวลาในการล้างมากกว่า 30 นาที จะทำให้ค่าความขมของยีสต์เพิ่มขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการล้างยีสต์ต่อการลดระดับความขมของยีสต์ พบว่าภาวะที่ลดระดับความขมได้มากที่สุด คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2% อุณหภูมิ 25°C ระยะเวลา 30 นาที

เมื่อวิเคราะห์การสูญเสียของปริมาณยีสต์ที่เกิดขึ้นในการล้างเซลล์ยีสต์ เพื่อลดระดับความขมด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต พบว่าการใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นสูง จะมีค่าการสูญเสียมากกว่าสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นต่ำ แต่ค่าที่วัดได้จะไม่แตกต่างกันมากนัก

ผลของอุณหภูมิในการล้างเซลล์ยีสต์ต่อปริมาณการสูญเสียของยีสต์ ที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตและระยะเวลาเดียวกัน การใช้อุณหภูมิสูงจะมีการสูญเสียยีสต์ในการล้างมากกว่าอุณหภูมิต่ำ และระยะเวลาในการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่เพิ่มขึ้นจะทำให้มีการสูญเสียยีสต์ในการล้างมากขึ้น โดยเฉพาะการล้างยีสต์ที่อุณหภูมิ 50°C ระยะเวลา 40 นาทีจะมีการสุญเสียยีสต์มากที่สุด ภาวะที่ในการล้างเซลล์ยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่มีการสูญเสียยีสต์น้อยที่สุด คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 1% อุณหภูมิ 4°C ระยะเวลา 20 นาที

เมื่อเปรียบเทียบผลของการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ต่อการลดระดับความขมและการสูญเสียยีสต์ในการล้าง พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดสารประกอบให้รสขมโดยการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต คือ ใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 2% อุณหภูมิ 25°C และระยะเวลาในการล้างยีสต์ 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.3 ศึกษาเปรียบเทียบการกำจัดสารให้รสขมด้วยวิธีการต่าง ๆ

จากการศึกษาเปรียบเทียบการกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมจากฮอพ โดยการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต และการล้างยีสต์ด้วยน้ำ เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการลดระดับความขมที่มีในยีสต์ พบว่าการล้างยีสต์ด้วยสารละลายด่างสามารถลดระดับความขมได้ดีกว่าการล้างยีสต์ด้วยน้ำ ในการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะลดระดับความขมได้มากกว่า การล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต แต่การล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต จะมีการสูญเสียยีสต์ในการล้างน้อยกว่าการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการล้างในวิธีต่างๆ

Treatment	Bitterness unit (BU.)	ค่าการสูญเสียของยีสต์ที่ผ่านการล้าง (%)
Sodium hydroxide[1]	5.12 ± 2.02[d]	25.74 ± 2.09[a]
Sodium carbonate[2]	12.65 ± 2.07[c]	14.94 ± 1.28[b]
น้ำ[3]	44.99 ± 7.40[b]	11.93 ± 1.71[c]
ไม่ผ่านการล้าง	138.98 ± 14.23[a]	0.00[d]

1 : สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2% อุณหภูมิ 50°C ระยะเวลา 20 นาที

2 : สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 2% อุณหภูมิ 25°C ระยะเวลา 20 นาที

3 : น้ำกลั่น ล้าง 5 ครั้งๆละ 20 นาที

a,b,c,d ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.4 จะพบว่าการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะมีความขม(BU.) เหลือในยีสต์ประมาณ 5.12 ส่วนการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ยีสต์จะมีความขม (BU.) ประมาณ 12.65 ซึ่งการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะลดระดับความขมได้มากกว่าการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ($p \leq 0.05$) ส่วนการล้างยีสต์ด้วยน้ำยีสต์ที่ได้จะมีความขม (BU.) 44.99 เมื่อพิจารณาในด้านการสูญเสียยีสต์ในขั้นตอนการล้างพบว่าการล้างยีสต์ด้วยน้ำมีการสูญเสียยีสต์น้อยที่สุด ประมาณ 11.93% รองลงมาคือการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตประมาณ 14.94% และโซเดียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 25.74%

จากการทดลองจะพบว่าการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 2% ระยะเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C จะเหมาะสมที่สุดในการกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมจากฮอพ เมื่อพิจารณาจากการลดค่าความขมในยีสต์และค่าการสูญเสียในการล้างยีสต์

4.3 การปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท

ในการศึกษาการเติมโปรตีนจากแหล่งอื่นในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ เพื่อช่วยปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท ได้ใช้โปรตีนจากพืช คือ กลูเต็นข้าวสาลี โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และกากถั่วเหลือง

4.3.1 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนพืชที่ใช้ปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท

โปรตีนจากพืชที่ใช้ในการศึกษาการปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท ได้แก่ กลูเต็นข้าวสาลี โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และกากถั่วเหลือง ที่ผ่านการสกัดไขมันออกแล้ว องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนพืชเหล่านี้แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 องค์ประกอบทางเคมีของกลูเต็นข้าวสาลี โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และกากถั่วเหลือง

องค์ประกอบทางเคมี (%)	กลูเต็นข้าวสาลี	โปรตีนถั่วเหลืองสกัด	กากถั่วเหลือง
ความชื้น	5.68 ± 0.10	4.92 ± 0.11	12.30 ± 0.58
โปรตีน	67.86 ± 0.13	77.96 ± 0.25	43.09 ± 0.36
คาร์โบไฮเดรต	20.46 ± 0.55	10.05 ± 0.74	28.38 ± 1.42
ไขมัน	4.82 ± 0.07	4.04 ± 0.13	3.63 ± 0.15
เถ้า	0.65 ± 0.22	2.26 ± 0.16	7.26 ± 0.21
เส้นใย	0.53 ± 0.03	0.77 ± 0.09	5.34 ± 0.12

เมื่อ : ทดลอง 3 ซ้ำ และรายงานค่าเป็นร้อยละโดยน้ำหนักเปียก

จากตาราง 4.5 จะพบว่าโปรตีนพืชที่นำมาใช้ในการทดลอง มีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกันไป ปริมาณโปรตีนในโปรตีนถั่วเหลืองจะสูงกว่ากลูเต็นจากข้าวสาลีและกากถั่วเหลือง แต่กากถั่วเหลืองจะมีความชื้นและคาร์โบไฮเดรตสูงกว่า ส่วนปริมาณไขมันของโปรตีนพืชทั้งสามชนิดจะใกล้เคียงกัน

4.3.2 การใช้เอนไซม์ Neutrase® 0.5L ร่วมกับโปรตีนพืชในการปรับปรุงกลิ่นรส

4.3.2.1 การใช้กลูเต็นข้าวสาลี

การเติมกลูเต็นข้าวสาลีและเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ในช่วงการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ โดยแปรปริมาณของกลูเต็นข้าวสาลีเป็น 0, 10 และ 20%(w/v) ปริมาณเอนไซม์ 0, 1 และ 2%(v/v) ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18, 20 และ 24 ชั่วโมง วัดปริมาณของออโตไลเสทที่ได้ ปริมาณโปรตีน และปริมาณคาร์โบไฮเดรต ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.7

จากการทดลองการเติมกลูเต็นข้าวสาลี โดยไม่มีการเติมเอนไซม์จากภายนอกลงไป จะทำให้ปริมาณของออโตไลเสทลดลง เพราะกลูเต็นข้าวสาลีที่เติมจะทำให้ปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายมากขึ้นและมากกว่าของแข็งในส่วนที่ละลายได้มาก เมื่อคำนวณปริมาณออโตไลเสทจึงทำให้ค่าที่ได้ลดลงจาก 32.16-35.11% เป็น 11.76-25.02% แต่ปริมาณของโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 4.12-4.70 mg./ml. เป็น 5.11-15.49 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรตจะเพิ่มขึ้นจาก 0.82-1.00 mg./ml. เป็น 3.75-6.83 mg./ml.โดยปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นมาจากกลูเต็นข้าวสาลีที่เติมและถูกย่อยโดยเอนไซม์ในช่วงการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

การเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 1% โดยไม่เติมโปรตีนพืช จะทำให้ปริมาณออโตไลเสทเพิ่มขึ้นเป็น 42.65-50.90% ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 4.49-5.64 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้นเป็น 1.58-3.14 mg./ml. ส่วนการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% พบว่าปริมาณของโปรตีน ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและปริมาณออโตไลเสทไม่แตกต่างจากการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ปริมาณ 1% ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.7 การเติมกลูเต็นข้าวสาลีและเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

Enzyme (%)	Gluten (%)	Time (hrs)	Autolysate (%)	Protein (mg./ml.)	Carbohydrate (mg./ml.)
0	0	18	32.66 ± 1.26^{ij}	4.70 ± 0.28^{h}	0.99 ± 0.13^{ij}
0	0	20	32.16 ± 0.40^{j}	4.12 ± 0.11^{h}	0.82 ± 0.26^{j}
0	0	24	$35.11 \pm 1.49^{i.}$	4.27 ± 0.47^{h}	0.96 ± 0.50^{ij}
0	10	18	18.69 ± 0.86^{l}	5.40 ± 0.20^{h}	5.20 ± 0.86^{def}
0	10	20	18.27 ± 0.64^{l}	5.11 ± 0.47^{h}	3.75 ± 0.27^{fg}
0	10	24	14.28 ± 0.75^{m}	6.21 ± 0.25^{h}	4.91 ± 0.87^{ef}
0	20	18	11.76 ± 1.58^{m}	13.07 ± 1.42^{f}	5.94 ± 1.18^{de}
0	20	20	18.00 ± 0.43^{l}	12.38 ± 0.71^{f}	6.83 ± 1.31^{d}
0	20	24	25.02 ± 3.37^{k}	15.49 ± 1.84^{e}	5.92 ± 0.54^{de}
1	0	18	42.65 ± 0.61^{gh}	5.64 ± 0.79^{h}	1.80 ± 0.64^{hij}
1	0	20	45.59 ± 2.91^{ef}	4.49 ± 0.25^{h}	1.58 ± 0.56^{hij}
1	0	24	50.90 ± 0.55^{cd}	5.30 ± 0.41^{h}	3.14 ± 0.23^{gh}
1	10	18	56.79 ± 0.60^{b}	10.16 ± 0.30^{g}	6.39 ± 1.67^{de}
1	10	20	58.09 ± 0.42^{b}	12.78 ± 1.54^{f}	6.38 ± 0.53^{de}
1	10	24	57.60 ± 0.71^{b}	14.52 ± 0.47^{ef}	9.39 ± 0.39^{c}
1	20	18	40.47 ± 0.69^{h}	16.32 ± 2.08^{e}	12.77 ± 1.25^{b}
1	20	20	50.75 ± 0.57^{cd}	19.74 ± 0.98^{d}	14.58 ± 1.34^{a}
1	20	24	45.88 ± 1.00^{ef}	19.24 ± 1.11^{d}	14.59 ± 1.07^{a}
2	0	18	44.31 ± 0.14^{fg}	4.21 ± 0.12^{h}	2.66 ± 0.14^{ghi}
2	0	20	46.16 ± 0.05^{ef}	4.65 ± 0.67^{h}	2.04 ± 0.33^{ghij}
2	0	24	48.30 ± 1.94^{de}	5.40 ± 0.84^{h}	2.46 ± 0.31^{ghij}
2	10	18	63.98 ± 1.68^{a}	24.47 ± 0.97^{ab}	10.32 ± 0.29^{c}
2	10	20	64.12 ± 0.77^{a}	23.69 ± 0.15^{ab}	10.09 ± 0.20^{c}
2	10	24	64.74 ± 0.42^{a}	25.87 ± 0.32^{a}	10.72 ± 0.84^{c}
2	20	18	47.23 ± 0.37^{e}	21.11 ± 1.14^{cd}	12.65 ± 0.70^{b}
2	20	20	47.93 ± 0.97^{e}	23.26 ± 2.15^{bc}	13.61 ± 1.36^{ab}
2	20	24	51.76 ± 1.62^{c}	22.83 ± 1.12^{bc}	13.54 ± 0.49^{ab}

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อเติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ทำให้ปริมาณออโตไลเสท ปริมาณโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น โดยการเติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% จะให้ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และปริมาณออโตไลเสทสูงที่สุด คือ 23.69-25.87 mg./ml., 10.09-10.72 mg./ml. และ 63.98-64.74% ตามลำดับ การเติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 1% จะให้ปริมาณออโตไลเสทสูง 56.79-58.09% ส่วนการเติมกลูเต็นที่ปริมาณ 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase 0.5L 1% และ 2% ปริมาณออโตไลเสทจะไม่แตกต่างจากการเติมเพียงเอนไซม์ Neutrase® 0.5L โดยไม่เติมกลูเต็นข้าวสาลี ($p \leq 0.05$) และคาร์โบไฮเดรตเป็น 12.65-14.59 mg./ml. ซึ่งไม่แตกต่างกันในการเติมเอนไซม์ทั้งสองระดับ ($p \leq 0.05$) ส่วนปริมาณโปรตีนในการเติมกลูเต็นข้าวสาลี 20% ร่วมกับ Neutrase® 0.5L 1% เป็น 16.32-19.74 mg./ml. และการเติม Neutrase® 0.5L 2% จะให้ผลไม่แตกต่างจากการเติมกลูเต็น 10%ร่วมกับการเติม Neutrase® 0.5L 2% ($p \leq 0.05$)

ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ พบว่าระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและปริมาณออโตไลเสทเพิ่มขึ้น แต่เพิ่มขึ้นไม่มากนัก เมื่อเทียบกับผลของเอนไซม์ Neutrase® 0.5L และกลูเต็นข้าวสาลีที่เติมลงในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

จากการทดลองเติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับการเติม Neutrase® 0.5L จะพบว่าการเติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับ Neutrase® 0.5L 2% เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง จะให้ปริมาณออโตไลเสทและปริมาณโปรตีนสูงที่สุด ส่วนการเติมกลูเต็นข้าวสาลี 20% ร่วมกับ Neutrase® 0.5L 2% เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุด ปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างจากการเติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับ Neutrase® 0.5L 2% นาน 18 ชั่วโมง การเติมกลูเต็นข้าวสาลี 20% ร่วมกับ Neutrase® 0.5L 1% เป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง จะให้ปริมาณออโตไลเสท และปริมาณคาร์โบไฮเดรตไม่แตกต่างจากการเติมกลูเต็นข้าวสาลี 20% ร่วมกับ Neutrase® 0.5L 2% นาน 24 ชั่วโมง ($p \leq 0.05$) เมื่อนำยีสต์ออโตไลเสททั้งสามชุดการทดลองมาทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ (ภาคผนวก ค.)ผลเป็นดังตารางที่ 4.8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.8 ค่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L

ชุดการทดลอง	ค่าการทดสอบ[ns]
เติมกลูเต็นข้าวสาลี 20% Neutrase® 0.5L 1% ระยะเวลา 20 ชั่วโมง	6.48 ± 1.13
เติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% Neutrase® 0.5L 2% ระยะเวลา 18 ชั่วโมง	7.20 ± 1.36
เติมกลูเต็นข้าวสาลี 20% Neutrase® 0.5L 2% ระยะเวลา 20 ชั่วโมง	7.14 ± 1.42

เมื่อ : ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 2 ซ้ำโดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน
ค่าการทดสอบเป็นคะแนนด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท
(โดย 0= ไม่มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อ และ10= มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อที่สุด)
ns ค่าเฉลี่ยที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากการทดสอบด้านประสาทสัมผัสจะพบว่าค่าการทดสอบกลิ่นรสคล้ายเนื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ทั้งสามชุดการทดลอง และเมื่อพิจารณาทางด้านปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต จะพบว่าการเติมกลูเต็น 10% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% เวลา 18 ชั่วโมง เหมาะสมที่สุด เพราะจะให้ปริมาณออโตไลเสทและโปรตีนสูงที่สุด จึงเลือกภาวะนี้ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

4.3.2.2 การใช้โปรตีนถั่วเหลืองสกัด

การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ในช่วงการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ โดยแปรปริมาณของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเป็น 0, 10 และ 20%(w/v) ปริมาณเอนไซม์ 0, 1 และ 2%(v/v) ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18, 20 และ 24 ชั่วโมง วัดปริมาณของออโตไลเสทที่ได้ ปริมาณโปรตีน และปริมาณคาร์โบไฮเดรต ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.9

จากการทดลองเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด โดยไม่มีการเติมเอนไซม์จากภายนอกลงไป จะทำให้ปริมาณของออโตไลเสทลดลง เพราะโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมจะทำให้ปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายมากขึ้นและมากกว่าของแข็งในส่วนที่ละลายได้มาก เมื่อคำนวนหาปริมาณออโตไลเสทจึงทำให้ค่าที่ได้ลดลงจาก 32.16-35.11% เป็น 20.93-28.51% แต่ปริมาณของโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 4.12-4.70 mg./ml. เป็น 14.68-20.40 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรตจะเพิ่มขึ้นจาก 0.82-1.00 mg./ml. เป็น 2.82-5.14 mg./ml. ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นมาจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติม และการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองสกัดโดยเอนไซม์ในช่วงการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

เมื่อเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ทำให้ปริมาณออโตไลเสท ปริมาณโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น โดยการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 20 ชั่วโมง จะให้ปริมาณโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุด คือ 28.16 mg./ml. และ 7.81 mg./ml. ตามลำดับ การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 10% ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 1% จะให้ปริมาณออโตไลเสทสูงที่สุด คือประมาณ 59.25-61.35% แต่ปริมาณโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตจะไม่แตกต่างจากการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 10% โดยไม่มีการเติมเอนไซม์ ($p \leq 0.05$) การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ปริมาณ 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 1% และ 2% ปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตจะสูงกว่าการเติมเพียงเอนไซม์ Neutrase® 0.5L โดยไม่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ปริมาณ 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 1% ปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ได้จะใกล้เคียงกับการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ปริมาณ 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% แต่ปริมาณออโตไลเสทที่ได้จะน้อยกว่า

ในการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ที่ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ทั้ง 3 ระดับ พบว่าระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณปริมาณออโตไลเสทเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต จะเพิ่มขึ้นไม่มากนักในช่วง 18-20 ชั่วโมง และเมื่อระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์มากขึ้นเป็น 24 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนจะลดลง

จากตารางที่ 4.9 เมื่อนำชุดการทดลองที่ให้ผลทางเคมีสูงจำนวน 3 ชุด ได้แก่ การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18 ชั่วโมง การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18 ชั่วโมง และ 20 ชั่วโมง มาทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ (ภาคผนวก ค.) ผลที่ได้เป็นดังตาราง 4.10

ตารางที่ 4.9 การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (SPI) และเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

Enzyme (%)	SPI (%)	Time (hrs)	Autolysate (%)	Protein (mg./ml.)	Carbohydrate (mg./ml.)
0	0	18	32.66 ± 1.26^{k}	4.70 ± 0.28^{j}	0.99 ± 0.13^{lm}
0	0	20	32.16 ± 0.42^{k}	4.12 ± 0.11^{j}	0.82 ± 0.26^{m}
0	0	24	35.11 ± 1.49^{k}	4.27 ± 0.47^{j}	0.96 ± 0.50^{lm}
0	10	18	20.93 ± 0.33^{m}	15.89 ± 1.37^{ghi}	4.56 ± 0.52^{cde}
0	10	20	23.40 ± 0.34^{lm}	17.75 ± 1.48^{fg}	4.22 ± 0.59^{cdef}
0	10	24	28.51 ± 1.38^{l}	$14.68 \pm 0.37^{i.}$	3.15 ± 0.11^{fghi}
0	20	18	22.20 ± 1.79^{m}	20.40 ± 1.71^{e}	2.82 ± 1.14^{ghij}
0	20	20	23.10 ± 2.39^{lm}	19.32 ± 1.14^{ef}	5.14 ± 0.12^{bc}
0	20	24	21.13 ± 0.22^{m}	15.31 ± 0.73^{hi}	4.76 ± 0.21^{cde}
1	0	18	42.65 ± 0.61^{j}	5.64 ± 0.79^{j}	1.80 ± 0.63^{jklm}

1	0	20	45.59 ± 2.91^{hij}	4.49 ± 0.25^{j}	1.58 ± 0.56^{klm}
1	0	24	50.90 ± 0.55^{def}	5.30 ± 0.41^{j}	3.14 ± 0.23^{fghi}
1	10	18	59.25 ± 0.20^{a}	16.95 ± 0.81^{gh}	2.86 ± 0.13^{ghij}
1	10	20	59.32 ± 0.84^{a}	17.01 ± 0.30^{gh}	3.95 ± 0.46^{cdefg}
1	10	24	61.35 ± 0.30^{a}	16.95 ± 0.34^{gh}	3.82 ± 0.48^{defgh}
1	20	18	47.35 ± 1.51^{ghi}	24.63 ± 0.56^{bc}	4.14 ± 0.24^{cdef}
1	20	20	49.92 ± 0.42^{efg}	22.63 ± 0.93^{d}	4.96 ± 0.22^{bcde}
1	20	24	51.11 ± 0.57^{def}	22.55 ± 0.85^{d}	5.99 ± 0.61^{b}
2	0	18	44.31 ± 0.14^{ij}	4.21 ± 0.12^{j}	2.66 ± 0.14^{hijk}
2	0	20	46.16 ± 0.49^{hi}	4.65 ± 0.67^{j}	2.05 ± 0.33^{ijkl}
2	0	24	48.30 ± 1.94^{fgh}	5.40 ± 0.84^{j}	2.46 ± 0.31^{ijk}
2	10	18	55.67 ± 0.55^{bc}	15.98 ± 0.23^{ghi}	4.94 ± 1.08^{bcde}
2	10	20	58.00 ± 0.39^{ab}	15.75 ± 0.77^{hi}	4.34 ± 0.45^{cdef}
2	10	24	61.13 ± 1.59^{a}	15.61 ± 0.19^{hi}	3.72 ± 0.11^{efgh}
2	20	18	52.84 ± 0.30^{cde}	25.47 ± 1.05^{b}	5.07 ± 0.79^{bcd}
2	20	20	53.51 ± 1.40^{cd}	28.16 ± 0.47^{a}	7.81 ± 1.07^{a}
2	20	24	55.95 ± 1.29^{bc}	23.65 ± 1.62^{cd}	4.99 ± 1.05^{bcd}

a, b, c,… ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.10 ค่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L

ชุดการทดลอง	ค่าการทดสอบ
เติมโปรตีนถั่วเลืองสกัด 20% Neutrase® 0.5L 1% เวลา 18 ชั่วโมง	6.64 ± 1.22^{b}
เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% Neutrase® 0.5L 2% เวลา 18 ชั่วโมง	8.14 ± 0.90^{a}
เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% Neutrase® 0.5L 2% เวลา 20 ชั่วโมง	8.54 ± 0.78^{a}

เมื่อ : ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 2 ซ้ำโดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน

ค่าการทดสอบเป็นคะแนนด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท

(โดย 0= ไม่มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อ และ10= มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อที่สุด)

a, b ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทที่เติม โปรตีนถั่วเหลืองสกัดร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L พบว่ายีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20 %ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% ระยะเวลาในการย่อยตัวเอง 18 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับยีสต์ ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20 % เอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% ระยะเวลา 20 ชั่วโมง จะมีค่าการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แม้ว่าจะมีค่าของปริมาณโปรตีนและปริมาณคาร์โบไฮเดรตน้อยกว่า จึงเลือกการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% ในช่วงการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อทดลองต่อไป

4.3.2.3 การใช้กากถั่วเหลือง

การเติมกากถั่วเหลืองและเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ในช่วงการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ โดยแปรปริมาณของกากถั่วเหลืองเป็น 0, 10 และ 20%(w/v) ปริมาณเอนไซม์ 0, 1 และ 2%(v/v) ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18, 20 และ 24 ชั่วโมง วัดปริมาณของออโตไลเสทปริมาณโปรตีน และปริมาณคาร์โบไฮเดรต ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.11

จากการทดลองเติมกากถั่วเหลือง โดยไม่มีการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L จะทำให้ปริมาณของออโตไลเสทลดลง เพราะกากถั่วเหลืองที่เติมจะทำให้ปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายมากขึ้นและมากกว่าของแข็งในส่วนที่ละลายได้มาก เช่นเดียวกับการเติมกลูเต็นข้าวสาลีและการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด เมื่อคำนวณหาปริมาณออโตไลเสทจึงทำให้ค่าที่ได้ลดลงจาก 32.16-35.11% เป็น 13.80-16.41% แต่ปริมาณของโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 4.12-4.70 mg./ml. เป็น 4.53-7.69 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรตจะเพิ่มขึ้นจาก 0.82-1.00% เป็น 2.52-3.68% ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นมาจากกากถั่วเหลืองที่เติมและถูกย่อยโดยเอนไซม์ในช่วงการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

เมื่อเติมกากถั่วเหลืองร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ทำให้ปริมาณออโตไลเสท ปริมาณโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น โดยการเติมกากถั่วเหลือง 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 1% ระยะเวลาย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 24 ชั่วโมง จะให้ปริมาณออโตไลเสท ปริมาณโปรตีนและปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุด คือ 54.40%, 8.77 mg./ml. และ 5.04 mg./ml. ตามลำดับ การเติมกากถั่วเหลือง 10% ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น18-24 ชั่วโมง จะให้ปริมาณออโตไลเสท 44.31-50.75% ซึ่งไม่แตกต่างจากการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% ที่ระยะเวลาการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 18-24 ชั่วโมง ($p \leq 0.05$) ปริมาณโปรตีนเป็น 5.64-5.74 mg./ml. และปริมาณคาร์โบไฮเดรตเป็น 3.04-4.18 mg./ml. จะไม่แตกต่างจากการเติมกากถั่วเหลือง 10 % โดยไม่มีการเติมเอนไซม์ ($p \leq 0.05$)

การเติมกากถั่วเหลืองที่ปริมาณ 10% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% จะให้ปริมาณออโตไลเสทสูงที่สุด 52.44-56.06% ปริมาณโปรตีน 5.38-5.66 mg./ml. ไม่แตกต่างจากการเติมกากถั่วเหลือง 10% ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 1% ($p \leq 0.05$) และปริมาณคาร์โบไฮเดรตเป็น 2.46-5.46 mg./ml. ซึ่งค่าที่ได้จะลดลงเมื่อเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์มากขึ้น การเติมกากถั่วเหลืองปริมาณ 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% ปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ได้จะใกล้เคียงกับการเติมกากถั่วเหลืองที่ปริมาณ 10% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% แต่ปริมาณออโตไลเสทที่ได้จะน้อยกว่า

ตารางที่ 4.11 การเติมกากถั่วเหลือง (SBM) และเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

Enzyme (%)	SBM (%)	Time (hrs)	Autolysate (%)	Protein (mg./ml.)	Carbohydrate (mg./ml.)
0	0	18	32.66 ± 1.26^{l}	4.70 ± 0.28^{hi}	0.99 ± 0.13^{jkl}
0	0	20	32.16 ± 0.42^{l}	$4.12 \pm 0.11^{i.}$	0.82 ± 0.26^{l}
0	0	24	35.11 ± 1.49^{k}	$4.27 \pm 0.47^{i.}$	0.96 ± 0.51^{kl}
0	10	18	14.31 ± 0.26^{m}	5.61 ± 1.09^{fgh}	2.67 ± 0.20^{fghi}
0	10	20	14.12 ± 0.89^{m}	4.53 ± 0.40^{hi}	2.52 ± 0.50^{ghij}
0	10	24	16.41 ± 0.36^{m}	5.18 ± 0.62^{ghi}	3.15 ± 1.15^{defghi}
0	20	18	14.42 ± 1.73^{m}	6.02 ± 0.18^{efg}	3.29 ± 0.43^{defgh}
0	20	20	15.29 ± 1.09^{m}	7.36 ± 0.90^{bcd}	3.68 ± 0.46^{cdefg}
0	20	24	13.80 ± 1.87^{m}	7.69 ± 0.57^{abc}	2.74 ± 0.59^{efghi}
1	0	18	42.65 ± 0.61^{j}	5.64 ± 0.79^{fgh}	1.80 ± 0.36^{hijkl}
1	0	20	45.59 ± 2.91^{ghi}	4.49 ± 0.25^{hi}	1.58 ± 0.56^{ijkl}
1	0	24	50.90 ± 0.55^{cd}	5.30 ± 0.41^{ghi}	3.14 ± 0.23^{defghi}
1	10	18	44.31 ± 0.80^{hij}	5.67 ± 0.49^{fgh}	4.18 ± 0.15^{bcdef}
1	10	20	48.38 ± 0.12^{def}	5.64 ± 0.27^{fgh}	3.04 ± 0.60^{defghi}
1	10	24	50.75 ± 0.74^{cd}	5.74 ± 0.55^{fgh}	3.82 ± 0.94^{cdefg}
1	20	18	50.27 ± 0.62^{cde}	7.32 ± 0.96^{bcd}	5.79 ± 0.27^{a}
1	20	20	53.51 ± 0.87^{ab}	8.19 ± 0.81^{ab}	5.04 ± 0.11^{abc}
1	20	24	54.40 ± 1.80^{ab}	8.77 ± 0.28^{a}	5.04 ± 0.56^{abc}
2	0	18	44.31 ± 0.61^{hij}	$4.21 \pm 0.12^{i.}$	2.66 ± 0.14^{fghi}
2	0	20	46.16 ± 0.45^{fgh}	4.65 ± 0.67^{hi}	2.05 ± 0.33^{hijkl}
2	0	24	48.30 ± 1.94^{def}	5.40 ± 0.28^{ghi}	2.46 ± 0.31^{ghijk}
2	10	18	53.80 ± 0.20^{ab}	5.38 ± 0.95^{ghi}	5.46 ± 1.82^{ab}

2	10	20	52.44 ± 0.28^{bc}	5.66 ± 0.20^{fgh}	4.57 ± 1.57^{abcd}
2	10	24	56.06 ± 0.83^{a}	5.42 ± 0.13^{fghi}	2.74 ± 0.25^{efghi}
2	20	18	43.26 ± 1.68^{ij}	6.70 ± 0.54^{cdef}	4.28 ± 0.51^{abcde}
2	20	20	46.06 ± 0.61^{fgh}	6.97 ± 0.66^{bcde}	4.25 ± 0.88^{abcde}
2	20	24	48.01 ± 0.13^{efg}	6.38 ± 0.13^{defg}	2.36 ± 0.45^{ghijk}

a, b, c,… ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ในการเติมกากถั่วเหลืองร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ที่ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ทั้ง 3 ระดับ พบว่าระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณปริมาณออโตไลเสทเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต จะเพิ่มขึ้นไม่มากนักในช่วง 18-24 ชั่วโมง และในบางชุดการทดลองค่าของปริมาณโปรตีนและปริมาณคาร์โบไฮเดรตจะลดลง

จากตารางที่ 4.11 เมื่อนำชุดการทดลองที่ให้ผลทางเคมีสูงจำนวน 5 ชุด ได้แก่ การเติมกากถั่วเหลือง 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 1% ระยะเวลาย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18, 20 และ 24 ชั่วโมง การเติมกากถั่วเหลือง 10% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% ระยะเวลาย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18 ชั่วโมง และการเติมกากถั่วเหลือง 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% ระยะเวลาย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 20 ชั่วโมง ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ (ภาคผนวก ค.) ผลที่ได้เป็นดังตาราง 4.12

ตารางที่ 4.12 ค่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L

ชุดการทดลอง	ค่าการทดสอบ
เติมกากถั่วเหลือง 20% Neutrase® 0.5L 1% เวลา 18 ชั่วโมง	7.73 ± 0.92^{a}
เติมกากถั่วเหลือง 20% Neutrase® 0.5L 1% เวลา 20 ชั่วโมง	7.58 ± 1.28^{a}
เติมกากถั่วเหลือง 20% Neutrase® 0.5L 1% เวลา 24 ชั่วโมง	7.80 ± 0.90^{a}
เติมกากถั่วเหลือง 10% Neutrase® 0.5L 2% เวลา 18 ชั่วโมง	6.94 ± 1.05^{b}
เติมกากถั่วเหลือง 20% Neutrase® 0.5L 2% เวลา 20 ชั่วโมง	7.77 ± 0.59^{a}

เมื่อ : ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 2 ซ้ำโดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน

ค่าการทดสอบเป็นคะแนนด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท

(โดย 0= ไม่มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อ และ10= มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อที่สุด)

a,b ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองสกัดร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L พบว่ายีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง 10 % ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% ระยะเวลาในการย่อยตัวเอง 18 ชั่วโมง จะมีค่าการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อต่ำที่สุดส่วนอีก 4 ชุดการทดลอง จะมีค่าการทดสอบไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาผลการทดลองด้านประสาทสัมผัสร่วมกับผลการทดลองด้านปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต จึงเลือกการเติมกากถั่วเหลือง 20% ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 1% ในช่วงการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เพื่อทดลองต่อไป

4.3.3 การใช้เอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ร่วมกับโปรตีนพืชในการปรับปรุงกลิ่นรส

4.3.3.1 การใช้กลูเต็นข้าวสาลี

การเติมกลูเต็นข้าวสาลีและเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ในช่วงการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ โดยแปรปริมาณของกลูเต็นข้าวสาลีเป็น 0, 10 และ 20%(w/v) ปริมาณเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 0, 1 และ 2%(v/v) ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18, 20 และ 24 ชั่วโมง วัดปริมาณของออโตไลเสท ปริมาณโปรตีนและปริมาณคาร์โบไฮเดรต ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.13

จากการทดลองการเติมกลูเต็นข้าวสาลี โดยไม่มีการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L จะทำให้ปริมาณของออโตไลเสทลดลง เพราะกลูเต็นข้าวสาลีที่เติมจะทำให้ปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายมากขึ้นและมากกว่าของแข็งในส่วนที่ละลายได้มาก เมื่อคำนวณหาปริมาณออโตไลเสทจึงทำให้ค่าที่ได้ลดลงจาก 32.16-35.11% เป็น 11.76-25.02% แต่ปริมาณของโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 4.12-4.70 mg./ml. เป็น 5.11-15.49 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรตจะเพิ่มขึ้นจาก 0.82-1.00 mg./ml. เป็น 3.75-6.83 mg./ml. โดยปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นมาจากกลูเต็นข้าวสาลีที่เติมและถูกย่อยโดยเอนไซม์ในช่วงการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.13 การเติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

Enzyme (%)	Gluten (%)	Time (hrs)	Autolysate (%)	Protein (mg./ml.)	Carbohydrate (mg./ml.)
0	0	18	32.66 ± 1.26^{lm}	4.70 ± 0.28^{lm}	0.99 ± 0.13^{k}
0	0	20	32.16 ± 0.42^{m}	4.12 ± 0.11^{m}	0.82 ± 0.26^{k}
0	0	24	35.11 ± 1.49^{l}	4.27 ± 0.47^{lm}	0.96 ± 0.50^{k}
0	10	18	18.69 ± 0.86^{o}	5.40 ± 0.20^{klm}	5.20 ± 0.86^{ij}

0	10	20	18.27 ± 0.64^{o}	5.11 ± 0.47^{klm}	3.75 ± 0.27^{j}
0	10	24	14.28 ± 0.75^{p}	6.21 ± 0.25^{klm}	4.91 ± 0.87^{ij}
0	20	18	11.76 ± 1.58^{p}	$13.07 \pm 1.42^{i.}$	$5.94 \pm 1.18^{i.}$
0	20	20	18.00 ± 0.43^{o}	$12.38 \pm 0.71^{i.}$	6.83 ± 1.31^{hi}
0	20	24	25.02 ± 3.37^{n}	15.49 ± 1.84^{h}	$5.92 \pm 0.54^{i.}$
1	0	18	65.51 ± 1.81^{gh}	5.74 ± 0.42^{klm}	5.20 ± 0.17^{ij}
1	0	20	$64.65 \pm 0.14^{i.}$	5.79 ± 0.24^{klm}	9.44 ± 0.65^{fg}
1	0	24	65.93 ± 0.22^{fgh}	9.94 ± 0.11^{j}	8.64 ± 0.23^{gh}
1	10	18	68.43 ± 0.53^{cdef}	18.93 ± 1.32^{f}	11.89 ± 1.08^{d}
1	10	20	68.99 ± 0.64^{bcde}	24.16 ± 2.11^{b}	11.46 ± 1.09^{de}
1	10	24	71.28 ± 1.50^{abc}	26.14 ± 1.55^{ab}	9.05 ± 1.08^{fg}
1	20	18	55.32 ± 1.73^{k}	18.62 ± 1.32^{fg}	16.47 ± 1.45^{bc}
1	20	20	62.21 ± 1.99^{ij}	19.20 ± 1.03^{ef}	16.43 ± 1.56^{bc}
1	20	24	60.41 ± 1.54^{j}	16.60 ± 2.14^{gh}	22.52 ± 0.24^{a}
2	0	18	66.95 ± 0.74^{efgh}	5.60 ± 0.84^{klm}	9.36 ± 0.99^{fg}
2	0	20	67.74 ± 0.86^{defg}	6.58 ± 0.40^{kl}	11.91 ± 0.57^{d}
2	0	24	66.90 ± 1.26^{fgh}	7.31 ± 0.32^{k}	9.82 ± 0.15^{efg}
2	10	18	70.31 ± 0.53^{bcd}	27.02 ± 1.74^{a}	12.04 ± 0.67^{d}
2	10	20	71.72 ± 0.81^{ab}	27.53 ± 0.48^{a}	12.17 ± 2.38^{d}
2	10	24	73.84 ± 0.42^{a}	21.78 ± 0.34^{cd}	10.74 ± 0.50^{def}
2	20	18	65.06 ± 0.85^{hi}	19.63 ± 0.36^{def}	16.07 ± 0.38^{bc}
2	20	20	71.05 ± 1.35^{abc}	22.07 ± 0.67^{c}	15.10 ± 0.51^{c}
2	20	24	69.98 ± 1.67^{bcde}	21.33 ± 0.58^{cde}	17.50 ± 0.19^{b}

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

การเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% โดยไม่เติมโปรตีนพืชจะทำให้ปริมาณออโตไลเสทเพิ่มขึ้นเป็น 64.65-65.93% ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 5.74-9.94 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้นเป็น 5.20-9.44 mg./ml. เมื่อระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เพิ่มขึ้น ส่วนการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 9.36-11.91 mg./ml. ซึ่งสูงกว่าการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ส่วนปริมาณโปรตีนเป็น 5.60-7.31 mg./ml. และปริมาณออโตไลเสท 66.90-67.74% โดยจะไม่แตกต่างจากการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ปริมาณ 1% ($p \leq 0.05$)

เมื่อเติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ทำให้ปริมาณออโตไลเสท ปริมาณโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น โดยการเติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับการเติมเอนไซม์

Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18-24 ชั่วโมง จะให้ปริมาณโปรตีน 18.93-26.14 mg./ml. คาร์โบไฮเดรต 9.05-11.89 mg./ml. และปริมาณออโตไลเสท 68.43-71.28% การเติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% จะให้ปริมาณออโตไลเสทสูง 70.31-73.84% ซึ่งจะไม่แตกต่างกับการเติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับ Flavourzyme® 1000L 1% ($p \leq 0.05$) ส่วนปริมาณโปรตีนเป็น 21.78-27.53 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรตเป็น 10.74-12.17 mg./ml. โดยเมื่อเวลาในการย่อยสลายตัวเองเพิ่มขึ้น ปริมาณของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตจะลดลง อาจเป็นเพราะเอนไซม์จะไปย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตได้เป็นกรดอะมิโนและน้ำตาล และเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด

การเติมกลูเต็นข้าวสาลีที่ปริมาณ 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18-24 ชั่วโมง จะมีปริมาณออโตไลเสท 55.32-62.21% โปรตีน 16.60-19.20 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรต 16.43-22.52 mg./ml. การเติมกลูเต็นข้าวสาลี 20% ร่วมกับ Flavourzyme® 1000L 2% จะมีปริมาณออโตไลเสท 65.06-71.05% ปริมาณโปรตีนเป็น 19.63-22.07 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรต 15.10-17.50 mg./ml. ซึ่งค่าของปริมาณโปรตีนและออโตไลเสทจะสูงกว่าการเติมกลูเต็นข้าวสาลี 20% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% แต่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตจะไม่แตกต่างกัน ($p \leq 0.05$)

จากการทดลองเติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ออโตไลเสท เมื่อวิเคราะห์ผลทางเคมีได้คัดเลือกชุดการทดลอง 5 ชุดได้แก่ การเติมกลูเต็นข้าวสาลีที่ปริมาณ 10% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 20 ชั่วโมง การเติม กลูเต็นข้าวสาลีที่ปริมาณ 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18 ชั่วโมง การเติมกลูเต็นข้าวสาลีที่ปริมาณ 10% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18 ชั่วโมง การเติมกลูเต็นข้าวสาลีที่ปริมาณ 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 20 และ 24 ชั่วโมง ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ (ภาคผนวก ค.) ผลการทดสอบเป็นดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ค่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท ที่เติม กลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L

ชุดการทดลอง	ค่าการทดสอบ
เติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% Flavourzyme® 1000L 1% เวลา 20 ชั่วโมง	7.90 ± 1.01^{a}
เติมกลูเต็นข้าวสาลี 20% Flavourzyme® 1000L 1% เวลา 18 ชั่วโมง	7.53 ± 1.00^{a}
เติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% Flavourzyme® 1000L 2% เวลา 18 ชั่วโมง	7.88 ± 0.72^{a}

เติมกลูเต็นข้าวสาลี 20% Flavourzyme® 1000L 2% เวลา 20 ชั่วโมง	6.72 ± 0.91^{b}
เติมกลูเต็นข้าวสาลี 20% Flavourzyme® 1000L 2% เวลา 24 ชั่วโมง	7.91 ± 0.66^{a}

เมื่อ : ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 2 ซ้ำโดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน
ค่าการทดสอบเป็นคะแนนด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท
(โดย 0= ไม่มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อ และ10= มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อที่สุด)
a,b ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส ด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท ดัง ตารางที่ 4.14 จะมีเพียงชุดการทดลองที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี 20% Flavourzyme® 1000L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 20 ชั่วโมง จะให้ค่าการทดสอบแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ($p \leq 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกชุดการทดลองที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลา ในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 20 ชั่วโมง ไว้ทดลองต่อไป

4.3.3.2 การใช้โปรตีนถั่วเหลืองสกัด

การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ในช่วงการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ โดยแปรปริมาณของโปรตีนถั่วเหลืองเป็น 0, 10 และ 20%(w/v) ปริมาณเอนไซม์ 0, 1 และ 2%(v/v) ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18, 20 และ 24 ชั่วโมง วัดปริมาณของออโตไลเสท ปริมาณโปรตีนและปริมาณคาร์โบไฮเดรต ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.15

การเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% โดยไม่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดจะทำให้ปริมาณออโตไลเสทเพิ่มขึ้นเป็น 64.65-65.93% ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 5.74-9.94 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้นเป็น 5.20-9.44 mg./ml. ส่วนการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% จะมีปริมาณโปรตีน 5.60-7.31 mg./ml. และปริมาณออโตไลเสท 66.90-67.74% ซึ่งจะไม่แตกต่างจากการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ($p \leq 0.05$) ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรต มีค่า 9.36-11.91 mg./ml. ซึ่งสูงกว่าการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1%

จากการทดลองการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด โดยไม่มีการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L จะทำให้ปริมาณของออโตไลเสทลดลง เพราะโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมจะทำให้ปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายมากขึ้นและมากกว่าของแข็งในส่วนที่ละลายได้มาก เมื่อคำนวณหาปริมาณออโตไลเสทจึงทำให้ค่าที่ได้ลดลงจาก 32.16-35.11% เป็น 20.93-28.51% แต่ปริมาณของโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 4.12-4.70 mg./ml. เป็น 15.31-20.40 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรตจะเพิ่มขึ้นจาก 0.82-1.00 mg./ml. เป็น 3.15-5.14 mg./ml. โดย

ปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นมาจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมและถูกย่อยโดยเอนไซม์ในช่วงการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

ตารางที่ 4.15 การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (SPI) ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

Enzyme (%)	SPI (%)	Time (hrs)	Autolysate (%)	Protein (mg./ml.)	Carbohydrate (mg./ml.)
0	0	18	32.66 ± 1.26^{fg}	4.70 ± 0.28^{ij}	0.99 ± 0.13^{k}
0	0	20	32.16 ± 0.42^{g}	4.12 ± 0.11^{j}	0.82 ± 0.26^{k}
0	0	24	35.11 ± 1.49^{f}	4.27 ± 0.47^{j}	0.96 ± 0.50^{k}
0	10	18	$20.93 \pm 0.33^{i.}$	15.89 ± 1.37^{e}	4.56 ± 0.52^{ghi}
0	10	20	$23.40 \pm 0.34^{i.}$	17.75 ± 1.48^{d}	4.22 ± 0.59^{hij}
0	10	24	28.51 ± 1.38^{h}	14.68 ± 0.37^{ef}	3.15 ± 0.11^{ij}
0	20	18	$22.20 \pm 1.79^{i.}$	20.40 ± 1.71^{c}	2.82 ± 1.14^{j}
0	20	20	$23.10 \pm 2.39^{i.}$	19.32 ± 1.14^{cd}	5.14 ± 0.12^{fgh}
0	20	24	$21.13 \pm 0.22^{i.}$	15.31 ± 0.73^{ef}	4.76 ± 0.21^{gh}
1	0	18	65.51 ± 1.81^{abcd}	5.74 ± 0.42^{hij}	5.20 ± 0.62^{fgh}
1	0	20	64.65 ± 0.14^{cd}	5.79 ± 0.24^{hij}	9.44 ± 0.65^{b}
1	0	24	65.93 ± 0.22^{abcd}	9.94 ± 0.01^{g}	8.64 ± 0.23^{bc}
1	10	18	63.89 ± 2.59^{d}	13.78 ± 1.83^{f}	5.74 ± 0.49^{efgh}
1	10	20	66.55 ± 0.44^{abcd}	14.38 ± 0.55^{ef}	6.09 ± 1.22^{defg}
1	10	24	67.77 ± 1.30^{ab}	14.04 ± 0.16^{ef}	7.07 ± 0.79^{de}
1	20	18	58.02 ± 1.51^{e}	22.42 ± 0.41^{b}	6.34 ± 0.45^{def}
1	20	20	58.29 ± 0.45^{e}	22.42 ± 0.59^{b}	6.60 ± 0.94^{def}
1	20	24	60.23 ± 1.19^{e}	24.52 ± 0.56^{a}	6.52 ± 0.45^{def}
2	0	18	66.95 ± 0.74^{abc}	5.60 ± 0.84^{hij}	9.36 ± 0.99^{b}
2	0	20	67.74 ± 0.86^{ab}	6.58 ± 0.40^{hi}	11.91 ± 0.57^{a}
2	0	24	66.90 ± 1.26^{abc}	7.31 ± 0.32^{h}	9.82 ± 0.15^{b}
2	10	18	66.09 ± 1.62^{abcd}	13.88 ± 1.68^{f}	5.81 ± 1.71^{efg}
2	10	20	67.44 ± 0.74^{abc}	13.76 ± 0.95^{f}	6.00 ± 0.28^{defg}

2	10	24	67.93 ± 1.39^{a}	15.67 ± 0.72^{ef}	9.88 ± 0.76^{b}
2	20	18	64.68 ± 0.18^{cd}	23.26 ± 0.48^{ab}	5.91 ± 0.26^{defg}
2	20	20	64.99 ± 0.42^{bcd}	23.97 ± 1.00^{ab}	6.46 ± 0.76^{def}
2	20	24	65.56 ± 0.42^{abcd}	22.37 ± 0.28^{b}	7.43 ± 0.47^{cd}

a, b, c,… ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ทำให้ปริมาณออโตไลเสท ปริมาณโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น โดยการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 10% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18-24 ชั่วโมง จะให้ปริมาณออโตไลเสท 63.89-67.77% ปริมาณโปรตีนโปรตีน 13.78-14.38 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรต 5.74-7.07 mg./ml. โดยค่าของปริมาณออโตไลเสทและคาร์โบไฮเดรตจะไม่แตกต่างจากการเติมเพียงเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% และ 2% แต่ปริมาณโปรตีนที่ได้จะสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 10% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% จะให้ปริมาณออโตไลเสทไม่แตกต่างจากการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L โดยไม่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด หรือการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 10% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ($p \leq 0.05$) ส่วนปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตจะไม่แตกต่างจากการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 10% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ($p \leq 0.05$)

เมื่อเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18-24 ชั่วโมง ปริมาณออโตไลเสทจะลดลงเป็น 58.02-60.23% ปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้นเป็น 22.42-24.52 mg./ml. ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตจะมีประมาณ 6.34-6.60 mg./ml. ซึ่งไม่แตกต่างจากการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 10% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ($p \leq 0.05$) การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% ร่วมกับการเติม Flavourzyme® 1000L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18-24 ชั่วโมง จะให้ปริมาณออโตไลเสทสูง 64.68-65.56% ปริมาณโปรตีน 22.37-23.97 mg./ml. และปริมาณคาร์โบไฮเดรต 5.91-7.43 mg./ml. ซึ่งปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ได้จะไม่แตกต่างจากการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ($p \leq 0.05$)

ในการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ที่ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ทั้ง 3 ระดับ พบว่าระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณออโตไลเสท ปริมาณโปรตีนและปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ได้เพิ่มขึ้นแต่จะเพิ่มขึ้นไม่มาก และเมื่อเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์มากขึ้นปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตจะลดลง

เมื่อวิเคราะห์ผลทางเคมีได้คัดเลือกชุดการทดลอง 6 ชุดได้แก่ การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ปริมาณ 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18 และ 24 ชั่วโมง การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดปริมาณ 10% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 24 ชั่วโมง การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดปริมาณ 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18

และ 24 ชั่วโมง และการเติมเพียงเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 20 ชั่วโมง ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ (ภาคผนวก ค.) ผลการทดสอบเป็นดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 ค่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท ที่เติม โปรตีนถั่วเหลืองสกัดร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L

ชุดการทดลอง	ค่าการทดสอบ
เติม Flavourzyme® 1000L 2% เวลา 20 ชั่วโมง	5.88 ± 0.53^{c}
เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% Flavourzyme® 1000L 1% เวลา 18 ชั่วโมง	6.25 ± 0.77^{c}
เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% Flavourzyme® 1000L 1% เวลา 24 ชั่วโมง	8.02 ± 0.72^{a}
เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 10% Flavourzyme® 1000L 2% เวลา 24 ชั่วโมง	7.44 ± 0.66^{b}
เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% Flavourzyme® 1000L 2% เวลา 18 ชั่วโมง	8.06 ± 1.06^{a}
เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% Flavourzyme® 1000L 2% เวลา 24 ชั่วโมง	7.90 ± 0.77^{a}

เมื่อ : ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 2 ซ้ำโดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน
ค่าการทดสอบเป็นคะแนนด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท
(โดย 0= ไม่มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อ และ10= มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อที่สุด)
a,b,c ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท ดังตารางที่ 4.16 จะมี 3 ชุดการทดลองที่ให้ค่าการทดสอบสูงที่สุดได้แก่ การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 24 ชั่วโมง การเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% Flavourzyme® 1000L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18 และ 24 ชั่วโมง ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาร่วมกับปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต จึงเลือกการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% ร่วมกับการเติม Flavourzyme® 1000L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18 ชั่วโมง ไว้ทดลองต่อไป

4.3.3.3 การใช้กากถั่วเหลือง

การเติมกากถั่วเหลืองและเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ในช่วงการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ โดยแปรปริมาณของกากถั่วเหลืองเป็น 0, 10 และ 20%(w/v) ปริมาณเอนไซม์ 0, 1 และ 2%(v/v) ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18, 20 และ 24 ชั่วโมง วัดปริมาณของออโตไลเสท ปริมาณโปรตีนและปริมาณคาร์โบไฮเดรต ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.17

การเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% โดยไม่เติมกากถั่วเหลืองจะทำให้ปริมาณออโตไลเสทเพิ่มขึ้นเป็น 64.65-65.93% ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 5.74-9.94 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้นเป็น 5.20-9.44 mg./ml. ส่วนการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% จะมีปริมาณโปรตีน 5.60-7.31 mg./ml. และปริมาณออโตไลเสท 66.90-67.74% ซึ่งจะไม่แตกต่างจากการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ($p \leq 0.05$) ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรต มีค่า 9.36-11.91 mg./ml. ซึ่งสูงกว่าการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1%

จากการทดลองการเติมกากถั่วเหลือง โดยไม่มีการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L จะทำให้ปริมาณของออโตไลเสทลดลง เพราะกากถั่วเหลืองจะทำให้ปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายมากขึ้นและมากกว่าของแข็งในส่วนที่ละลายได้มาก เมื่อคำนวณหาปริมาณออโตไลเสทจึงทำให้ค่าที่ได้ลดลงจาก 32.16-35.11% เป็น 13.80-16.41% แต่ปริมาณของโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 4.12-4.70 mg./ml. เป็น 4.53-9.69 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรตจะเพิ่มขึ้นจาก 0.82-1.00 mg./ml. เป็น 2.52-3.80 mg./ml. โดยปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นมาจากกากถั่วเหลืองที่เติมถูกย่อยโดยเอนไซม์ในช่วงการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

การเติมกากถั่วเหลืองร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ทำให้ปริมาณออโตไลเสท ปริมาณโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น โดยการเติมกากถั่วเหลือง 10% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18-24 ชั่วโมง จะให้ปริมาณออโตไลเสท 50.69-53.60% ปริมาณโปรตีน 6.63-8.23 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรต 8.33-9.35 mg./ml. การเติมกากถั่วเหลือง 10% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% จะให้ปริมาณออโตไลเสท 58.68-62.19% ซึ่งสูงกว่าการเติมกากถั่วเหลือง 10% ร่วมกับ Flavourzyme® 1000L 1% ส่วนปริมาณโปรตีนเป็น 6.88-7.75 mg./ml. และปริมาณคาร์โบไฮเดรต 8.43-10.41 mg./ml. ค่าของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ได้จะไม่แตกต่างจากการเติมกากถั่วเหลือง 10% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ที่ระยะเวลาการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 18-24 ชั่วโมง ($p \leq 0.05$)

เมื่อเติมกากถั่วเหลือง 20%ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18-24 ชั่วโมง ปริมาณออโตไลเสทจะลดลงเป็น 47.92-57.20% ส่วนปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้นเป็น 9.21-10.44 mg./ml. และปริมาณคาร์โบไฮเดรตเป็น 6.95-9.06 mg./ml. การเติมกากถั่วเหลือง 20% ร่วมกับการเติม Flavourzyme® 1000L 2% ที่ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18-24 ชั่วโมงจะให้ปริมาณออโตไลเสท 47.85-54.29% ปริมาณโปรตีน 9.58-10.09 mg./ml. และปริมาณคาร์โบไฮเดรต 7.04-8.84 mg./ml. ซึ่งปริมาณโปรตีน ปริมาณออโตไลเสท และคาร์โบไฮเดรตที่ได้ จะไม่แตกต่าง

จากการเติมกากถั่วเหลือง 20% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ที่ระยะเวลาการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18-24 ชั่วโมง ($p \leq 0.05$)

ในการเติมกากถั่วเหลืองร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ที่ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ทั้ง 3 ระดับ พบว่าปริมาณออโตไลเสทที่ได้จะน้อยกว่าการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L โดยไม่มีการเติมกากถั่วเหลือง

ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณออโตไลเสท ปริมาณโปรตีน และปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ได้เพิ่มขึ้น แต่จะเพิ่มขึ้นไม่มาก และเมื่อเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์มากขึ้นปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตจะลดลง

จากการทดลองเติมกากถั่วเหลืองร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ออโตไลเสท เมื่อวิเคราะห์ผลทางเคมีได้คัดเลือกชุดการทดลอง 5 ชุดได้แก่ การเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 24 ชั่วโมง การเติมกากถั่วเหลืองปริมาณ 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18 ชั่วโมง การเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 20 ชั่วโมง การเติมกากถั่วเหลืองปริมาณ 10% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18 ชั่วโมง และการเติมกากถั่วเหลืองปริมาณ 20% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18 ชั่วโมง ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ผลการทดสอบเป็นดังตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.17 การเติมกากถั่วเหลือง (SBM) ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

Enzyme (%)	SBM (%)	Time (hrs)	Autolysate (%)	Protein (mg./ml.)	Carbohydrate (mg./ml.)
0	0	18	32.66 ± 1.26^{j}	4.70 ± 0.28^{ijkl}	$0.99 \pm 0.13^{i.}$
0	0	20	32.16 ± 0.42^{j}	4.12 ± 0.11^{l}	$0.82 \pm 0.26^{i.}$
0	0	24	$35.11 \pm 1.49^{i.}$	4.27 ± 0.47^{kl}	$0.96 \pm 0.50^{i.}$
0	10	18	14.31 ± 0.26^{kl}	5.61 ± 1.09^{ghijk}	2.67 ± 0.20^{hi}
0	10	20	14.12 ± 0.89^{kl}	4.53 ± 0.40^{jkl}	2.52 ± 0.50^{hi}
0	10	24	16.41 ± 0.36^{l}	5.18 ± 0.62^{hijkl}	3.15 ± 1.15^{h}
0	20	18	14.42 ± 1.73^{kl}	6.02 ± 0.18^{efghi}	3.80 ± 1.14^{gh}
0	20	20	15.29 ± 1.09^{kl}	7.36 ± 0.90^{cde}	3.68 ± 0.46^{gh}
0	20	24	13.80 ± 1.87^{l}	9.69 ± 0.57^{a}	2.74 ± 0.59^{hi}
1	0	18	65.51 ± 1.81^{ab}	5.74 ± 0.42^{fghij}	5.20 ± 0.62^{fg}
1	0	20	64.65 ± 0.14^{b}	5.79 ± 0.24^{fghij}	9.44 ± 0.65^{b}
1	0	24	65.93 ± 0.22^{ab}	9.94 ± 0.11^{a}	8.64 ± 0.23^{bcd}

1	10	18	50.69 ± 0.57^{g}	7.12 ± 0.88^{cdef}	9.35 ± 0.82^{b}
1	10	20	53.60 ± 0.29^{f}	6.63 ± 0.91^{defgh}	8.33 ± 1.40^{bcd}
1	10	24	53.53 ± 1.62^{f}	8.23 ± 0.32^{bc}	8.95 ± 0.12^{bcd}
1	20	18	48.71 ± 0.58^{gh}	9.87 ± 0.64^{a}	9.06 ± 0.22^{bc}
1	20	20	47.92 ± 0.27^{h}	9.21 ± 0.22^{ab}	6.95 ± 0.50^{def}
1	20	24	57.20 ± 0.18^{e}	10.44 ± 0.16^{a}	7.07 ± 0.63^{cdef}
2	0	18	66.95 ± 0.74^{ab}	5.59 ± 0.84^{ghijk}	9.36 ± 0.99^{b}
2	0	20	67.74 ± 0.86^{a}	6.58 ± 0.40^{defgh}	11.91 ± 0.57^{a}
2	0	24	66.90 ± 1.26^{ab}	7.31 ± 0.32^{cde}	9.82 ± 0.15^{b}
2	10	18	58.68 ± 0.64^{de}	7.75 ± 1.03^{cde}	10.41 ± 1.87^{ab}
2	10	20	62.19 ± 0.80^{c}	7.72 ± 0.48^{cd}	8.43 ± 1.69^{bcd}
2	10	24	59.54 ± 1.97^{d}	6.88 ± 0.16^{cdefg}	9.66 ± 1.85^{b}
2	20	18	48.50 ± 0.58^{gh}	9.58 ± 0.83^{a}	7.32 ± 0.56^{cde}
2	20	20	47.85 ± 1.03^{h}	10.09 ± 1.28^{a}	7.04 ± 1.02^{def}
2	20	24	54.29 ± 0.78^{f}	9.92 ± 0.51^{a}	8.84 ± 0.42^{bcd}

a, b, c,… ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.18 ค่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท ที่เติม กากถั่วเหลืองร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L

ชุดการทดลอง	ค่าการทดสอบ
เติม Flavourzyme® 1000L 1% เวลา 24 ชั่วโมง	6.72 ± 0.98^{c}
กากถั่วเหลือง 20% Flavourzyme® 1000L 1% เวลา 18 ชั่วโมง	8.11 ± 0.52^{a}
เติม Flavourzyme® 1000L 2% เวลา 20 ชั่วโมง	7.50 ± 0.69^{b}
เติมกากถั่วเหลือง 10% Flavourzyme® 1000L 2% เวลา 18 ชั่วโมง	7.49 ± 0.55^{b}
เติมกากถั่วเหลือง 20% Flavourzyme® 1000L 2% เวลา 18 ชั่วโมง	7.64 ± 0.95^{b}

เมื่อ : ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 2 ซ้ำโดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน

ค่าการทดสอบเป็นคะแนนด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท

(โดย 0= ไม่มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อ และ10= มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อที่สุด)

a,b,c ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท ชุดการทดลองที่ให้ค่าการทดสอบสูงที่สุดได้แก่ การเติมกากถั่วเหลือง 20% Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18 ชั่วโมง ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาร่วมกับปริมาณ ออโตไลเสท โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต จึงเลือกการเติมกากถั่วเหลือง 20% ร่วมกับการเติม Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18 ชั่วโมง ไว้ทดลองต่อไป

4.3.4 การเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ Neutrase® 0.5L และ Flavourzyme® 1000L ร่วมกับโปรตีนพืชในการปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท

การเติมโปรตีนพืช 3 ชนิด ได้แก่ กลูเต็นจากข้าวสาลี โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และกากถั่วเหลืองร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L และเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ในช่วงการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ สามารถเพิ่มปริมาณของออโตไลเสท ปริมาณโปรตีนและปริมาณคาร์โบไฮเดรต ซึ่งมีผลต่อการปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท

จากการทดลองเติมโปรตีนพืชและเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ที่ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ทั้งสามระดับ จะได้ชุดการทดลองที่นำมาทดลองเปรียบเทียบผลการทดลองทางด้านเคมี (ตารางที่ 4.19) และผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ (ตารางที่ 4.20)

การทดสอบเปรียบเทียบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนพืช ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L และ Flavourzyme® 1000L ดังตารางที่ 4.19 จะพบว่าการเติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 20 ชั่วโมง จะให้ปริมาณออโตไลเสท ปริมาณโปรตีน และปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุด คือ 70.72%, 27.53 mg./ml. และ 12.17 mg./ml. โดยปริมาณโปรตีนที่ได้จะไม่แตกต่างจากการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์เป็น 18 ชั่วโมง ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตจะไม่แตกต่างจากการเติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 18 ชั่วโมง ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.19 การเปรียบเทียบผลทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และกากถั่วเหลือง ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L และ Flavourzyme® 1000L

Treatment	Autolysate (%)	Carbohydrate (mg./ml.)	Protein (mg./ml.)
1. None	32.66 ± 1.26^{f}	0.99 ± 0.13^{f}	4.70 ± 0.28^{e}
2. Non protein with Neutrase® 0.5L	42.65 ± 0.61^{e}	1.80 ± 0.63^{f}	5.64 ± 0.79^{e}
3. Gluten with Neutrase® 0.5L	62.74 ± 1.30^{b}	10.55 ± 0.92^{ab}	25.87 ± 0.66^{b}
4. Gluten with Flavourzyme® 1000L	70.72 ± 0.81^{a}	12.17 ± 1.38^{a}	27.53 ± 0.81^{a}
5. Soy protein with Neutrase® 0.5L	52.51 ± 1.02^{c}	7.26 ± 1.07^{cd}	27.16 ± 0.47^{a}
6. Soy protein with Flavourzyme® 1000L	66.93 ± 0.75^{b}	6.46 ± 0.76^{de}	25.97 ± 1.00^{b}
7. Soy bean meal with Neutrase® 0.5L	54.40 ± 1.80^{c}	5.04 ± 0.55^{e}	8.24 ± 0.74^{d}
8. Soy bean meal with Flavourzyme® 1000L	50.56 ± 0.68^{d}	9.15 ± 0.82^{bc}	9.25 ± 0.38^{d}

เมื่อ 1 = 0% โปรตีน, 0% เอนไซม์, ระยะเวลา 18 ชั่วโมง

2 = 0% โปรตีน, 1% Neutrase® 0.5L , ระยะเวลา 18 ชั่วโมง

3 = 10% กลูเต็นข้าวสาลี, 2% Neutrase® 0.5L, ระยะเวลา 18 ชั่วโมง

4 = 10% กลูเต็นข้าวสาลี, 1% Flavourzyme® 1000L, ระยะเวลา 20 ชั่วโมง

5 = 20% โปรตีนถั่วเหลืองสกัด, 2% Neutrase® 0.5L, ระยะเวลา 18 ชั่วโมง

6 = 20% โปรตีนถั่วเหลืองสกัด, 2% Flavourzyme® 1000L, ระยะเวลา 18 ชั่วโมง

7 = 20% กากถั่วเหลือง, 1% Neutrase® 0.5L, ระยะเวลา 20 ชั่วโมง

8 = 20% กากถั่วเหลือง, 1% Flavourzyme ®1000L, ระยะเวลา 18 ชั่วโมง

a,b,c,... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.20 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทที่เติม กลูเต็นข้าวสาลี โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และกากถั่วเหลือง ร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L และ Flavourzyme® 1000L

ชุดการทดลอง	ค่าการทดสอบ
1. None	5.44 ± 1.46^{d}
2. Non protein with Neutrase® 0.5L	6.84 ± 1.73^{c}
3. Gluten with Neutrase® 0.5L	7.20 ± 1.38^{bc}
4. Gluten with Flavourzyme® 1000L	7.88 ± 0.72^{ab}
5. Soy protein with Neutrase® 0.5L	8.54 ± 0.78^{a}
6. Soy protein with Flavourzyme® 1000L	7.90 ± 0.77^{ab}
7. Soy bean meal with Neutrase® 0.5L	7.79 ± 0.90^{ab}
8. Soy bean meal with Flavourzyme® 1000L	8.11 ± 0.52^{a}

เมื่อ : ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 2 ซ้ำโดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน
ค่าการทดสอบเป็นคะแนนด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท
(โดย 0= ไม่มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อ และ10= มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อที่สุด)

1 = 0% โปรตีน, 0% เอนไซม์, ระยะเวลา 18 ชั่วโมง

2 = 0% โปรตีน, 1% Neutrase® 0.5L , ระยะเวลา 18 ชั่วโมง

3 = 10% กลูเต็นข้าวสาลี, 2% Neutrase® 0.5L, ระยะเวลา 18 ชั่วโมง

4 = 10% กลูเต็นข้าวสาลี, 1% Flavourzyme® 1000L, ระยะเวลา 20 ชั่วโมง

5 = 20% โปรตีนถั่วเหลืองสกัด, 2% Neutrase® 0.5L, ระยะเวลา 18 ชั่วโมง

6 = 20% โปรตีนถั่วเหลืองสกัด, 2% Flavourzyme® 1000L, ระยะเวลา 18 ชั่วโมง

7 = 20% กากถั่วเหลือง, 1% Neutrase® 0.5L, ระยะเวลา 20 ชั่วโมง

8 = 20% กากถั่วเหลือง, 1% Flavourzyme® 1000L, ระยะเวลา 18 ชั่วโมง

a,b,c,d ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อจะพบว่า ยีสต์ออโตไลเสท 5 ชุดการทดลอง ได้แก่ ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลา 20 ชั่วโมง ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% เอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% ระยะเวลา 18 ชั่วโมง ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% เอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% ระยะเวลา 18 ชั่วโมง ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง 20% เอนไซม์ Neutrase® 0.5L 1% ระยะเวลา 20 ชั่วโมง และยีสต์ออโตไลเสทที่เติม

กากถั่วเหลือง 20% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลา 18 ชั่วโมง จะมีค่าการทดสอบที่สูงที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบทางด้านเคมีร่วมกับผลการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทที่ได้ จึงเลือกชุดการทดลองที่ให้ผลการทดสอบทางเคมีและผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสสูงที่สุด คือ ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 20 ชั่วโมง ไว้ทดลองต่อไป

4.4 การเพิ่มปริมาณ 5'-นิวคลีโอไทด์ในยีสต์ออโตไลเสท

4.4.1 ปริมาณ RNA ของยีสต์ออโตไลเสท

จากที่ทราบกันว่ายีสต์เป็นแหล่งของกรดนิวคลีอิกที่สำคัญ เนื่องจากยีสต์จะมีกรดนิวคลีอิก ประมาณ 8-15% ดังนั้นในกระบวนการผลิตยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสทจะได้กรดนิวคลีอิกผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์ด้วย

RNA เป็นสารตั้งต้นของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ การย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ phosphodiesterase จะได้สารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ซึ่งสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์นี้มีสมบัติเป็นสารเพิ่มกลิ่นรสอาหาร

การสกัด RNA สามารถทำได้โดย ปรับ pH ของยีสต์ออโตไลเสทเป็น 6.5 ให้ความร้อนที่ 90°C เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง วัดปริมาณของ RNA ตามวิธีของ Herbert และคณะ (1971) ผลเป็นดังตารางที่ 4.21

ตารางที่ 4.21 ปริมาณของ RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนพืชและไม่เติมโปรตีนพืช

ชุดทดลอง	RNA (mg./ml.)[ns]
ยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช	10.18 ± 0.25
ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี	10.19 ± 0.42
ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง	10.22 ± 0.35

เมื่อ : ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

[ns] ค่าเฉลี่ยที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.21 จะพบว่าปริมาณ RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี ยีสต์ ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง และยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืชจะมีค่าประมาณ 10.18-10.22 mg./ml. ซึ่งค่าที่ได้จะ

ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และจากการทดลองสามารถบอกได้ว่าปริมาณ RNA ที่วัดได้เป็น RNA ที่สกัดได้จากยีสต์

4.4.2 การย่อยสลาย RNA ในยีสต์ออโตไลเสท

5'-Phosphodiesterase RP®-1 (PDE) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย RNA ให้เป็นสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีสมบัติเป็นสารเพิ่มกลิ่นรสอาหาร จากการทดลองแปรปริมาณ PDE เป็น 0.2, 0.5 และ 1.0%(w/v) ลงในยีสต์ออโตไลเสทที่ผ่านการสกัด RNA ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 65°C ระยะเวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง ปริมาณ RNA ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี หรือกากถั่วเหลือง เมื่อผ่านการเติมเอนไซม์ PDE จากการวิเคราะห์ทางสถิติจะพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมกันของปริมาณ PDE อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ ต่อการย่อยสลาย RNA ในยีสต์ออโตไลเสท แต่จะพบอิทธิพลร่วมของปริมาณ PDE และอุณหภูมิต่อการย่อยสลาย RNA และอิทธิพลของอุณหภูมิและระยะเวลาต่อการย่อยสลาย RNA

การเติมเอนไซม์ PDE และอุณหภูมิต่อการย่อยสลาย RNA ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติม กลูเต็นข้าวสาลีจะเป็นดังตารางที่ 4.22

ตารางที่ 4.22 ปริมาณ RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี เมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ PDE ปริมาณ 0.2, 0.5 และ 1.0% ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 65°C ระยะเวลา 2, 4 และ 6ชั่วโมง

PDE (%)	Temp. (°C)	RNA (mg/ml)
0.2	45	8.58 ± 1.10^{a}
	55	2.25 ± 0.31^{e}
	65	3.31 ± 0.34^{d}
0.5	45	6.76 ± 0.46^{b}
	55	2.11 ± 0.09^{e}
	65	2.30 ± 0.12^{e}
1.0	45	6.02 ± 0.94^{c}
	55	2.53 ± 0.33^{e}
	65	2.64 ± 0.32^{e}

a,b,c ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.22 จะพบว่าปริมาณ PDE และอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจะมีผลต่อการย่อยสลาย RNA เมื่อปริมาณ PDE และอุณหภูมิสูงขึ้นจะย่อยสลาย RNA ได้มากขึ้น ทำให้ปริมาณ RNA ที่วัดได้ลดลง

การเติมเอนไซม์ PDE ที่ระดับ 0.2, 0.5 และ 1.0% และอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 45°C เป็น 55°C จะมีการย่อยสลาย RNA สูงขึ้น การเติม PDE 0.2, 0.5 และ 1.0% ที่อุณหภูมิ 55°C จะมีการย่อยสลาย RNA ไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% การเติมเอนไซม์ PDE 0.2% อุณหภูมิ 55°C จะเหมาะสมต่อการย่อยสลาย RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี

การเติมเอนไซม์ PDE ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ ต่อการย่อยสลาย RNA ของยีสต์ ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีจะเป็นดังตารางที่ 4.23

ตารางที่ 4.23 ปริมาณ RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี เมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ PDE ปริมาณ 0.2, 0.5 และ 1.0% ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 65°C ระยะเวลา 2, 4 และ 6ชั่วโมง

Temp.(°C)	Time (hrs.)	RNA (mg/ml)
45	2	7.94 ± 1.38^{a}
	4	7.09 ± 1.20^{ab}
	6	6.32 ± 1.23^{b}
55	2	2.54 ± 0.37^{c}
	4	2.27 ± 0.19^{c}
	6	2.07 ± 0.11^{c}
65	2	3.00 ± 0.55^{c}
	4	2.76 ± 0.52^{c}
	6	2.49 ± 0.38^{c}

a,b,c ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 4.23 จะพบว่าการเติมเอนไซม์ PDE ที่อุณหภูมิ 45°C ระยะเวลา 2-6 ชั่วโมงจะย่อยสลาย RNA ได้น้อยกว่าการเติม PDE ที่อุณหภูมิ 55°C และ 65°C ระยะเวลา 2-6 ชั่วโมง ดังนั้นจากการทดลองจะพบว่าการเติม PDE ที่อุณหภูมิ 55°C ระยะเวลา 2 ชั่วโมง จะเหมาะสมต่อการย่อยสลาย RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี

การทดลองเติมเอนไซม์ PDE และอุณหภูมิต่อการย่อยสลาย RNA ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองจะเป็นดังตารางที่ 4.24

ตารางที่ 4.24 ปริมาณ RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง เมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ PDE ปริมาณ 0.2, 0.5 และ 1.0% ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 65°C ระยะเวลา 2, 4 และ 6ชั่วโมง

PDE (%)	Temp. (°C)	RNA (mg/ml)
0.2	45	8.63 ± 1.35^{a}
	55	2.26 ± 0.09^{d}
	65	3.13 ± 0.24^{c}
0.5	45	6.43 ± 0.69^{b}
	55	2.12 ± 0.23^{d}
	65	2.53 ± 0.29^{cd}
1.0	45	5.97 ± 1.10^{b}
	55	2.39 ± 0.16^{cd}
	65	2.71 ± 0.17^{cd}

a,b,c,d ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.24 จะพบว่าปริมาณ PDE และอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจะมีผลต่อการย่อยสลาย RNA เมื่อปริมาณ PDE และอุณหภูมิสูงขึ้นจะย่อยสลาย RNA ได้มากขึ้น ทำให้ปริมาณ RNA ที่วัดได้ลดลง

การเติมเอนไซม์ PDE ที่ระดับ 0.2, 0.5 และ 1.0% และอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 45°C เป็น 55°C จะมีการย่อยสลาย RNA สูงขึ้น การเติม PDE 0.2, 0.5 และ 1.0% อุณหภูมิ 55°C การย่อยสลาย RNA ไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% การเติมเอนไซม์ PDE 0.2% อุณหภูมิ 55°C จะเหมาะสมต่อการย่อยสลาย RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง เช่นเดียวกับยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี

การเติมเอนไซม์ PDE ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ ต่อการย่อยสลาย RNA ของยีสต์ ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองจะเป็นดังตารางที่ 4.25

ตารางที่ 4.25 ปริมาณ RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง เมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ PDE ปริมาณ 0.2, 0.5 และ 1.0% ที่อุณหภูมิ 45, 55 และ 65°C ระยะเวลา 2, 4 และ 6ชั่วโมง

Temp.(°C)	Time (hrs.)	RNA (mg/ml)
45	2	7.75 ± 1.26^{a}
	4	7.21 ± 1.89^{a}
	6	6.07 ± 1.20^{b}
55	2	2.46 ± 0.11^{c}
	4	2.29 ± 0.95^{c}
	6	2.12 ± 0.13^{c}
65	2	3.03 ± 0.28^{c}
	4	2.77 ± 0.32^{c}
	6	2.56 ± 0.28^{c}

a,b,c ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.25 จะพบว่าการเติมเอนไซม์ PDE ที่อุณหภูมิ 45°C ระยะเวลา 2-6 ชั่วโมงจะย่อยสลาย RNA ได้น้อยกว่าการเติม PDE ที่อุณหภูมิ 55°C และ 65°C ระยะเวลา 2-6 ชั่วโมง ดังนั้นจากการทดลองจะพบว่าการเติม PDE ที่อุณหภูมิ 55°C ระยะเวลา 2 ชั่วโมง จะเหมาะสมต่อการย่อยสลาย RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง

4.4.3 การวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์

จากการทดลองเติมเอนไซม์ PDE ปริมาณ 0.2, 0.5 และ 1.0% ที่อุณหภูมิ 55°C เพื่อย่อยสลาย RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลือง เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ที่เกิดขึ้น ได้แก่ 5'-GMP, 5'-AMP และ 5'-IMP ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.26

ตารางที่ 4.26 ปริมาณสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี หรือกากถั่วเหลือง เมื่อเติมเอนไซม์ PDE ปริมาณ 0.2% อุณหภูมิ 55°C ระยะเวลา 2 ชั่วโมง

ยีสต์ออโตไลเสท	ปริมาณสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ (μg./ml.)		
	5'-GMP	5'-AMP	5'-IMP^{ns}
ยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช			

ไม่เติม PDE	12.73 ± 1.90[b]	19.73 ± 13.54[b]	16.86 ± 4.81
เติม PDE	71.07 ± 9.20[a]	365.03 ± 10.37[a]	18.72 ± 1.34
ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี			
ไม่เติม PDE	13.11 ± 0.86[b]	34.40 ± 16.30[b]	22.41 ± 7.20
เติม PDE	71.76 ± 6.44[a]	361.51 ± 56.63[a]	21.60 ± 7.34
ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง			
ไม่เติม PDE	12.62 ± 0.65[b]	34.67 ± 8.14[b]	11.27 ± 4.94
เติม PDE	67.40 ± 4.17[a]	416.06 ± 29.73[a]	10.97 ± 6.02

[ns] ค่าเฉลี่ยที่มีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

a,b ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.26 จะพบว่าเมื่อเติมเอนไซม์ PDE 0.2% ลงในยีสต์ออโตไลเสท pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 55°C ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ปริมาณของสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ โดยเฉพาะสารประกอบ 5'-GMP และ 5'-AMP จะเพิ่มสูงขึ้นกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมเอนไซม์ PDE ปริมาณของ 5'-GMP จะมีค่า 67.40-71.76 μg/ml. ปริมาณ 5'-AMP 361.51-416.06 μg/ml. โดยจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ทั้งยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี หรือกากถั่วเหลือง และยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช ส่วนปริมาณของ 5'-IMP ในยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมหรือเติมเอนไซม์ PDE จะมีค่าประมาณ 11.00-22.41 μg./ml. ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4. 5 การปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท โดยเติมซิสเตอีน เมทไธโอนีน และไทอามีน

ในการทดลองปรับปรุงกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทโดยใช้ ซิสเตอีน ไทอามีนและเมทไธโอนีน ทำได้โดยใช้ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี 10%(w/v) ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1%(v/v) ระยะเวลาย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 20 ชั่วโมง และยีสต์ ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง 20%(w/v) ร่วมกับ Flavourzyme® 1000L 1%(v/v) ระยะเวลาย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 18 ชั่วโมง ทำเป็นสารละลายเข้มข้น 20 % เติมกลูโคส 1% ปรับ pH เป็น 5.0 ให้ความร้อน 55°C ในภาวะสุญญากาศ จนเข้มข้นเป็น 60% เติมซิสเตอีน และเมทไทโอนีน โดยแปรปริมาณ 0.1, 0.2 และ 0.3 ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้น และเติมไทอามีน ปริมาณ 0.1 และ 0.2 ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้น เก็บที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Gasser, 1972) จากนั้นทำให้ยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้นจนมีปริมาณของแข็งที่ละลาย

ได้ 80° บริกซ์ อบแห้งที่อุณหภูมิ 100°C จนมีความชื้น 3-5% และบดให้เป็นผง เมื่อทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้าน กลิ่นรสคล้ายเนื้อจะให้ผลดังตารางที่ 4.27 และ 4.28

การเติมซิสเตอีน:เมทไธโอนีน:ไทอามีน อัตราส่วน และ 0.3:0.2:0.1 ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้น ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี (ตารางที่ 4.27) จะมีค่าการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อสูงที่สุด รองลงมาคือ 0.2:0.3:0.1, 0.3:0.1:0.2 ($p \leq 0.05$) จึงเลือกการเติม ซิสเตอีน:เมทไธโอนีน:ไทอามีน อัตราส่วน 0.3:0.2:0.1 ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี ร่วมกับ Flavourzyme® 1000L 1%

การเติม ซิสเตอีน:เมทไธโอนีน:ไทอามีน อัตราส่วน 0.1:0.1:0.1, 0.1:0.2:0.2, 0.1:0.3:0.1 และ 0.2:0.1:0.1 ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้น ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง (ตารางที่ 4.28) จะพบว่าจะมีค่าการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อสูงที่สุด และไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จึงเลือกการเติม ซิสเตอีน:เมทไธโอนีน:ไทอามีน อัตราส่วน 0.1:0.1:0.1 ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง 20% ร่วมกับ Flavourzyme® 1000L

ตารางที่ 4.27 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทที่เติม กลูเต็นข้าวสาลี 10% Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 20 ชั่วโมง ร่วมกับการเติมซิสเตอีน เมทไธโอนีน และไทอามีนที่ระดับต่างๆ

ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้น			ค่าการทดสอบ
Cysteine	Methionine	Thiamine	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

0.1	0.1	0.1	7.40 ± 1.05^{bcdef}
0.1	0.1	0.2	6.72 ± 0.61^{h}
0.1	0.2	0.1	7.60 ± 0.68^{bcd}
0.1	0.2	0.2	7.41 ± 0.96^{bcdef}
0.1	0.3	0.1	7.14 ± 0.91^{defgh}
0.1	0.3	0.2	6.88 ± 0.93^{fgh}
0.2	0.1	0.1	7.19 ± 1.19^{defgh}
0.2	0.1	0.2	6.99 ± 1.36^{efgh}
0.2	0.2	0.1	7.34 ± 0.86^{bcdefg}
0.2	0.2	0.2	7.76 ± 0.94^{bc}
0.2	0.3	0.1	7.83 ± 0.82^{b}
0.2	0.3	0.2	7.24 ± 0.78^{cdefgh}
0.3	0.1	0.1	7.15 ± 1.55^{defgh}
0.3	0.1	0.2	7.84 ± 0.72^{b}
0.3	0.2	0.1	8.36 ± 1.46^{a}
0.3	0.2	0.2	7.56 ± 0.79^{bcde}
0.3	0.3	0.1	7.04 ± 0.89^{defgh}
0.3	0.3	0.2	6.78 ± 1.63^{gh}

เมื่อ : ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 2 ซ้ำโดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน
ค่าการทดสอบเป็นคะแนนด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท
(โดย 0= ไม่มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อ และ10= มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อที่สุด)
a,b,c,... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.28 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง 20% Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 18 ชั่วโมง ร่วมกับการเติมซิสเตอีน เมทไธโอนีน และไทอามีนที่ระดับต่างๆ

ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้น			ค่าการทดสอบ
Cysteine	Methionine	Thiamine	

0.1	0.1	0.1	8.50 ± 0.75^{ab}
0.1	0.1	0.2	7.88 ± 0.72^{bcdef}
0.1	0.2	0.1	7.53 ± 0.76^{defghi}
0.1	0.2	0.2	8.56 ± 0.74^{a}
0.1	0.3	0.1	8.04 ± 0.82^{abcde}
0.1	0.3	0.2	7.50 ± 1.33^{efghi}
0.2	0.1	0.1	8.22 ± 0.93^{abcd}
0.2	0.1	0.2	7.79 ± 0.98^{cdef}
0.2	0.2	0.1	7.61 ± 1.26^{cdefgh}
0.2	0.2	0.2	$6.90 \pm 1.08^{i.}$
0.2	0.3	0.1	7.82 ± 1.01^{cdef}
0.2	0.3	0.2	6.98 ± 1.00^{hi}
0.3	0.1	0.1	7.02 ± 1.13^{ghi}
0.3	0.1	0.2	7.34 ± 0.90^{efghi}
0.3	0.2	0.1	7.22 ± 0.93^{fghi}
0.3	0.2	0.2	7.70 ± 0.95^{cdefg}
0.3	0.3	0.1	7.57 ± 0.88^{defghi}
0.3	0.3	0.2	7.27 ± 0.86^{fghi}

เมื่อ : ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 2 ซ้ำโดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน
ค่าการทดสอบเป็นคะแนนด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท
(โดย 0= ไม่มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อ และ10= มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อที่สุด)
a,b,c,... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสทที่ผ่านการปรับปรุงกลิ่นรส

4.6.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสท

องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี และยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ค่าที่ได้เป็นดังตาราง 4.29

ตารางที่ 4.29 องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนพืช

องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ			
	ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี	ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง	ยีสต์ออโตไลเสท[1]	ยีสต์สกัด[2]
ความชื้น	5.76 ± 0.19	5.52 ± 0.60	5.15 ± 0.50	5.4
โปรตีน	64.23 ± 0.65	54.63 ± 0.88	61.65 ± 0.91	58.1
คาร์โบไฮเดรต	24.02 ±1.51	31.52 ± 2.71	28.74 ± 0.63	NR
ไขมัน	0.27 ± 0.03	0.31 ± 0.32	0.29 ± 0.03	NR
เถ้า (ไม่รวมเกลือ)	4.62 ± 0.38	5.52 ± 0.74	3.59 ± 0.19	9.3
เส้นใย	0.21 ± 0.04	0.23 ± 0.09	NR	NR
เกลือ* (NaCl)	0.89 ± 0.12	0.76 ± 0.08	0.58 ± 0.00	1.8
Total nitrogen	10.28 ± 0.10	8.74 ± 0.25	9.86	9.3

เมื่อ : ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

1 = วิวัฒน์ หวังเจริญ (2535) 2 = Niumthanorm (1997)

NR = ไม่ได้รายงานผล

จากตารางที่ 4.29 พบว่ายีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี ร่วมกับ Flavourzyme® 1000L. จะมีปริมาณความชื้น 5.76% โปรตีน 64.23% ไขมัน 0.27% เถ้า 4.62% เส้นใย 0.21% และคาร์โบไฮเดรต 24.02% ส่วนยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์Flavourzyme® 1000L. จะมีปริมาณความชื้น 5.52% โปรตีน 54.63% ไขมัน 0.31% เถ้า 5.52% เส้นใย 0.23% และคาร์โบไฮเดรต 31.52% เมื่อพิจารณาถึงปริมาณของเกลือโซเดียม คลอไรด์จะพบว่ามีปริมาณ 0.89 และ 0.76% ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ออโตไลเสทที่ได้จากการทดลองของ วิวัฒน์ หวังเจริญ (2535) จะพบว่าปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลือง มีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเทียบกับยีสต์สกัดที่ได้ตามวิธีของ Niumthanorm (1997) จะพบว่ามีค่าของเถ้าน้อยกว่า

4.6.2 การวิเคราะห์สารประกอบที่ให้กลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท

จากการทดลองวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L. และยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองร่วมกับเอนไซม์Flavourzyme® 1000L. โดยการสกัดสารประกอบที่ให้กลิ่นรสด้วยวิธี solvent extraction แล้ววิเคราะห์สารประกอบที่ให้กลิ่นรสด้วยเครื่อง gas chromatography ตามวิธีของ Ames และ MacLeod (1985) เปรียบเทียบกับยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสทที่มีจำหน่ายทางการค้า และกลิ่นรสต่างๆ โดยพิจารณาค่า Retention time (RT) และพื้นที่ใต้กราฟ ที่วิเคราะห์ได้

จากตารางที่ 4.30 จะพบว่ายีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวลี หรือกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L จะมีองค์ประกอบของสารประกอบที่ให้กลิ่นรสบางชนิดเหมือนกับยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสทและกลิ่นรสเนื้อสัตว์ที่มีจำหน่ายทางการค้า โดยยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L จะมีสารประกอบที่ให้กลิ่นรสคล้ายกับยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสทที่มีเกลือต่ำทางการค้า ส่วนยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L จะมีสารประกอบที่ให้กลิ่นรสคล้ายกับยีสต์สกัด และกลิ่นรสเนื้อสัตว์ที่มีจำหน่ายทางการค้า แต่ยีสต์ออโตไลเสทที่มีการเติมกลูเต็นข้าวสาลีจะมีสารประกอบที่ให้กลิ่นรสค่อนข้างแตกต่างจากยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง (โครมาโตแกรมสารประกอบให้กลิ่นรสแสดงอยู่ในภาคผนวก ข.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.30. การเปรียบเทียบระยะเวลาของโครมาโตแกรมยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีและกากถั่วเหลือง กับยีสต์ออโตไลเสททางการค้าและกลิ่นรสเนื้อออบ หมู และไก่ที่มีจำหน่ายทางการค้า

ลำดับ	เวลา (นาที)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	2.5	0.0236				0.0142	0.0074	0.0006	0.0376	0.0341		0.0338	0.0402	0.0380	0.0274	0.0126
2	2.6		0.0317	0.0291	0.0280				0.0007		0.0343	0.0006	0.0008			
3	2.8	0.0050			0.0055	0.0034	0.0018					0.0069	0.0076	0.0077	0.0058	
4	2.9		0.0066					0.0128	0.0149	0.0129	0.0084					
5	3.0	0.0093			0.0112	0.0057	0.0028					0.0134	0.0160	0.0140	0.0103	
6	3.1		0.0126	0.0127							0.0129					
7	4.2				0.0998	0.0539	0.0273						0.1411	0.1397	0.1069	
8	4.3		0.1164	0.1017							0.1288	0.1227				
9	5.4		0.0015	0.0016	0.0011						0.0022		0.0017			
10	6.2		0.0033	0.0031	0.0029						0.0030	0.0030				
11	9.2		0.0091	0.0070							0.0066	0.0062				
12	15.7			0.0067								0.0033	0.0038	0.0161		
13	23.8								0.0017					0.0303	0.0120	
14	24.0							0.0012						0.0319	0.0123	
15	25.2				0.0043	0.0076				0.0210			0.0040	0.0295		
16	25.3			0.0019		0.0032					0.0211	0.0020	0.0015	0.0081		
17	28.7			0.0023	0.0013						0.0095			0.0078		
18	28.8			0.0010							0.0123	0.0042				
19	29.1	0.0046		0.0006							0.0019					

ตารางที่ 4.30 (ต่อ)

ลำดับ	เวลา (นาที)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
20	29.6	0.0034							0.0006	0.0260	0.0050				0.0153	
21	29.8	0.0471				0.0020			0.0749					0.0037	0.1339	0.0461
22	30.2											0.0008	0.0919	0.0092		
23	30.9						0.0576				0.0035			0.0117		
24	31.2										0.0014				1.0409	0.0206
25	32.5							0.0004		0.0061				0.0118		0.2169
26	32.6					0.0080				0.0096	0.0139				0.2158	0.0960
27	32.9	0.0017					0.0006			0.0286				0.0042	0.4219	0.0736
28	33.0					0.0055				0.0054	0.0688				0.0489	
29	33.3					0.0094								0.0037	0.0886	
30	33.4										0.0157	0.0045				0.3014
31	34.5					0.0110								0.0208		0.7279
	รวม	7	7	11	8	11	6	4	6	9	17	12	10	17	13	8

ค่าที่อยู่ในตารางแสดงถึงเปอร์เซนต์พื้นที่ใต้กราฟ

1 = Chicken flavor snack

2 = Yeast extract (BBL)

3 = Dry autolysed yeast 2000 powder without salt

4 = Yeast extract (Merck)

5 = Protibel yeast extract

6 = Maxacrome yeast extract (Gistbrocades)

7 = Yeast extract standard 36 powder

8 = Vegamite concentrated yeast extract

9 = Baker's yeast extract

10 = ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี

11 = Dry food yeast spray dried VS2000

12 = Springarom roasted meat flavour

13 = ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง

14 = Vegetarian chicken flavor

15 = Pork flavor

4.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน

จากการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของกรดอะมิโน ที่มีในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme®1000L. และยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L. โดยใช้เครื่อง HPLC ผลเป็นดังตารางที่ 4.31

ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีจะมีปริมาณของกรดกลูตามิค 14.94 g/100g. ซึ่งจะมีปริมาณกลูตามิคมากกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช (วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2535) และยีสต์ออโตไลเสทที่ผลิตได้จากยีสต์ขนมปัง (Thornton, 1992: Suphantharika, Varavinit และ Shobsngob, 1997) ส่วนในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองจะมีปริมาณกรดกลูตามิค 6.28 g/100g. ซึ่งจะสูงกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช

ปริมาณของกรดอะมิโนชนิดอื่นๆที่ตรวจสอบได้ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลืองจะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่จะพบว่ามีปริมาณของกรดอะมิโนค่อนข้างสูงกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของกรดอะมิโนในยีสต์ออโตไลเสทที่เติม กลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลือง จะพบว่ามีปริมาณของกรดอะมิโนค่อนข้างต่ำกว่ายีสต์ ออโตไลเสทที่ผลิตได้จากยีสต์ปฐมภูมิหรือยีสต์ขนมปังที่รายงานผลโดย Thornton (1992) และ Suphantharika และคณะ (1997) (ตารางที่ 4.31)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.31 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี หรือกากถั่วเหลือง

กรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (g./100g.)				
	YAG	YASB	YA[1]	YA[2]	YA[3]
Alanine	2.08	2.21	1.833	4.35	4.87
Arginine	1.96	2.07	1.267	3.20	2.17
Aspartic acid	2.21	2.93	0.801	6.41	6.34
Cysteine	ND	ND	ND	0.68	0.92
Glutamic acid	14.94	6.28	1.599	10.66	8.89
Glycine	1.79	1.58	0.697	2.83	3.03
Histidine	1.16	1.05	0.615	1.37	1.25
Isoleucine *	2.66	2.42	2.157	3.01	2.81
Leucine *	3.88	3.19	3.559	4.37	4.25
Lysine*	1.60	1.78	0.936	4.98	6.09
Methionine *	ND	ND	0.787	0.93	0.87
Phenylalanine*	2.74	1.91	1.676	2.64	2.41
Proline	6.13	3.26	0.687	2.23	2.19
Serine	2.43	2.09	1.896	2.85	2.75
Threonine *	1.73	2.04	1.313	2.96	2.88
Tryptophan *	ND	ND	ND	0.64	ND
Tyrosine	1.91	1.23	1.804	2.29	0.98
Valine *	2.72	2.53	2.224	3.38	3.57

* = กรดอะมิโนจำเป็น ND = ไม่ได้ตรวจวิเคราะห์

YAG = ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี YA[1] = ยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช

YASB = ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง YA[2] = ยีสต์ออโตไลเสท (Thornton, 1992)

YA[3] = ยีสต์สกัด (Suphantharika และคณะ, 1997)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี หรือกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L. เปรียบเทียบกับยีสต์ออโตไลเสท หรือยีสต์สกัดทางการค้า ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.32

ตารางที่ 4.32 ปริมาณจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในยีสต์ออโตไลเสท

ยีสต์ออโตไลเสท	Total plate count (CFU./g.)	ยีสต์และรา (CFU./g.)
ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี	3,300	32
ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง	4,100	40
Dry autolysed yeast 2000 powder without salt[a]	700	<30
Dry food yeast spray dried VS 2000[a]	2,500	<30
Gistex standard AGGL[b]	1,800	<30
Vegamite concentrated yeast extract[c]		
Yeast extract standard 36 powder[a]	5,000	35
Yeast extract[d]	5,000	47
Yeast extract[e]	3,000	<30
	600	30

a = บริษัท Bio-springer

b = บริษัท Gist Brocades

c = บริษัท Kraft Foods Limited

d = บริษัท BBL

e = บริษัท Merck

จากการตรวจสอบปริมาณของแบคทีเรีย ยีสต์ และราที่มีในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลืองจะพบว่ามีปริมาณแบคทีเรีย 3,300 และ 4,100 CFU/g. ตามลำดับ ส่วนปริมาณของยีสต์และราจะเป็น 32 และ 40 CFU/g. ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ ยีสต์ออโตไลเสทหรือยีสต์สกัดที่มีจำหน่ายทางการค้าจะพบว่า มีปริมาณของจุลินทรีย์มากกว่ายีสต์ออโตไลเสทหรือยีสต์สกัดทางการค้าบางชนิด และมีปริมาณจุลินทรีย์น้อยกว่ายีสต์ ออโตไลเสทหรือยีสต์สกัดทางการค้าบางชนิด

4.7 การเติมยีสต์ออโตไลเสทในผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัติ

ในการทดลองเติมยีสต์ออโตไลเสทปริมาณ 1, 2 และ 3% (w/w) ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้น มังสวิรัติ (ภาคผนวก ค.) และทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.33 และ 4.34

ตารางที่ 4.33 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ และความยอมรับของ ผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นมังสวิรัติที่เติมยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี

ปริมาณยีสต์ออโตไลเสท (%)	ค่าการทดสอบ	
	กลิ่นรส	ความยอมรับ
1	6.28 ± 0.87^{b}	5.80 ± 0.67^{c}
2	7.24 ± 0.66^{a}	7.77 ± 0.73^{a}
3	7.52 ± 0.71^{a}	6.44 ± 1.01^{b}

ค่าการทดสอบเป็นคะแนนด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อและความยอมรับด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท

a,b,c ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.34 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ และความยอมรับของ ผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นมังสวิรัติที่เติมยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง

ปริมาณยีสต์ออโตไลเสท (%)	ค่าการทดสอบ	
	กลิ่นรส	ความยอมรับ
1	6.24 ± 0.77^{c}	6.10 ± 0.47^{c}
2	7.11 ± 0.47^{b}	7.46 ± 0.57^{a}
3	7.88 ± 0.65^{a}	6.62 ± 0.77^{b}

ค่าการทดสอบเป็นคะแนนด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อและความยอมรับด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท

a,b,c ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่า การเติมยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี 2.0% ลงในลูกชิ้นมังสวิรัติ จะให้ค่าการทดสอบด้านกลิ่นรสสูงที่สุด และมีค่าการยอมรับมากที่สุด ส่วนการเติมยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง 2.0% ลงในลูกชิ้นมังสวิรัติ จะให้ค่าการทดสอบด้านกลิ่นรสสูงและมีค่าการยอมรับมากที่สุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์วัตถุดิบ

ยีสต์จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ (*Saccharomyces carlsbergensis*) เป็นผลพลอยได้ (by-product) จากกรรมวิธีในการผลิตเบียร์ อยู่ในรูปของ yeast cream หรือ slurry ที่มีปริมาณของแข็งประมาณ 15-20% ในการผลิตเบียร์ยีสต์ที่เหลือจากการหมักจะถูกแยกออกในขั้นสุดท้าย ในรูปของกากเบียร์ซึ่งจัดเป็นของเหลือทิ้ง (waste) จากอุตสาหกรรมเบียร์

การแยกยีสต์จากการผลิตเบียร์สามารถทำได้โดยการตกตะกอนและการเหวี่ยงแยกเซลล์ยีสต์ และยีสต์ที่แยกได้จะต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำประมาณ -15°C เพราะแม้แต่ที่อุณหภูมิ 4°C ยีสต์ยังมีการหายใจ และใช้คาร์โบไฮเดรตอยู่ (Reed และ Nagodawithana,1991)

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* ที่แยกได้จากตะกอนเบียร์จะพบว่ามีปริมาณของโปรตีนอยู่สูง คือ 21.74%(โดยน้ำหนักเปียก) หรือ 60.64% โดยน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 4.1) ซึ่งจะพบว่ามีปริมาณโปรตีนสูงสามารถนำมาผลิตเป็นยีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสคล้ายเนื้อ เนื่องจากในการเกิดกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา Maillard reaction, Strecker degradation และ Thermal degradation ที่มีโปรตีนเป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยา แต่ปริมาณโปรตีนในยีสต์วัตถุดิบที่ได้จะมีค่าต่ำกว่ายีสต์ขนมปังที่มีปริมาณโปรตีนประมาณ 44.93% (Niumthanorm, 1997) หรือ 47% (Reed และ Nagodawithana, 1991) นอกจากนี้ในยีสต์วัตถุดิบยังมีปริมาณไขมันต่ำประมาณ 2.14% ทำให้การย่อยสลายโปรตีนของยีสต์เกิดได้ง่ายขึ้น ทั้งนี้เพราะถ้าหากยีสต์มีปริมาณไขมันสูงไขมันจะรวมตัวกับโปรตีนได้ง่ายและทำให้การย่อยสลายโปรตีนของยีสต์เกิดได้ยาก (Roach และ Gehrke, 1970; วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2535)

5.2 การกำจัดสารประกอบที่ให้รสขม

ปกติยีสต์สกัดที่ได้จากยีสต์ในอุตสาหกรรมเบียร์มักจะมีรสขม เนื่องจากในขั้นตอนการต้มน้ำเวอร์ท (wort) กับฮอพของการผลิตเบียร์ สารประกอบในฮอพ (hop substances) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ให้รสขมจะดูดซับอยู่ที่ผิวเซลล์ยีสต์ โดยสารประกอบในฮอพเหล่านี้ ได้แก่ กรดแอลฟา (α-acid) กรดเบต้า (β-acid) กรดไอโซแอลฟา (iso-α-acid) และฮิวลูโพน (hulupone) ปกติจะอยู่ในรูปเรซิน (resin) ที่ไม่ละลายน้ำในภาวะกรด แต่จะละลายน้ำได้ในภาวะด่าง (Reed and Nagodawithana,1991; McMurrough และ Medigan,1996; Maltz, 1981)

ในการผลิตยีสต์สกัดสารประกอบที่จะมีผลต่อรสขมของผลิตภัณฑ์ คือ กรดแอลฟาและกรดไอโซแอลฟา โดยเฉพาะฮิวมูโลน (humulone) และไอโซฮิวมูโลน (iso-humulone) ซึ่งจะจับกับผนังเซลล์ของยีสต์ โดยกรดไอโซแอลฟาจะเกิดพันธะกับผนังเซลล์อาจเป็นพันธะไฮโดรเจนหรือพันธะเคมีอื่นที่มีแรงอ่อน (weak force) (Lewis และ Young, 1995)

โดยทั่วไปกรดแอลฟาจะมีรสขมน้อยมาก แต่เมื่อต้มฮอพกับน้ำเวอร์ทจะทำให้เกิดการ ไอโซเมอไรเซชั่น ของกรดแอลฟาได้เป็นกรดไอโซแอลฟาซึ่งมีรสขมมาก (Keukeleire และคณะ, 1992)

การศึกษาการใช้สารละลายด่างในการกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมจากฮอพออกจากเซลล์ยีสต์โดยการใช้สารละลายด่างที่ pH สูง สามารถกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมได้มากกว่าการใช้สารละลาย pH ต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบที่ให้รสขมเหล่านี้สามารถละลายได้ในภาวะด่างที่ pH ประมาณ 9 หรือสูงกว่า (Maltz, 1981; Reed และ Nagodawithana, 1991; McMurrough และ Medigan,1996)

การกำจัดสารประกอบที่ให้รสขม โดยล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมคาร์บอเนตจะพบว่าความเข้มข้นของสารละลายด่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาในการล้างยีสต์จะมีผลต่อการกำจัดสารประกอบที่ให้รสขม สารละลายด่างที่ความเข้มข้นสูง อุณหภูมิในการล้างยีสต์ที่สูง และระยะเวลาในการล้างที่นานขึ้น จะสามารถกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมได้มากขึ้น เพราะสามารถทำลายพันธะไฮโดรเจนของสารประกอบฮอพที่ดูดซับบนเซลล์ยีสต์ และอยู่ในรูปที่ละลายได้ จึงสามารถกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมได้ (Dixon และ Leach, 1968) แต่ถ้าระยะเวลาในการล้างยีสต์นานขึ้นเป็น 40 นาที และใช้อุณหภูมิสูงจะทำให้ค่าความขมที่วัดได้เพิ่มสูงขึ้นอีก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารประกอบฮอพเกิดปฏิกิริยากับสารละลายด่างที่ใช้ ได้เป็นเกลือที่มีค่าการละลายต่ำและเกาะติดกับเซลล์ยีสต์เช่นเดิม (Reed และ Nagodawithana, 1991)

ในด้านการสูญเสียของยีสต์ในระหว่างการกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมพบว่า ความเข้มข้นของสาระลายด่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาในการล้างยีสต์จะมีผลต่อการกำจัดสารประกอบที่ให้รสขม สารละลายด่างที่ความเข้มข้นสูง อุณหภูมิในการล้างยีสต์ที่สูง และระยะเวลาในการล้างที่นานขึ้นจะทำให้มีการสูญเสียยีสต์มากขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารละลายด่างที่ใช้จะละลายโปรตีนบางส่วนออกจากเซลล์ยีสต์ได้ และอุณหภูมิที่สูงหรือระยะเวลาในการล้างที่นานขึ้นจะทำให้ยีสต์เกิดการย่อยสลายตัวเองไปบางส่วนแล้ว (Steckley และคณะ, 1979) ค่าการสูญเสียของยีสต์วัดจากน้ำหนักของยีสต์ที่หายไป โดยคาดว่าส่วนที่สูญเสียไปอาจจะเป็นโปรตีนที่ละลายในสารละลายด่างทำให้น้ำหนักของยีสต์ลดลงไป เพราะการใช้สารละลายด่าง เช่น 10N. โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือ 10% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ สามารถใช้สกัดโปรตีนยีสต์ได้ (Maltz, 1981)

ภาวะที่เหมาะสมในการล้างเซลล์ยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อกำจัดรสขม คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2% อุณหภูมิ 50°C ระยะเวลา 20 นาที (ตารางที่ 4.2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dwivedi และ Gibson (1970) ที่รายงานว่าการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิ 50°C จะกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมได้ดี ส่วนภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดสารประกอบให้รสขมโดยการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต คือ ใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 2% อุณหภูมิ 25°C และระยะเวลาในการล้างยีสต์ 20 นาที (ตารางที่ 4.3) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Niumthanorm (1997) แต่ Pyke (1985) ได้รายงานว่าการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิต่ำจะเหมาะสมมากกว่า เนื่องจากจะมีการเปลี่ยนแปลงของยีสต์น้อยกว่าการล้างยีสต์ที่อุณหภูมิสูง

เมื่อเปรียบเทียบการกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมจากฮอพในยีสต์ โดยการล้างยีสต์ด้วยน้ำและสารละลายด่าง พบว่าการล้างยีสต์ด้วยน้ำกลั่นจะสามารถกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมได้ประมาณ 67.6% (ตารางที่ 4.4) ทั้งนี้เป็นเพราะสารประกอบฮอพจะละลายได้ต่ำในภาวะที่เป็นกลางหรือกรด (Reed และ Nagodawithana, 1991) และน้ำกลั่นที่ใช้จะมี pH ประมาณ 5.8-6.7 ซึ่งเป็นภาวะที่เป็นกรดเล็กน้อย จึงกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมจากฮอพออกไปได้น้อย ในขณะที่การล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะลดค่าความขมได้

ประมาณ 96% ส่วนการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตจะลดค่าความขมได้ประมาณ 91% เนื่องจาก pH ของสารละลายจะประมาณ 10-12 ซึ่งอยู่ในภาวะด่างทำให้สารประกอบฮอพละลายได้ดีจึงสามารถแยกออกได้ง่ายกว่าการล้างยีสต์ด้วยน้ำ แต่การล้างยีสต์ด้วยสารละลายด่างจะมีค่าการสูญเสียของยีสต์มากกว่าการล้างยีสต์ด้วยน้ำเพราะสารละลายด่างที่ใช้อาจจะละลายโปรตีนบางส่วนออกจากเซลล์ยีสต์ได้ (Maltz, 1981) และอุณหภูมิที่สูงหรือระยะเวลาในการล้างที่นานขึ้นจะทำให้ยีสต์เกิดการย่อยสลายตัวเองหรือกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในเซลล์ยีสต์ให้ย่อยสลายตัวเอง (Pyke, 1985)

ยีสต์ที่ล้างด้วยสารละลายด่างจนมีค่า bitterness unit ประมาณ 10-16 สามารถนำไปผลิตเป็นยีสต์ออโตไลเสทได้ (Niumthanorm, 1997) สำหรับค่าความขมต่ำสุดที่ผู้บริโภคสามารถรับความรู้สึกได้ (threshold) ของกรดไอโซแอลฟาในฮอพยังไม่มีการรายงาน แต่มีการรายงานค่าความขมที่เป็น threshold ของมนุษย์อยู่ประมาณ 0.0007M.caffeine (Shallenberger, 1993) ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาต่อไป

5.3 การปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทโดยการเติมเอนไซม์จากภายนอกร่วมกับโปรตีนพืชในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

กลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทเกิดจากสาเหตุสามประการใหญ่ๆ คือ การเกิดสารประกอบจากการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ในเซลล์ยีสต์ การรวมตัวของสารต่างๆภายในเซลล์ยีสต์ ขณะที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายตัวเอง และการเกิดสารประกอบจากปฏิกิริยาที่เกิดจากการได้รับความร้อนในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ การทำให้เข้มข้น และการทำแห้งยีสต์ออโตไลเสท ซึ่งส่งผลให้เกิดสารประกอบที่ระเหยได้จำนวนมาก (Nagodawithana, 1995) ปฏิกิริยาที่สำคัญในการเกิดกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท ได้แก่ Maillard reaction, Strecker degradation และ Thermal degradation

สำหรับกระบวนการผลิตยีสต์ออโตไลเสทในการทดลองนี้เริ่มจากเตรียมยีสต์ครีม (yeast cream) หรือ yeast slurry ที่มียีสต์เซลล์ 15%(w/v) จากยีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เติมโปรตีนพืชปริมาณ 0-20% (w/v) และเอนไซม์จากภายนอก 0-2% (v/v) ปรับ pH สารละลายเป็น 5.5 อุณหภูมิเป็น 45°C ระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง นำยีสต์ออโตไลเสทที่ได้มาพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 80°C ลดอุณหภูมิ แยกส่วนของเซลล์ที่ไม่ละลาย (cell debris) ออกโดยการเหวี่ยงแยก จากนั้นนำส่วนของออโตไลเสทที่ได้ไปทำให้เข้มข้นจนมีปริมาณของแข็งเป็น 70-80% แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 100°C จนมีความชื้น 3-5% แล้วบดเป็นผง

ยีสต์ออโตไลเสทสามารถให้กลิ่นรสอาหารคาว (savory flavor) เช่น กลิ่นรสเนื้อ (meaty) และกลิ่นเนยแข็ง (cheesy) เป็นต้น การปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทเพื่อให้มีกลิ่นรสเป็นที่ยอมรับมากยิ่งขึ้น และเพื่อเพิ่มความหลากหลายของกลิ่นรสที่ได้นั้นอาจทำได้โดยวิธีการต่างๆ เช่น การเติมเอนไซม์จากเนื้อวัวเพื่อย่อยสลายยีสต์ออโตไลเสทให้มีกลิ่นเหมือนเนื้อวัว (Gasser, 1972) การเติมโปรตีนพืชไฮโดรไลเสท น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และสารประกอบซัลไฟด์ก่อนให้ความร้อนและทำแห้ง (Poiger และ Huster, 1980) การเติมแอมโมเนียมไบคาร์บอเนตและน้ำตาลกลูโคสลงในยีสต์ ออโตไลเสทก่อนเอ็กซ์ทรูด (Izzo และ Ho,1992) และการเติมโปรตีนอื่นในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ ได้แก่ เวย์ กลูเต็นข้าวโพด กลูเต็นข้าวสาลี กลูเต็นข้าว เลือดอบแห้ง รำข้าวโอ๊ตและรำข้าวสาลี (Hobson และ Anderson, 1995)

ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้วิธีการเติมโปรตีนพืช ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ คือ กลูเต็นข้าวสาลี โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และกากถั่วเหลือง การที่เลือกกลูเต็นข้าวสาลีและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดมาใช้ใน

การทดลอง เนื่องจากกลูเต็นข้าวสาลีและโปรตีนถั่วเหลืองสกัดจะปริมาณโปรตีนสูง คือ 67.86 และ 77.96% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) ซึ่งปริมาณโปรตีนจะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกลิ่นรส ดังนั้นการที่ปริมาณโปรตีนสูงน่าจะทำให้เกิดสารประกอบที่ให้กลิ่นรสได้มาก ส่วนกากถั่วเหลืองจะมีปริมาณโปรตีนที่ไม่สูงมาก คือ 43.09% แต่กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิตโปรตีนพืชไฮโดรไลเสท เพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารและมีราคาถูก (สมชาย ประภาวัต, 2533) จึงเลือกกากถั่วเหลืองมาเป็นแหล่งของโปรตีนพืชที่ใช้ทดลองด้วย

นอกจากนี้ปริมาณของกรดอะมิโนในโปรตีนพืชที่เติมลงในยีสต์ออโตไลเสท (ภาคผนวก ซ.) เป็นองค์ประกอบที่จะส่งผลต่อกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท เพราะกรดอะมิโนโดยเฉพาะกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์ซึ่งสามารถสลายตัวเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสเนื้อ เช่น ไทอาโซล ไทอาโซลีน และโอซาโซล เป็นต้น (รูปที่ 2.7) และกรดกลูตามิคจะมีผลต่อกลิ่นรสของยีสต์ ออโตไลเสท โดยโปรตีนถั่วเหลืองสกัดจะมีปริมาณกรดกลูตามิค 13.56 g/100g. เมทไธโอนีน 1.34 g/100g และซิสเตอีน 1.09 g/100g กากถั่วเหลืองมีกรดกลูตามิค 16.5 g./16 g.N เมทไธโอนีน 1.1 g/16 g.N และซิสเตอีน 0.7 g./16 g.N (Maltz,1981) ส่วนกลูเต็นข้าวสาลีมีปริมาณกรดกลูตามิค เมทไธโอนีน และซิสเตอีน ประมาณ 290, 12 และ 14 โมลของกรดอะมิโนต่อ10^5กรัมโปรตีน ตามลำดับ (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2538) นอกจากนี้กรดอะมิโนไลซีนยังสามารถเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาลได้เป็นสารระเหยที่ให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อวัวได้ (สายสนม ประดิษฐ์ดวง, 2543)

เอนไซม์จากภายนอกที่เลือกใช้ในงานทดลองนี้ ได้แก่ Neutrase® 0.5L และ Flavourzyme® 1000L โดยเอนไซม์ Neutrase® 0.5 L อยู่ในกลุ่ม metallo protease (Zn.) เป็น endo-protease ที่แยกได้จากเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* สามารถทำงานได้ในช่วง pH 5.0-7.5 ที่อุณหภูมิ 40-55°C (Novo Nordisk A/S, 1996) ส่วน Flavourzyme® 1000L เป็น acid protease ที่แยกได้จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* สามารถทำงานได้ในช่วง pH 5.0-7.0 อุณหภูมิ 40-60°C เป็นเอนไซม์ผสมระหว่าง endo-protease และ exo-protease (Novo Nordisk A/S, 1998) เนื่องจากภาวะของการย่อยสลายตัวเองของยีสต์จะอยู่ในช่วง pH 4.0-5.5 ซึ่งอยู่ในช่วงการทำงานของ Flavourzyme® 1000L และ Neutrase® 0.5L อีกทั้งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดยังเป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากเชื้อจุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัติได้ จึงเหมาะสมสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

จากการทดลองเติมโปรตีนพืช ได้แก่ กลูเต็นข้าวสาลี โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และกาก ถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L หรือ Flavourzyme® 1000L ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่ pH 5.5 อุณหภูมิ 45°C จะทำให้ปริมาณออโตไลเสท ปริมาณโปรตีน และปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มสูงขึ้น

การปรับปรุงกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท โดยการเติมโปรตีนพืชและเอนไซม์จากภายนอกในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์นั้น โปรตีนที่เติมลงไปจะช่วยเพิ่มปริมาณ ออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตของยีสต์ออโตไลเสทที่ได้ให้มากขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ที่มีในยีสต์และเอนไซม์ที่เติมจากภายนอกจะย่อยสลายโปรตีนพืชที่เติมลงไปในระหว่างการย่อยสลายเซลล์ยีสต์ด้วย (Hobson และ Anderson, 1995) ในการเกิดกลิ่นรสคล้ายเนื้อนั้นโปรตีนเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท ทั้งนี้เพราะกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทจะเกิดจากปฏิกิริยา Maillard reaction, Strecker degradation และ Thermal degradation ซึ่งจะมีโปรตีนหรือกรดอะมิโนเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญ (Nagodawithana, 1995)

การเติมโปรตีนพืชโดยไม่มีการเติมเอนไซม์จากภายนอกลงไป จะทำให้ปริมาณของ ออโตไลเสทลดลง เช่น การเติมกลูเต็นข้าวสาลีลงในยีสต์ออโตไลเสทโดยไม่เติมเอนไซม์จากภายนอกจะทำให้ปริมาณออโตไล

เสทลดลงจาก 32.16-35.11% เป็น 11.76-25.02% (ตารางที่ 4.6) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโปรตีนพืชที่เติมจะทำให้ปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายมากขึ้น และมากกว่าของแข็งในส่วนที่ละลายได้มาก เมื่อคำนวณปริมาณออโตไลเสทจึงทำให้ค่าที่ได้ลดลง ซึ่งก็คือปริมาณ yield ที่ได้จะลดลง หรืออาจจะเกิดจากการที่เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนมีอยู่จำกัดคือเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในเซลล์ยีสต์เท่านั้น แต่ปริมาณของโปรตีนจะมีทั้งโปรตีนในเซลล์ยีสต์และโปรตีนพืชที่เติมจึงทำให้เกิดภาวะ substrate saturation ส่วนปริมาณของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตจะเพิ่มสูงขึ้น โดยค่าที่เพิ่มขึ้นจะมาจากโปรตีนพืชที่เติมลงไป

การเติมเพียงเอนไซม์ Neutrase® 0.5L หรือ Flavourzyme® 1000L จะทำให้ปริมาณของออโตไลเสท โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น เพราะเอนไซม์ Neutrase® 0.5L และ Flavourzyme® 1000L จะช่วยย่อยสลายเซลล์ยีสต์ทำให้ค่าของปริมาณออโตไลเสท โปรตีนและ คาร์โบไฮเดรตสูงขึ้น และหากเปรียบเทียบระหว่างการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L และ Flavourzyme® 1000L จะพบว่า Flavourzyme® 1000L จะให้ค่าออโตไลเสท โปรตีน และ คาร์โบไฮเดรต สูงกว่าการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L เช่น ในการเติม Neutrase® 0.5L 1.0% ลงในยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืชจะมีปริมาณออโตไลเสท 42.65-50.90% โปรตีน 4.50-5.64 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรต 1.58-3.14 mg./ml. (ตารางที่ 4.6, 4.8 และ 4.10) ส่วนการเติม Flavourzyme® 1000L 1.0% ลงในยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืชจะมีปริมาณออโตไลเสท 64.65-65.93% โปรตีน 5.74-9.94 mg./ml. และคาร์โบไฮเดรต 5.20-9.44 mg./ml. (ตารางที่ 4.12, 4.14 และ 4.16) ซึ่งจะเห็นว่า Flavourzyme® 1000L จะให้ค่าออโตไลเสท โปรตีน และ คาร์โบไฮเดรตสูงกว่าการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L เป็นเอนไซม์ acid protease และเป็นเอนไซม์ผสมระหว่าง endo-protease และ exo-protease (Novo Nordisk A/S, 1998) ซึ่งสามารถทำงานได้ดีในภาวะที่ใช้เนื่องจากภาวะของการย่อยสลายตัวเองของยีสต์จะอยู่ในช่วงที่เป็นกรดเล็กน้อย (pH 5.5) ส่วนเอนไซม์ Neutrase® 0.5L จะเป็น neutral protease (Novo Nordisk A/S, 1996) ที่ทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลาง

เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยที่ผลิตยีสต์ออโตไลเสทโดยการเติมเอนไซม์จากภายนอกในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ จะพบว่าการเติมเอนไซม์จะช่วยให้ปริมาณของ yield ปริมาณโปรตีน และปริมาณคาร์โบไฮเดรตของยีสต์ออโตไลเสทที่ได้เพิ่มสูงขึ้น เช่น การเติมเอนไซม์ ปาเปน 0.1-1.0% (Verduyn และคณะ, 1997; สุพจน์ บุญแรง, 2540) การเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 0.1% (วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2535) และการเติมเอนไซม์ macerate (Belousovaและคณะ,1995)

การเติมโปรตีนพืชร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L หรือ Flavourzyme® 1000L ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์จะทำให้ปริมาณออโตไลเสท ปริมาณโปรตีน และปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มสูงขึ้น เช่น การเติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L 0.1% ปริมาณออโตไลเสทจะเพิ่มขึ้นจาก 32-35% เป็น 56-58% ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 4 mg./ml. เป็น 10-12 mg./ml และคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้นจากประมาณ 1 mg./ml. เป็น 6 mg./ml. (ตารางที่ 4.7) หรือการเติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme®1000L 0.1% ปริมาณออโตไลเสทจะเพิ่มขึ้นเป็น 68-71 ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 18-26 mg./ml และคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้นเป็น 9-11 mg./ml. (ตารางที่ 4.13) โดยปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นมาจากโปรตีนพืชและการทำงานของเอนไซม์ที่เติมลงไปในยีสต์ออโตไลเสท แต่เมื่อระยะ

เวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์มากขึ้นเป็น 24 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนจะลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโปรตีนถูกเอนไซม์ย่อยสลายเกิดเป็นกรดอะมิโนอิสระ ส่วนปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่ลดลงไปอาจเป็นเพราะถูกเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ในเซลล์ยีสต์ ย่อยสลายจนกลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโนหรือโปรตีนได้เป็นสารประกอบอื่นๆ ทำให้ปริมาณโปรตีนและปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วัดได้ลดลงไป

ปริมาณโปรตีนของยีสต์ออโตไลเสทจะมีผลต่อกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท ทั้งนี้เพราะโปรตีนเป็นปัจจัยสำคัญในการเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท (Nagodawithana, 1995) ดังนั้นในการเลือกชุดการทดลองแต่ละชุด เพื่อใช้ทดสอบในด้านประสาทสัมผัสจะให้ความสำคัญกับปริมาณของโปรตีนมากกว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรต และออโตไลเสท นอกจากนี้ในขั้นตอนการทำให้เข้มข้นและการอบแห้งจะสามารถทำให้เกิดสารประกอบที่ให้กลิ่นรสได้ เกณฑ์ในการเลือกชุดการทดลองเพื่อมาทดลองทางด้านประสาทสัมผัสของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนพืชร่วมกับเอนไซม์จากภายนอก จะพิจารณาจากค่าของออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต โดยจะพิจารณาจากปริมาณโปรตีนเป็นหลัก สำหรับปริมาณของคาร์โบไฮเดรตและออโตไลเสทจะให้ความสำคัญรองลงมา คาร์โบไฮเดรตในยีสต์ออโตไลเสทจะเป็นปริมาณผสมของน้ำตาลรีดิวซ์และคาร์โบไฮเดรตส่วนอื่นๆ ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์จัดเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาที่ให้กลิ่นรสเช่นกัน แต่เมื่อพิจารณาหลักๆแล้วโดยดูจากตารางการทดลองเปรียบเทียบการเติมโปรตีนพืชร่วมกับเอนไซม์ภายนอกในด้านเคมีและการทดสอบทางประสาทสัมผัส จะพบว่าชุดการทดลองที่ให้ค่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสสูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ จะมีค่าปริมาณโปรตีนสูงและค่าของโปรตีนแทบจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ด้วย.

เมื่อเปรียบเทียบการเติมโปรตีนพืช ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L หรือ Flavourzyme® 1000L จะพบว่าการเติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 20 ชั่วโมง จะมีปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และ คาร์โบไฮเดรตสูงกว่าการใช้โปรตีนพืชชนิดอื่น (ตารางที่ 4.19) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์ภายในเซลล์ยีสต์สามารถย่อยสลายกลูเต็นข้าวสาลีได้ดี และเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L สามารถย่อยสลายกลูเต็นและเซลล์ยีสต์ได้ดีกว่าเอนไซม์ Neutrase® 0.5L เนื่องจากภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์จะอยู่ในช่วง pH ที่เหมาะสมกับ Flavourzyme® 1000L มากกว่า Neutrase® 0.5L และเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L เป็นเอนไซม์ที่เป็นทั้ง endo-protease และ exo-protease ในขณะที่ Neutrase® 0.5L เป็นเพียง endo-protease (Novo Nordisk A/S, 1996; 1998)

ในด้านของกลิ่นรสคล้ายเนื้อจะพบว่ายีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 20 ชั่วโมง จะมีค่าการทดสอบที่สูงและไม่แตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จากยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% เอนไซม์ Neutrase® 0.5L 2% ระยะเวลา 18 ชั่วโมง ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 20% เอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 2% ระยะเวลา 18 ชั่วโมง ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง 20% เอนไซม์ Neutrase® 0.5L 1% ระยะเวลา 20 ชั่วโมง และยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง 20% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L 1% ระยะเวลา 18 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.20) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาร่วมกับค่าการทดลองด้านปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และ

คาร์โบไฮเดรต จะเห็นว่ามีปริมาณของโปรตีนที่สูงและแทบจะไม่แตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) จึงน่าจะ บ่งบอกได้ว่าปริมาณโปรตีนที่ได้จะเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสท ส่วนในชุดของกากถั่วเหลืองที่ให้ค่าการทดสอบที่สูงแต่มีปริมาณของโปรตีนต่ำ อาจจะเป็นเพราะองค์ประกอบอื่นที่มีในกากถั่วเหลือง เช่น กรดอะมิโนซิสเตอีน ไลซีน และเมทไธโอนีนที่สามารถสลายตัวให้สารประกอบที่มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ในกากถั่วเหลืองที่นำมาใช้มีปริมาณสูง (ภาคผนวก ซ.) จึงทำให้ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง สามารถเกิดสารประกอบที่ให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อได้มาก แม้จะมีค่าของปริมาณโปรตีนต่ำกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือโปรตีนถั่วเหลืองสกัด หรืออาจจะเป็นผลจากปริมาณของคาร์โบไฮเดรตในกากถั่วเหลืองที่มีมากกว่ากลูเต็นข้าวสาลี โดยคาร์โบไฮเดรตในกากถั่วเหลืองจะเป็นพวก galactans, pentosans, sucrose, raffinose และ stachyose (สมชาย ประภาวัติ, 2534) ซึ่งอาจถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและเกิดปฏิกิริยา Maillard reaction ได้เป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อในผลิตภัณฑ์

5.4 การเพิ่มปริมาณสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ในยีสต์ออโตไลเสท

ยีสต์เป็นแหล่งของกรดนิวคลีอิก เนื่องจากยีสต์จะมีปริมาณกรดนิวคลีอิกประมาณ 8-15% ของไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ในยีสต์ โดยที่พบมากที่สุดจะได้แก่กรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid ; RNA) (Reed และ Nagodawithana, 1991) การย่อยสลายของกรดนิวคลีอิกจะเกิดในภาวะที่มีเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) โดยเฉพาะเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย RNA ของยีสต์ สารประกอบที่สำคัญที่ได้จากการย่อยสลาย RNA ของยีสต์ได้แก่ 5'-GMP (Guanosine-5'-monophosphate), 5'-IMP (Inosine-5'-monophosphate) และ 5'-AMP (Adenosine-5'-monophosphate) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ช่วยเสริมกับกรดกลูตามิกในการเพิ่มกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์อาหาร โดยจะทำให้เกิดรสชาติที่เรียกว่า "umami" โดยเฉพาะสารประกอบ 5'-IMP และ 5'-GMP โดยที่สารประกอบ 5'-GMP จะมีสมบัติในการเป็นสารเพิ่มกลิ่นรสอาหารสูงที่สุด (Nagodawithana, 1994) จึงมีการนำสารประกอบนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการย่อยสลาย RNA ของยีสต์มาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารแทนการใช้ผงชูรส (MSG) (Nagodawithana, 1992)

ในการเพิ่มสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ในยีสต์ออโตไลเสทจะเริ่มจากการสกัด RNA ในยีสต์ออกมาสู่สารละลายภายนอกด้วยการให้ความร้อนต่อสารละลายยีสต์ 90°C เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ที่ pH 6.5 เพื่อให้ทำลายเซลล์ยีสต์อย่างสมบูรณ์และปลดปล่อย RNA ออกมาสู่สารละลายภายนอก โดยภาวะนี้จะทำลายเอนไซม์นิวคลีเอสที่มีในยีสต์ด้วย (Reed และ Nagodawithana, 1991; Nagodawithana, 1992) เพื่อไม่ให้เอนไซม์นิวคลีเอสเปลี่ยน RNA เป็นสารประกอบ 2'-นิวคลีโอไทด์ และ 3'-นิวคลีโอไทด์ ที่ไม่มีผลเป็นสารเพิ่มรสชาติอาหาร ทำให้ RNA ที่มีในยีสต์สามารถเปลี่ยนเป็นสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ ที่เป็นสารเพิ่มรสชาติอาหารได้มากที่สุด เมื่อมีการเติมเอนไซม์ PDE จากการทดลองจะพบว่าปริมาณ RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่ผ่านการสกัด RNA มีประมาณ 10.15-10.45 mg./ml. และเมื่อทดลองทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบปริมาณ RNA อีกครั้งพบว่าปริมาณของ RNA ไม่แตกต่างจากในช่วงแรก แสดงว่าเอนไซม์นิวคลีเอสที่มีอยู่ในยีสต์ถูกทำลายด้วยความร้อนหมดแล้ว (ตารางที่ ฉ3)

ปริมาณ RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง และยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืชจะมีค่าประมาณ 10.18-10.22 mg./ml. (ตารางที่ 4.21) ซึ่งค่าที่ได้จะไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และจากการทดลองสามารถบอกได้ว่าปริมาณ RNA ที่วัดได้เป็น RNA ที่สกัดได้จากยีสต์

เมื่อเติมเอนไซม์ 5'-phosphodiesterase RP®-1 (PDE) เพื่อย่อยสลาย RNA เป็นสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ พบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมกันของปริมาณ PDE อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ต่อการย่อยสลาย RNA ในยีสต์ออโตไลเสท (ตารางที่ ฉ1 และ ฉ2) แต่จะพบอิทธิพลร่วมของปริมาณ PDE และอุณหภูมิต่อการย่อยสลาย RNA และอิทธิพลของอุณหภูมิและระยะเวลาต่อการย่อยสลาย RNA

ปริมาณ PDE และอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจะมีผลต่อการย่อยสลาย RNA เมื่อปริมาณ PDE และอุณหภูมิสูงขึ้นจะย่อยสลาย RNA ได้มากขึ้น ทำให้ปริมาณ RNA ที่วัดได้ลดลง โดยปริมาณเอนไซม์ PDE 0.2, 0.5 และ 1.0% ที่อุณหภูมิ 55°C จะสามารถย่อยสลาย RNA ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.22 และ 4.24) อาจจะเป็นไปได้ที่ว่าที่ pH 6.5 และอุณหภูมิ 55°C ที่ใช้ในการทดลองเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ PDE จึงทำให้ปริมาณของเอนไซม์ PDE ที่ใช้ในระดับต่างๆไม่มีผลต่อการย่อยสลาย RNA มากนัก หรือปริมาณ RNA ที่มีในยีสต์ออโตไลเสทมีปริมาณน้อยหรือค่า specific activity ของ PDE มีค่าสูง

เมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการย่อยสลาย RNA เมื่อเติม PDE ในยีสต์ออโตไลเสท จะพบว่าที่อุณหภูมิ 55°C และ 65°C ระยะเวลา 2,4 และ 6 ชั่วโมง เอนไซม์ PDE สามารถย่อยสลาย RNA ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.23 และ 4.25) อาจเป็นเพราะที่อุณหภูมิสูง PDE สามารถทำงานได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ หรือปริมาณ RNA ที่มีในยีสต์ออโตไลเสทมีปริมาณน้อยหรือค่า specific activity ของ PDE มีค่าสูง ระยะเวลาเพียง 2 ชั่วโมง ก็เพียงพอต่อการย่อยสลาย RNA ในยีสต์ออโตไลเสทแล้ว

เมื่อเติมเอนไซม์ PDE 0.2% ลงในยีสต์ออโตไลเสท pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 55°C ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ปริมาณของสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ โดยเฉพาะสารประกอบ 5'-GMP และ 5'-AMP จะเพิ่มสูงขึ้นกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมเอนไซม์ PDE ปริมาณของ 5'-GMP จะมีค่า 67.40-71.76 μg/ml. ปริมาณ 5'-AMP 361.51-416.06 μg/ml. โดยจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ทั้งยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลือง และยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช ส่วนปริมาณของ 5'-IMP ในยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมหรือเติมเอนไซม์ PDE จะมีค่าประมาณ 10.97-22.41 μg./ml. ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เป็นเพราะสารประกอบ 5'-IMP จะได้มาจากการเปลี่ยนสารประกอบ 5'-AMP ด้วยเอนไซม์ adenyl deaminase (Reed และ Nagodawithana, 1991; Nagodawithana, 1992) แต่ในการทดลองนี้ไม่ได้เติมเอนไซม์ชนิดนี้ จึงไม่มีการเพิ่มขึ้นของสารประกอบ 5'-IMP

5.5 การปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทโดยการเติมซิสเตอีน เมทไธโอนีน และไทอามีน

ในการศึกษาเพื่อปรับปรุงกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสท นอกจากการใช้โปรตีนพืชร่วมกับการเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L และ Flavourzyme® 1000L แล้ว ยังอาจจะปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทให้คล้ายกลิ่นรสเนื้อมากขึ้นอีก เช่น การเติมเอนไซม์จากเนื้อวัวเพื่อให้มีกลิ่นรสเหมือนเนื้อวัว จากการย่อยสลายสารประกอบต่างๆในยีสต์ออโตไลเสทด้วยเอนไซม์ (Gasser, 1972) การเติมโปรตีนพืชไฮโดรไลเสท น้ำตาล

โมเลกุลเดี่ยว และสารประกอบซัลไฟด์ (Poiger และ Huster, 1980) และการเติมแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต และน้ำตาลกลูโคส (Izzo และ Ho,1992) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้เป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อ

จากการที่เราทราบว่ากลิ่นรสของเนื้อสัตว์ที่ผ่านการให้ความร้อน จะเกิดจากสารประกอบระเหยได้ในผลิตภัณฑ์โดยเฉพาะสารประกอบซัลเฟอร์ การแตกสลายของไทอามีน รวมถึงปฏิกิริยาMaillard reaction จากการทำปฏิกิริยาของกรดอะมิโนและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โดยพบว่าการเติมกลูโคส 1%(w/v) จะช่วยให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ยีสต์ออโตไลเสทมีกลิ่นรสคล้ายเนื้อ (วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2535) นอกจากนี้ Gasser (1972) กล่าวว่ายีสต์ออโตไลเสทที่สามารถให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อกับผลิตภัณฑ์ควรมีปริมาณของ ซิสเตอีน 0.1-0.3 เมทไธโอนีน 0.1-0.3 และไทอามีน 0.05-0.2 ส่วนในพันส่วนของน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้น ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการเติม ซิสเตอีน เมทไธโอนีน และไทอามีน ลงในยีสต์ออโตไลเสทเพื่อปรับปรุงให้มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อมากยิ่งขึ้น

การเติมซิสเตอีน:เมทไธโอนีน:ไทอามีน อัตราส่วน 0.3:0.2:0.1 ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี และการเติมซิสเตอีน:เมทไธโอนีน:ไทอามีน อัตราส่วน 0.1:0.1:0.1 ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองเข้มข้น จะพบว่าจะมีค่าการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) การที่ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองมีค่าการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อสูงทั้งที่เติมซิสเตอีนและเมทไธโอนีน ในอัตราส่วนที่ต่ำกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี อาจเป็นเพราะสารประกอบหรือองค์ประกอบบางชนิดในกากถั่วเหลือง สามารถเกิดปฏิกิริยาเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อได้ง่ายกว่าในกลูเต็นข้าวสาลี เช่น กรดอะมิโนซิสเตอีน ไลซีน และเมทไธโอนีนที่สามารถสลายตัวให้สารประกอบที่มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ในกากถั่วเหลืองที่นำมาใช้มีปริมาณสูง (ภาคผนวก ซ.) หรืออาจจะเป็นผลจากปริมาณของคาร์โบไฮเดรตในกากถั่วเหลืองที่มีมากกว่ากลูเต็นข้าวสาลี ซึ่งอาจถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและเกิดปฏิกิริยา Maillard reaction ได้เป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อในผลิตภัณฑ์ จึงทำให้ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองสามารถเกิดสารประกอบที่ให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อได้มาก โดยไม่ต้องเติมซิสเตอีนและเมทไธโอนีนสูงเหมือนกับในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี

5.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของยีสต์ออโตไลเสทที่ผ่านการปรับปรุงกลิ่นรส

5.6.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีจะมีปริมาณความชื้น 5.76% โปรตีน 64.23% ไขมัน 0.27% เถ้า 4.62% เส้นใย 0.21% และคาร์โบไฮเดรต 24.02% ส่วนยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองจะมีปริมาณความชื้น 5.52% โปรตีน 54.63% ไขมัน 0.31% เถ้า 5.52% เส้นใย 0.23% และคาร์โบไฮเดรต 31.52% โดยจากผลการทดลองจะเห็นว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ได้มีปริมาณของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตสูง ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการเกิดกลิ่นรสคล้ายเนื้อนอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงปริมาณของเกลือโซเดียมคลอไรด์จะพบว่ามีปริมาณ 0.89 และ 0.76% ตามลำดับ โดยปริมาณของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ต่ำทำให้สามารถใช้ยีสต์ออโตไลเสทใน ผลิตภัณฑ์อาหารได้หลากหลายมากขึ้น เพราะมีผู้บริโภคบางกลุ่มที่ไม่สามารถบริโภคอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ปริมาณสูงได้ เช่น ผู้บริโภคที่มีปัญหาเกี่ยวกับไตหรือความดันโลหิต (นิธิยา รัตนาปนนท์ และวิบูลย์ รัตนาปนนท์, 2543)

เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ออโตไลเสทที่ได้จากการทดลองของ วิวัฒน์ หวังเจริญ (2535) และ Niumthanorm (1997) พบว่าปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลืองจะมีค่าใกล้เคียงกัน เพียงแต่ปริมาณเถ้าของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลืองจะมีปริมาณ 4.6 และ 5.5% ซึ่งมีค่าต่ำกว่ายีสต์สกัดที่ได้ตามวิธีของ Niumthanorm (1997) ที่มีปริมาณเถ้า 9.3% แต่จะสูงกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ได้จากการทดลองของ วิวัฒน์ หวังเจริญ (2535) ซึ่งมีปริมาณเถ้าเพียง 3.59%

5.6.2 การวิเคราะห์สารประกอบที่ให้กลิ่นรสในยีสต์ออโตไลเสท

จากการทดลองวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี และยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง เปรียบเทียบกับยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสทและกลิ่นรสต่างๆ ที่มีจำหน่ายทางการค้า โดยพิจารณาจากค่า retention time (RT) และพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้

จากตารางที่ 4.30 จะพบว่ายีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี หรือกากถั่วเหลืองจะมี องค์ประกอบของสารประกอบที่ให้กลิ่นรสบางชนิดเหมือนกับยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสทและกลิ่นรสเนื้อสัตว์ที่มีจำหน่ายทางการค้า โดยยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีจะมีสารประกอบที่ให้กลิ่นรสคล้ายกับยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสทที่มีเกลือต่ำทางการค้า ส่วนยีสต์ ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองจะมีสารประกอบที่ให้กลิ่นรสคล้ายกับยีสต์สกัดและกลิ่นรสเนื้อสัตว์ที่มีจำหน่ายทางการค้า แต่ยีสต์ออโตไลเสทที่มีการเติมกลูเต็นข้าวสาลีจะมีสารประกอบที่ให้กลิ่นรสค่อนข้างแตกต่างจากยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง

การนำค่า retention time ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลืองมาเปรียบเทียบกับค่า retention time ของยีสต์สกัดและกลิ่นรสเนื้อสัตว์บางชนิดที่มีจำหน่ายทางการค้า เพื่อวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบที่ให้กลิ่นรส โดยสารประกอบที่น่าจะเป็นสารชนิดเดียวกันควรจะมีค่า retention time เท่ากันที่ภาวะในการวิเคราะห์เดียวกัน ส่วนปริมาณสารประกอบที่ให้กลิ่นรสว่ามีมากหรือน้อยเพียงใดจะดูได้จากพื้นที่ใต้กราฟ ถ้ามีพื้นที่ใต้กราฟมากจะแสดงว่ามีสารประกอบชนิดนั้นๆอยู่มาก (แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2539)

เมื่อเปรียบเทียบค่า retention time ของสารประกอบที่วิเคราะห์ได้จากยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลืองกับ retention time ของสารประกอบที่ให้กลิ่นรสของยีสต์สกัดที่วิเคราะห์โดย Ames และ MacLeod (1985) ดังตารางที่ 2.10 จะเห็นว่าสารประกอบที่วิเคราะห์ได้จากยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลือง อาจจะเป็นสารประกอบ ฟูแรน (furan) และสารประกอบไพราซีน (pyrazine) โดยฟูแรนเป็นสารประกอบที่ได้จากปฏิกิริยา Maillard reaction ซึ่งสารประกอบกลุ่มนี้ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณน้อยแต่จะมีผลต่อกลิ่นรสเนื่องจากมีค่า threshold ของ aroma และ flavor ต่ำ ส่วนไพราซีนเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ (volatile nitrogen compound) เกิดจากปฏิกิริยา Strecker degradation (รูปที่ 2.7) ซึ่งสารประกอบทั้งสองชนิดสามารถให้กลิ่นรสเนื้อ

5.6.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในยีสต์ออโตไลเสท

จากการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของกรดอะมิโน ที่มีในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีและยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง พบว่ายีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีจะมีปริมาณของกรดกลูตามิค 14.94 g/100g. ซึ่งจะมีปริมาณกลูตามิคมากกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช (วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2535) และยีสต์ออโตไลเสทที่ผลิตได้จากยีสต์ขนมปัง (Thronton, 1992: Suphantharika และคณะ, 1997) ส่วนในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองจะมีปริมาณกรดกลูตามิค 6.28 g/100g. ซึ่งจะสูงกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช การที่ปริมาณกรดกลูตามิคในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนพืชมีปริมาณสูงกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช ปริมาณกรดกลูตามิคที่เพิ่มขึ้นอาจจะได้จากเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนพืชที่เติมลงในออโตไลเสทในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ โดยกลูเต็นข้าวสาลีจะมีปริมาณกรดกลูตามิคสูงประมาณ 290 โมลของกรดอะมิโนต่อ 10^5 กรัมโปรตีน (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2538) ส่วนกากถั่วเหลืองมีกรดกลูตามิค 16.5 g./16 g.N (Maltz,1981) (ภาคผนวก ซ)

ปริมาณของกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ที่ตรวจสอบได้ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลืองจะมีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.31) แต่จะพบว่ามีปริมาณของกรดอะมิโนค่อนข้างสูงกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช โดยปริมาณกรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการที่เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนพืชที่เติมในยีสต์ออโตไลเสทระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของกรดอะมิโนในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลือง จะพบว่ามีปริมาณของกรดอะมิโนค่อนข้างต่ำกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ผลิตได้จากยีสต์ปฐมภูมิหรือยีสต์ขนมปัง (ตารางที่ 4.31) ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนของยีสต์ออโตไลเสทด้วยวิธี AccQ-Tag (ภาคผนวก ข) นี้ไม่สามารถวิเคราะห์กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ จึงไม่สามารถรายงานถึงปริมาณซิสเตอีนและเมทไธโอนีนในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนพืช โดยที่ ซิสเตอีนและเมทไธโอนีนสามารถสลายตัวเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสได้ (Nagodawithana, 1992) ส่วนกรดอะมิโนไลซีนที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาลได้เป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อวัว (สายสนม ประดิษฐ์ดวง, 2543) ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลืองจะมีปริมาณของไลซีนสูงกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช โดยปริมาณไลซีนที่เพิ่มขึ้นอาจจะมาจากกลูเต็นข้าวสาลีและกากถั่วเหลืองที่เติมลงในยีสต์ออโตไลเสท ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

5.6.4. การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในยีสต์ออโตไลเสท

จากการตรวจสอบปริมาณของแบคทีเรีย ยีสต์ และราที่มีในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลืองจะพบว่ามีปริมาณแบคทีเรีย 3,300 และ 4,100 CFU/g. ตามลำดับ ส่วนปริมาณของยีสต์และราจะเป็น 32 และ 40 CFU/g. ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ ยีสต์ออโตไลเสทหรือยีสต์สกัดที่มีจำหน่ายทางการค้าจะพบว่า มีปริมาณของแบคทีเรีย ยีสต์และราใกล้เคียงกับยีสต์ออโตไลเสทหรือยีสต์สกัดทางการค้า

อย่างไรก็ตามปริมาณของจุลินทรีย์ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลือง สามารถเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นอีกถ้าหากบรรจุในภาชนะที่ไม่กันความชื้น เนื่องจากยีสต์ ออโตไลเสทหรือยีสต์สกัดจะมีสมบัติดูดความชื้นได้ง่าย (hydroscopic) นอกจากนี้ยีสต์ ออโตไลเสทยังเป็นแหล่งของสารอาหารที่ดีของจุลินทรีย์เพราะมีทั้งโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และวิตามิน ดังนั้นถ้ามีภาวะการเก็บที่ไม่เหมาะสมปริมาณจุลินทรีย์อาจจะมีมากขึ้น

5.7 การใช้ยีสต์ออโตไลเสทเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสคล้ายเนื้อในผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัติ

จากการที่ผู้บริโภคมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับบทบาทของอาหารที่มีผลต่อสุขภาพมากขึ้น ผู้บริโภคจึงลดหรือหลีกเลี่ยงการบริโภคเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ แล้วหันมาบริโภคอาหารมังสวิรัติที่ทำมาจากโปรตีนพืชแทน เพื่อสุขภาพหรือเป็นโภชนะบำบัดร่วมกับการควบคุมโรคเพิ่มมากขึ้น (เอกพันธ์ แก้วมณีชัย, 2536) จึงทำให้มีการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัติให้มีความหลากหลายทั้งในด้านชนิดและรูปแบบ รวมทั้งมีลักษณะใกล้เคียงกับอาหารที่บริโภคในชีวิตประจำวัน และอาหารที่ผลิตจากเนื้อสัตว์มากขึ้น

การผลิตอาหารมังสวิรัติเพื่อให้มีลักษณะคล้ายเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ นอกจากต้องมีลักษณะทางเนื้อสัมผัส และลักษณะปรากฏคล้ายเนื้อสัตว์จริงแล้ว กลิ่นรสของเนื้อสัตว์เป็นสิ่งหนึ่งที่บ่งชี้ถึงความยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัตินั้น โดยกลิ่นรสที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี การนำยีสต์ออโตไลเสทมาใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสเนื้อสัตว์ในอาหาร นับเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้สารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารที่ได้จากธรรมชาติ

ในการทดลองเติมยีสต์ออโตไลเสทปริมาณ 1, 2 และ 3% (w/w) ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้น มังสวิรัติ (ภาคผนวก ค.) จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าการเติมยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี 2.0% ลงในลูกชิ้นมังสวิรัติ จะให้ค่าการทดสอบด้านกลิ่นรสสูงที่สุดและมีค่าการยอมรับมากที่สุด ($p \leq 0.05$) ส่วนการเติมยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง 2.0% ลงใน ลูกชิ้นมังสวิรัติ จะให้ค่าการทดสอบด้านกลิ่นรสสูงและมีค่าการยอมรับมากที่สุด ($p \leq 0.05$)

ในการทดลองที่เลือกใช้ผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นมังสวิรัติเป็นตัวแทน ในการทดสอบการใช้ยีสต์ ออโตไลเสทเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสคล้ายเนื้อ เพราะในขั้นตอนการผลิตลูกชิ้นมังสวิรัติจะต้องมีการต้มซึ่งน่าจะมีการสูญเสียกลิ่นรสได้มาก ถ้าหากในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นที่ได้ยังมีกลิ่นรสคล้ายเนื้ออยู่การผลิตผลิตภัณฑ์ที่ให้ความร้อนด้วยวิธีอื่น เช่น การนึ่ง ก็น่าที่จะยังคงมีกลิ่นรสคล้ายเนื้ออยู่ในผลิตภัณฑ์มาก นอกจากนี้ในสูตรของผลิตภัณฑ์มีการใช้โปรตีนถั่วเหลืองซึ่งจะมีกลิ่นรสของถั่ว ค่อนข้างแรง การใช้ยีสต์ออโตไลเสทจะช่วยกลบกลิ่นรสหรือกำบัง (masking) กลิ่นรสของถั่วที่มีในผลิตภัณฑ์ได้ (อดิศักดิ์ อินทพิเชฏฐ์, 2544)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การกำจัดสารประกอบที่ให้รสขมจากฮอพสามารถทำได้โดยการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ภาวะที่เหมาะสมในการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต คือ โซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 2% อุณหภูมิในการล้างยีสต์ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที สามารถลดค่าความขมได้ประมาณ 91% โดยค่าความขมของยีสต์จะเหลือ 12.65 (BU.) และมีการสูญเสียยีสต์ในการล้าง 14.94%

การเติมกลูเต็นข้าวสาลี โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L. และ Flavourzyme® 1000L. ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ สามารถเพิ่มปริมาณออโตไลเสท ปริมาณโปรตีน และปริมาณคาร์โบไฮเดรต ของยีสต์ออโตไลเสทที่ได้โดยการเติม กลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L. 1.0% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 20 ชั่วโมง จะมีปริมาณออโตไลเสท ปริมาณโปรตีน และปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุด คือ 70.72%, 27.53 mg./ml. และ 12.17 mg./ml. และยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี 10% ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L. 1.0% ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ 20 ชั่วโมง จะให้ค่าการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อที่สูง

การนำยีสต์ออโตไลเสทมาให้ความร้อนที่ 90°C ที่ pH 6.5 ระยะเวลา 2 ชั่วโมง จะสกัด RNA ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีได้ 10.19 mg./ml. ส่วนยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองจะมี RNA 10.22 mg./ml.

เมื่อเติมเอนไซม์ 5'-phosphodiesterase RP®1 0.2% ลงในยีสต์ออโตไลเสทที่ผ่านการสกัด RNA ที่อุณหภูมิ 55°C ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีจะมีปริมาณ 5'-GMP 71.76 μg./ml. 5'-AMP 361.51 μg./ml. และ 5'-IMP 21.60 μg./ml. ส่วนยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองจะมีปริมาณ 5'-GMP 67.40 μg./ml. , 5'-AMP 416.06 μg./ml. และ 5'-IMP 10.97μg./ml.

การเติมซิสเตอีน 0.3 เมทไธโอนีน 0.2 และไทอามีน 0.1 ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี และการเติมซิสเตอีน 0.1 เมทไธโอนีน 0.1 และไทอามีน 0.1 ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง จะให้ค่าการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อที่สูง เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสเนื้อในอาหาร

ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L. จะมีปริมาณความชื้น 5.76% โปรตีน 64.23% ไขมัน 0.27% เถ้า 4.62% เส้นใย 0.21% และคาร์โบไฮเดรต 24.02% ส่วนยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L. จะมีปริมาณความชื้น 5.52% โปรตีน 54.63% ไขมัน 0.31% เถ้า 5.52% เส้นใย 0.23% และคาร์โบไฮเดรต 31.52%

ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลือง จะมีปริมาณแบคทีเรีย 3,300 และ 4,100 CFU/g. ตามลำดับ ส่วนปริมาณของยีสต์และราจะเป็น 32 และ 40 CFU/g. ตามลำดับ

ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีจะมีสารประกอบที่ให้กลิ่นรสคล้ายกับยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสทที่มีเกลือต่ำทางการค้า ส่วนยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองจะมีสารประกอบที่ให้กลิ่นรสคล้ายกับยีสต์สกัดและกลิ่นรสเนื้อสัตว์ที่มีจำหน่ายทางการค้า แต่ยีสต์ออโตไลเสทที่มีการเติมกลูเต็นข้าวสาลีจะมีสารประกอบที่ให้กลิ่นรส ค่อนข้างแตกต่างจากยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง

ปริมาณของกรดอะมิโนชนิดอื่นๆที่ตรวจสอบได้ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลืองจะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่จะพบว่ามีปริมาณของกรดอะมิโนค่อนข้างสูงกว่ายีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช กรดอะมิโนที่มีมากที่สุดคือกรดกลูตามิคโดยมีปริมาณ 14.94 g/100g. และ 6.28 g/100g ตามลำดับ

การเติมยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีหรือกากถั่วเหลือง เพื่อเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสคล้ายเนื้อในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นมังสวิรัติปริมาณ 2.0% ของน้ำหนักวัตถุดิบหลักจะให้คะแนนด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อและความยอมรับสูงที่สุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปขั้นตอนการผลิตยีสต์ออโตไลเสทที่ให้กลิ่นรสคล้ายเนื้อเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร มังสวิรัติ

Yeast slurry 15%(w/v)

⇓

ล้างด้วย Na_2CO_3 2% อุณหภูมิ 25°C ระยะเวลา 20 นาที

⇓

ล้างด้วยน้ำกลั่น เหวี่ยงแยกยีสต์ที่ 10,000g 4°C 10 นาที

⇓

เตรียม yeast slurry 15%(w/v)

⇓

เติมกลูเต็นข้าวสาลี 10%(w/v) Flavourzyme®1000L 1%(v/v) หรือ
กากถั่วเหลือง 20%(w/v) Flavourzyme®1000L 1%(v/v)

⇓

ปรับ pH 5.5 อุณหภูมิ 45°C ระยะเวลา 20 ชั่วโมง (18 ชั่วโมง)

⇓

ปรับ pH 6.5 ให้ความร้อน 90°C นาน 2 ชั่วโมง

⇓

เหวี่ยงแยกยีสต์ออโตไลเสท

⇓

เติม PDE 0.2% (w/v) ที่ 55°C นาน 2 ชั่วโมง

⇓

ให้ความร้อนที่ 80°C 5 นาที

⇓

เติมกลูโคส 1% (w/v) ปรับ pH 5.0

⇓

ทำให้เข้มข้นเป็น 80% อบแห้งที่ 100°C บดเป็นผง

⇓

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เตรียมสารละลายยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้น 20%

⇓

เติมกลูโคส 1% ที่ pH 5.0 ทำให้เข้มข้น 60%

⇓

เติมซิสเตอีน : เมทไธโอนีน :ไทอามีน

ปริมาณ 0.3:0.2:0.1 (สำหรับยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี)

หรือ 0.1:0.1:0.1 (สำหรับยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง)

ส่วนต่อพันส่วนน้ำหนักแห้งของยีสต์ออโตไลเสทเข้มข้น

⇓

บ่มที่ 10°C นาน 24 ชั่วโมง

⇓

ทำให้เข้มข้นเป็น 80% อบแห้งที่ 100°C บดเป็นผง

⇓

ยีสต์ออโตไลเสท

เมื่อ ตัวอักษรสีม่วง เป็นขั้นตอนการล้างยีสต์

ตัวอักษรสีเขียว เป็นขั้นตอนการย่อยสลายยีสต์และการปรับปรุงกลิ่นรสคล้ายเนื้อด้วยโปรตีนพืชและเอนไซม์

ตัวอักษรสีดำ เป็นขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์

ตัวอักษรสีน้ำเงิน เป็นขั้นตอนการปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทด้วยซิสเตอีน เมทไธโอนีน และไทอามีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

1. การเติมโปรตีนพืชในระหว่างการย่อยสลายยีสต์ อาจศึกษาการเติมในปริมาณที่สูงกว่านี้ได้หากมีการกวนผสมที่ดี ในการศึกษานี้ใช้ incubator shaker ซึ่งไม่สามารถเขย่าผสมสารแขวนลอยที่มีความเข้มข้นสูงได้ดี เนื่องจากโปรตีนพืชโดยเฉพาะกลูเต็นข้าวสาลีจะรวมตัวกัน และไม่สามารถเขย่าให้ผสมกับ yeast slurry นอกจากนี้อาจศึกษาการเติมโปรตีนและเอนไซม์ชนิดอื่นในการปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทต่อไป
2. การเพิ่มปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ในยีสต์ออโตไลเสทอาจใช้เอนไซม์ PDE ที่แยกได้จากแหล่งอื่น เช่น ข้าวโอ๊ต และรากข้าวมอล์ท เนื่องจากเอนไซม์ 5'-phosphodiesterase RP®1 ยังไม่ได้รับความยอมรับจากองค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา และอาจศึกษาการเติมเอนไซม์ adenyl deaminase เพื่อเพิ่มปริมาณสารประกอบ 5'-IMP
3. ในการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสจะพบว่าผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนสามารถบ่งบอกถึงกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทได้ แต่ยังไม่สามารถบ่งบอกถึงรสชาติของรส umami ได้ อาจต้องใช้ผู้ทดสอบที่มีความชำนาญในด้านนี้มากกว่านี้
4. การวิเคราะห์สารประกอบที่ให้กลิ่นรสด้วยเครื่อง GC ควรจะวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS เพิ่มเติม และควรใช้วิธีอื่นในการสกัดสารประกอบที่ให้กลิ่นรสด้วยวิธีอื่นๆ ด้วย เช่น steam distillation solvent extraction แทนการใช้วิธี solvent extraction เนื่องจากการสกัดด้วยวิธี solvent extraction ในการทดลองจะพบว่ามีสารประกอบที่แยกออกมาได้น้อย นอกจากนี้อาจศึกษาชนิดของสารประกอบที่ให้กลิ่นรสโดยมีสารมาตรฐานเปรียบเทียบ
5. ศึกษาวิธีอื่นเพื่อช่วยปรับปรุงกลิ่นรสของยีสต์ออโตไลเสทเพื่อให้มีกลิ่นรสเหมือนกับกลิ่นรสเนื้อสัตว์ต่างๆ เช่น กลิ่นเนื้ออบ กลิ่นหมูย่าง เป็นต้น
6. ศึกษาการใช้ยีสต์ออโตไลเสทเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสคล้ายเนื้อในผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัติชนิดอื่น เช่น ไส้กรอกมังสวิรัติ หรือการใช้ในผลิตภัณฑ์ขนมอบ เช่น บิสกิตและแครกเกอร์ เป็นต้น
7. ศึกษาสมบัติด้านอื่นของยีสต์ออโตไลเสทที่ได้ เช่น สมบัติด้าน solubility และ water absorption

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมศุลกากร. 2541. สถิติการนำเข้า-ส่งออกสินค้า. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.customs.go.th

กรมศุลกากร. 2542. สถิติการนำเข้า-ส่งออกสินค้า. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.customs.go.th

จตุพร เหมสุวรรณ์. 2531. การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารจากกะปิ ถั่วเหลือง และยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เชิดชัย เชี่ยวธีรกุล. 2537. ความสำคัญและการใช้ yeast extract ในอุตสาหกรรมอาหาร. วิทยาศาสตร์. 48(3) : 146-149.

นิธิยา รัตนาปนนท์ และ วิบูลย์ รัตนาปนนท์. 2543. สารพิษในอาหาร. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2539. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ชวนพิมพ์.

วารยา บุษปธำรง. 2539. เครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิไลรัตน์ มณีเสถียรรัตนา. 2535. การผลิตไส้กรอกเลียนแบบจากโปรตีนถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิวัฒน์ หวังเจริญ. 2535. การผลิตยีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิวัฒน์ หวังเจริญ และ วัลยา โมราสุข. 2539. การผลิตยีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสเนื้อ ตอนที่ 2 : การผลิตยีสต์ออโตไลเสทจากยีสต์ขนมปังเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร. อาหาร. 26(3) : 182-189.

ศรีสมร คงพันธุ์. 2541. อาหารมังสวิรัติ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์สุขภาพใจ.

สมชาย ประภาวัต. 2533. การใช้ประโยชน์จากถั่วเหลืองเป็นอาหารในประเทศไทย. อาหาร. 20(3): 204-214

สมชาย ประภาวัต. 2534. เทคโนโลยีการทำแป้งถั่วเหลืองจากถั่วเหลือง. กรุงเทพมหานคร: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (อัดสำเนา).

สายสนม ประดิษฐ์ดวง. 2543. ผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงรส. ใน เอกสารการสอนชุดวิชาผลิตภัณฑ์อาหารหน่วยที่8-15, หน้า 282-288. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.

สุพจน์ บุญแรง. 2540. การศึกษาสภาวะเหมาะสมต่อการย่อยสลายยีสต์ขนมปังและการใช้ประโยชน์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อดิศักดิ์ อินทพิเชฏฐ์. 2544. Flavor masking กลยุทธสู่ความสำเร็จ. วารสารจาร์พา. ก.ย.-ต.ค.: 85-87.

อมราภรณ์ วงษ์ฟัก. (ม.ป.ป.). กลูเต็น เนื้อเทียมจากแป้งสาลี. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แม่บ้าน.

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2538. เคมีทางธัญญาหาร. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกพันธ์ แก้วมณีชัย. 2536. อาหารมังสวิรัติกับโภชนาการ. อุตสาหกรรมเกษตร. 4(2): 46-49.

ภาษาอังกฤษ

Akin, C. and Murphy, R.M. 1981. Method for accelerating of yeast. U.S. Patent 4,285,976.

Albercht, J.J. and Deindoerfer, F.H. 1966. Autolyzed yeast extracts: make foods flavorful. Food Eng. 92-95.

Ames, J.M. and MacLeoad, G. 1985. Volatile components of a yeast extract composition. J. Food Sci. 50: 125-131.

Amoco Food Co. 1985. Torutein Product Bulletin. Chicago, Illinois.

A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Washington D.C. : Association of Official Analytical Chemists.

Asenjo, J.A. and Andrew, B.A. 1990. Enzymatic cell lysis for product release. In Asenjo, J.A. (ed.). Separation process in biotechnology. New York: Marcell Dekker.

Belem, M.A.F., Gibbs, B.F. and Lee, B.H. 1997. Enzymatic production of ribonucleotides from autolysate of *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. J. of Food Sci. 62(4) : 851-854.

Belousova, N.I., Gordienko, S.V. and Eroshin, V.K. 1995. Influence of autolysis conditions on the properties of amino acid mixtures produced by ethanol assimilating yeast. Appl. Biochem. Microbiol. 31(4): 391-395

Berggruen, J.C., Nagodawithana, T.W. and Schoenberg, E.A. 1990. Utilization of yeast as a raw material in the production of flavor or flavor enhancing extracts. Prepared for presentation at the annual AICHE Meeting. November, 16.

Bernstein, S. and Plantz, P.E. 1977. Production of yeast from whey. Food Eng. 49(11): 74-75.

Brookman, J.G. 1974. Mechanism of cell disintegration in a high pressure homogenizer.

Biotechnol.Bioeng. 16: 371-383.

Ceseram, V., Kinton, R. and Foskett, D. 1995. Advanced practical cookery. Great Britain: Hodder & Stoughton Educational.

Chao, K.C. ; McCarthy, E.F. and McConaghy, G.A. 1980. Yeast autolysis process. U.S Patent. 4,218,481.

Cochran, W.G. and Cox, G.M. 1957. Experimental designs. New York: John Willey & Sons.

Cunningham, S.D., Cater, C.M. and Mattill, K.F. 1975. Rupture and protein extraction of petroleum-grown yeast. J. Food Sci. 40: 732-735.

Dixon, I.J. and Leach, A.A. 1968. The adsorption of hop substances on the yeast cell wall. J.Inst.Brew. 74: 63-67.

Dwivedi, B.K. and Gibson, D.L. 1970. Processing of spent brewer's yeast for food use. J.Inst.Can.Technolo.Aliment. 3(3) : 110-112.

Dziezak, J.D. 1987. Yeast and yeast derivertives : definition, characteristics and processing. Food Tech. 41(2) : 104-121.

Furuya, A. and Kodaira, R. 1973. Fermentative production of guanosine. J. general App. Microbiol. 19: 263-271.

Gasser, R.J. 1972. Use of meat enzymes to treat yeast autolysates. U.S. Patent 3,881,022.

Gasser, R.J. and Huster, L.B. 1978. Preparation of bouillon base devoid of after-taste. U.S. Patent 4,073,961.

Hanson, H.L., Brushway, M.J. and Lineweaver, H.1960. Food Technol. 14: 32.

Herbert, D., Phipps, P.J. and Strange, R.E. 1971. Chemical analysis of microbial cells. In Norris, J.K. and Robbinson, D. Method in Microbiology. Vol.5B. London : Academic Press.

Hill, F.F. 1981. Process for the production of a yeast autolysate. U.S.Patent 4,264,628.

Hobson, J.C. and Anderson, D.A.G. 1995. Method of preparing yeast extract containing hydrolyzed non yeast protein with yeast autolytic enzyme. U.S. Patent 5,427,921.

Hough, J.S. and Maddox, I.S. 1970. Yeast autolysis. Process Biochem. 5 : 50-52.

Hunter, J.B. and Asenjo, J.A. 1988. A structured mechanistic model of the kinetic lysis and distruption of yeast cells. Biotech. and Bioeng. 31: 929-943.

Hyoky, G., Sarkki, M.L. และ Tylli M. 1996. Method of producing a yeast extract useable in foodstuffs, where undesirable flavoring agent in the extract have been removed. WO. Patent 96/38057.

Ikeda, K. 1909. On a new seasoning. J. Tokyo. Chem Soc. 30: 820.

International Commission of Microbiology Specification for Food. 1974. Microorganism in foods. 2nd ed. New York: Academic Press.

Izzo, H.V. and Ho, C.T. 1991. Isolation and Identification of the volatile components of an extrude autolyzed yeast extract. J. Agric. Food Chem. 39: 2245-2248.

Izzo, H.V. and Ho, C.T.1992. Ammonia affects Maillard chemistry of an extruded autolyzed yeast extract: pyrazine aroma generation and brown color formation. J. Food Sci. 57(3) : 657-659, 674.

Jazwinski, S.M. 1990. Preparation of extraction from yeast, pp. 154-174. In Deutscher, M.P. (ed.). Method in Enzymology. Vol 82. London : Academic Press. .

Jones, M.A. and Ingledew, W.M. 1994. Fermentation of very high gravity wheat mash prepared using fresh yeast autolysate. Bioresource Technol. 50: 97-101.

Kamatsu, I. 1972. Accumulation of nucleic acid related substance by microorganisms (III). Derivation of guanosine producing mutants from adenine auxotroph of a *Bacillus* stain. J. General App. Microbiol. 18: 19-27.

Kelly, M. 1983. Yeast extract. In Godfrey nad Reichelt (eds.). The application of enzyme in industry. London: Academic Press.

Keenan, N. 1994. Savory Ingredient House. Reproduction of slides from presentation by Gist Brocades In Bangkok, March.

Keukeleire, D.D, Vindervogel, J., Szucs, R. and Sandra, P.1992. The history and analytical chemistry of beer bitter acids. Trends in Analytical Chemistry. 11(8): 275-280.

Knorr, D., Shetty, K.J., Hood, L.F. and kinsella, J.E. 1979. An enzymatic method for yeast autolysis. J. Food Sci. 44(5): 1362-1365.

Koller, R., Sturrdik, E. and Farkas, V. 1991. Induction and acceleration of yeast lysis by addition of fresh yeast autolysate. Biotechnol. Lett. 13(8): 543-546.

Kuninaka, A. 1957. Enzymatic degradation of yeast ribonucleic acid and its related compounds by *Aspergillus oryzae*. J. general App. Microbiol. 3: 55.

Kuninaka, A. 1960. Studies on taste of ribonucleic acid derivatives. J.Agri. Chem. Soc. Jpn. 34: 489.

Lee, K and Lee, Y. 1996. Continuous process for yeast biomass production from sugar beet stillage by a novel strain of *Candida rogosa* and protein profile of the yeast. J. Chem. Tech. Biotechnol. 66: 349-354.

Lewis, M.J. and Young, T.W.1995. Hop chemistry and wort boiling. In Lewis,M.J. and

Young, T.W. (eds.) Brewing. London : Chapman & Hall.

Libbey, L.M. and Kuninaka, A. 1967. The chemistry and physiology of flavours. Connecticut: AVI. Publishing.

Liu, L.C., Prokopakis, K.J. and Asenjo, A.J. 1988. Optimization of enzymatic lysis of yeast. Biotech. And Bioeng. 32: 1113-1127.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randali, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Maltz, M.A. 1981. Protein food supplements recent advances. New Jersey: Noyes Data Corporation.

McMurrough, I. and Madigan, D. 1996. Bittering substances. In Nollel, L.M.L. (ed.) Handbook of food analysis. Vol.1. New York : Marcel Dekker, Inc.

Moll, M. 1987. European Brewery Convention, Analytica-EBC. 4th ed. Switzerland : Bruhin A.G.

Mottram, D.S. 1994. Flavor compounds formed during the Maillard reaction. In Parliament, T.H., Morello, M.J. and McGorrin, R.J. (eds.). Thermally generated flavors. Washington D.C.: American Chemical Society.

Mottram, D.S. and Whitfield, F.B. 1994. Aroma volatiles from meat-like Maillard systems. In Parliament, T.H., Morello, M.J. and McGorrin, R.J. (eds.). Thermally generated flavors. Washington D.C.: American Chemical Society.

Nagodawithana, T.W. 1992. Yeast derived flavors and flavor enhancers and their probable mode of action. Food Tech. 51(11) : 138-144.

Nagodawithana, T.W. 1994. Savory flavor. In Nagodawithana, T.W. (ed.). Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients. New York: John Wiley & Sons.

Nagodawithana, T.W. 1995. Yeast extract. In: Savory flavor. USA.: Esteekay Associates.

Newell, J.A., Suley, R.D. and Robbins, E.A. 1975. Mild alkaline extraction of homogenized cell. U.S. Patent 3,888,839.

Niumthanorm, A. 1997. Production of yeast extracts from spent brewer's yeast. Master's Thesis, Department of biotechnology, Graduate School, Mahidol University.

Novo Nordisk A/S. 1996. Neutrase®. Denmark: Product sheet enzyme business of Novo Nordisk A/S. (Unpublished Manuscript.).

Novo Nordisk A/S. 1998. Flavourzyme®. Denmark: Product sheet enzyme business of

Novo Nordisk A/S. (Unpublished Manuscript.).

Olmedo, F., Iturbe, F., Hernandez, J.G. and Munguia, A.L. 1994. Continuos production of 5'-ribonucleotides from yeast RNA by hydrolysis with immobilized 5'-phosphodiesterase and 5'-adenylate deaminase. World J. Microbiol & Biotechnol. 10: 36-40.

Olsen, H.S. 1995. Production of flavor enhancers. In Jand, R.H., Reed, G., Puhlex, A. and Stadler, P. (eds.). Biotechnology. Vol.9. 2nd ed. Weinhiem.

Origane, A. and Sato, T. 1993. Process for producing yeast extract. U.S. Patent 5,188,852.

Otero, A.M., Vasallo, M., Verdecia, O., Fernandez, V. and Betancourt, D. 1996. A process for the complete fractionation of baker's yeast. J. Chem. Technol. Biotechnol. 67:67-71.

Peppler, H.J. 1970. The yeaasts. Vol.3. London: Academic Press.

Peppler, H.J. 1982. Yeast extract. In Rose, A.K. (ed.) Economic Microbiology. Vol.7. London : Academic Press.

Peppler, H.J., Nakao, Y. and Perlman, D. 1979. Microbial production of nucleotides and nucleotides. In Microbial technology I. New York: Academic Press.

Poiger, H. and Huster, L.B. 1980. Cooked meat flavored bouillon base. U.S. Patent 4,194,017.

Potman, R.P. and Wesdrop, J. 1994. Method for the preparation of a yeast extract. U.S.Patent 5,288,509.

Pyke, M. 1985. Brewer's yeast. In Cook, A.H. ed. The chemistry and biology of yeast. New York: Academic Press.

Reed, G. 1981. Use of microbial cultures yeast products. Food Technol. Jan: 89-93.

Reed, G. and Nagodawithana, T.W. 1991. Yeast technology. 2nd ed. New York : AVI. Publishing.

Reed, G. and Peppler, H.J. 1973. Yeast technology. Westport, Connecticut : AVI. Publishing.

Rhodes, J., Titherley, A.C., Norman, J.A., Wood, R. and Lord, D.W. 1991. A survey of the monosodium glutamate content of foods and an estimation of the dietary intake of monosodium glutamate. Food Addit Contam. 8: 663-672.

Roach, D. and Gehrke, C.W. 1970. The hydrolysis of protein. J.Chromatog. 52(5): 393-404.

Schaumburg, H.H., Byck, R., Gerstl, R. and Mashman, J.H. 1969. Monosodium

L-glutamate, its pharmacology and role in the chinese restaurant syndrome. Science. 163: 826-828.

Schoenberg, E. 1992. The science of flavor enhancement. Int. Food Ingred. 2: 36-38.

Schiffman, S.S. and Gill, M. 1987. Umami: a basic taste. New York: Marcel Dekker Inc.

Scopes, R.K. 1987. Protein purification principles and practices. New York: Springer-Verlag.

Shahidi, F. 1994. Flavor of meat and meat products-an overview. In Shahidi, F. ed. Flavor of meat and meat products. Great Britain: Blackie Academic & Professional.

Shallenberger, R.S. 1993. Taste chemistry. Great Britain: Blackie Academic & Professional.

Sombutyanuchit, P., Suphantharika, M. and Verduyn, C. 2001. Preparation of 5'-GMP rich yeast extracts from spent brewer's yeast. World J. Microbiol. 17: 163-168.

Sommer, R. 1989. Yeast autolysate production properties and application. Product information of deutshe hefiwerke, GmbH.

Steckley, J.D., Grieve, D.G., Macleod, G.K., and Moran, E.T. 1979. Brewer's yeast slurry I. Composition as a affected by length of storage, temperature and chemical treatment. J. Dairy Sci. 62: 941-946.

Sugimoto, H. 1974. Synergistic effect of ethanol and sodium chloride on autolysis of baker's yeast for preparing food grade yeast extract. J. of Food Sci. 39: 939-942.

Suphantharika, M., Varavinit, S. and Shobsngob, S. 1997. Determination of optimum conditions for autolyzed yeast extract production. ASEAN J. Sci. Technol. Develop. 14(1): 21-28.

Tamura, M., Nakamura, K. and Okai, H. 1992. Do we recognize sweetness and bitterness at the same receptor. Food flavor and safety. . Washington, D.C.: American Chemical Society.

Tandkawa, T., Takashima, H., Hachiya, T. and Kawasaki, T. 1981. Production of yeast extract containing flavoring. U.S. Patent 4,303,680.

Thornton, J. 1992. Brewer's yeast extract-a survey of the types available to the food processor. Food ingredient. 2: 40-43.

Verduyn, C, Niemthanorm, A. and Supantharika, M. 1997. Effect of solids papain and salt on yield and protein content of autolyzed yeast extract.

ASEAN J. Sci. Technol Develop. 14(1): 29-40.

Verduyn, C., Suksomcheep, A. and Supantharika, M. 1999. Effect of high pressure homogenization and papain on the preparation of autolyzed yeast extract. World J. Microbio & Biotech. 15: 57-63.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

การวิเคราะห์องค์ประกอบพื้นฐานทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (A.O.A.C. 1990)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างในปริมาณที่เหมาะสมและทราบน้ำหนักที่แน่นอน ในภาชนะหาความชื้นที่อบและทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. นำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
3. นำตัวอย่างออกจากตู้อบมาไว้ในภาชนะกันความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น และ ชั่งน้ำหนัก
4. นำตัวอย่างไปอบซ้ำอีกประมาณ 15-30 นาที หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้น

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(w1-w2)}{w1} \times 100$$

เมื่อ

w1 = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

w2 = น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

2. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (A.O.A.C. 1990)

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ในครูซิเบิลที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
2. นำตัวอย่างไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน
3. เผาตัวอย่างในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งได้เถ้าสีขาว
4. นำออกมาใส่ในภาชนะกันความชื้น ชั่งน้ำหนัก คำนวณหาปริมาณเถ้า

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = (w2/w1) \times 100$$

เมื่อ

w1 = น้ำหนักก่อนเผา (กรัม)

w2 = น้ำหนักหลังเผา (กรัม)

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (A.O.A.C. 1990)

สารเคมี

K_2SO_4

$CuSO_4.5H_2O$

กรดซัลฟูริคเข้มข้น

50% โซเดียมไฮดรอกไซด์

4% กรดบอริค

เมทิลเรด-โบรโมครีซอลกรีน

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.1 กรัม ใส่ในขวดสำหรับย่อยโปรตีน เติมคะตะลิสต์ 1 กรัม (K_2SO_4 10 กรัม และ $CuSO_4.5H_2O$ 0.5 กรัม บดผสมกัน)
2. เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 10-15 มิลลิลิตร นำไปย่อยจนได้สารละลายสีฟ้าใสหรือไม่มีสี
3. กลั่นโดยเติม สารละลาย 50% โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 มิลลิลิตร และรองรับสารที่กลั่นได้ด้วยสารละลาย 4%กรดบอริค 10 มิลลิลิตร ซึ่งเติมเมทิลเรด-โบรโมครีซอล กรีนเป็นอินดิเคเตอร์ 3-4 หยด
4. กลั่นจนได้ปริมาตรสารที่กลั่นได้ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่กลั่นได้มาไตเตรทกับกรดซัลฟูริคเข้มข้น 0.05N. จนสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีชมพู คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณโปรตีนดังนี้

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{X \times N \times 14}{W \times 1000} \times 100$$

เมื่อ

X = ปริมาตรของกรดซัลฟูริคที่ใช้ในการไตเตรท (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริค (นอร์มอล)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

ปริมาณโปรตีน = ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด x 6.25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (A.O.A.C. 1990)

สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเธอร์

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 42 แล้วนำไปใส่ thimble ใน extraction tube ของเครื่อง Soxhlet apparatus
2. ใส่ปิโตรเลียมอีเธอร์ 250 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
3. นำไป reflux บน heating mantle ใช้อุณหภูมิ 40-60°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นก่อนนำขวดก้นกลมออก
4. ระเหยปิโตรเลียมอีเธอร์ออก จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100°C นาน 4ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่
5. ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักไขมันที่สกัดได้ แล้วคำนวณหาปริมาณไขมัน

$$\text{ปริมาณไขมัน (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันที่สกัดได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

5. การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย (ดัดแปลงจาก A.O.A.C. 1990)

สารเคมี

กรดซัลฟูริคเข้มข้น 1.25%

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.25%

N-Octanol

อะซีโตน

วิธีการ

1. อบตัวอย่างที่ 105°C จนน้ำหนักคงที่ ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น
2. บดตัวอย่างให้ละเอียดแล้วใส่ใน filter crucible ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม
3. เติมสารละลายกรดซัลฟูริค เข้มข้น 1.25% ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เติม N-Octanol 3-5 หยด เพื่อป้องกันการเกิดฟอง แล้วต้มให้เดือด 30 นาที
4. เปิดวาล์วระบายกรดซัลฟูริคออก ล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร โดยในการล้างแต่ละครั้งให้เปิดวาล์วไปที่ pressure เพื่อดันให้อากาศผ่านฐานของถ้วยแก้วทำให้ส่วนผสมในถ้วยแก้วคลุกเคล้ากันตลอด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.25% ที่ร้อนปริมาตร 150 มิลลิลิตร เติม N-Octanol 3-5 หยด ต้มให้เดือด 30 นาที
6. ระบายสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ออก ล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร
7. ล้างด้วยน้ำกลั่นเย็น 1 ครั้ง แล้วล้างด้วยอะซีโตน 3 ครั้ง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร เปิดให้ความร้อนเข้าทุกครั้งที่ทำการล้าง
8. ทำแห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 105°C นาน 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่
9. เผาที่อุณหภูมิ 500C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

$$\text{ปริมาณเส้นใย (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักหลังอบ (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลังเผา (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

วิธีการวิเคราะห์ทางเคมีและจุลินทรีย์

1. การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีลาวรี (Lowry' s method) (Herbert และคณะ, 1971)

สารเคมี

สารละลาย A : 2% Na_2CO_3 ใน 0.1N. NaOH

สารละลาย B : 0.5% $CuSO_4.5H_2O$ ใน 1% potassium tartrate

สารละลาย C : alkaline copper solution จากการผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร กับ สารละลาย B 5 มิลลิลิตร (สารละลาย C ควรใช้ภายใน 24 ชั่วโมง)

Folin-Ciocalteau reagent เจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1

Bovine serum albumin (BSA)

วิธีการ

1. นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย C 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
2. เติมสารละลาย Folin-Ciocalteau reagent เจือจางด้วยน้ำกลั่น ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงโปรตีนกับกราฟมาตราฐาน โดยใช้ BSA ความเข้มข้นระหว่าง 25-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่าแบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง)

2. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริค (Herbert และคณะ, 1971)

สารเคมี

กรดซัลฟูริค (95.5% H_2SO_4 ความถ่วงจำเพาะ 1.84)

ฟีนอล 5% โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งน้ำกลั่น 95 กรัม และ ฟีนอล 5 กรัม ละลายให้เข้ากัน

D-glucose

วิธีการ

1. นำสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร
2. เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที
3. เขย่าและนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส สักครู่

4. วัดค่าการการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตราฐานของ D-glucose ความเข้มข้น 10-70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่าแบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง)

3. **ปริมาณออโตไลเสท** (Hill, 1981)

วิธีการ

1. นำตัวอย่างสารแขวนลอยของยีสต์ 5 มิลลิลิตร มาเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 3000g นาน 15 นาที แยกส่วนของของเหลวและของแข็งออกจากกัน
2. นำส่วนของแข็งและของเหลวไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่
3. คำนวณหาปริมาณออโตไลเสทดังนี้

$$\text{ปริมาณออโตไลเสท (ร้อยละ)} = \frac{wl}{wl + ws} \times 100$$

เมื่อ

wl = น้ำหนักแห้งของส่วนของเหลว (กรัม)

ws = น้ำหนักแห้งของส่วนของแข็ง (กรัม)

4. **การวิเคราะห์กรดนิวคลีอิกด้วยวิธี** Orcinol test (Herbert **และคณะ**, 1971)

สารเคมี

Orcinol reagent : ละลาย orcinol 0.2 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 20 มิลลิลิตรที่มีเฟอร์ริคคลอไรด์ 0.1 กรัม

RNA standard

วิธีการ

1. นำสารละลายตัวอย่าง 2 มิลลิลิตรเติม Orcinol reagent 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทำให้เย็น
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เทียบกับค่าการดูกลืนแสงของ RNA standard

5. การวิเคราะห์ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ (A.O.A.C., 1990)

สารเคมี

สารละลายกรดไนตริก (HNO_3) เข้มข้น 50%
สารละลายโพแทสเซียมไธโอไซยาเนต เข้มข้น 0.1 N.
สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$) เข้มข้น 0.1 N.
เฟอร์ริกอะลัมอินดิเคเตอร์

วิธีการ

1. ตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนเจือจางด้วยน้ำกลั่น
2. นำสารละลายเจือจาง 10 มิลลิลิตรเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต เข้มข้น 0.1 N. ในปริมาณที่มากพอที่จะตกตะกอนคลอไรด์ทั้งหมดเป็นซิลเวอร์คลอไรด์
3. เติมกรดไนตริกเข้มข้น 50% ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดจนกระทั่งของแข็งอื่นที่ไม่ใช่ซิลเวอร์คลอไรด์ละลายหมด ใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที จากนั้นทำให้เย็น
4. เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรและเติมเฟอร์ริกอะลัมอินดิเคเตอร์ 5 หยด ไตเตรตด้วยสารละลายโพแทสเซียมไธโอไซยาเนต เข้มข้น 0.1 N. จนกระทั่งสารละลายกลายเป็นสี น้ำตาลอ่อน

ปริมาตรของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตที่ใช้ = ปริมาตรของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตที่เติมลงในตัวอย่าง – ปริมาตรของสารละลายโพแทสเซียมไธโอไซยาเนตที่ใช้ไตเตรต

1 มิลลิลิตรของ 0.1 N. ซิลเวอร์ไนเตรต = 0.58% โซเดียมคลอไรด์

6. การวัดค่าการสูญเสียของยีสต์จากการล้าง (Niumthanorm, 1997)

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของยีสต์ก่อนเตรียมเป็น yeast slurry เพื่อทำการล้าง
2. ชั่งน้ำหนักของยีสต์หลังผ่านการล้างและเหวี่ยงแยก

$$\% \text{ การสูญเสียยีสต์} = \frac{w1-w2}{w1} \times 100$$

เมื่อ w1 = น้ำหนักยีสต์ก่อนล้าง

w2 = น้ำหนักยีสต์หลังผ่านการล้าง

7. การวิเคราะห์ค่าความขม (Bitterness unit; BU.) (Moll, 1987)

สารเคมี

iso-octane

กรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น 6 M.

วิธีการ

1. นำตัวอย่างเข้มข้น 10% หรือตัวอย่างที่มีปริมาณของแข็ง 10% ปริมาณ 10 มิลลิลิตร
2. เติมกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 6 M. ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร
3. เติม iso-octane 20 มิลลิลิตร และเติม glass ball 2-3 ชิ้น
4. เขย่าเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 20°C
5. แยกชั้นของ iso-octane มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตรและคำนวณค่าความขม

$$\text{Bitterness unit (BU.)} = A275 \times 50$$

เมื่อ

A275 = ค่าการดูดกลืนแสงของกรดไอโซแอลฟาในชั้นของ iso-octane ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

8. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ (Sombutyanuchit **และคณะ**, 2001.)

สารเคมี

KH_2PO_4

H_3PO_4

Guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP)

Inosine-5'-monophosphate (5'-IMP)

Adenosine-5'-monophosphate (5'-AMP)

วิธีการ

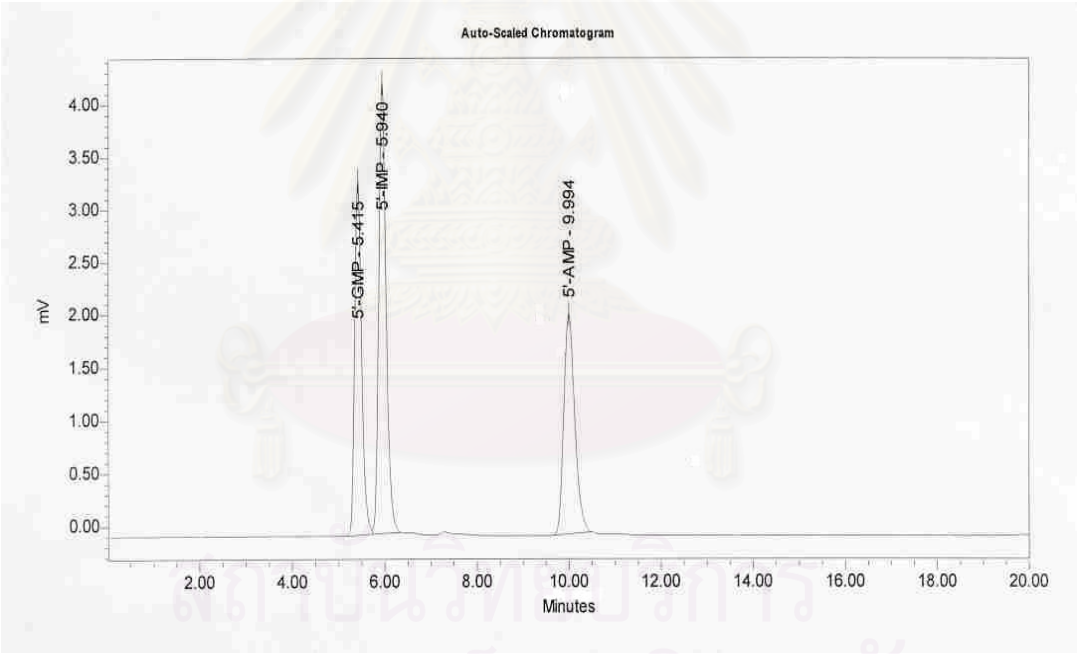
การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์จะใช้การตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC รุ่น Consta Metric 3500 pump. ใช้ Spectro Monitor 3100 เป็น detector ที่ความยาวคลื่น 245nm. และใช้ recorder รุ่น CI-4100.

คอลัมน์ใช้ Nova Pak C18 125 Å 4 μ ของ Waters ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.9 x 300 mm. คอลัมน์เก็บในเมทานอลเมื่อยังไม่ได้ใช้งาน

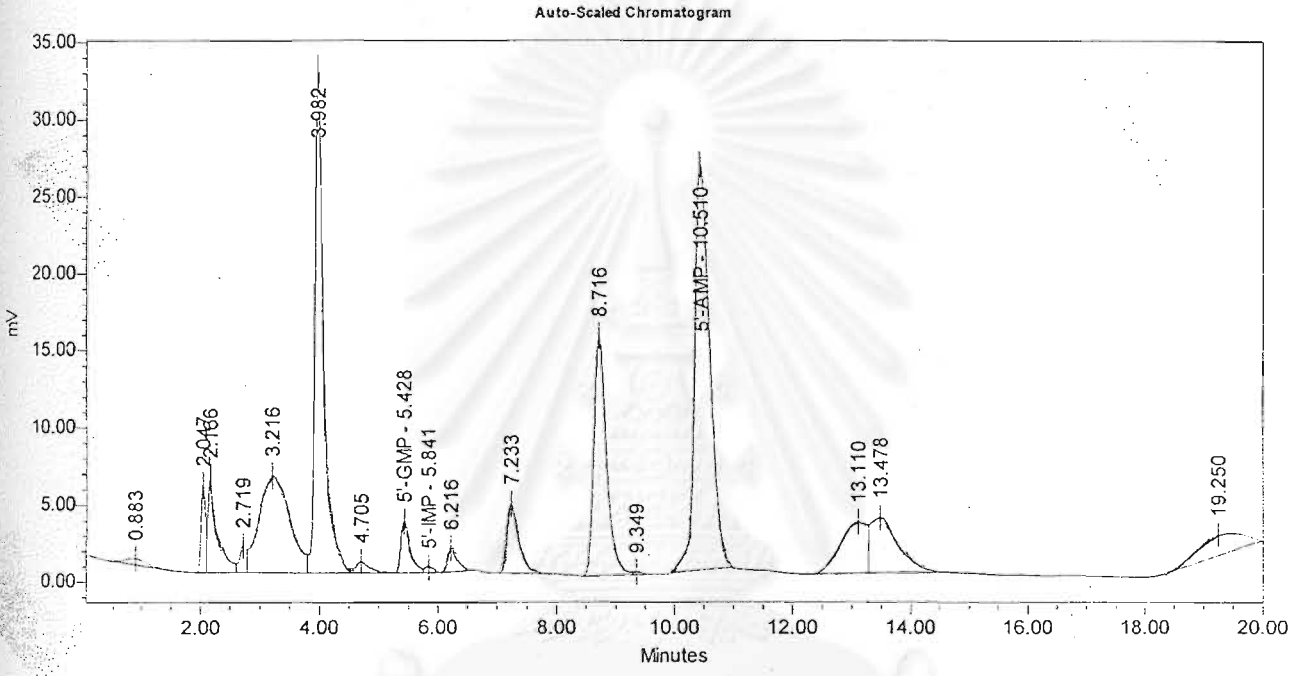
Mobile phase ใช้ 0.05 M. KH_2PO_4 ปรับ pH เป็น 4.0 ด้วย H_3PO_4 เจือจาง กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45μm.

ตัวอย่างกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.25μm. ฉีดตัวอย่างปริมาตร 5 μl. อัตราการป้อนตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ระยะเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

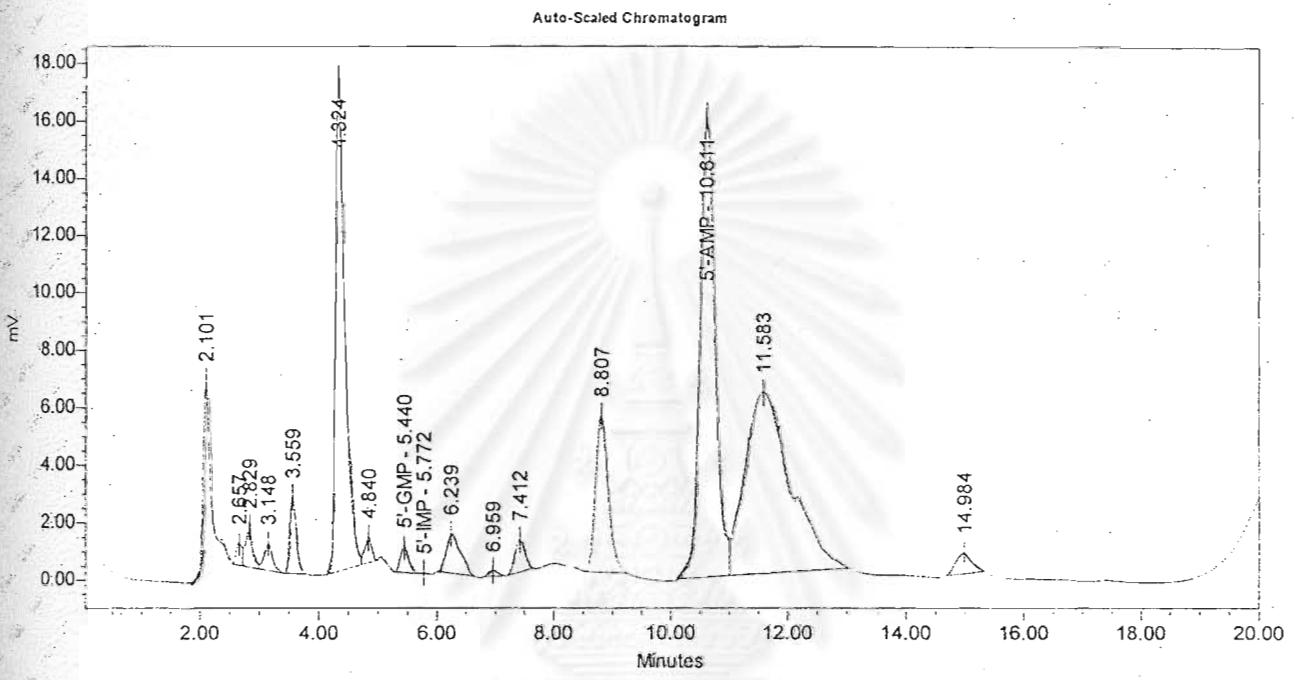


รูปที่ ข1. โครมาโตแกรมของสารประกอบ 5'-GMP, 5'-IMP และ 5'-AMP



รูปที่ ข2. โครมาโตแกรมสารประกอบ 5'-GMP, 5'-IMP และ 5'-AMP ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ข3. โครมาโตแกรมสารประกอบ 5'-GMP, 5'-IMP และ 5'-AMP ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. การวิเคราะห์สารประกอบที่ให้กลิ่นรสด้วยเครื่อง gas chromatography (ดัดแปลงจาก Ames และ MacLeod, 1985)

สารเคมี

Dichlorometane

ยีสต์สกัดหรือยีสต์ออโตไลเสทที่มีจำน่ายทางการค้า

กลิ่นรสเนื้อสัตว์ทางการค้า

วิธีการ

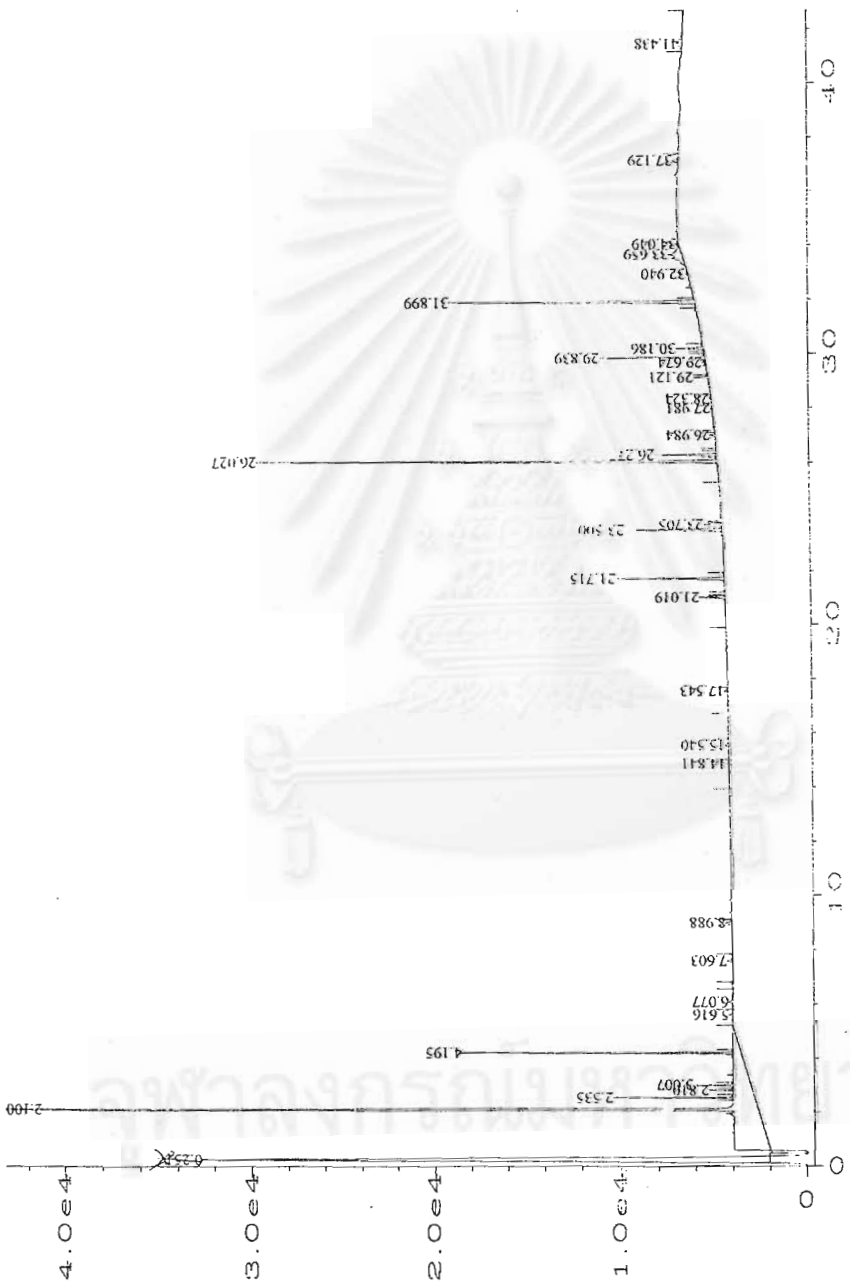
การสกัดสารประกอบที่ให้กลิ่นรส

นำยีสต์ออโตไลเสท 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร สกัดสารประกอบกลิ่นรสด้วยไดคลอโรมีเทน 40 มิลลิลิตร ในกรวยแยก ทำการสกัด 3 ครั้ง แยกชั้นของไดคลอโรมีเทนมาระเหยด้วย rotary evaporator จนมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่อง Gas chromatography ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

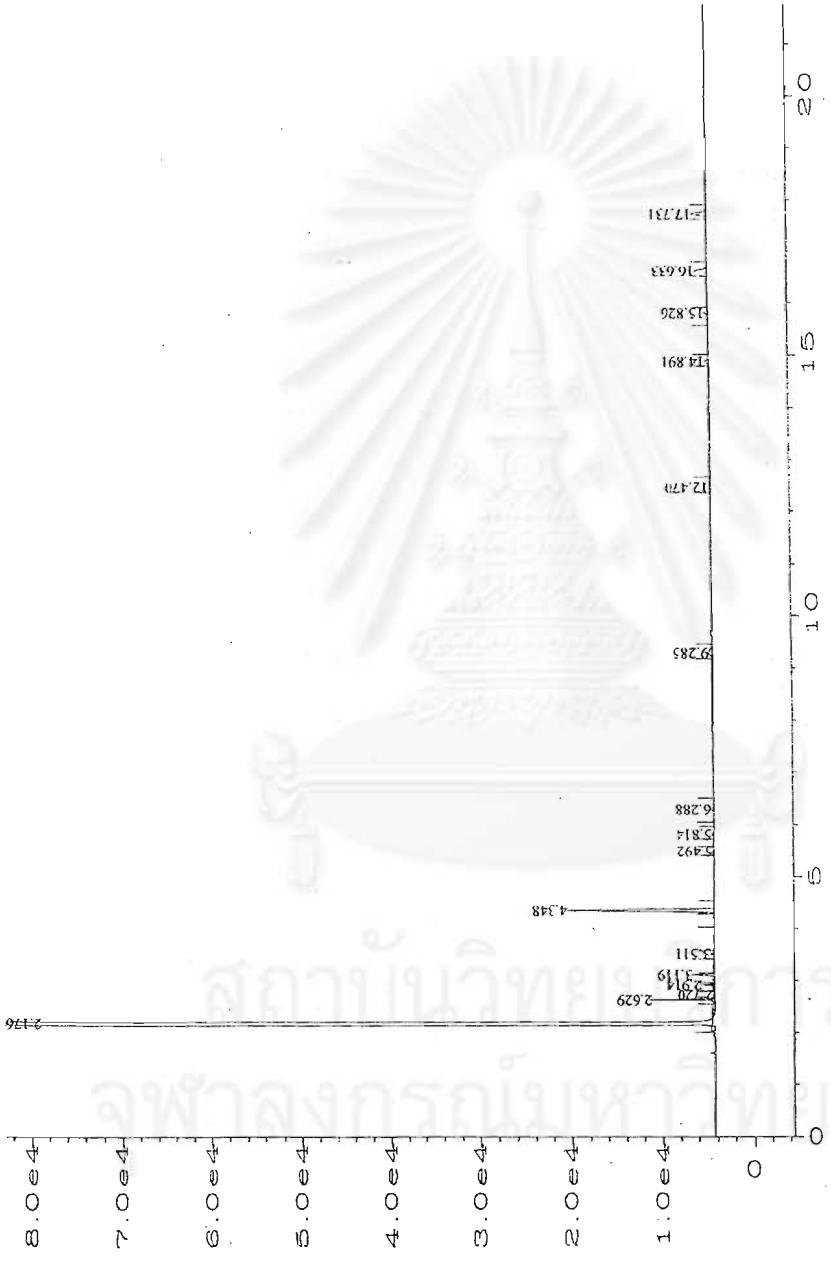
การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography

เครื่อง Gas chromatography ใช้ nonpolar fused silica capillary column ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร เคลือบด้วย Carbowax 20M หนา 0.25 ไมโครเมตร ใช้ก๊าซฮีเลี่ยม (helium gas) เป็นก๊าซตัวพาด้วยอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิเริ่มต้น 70°C และเพิ่มขึ้น 1°C ต่อนาที จนอุณหภูมิ 80°C อุณหภูมิเพิ่มขึ้น 5°C ต่อนาที จนอุณหภูมิ 200°C อุณหภูมิของ injector เป็น 220°C อุณหภูมิของ detector เป็น 220°C ปริมาตรของสารสกัดที่ฉีดเข้าเป็น 1 ไมโครลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

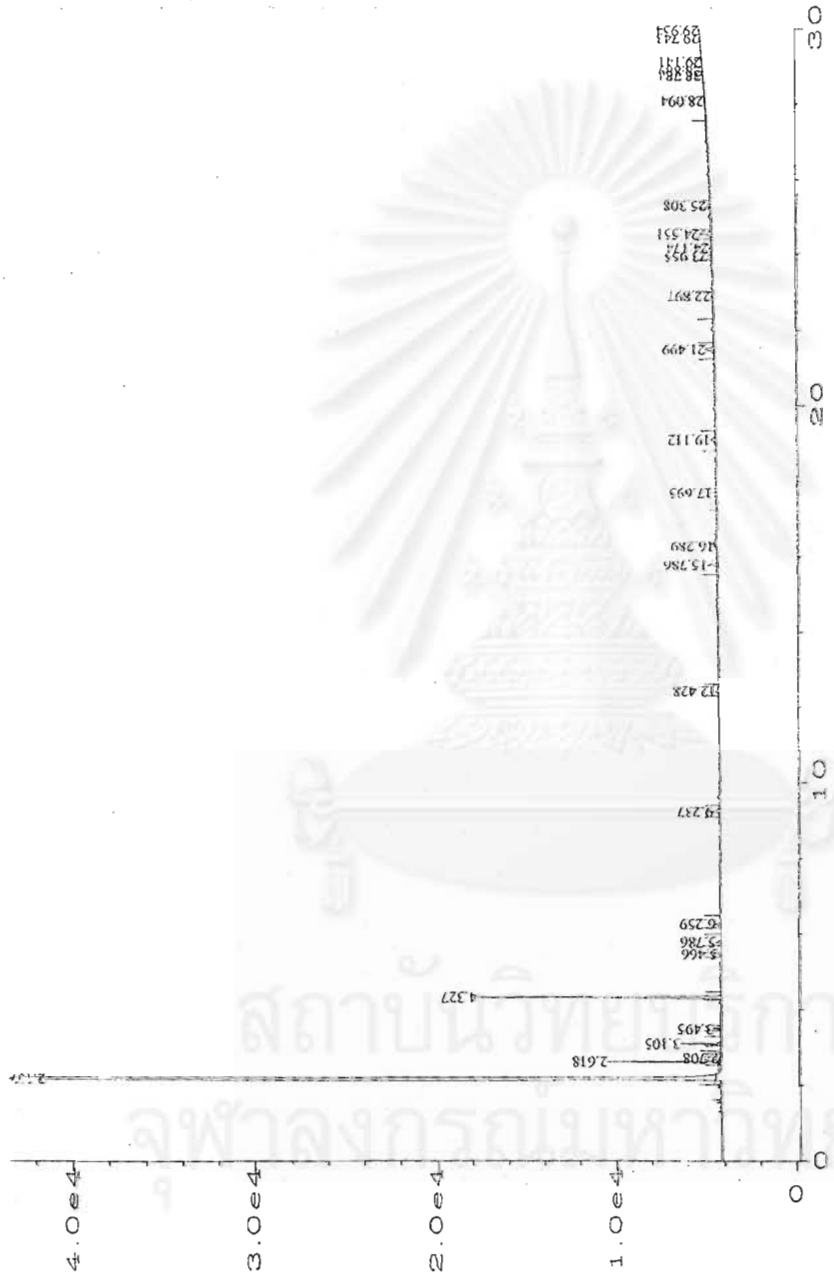


ภาพที่ 14. โครมาโตแกรมของ Chicken flavor snack

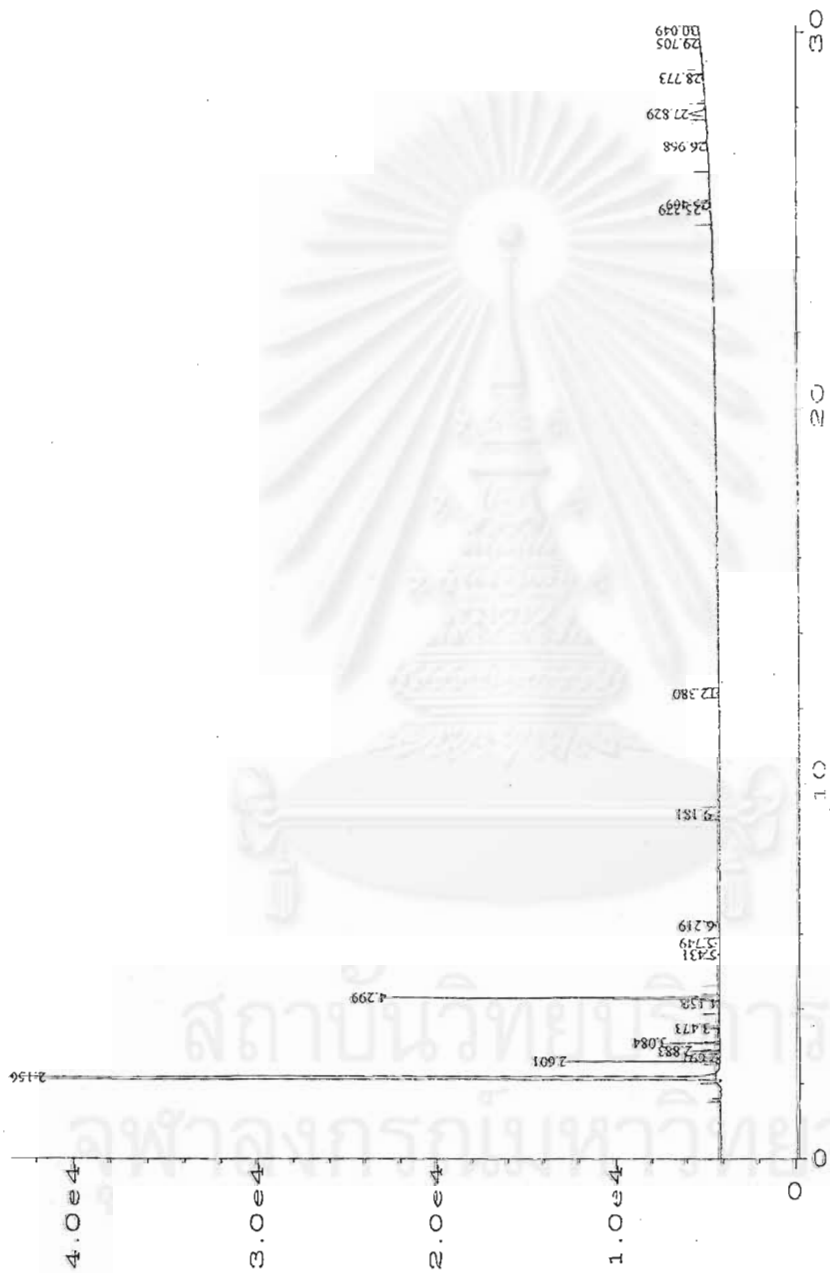


รูปที่ ข5. โครมาโทแกรมของ Yeast extract (BBL)

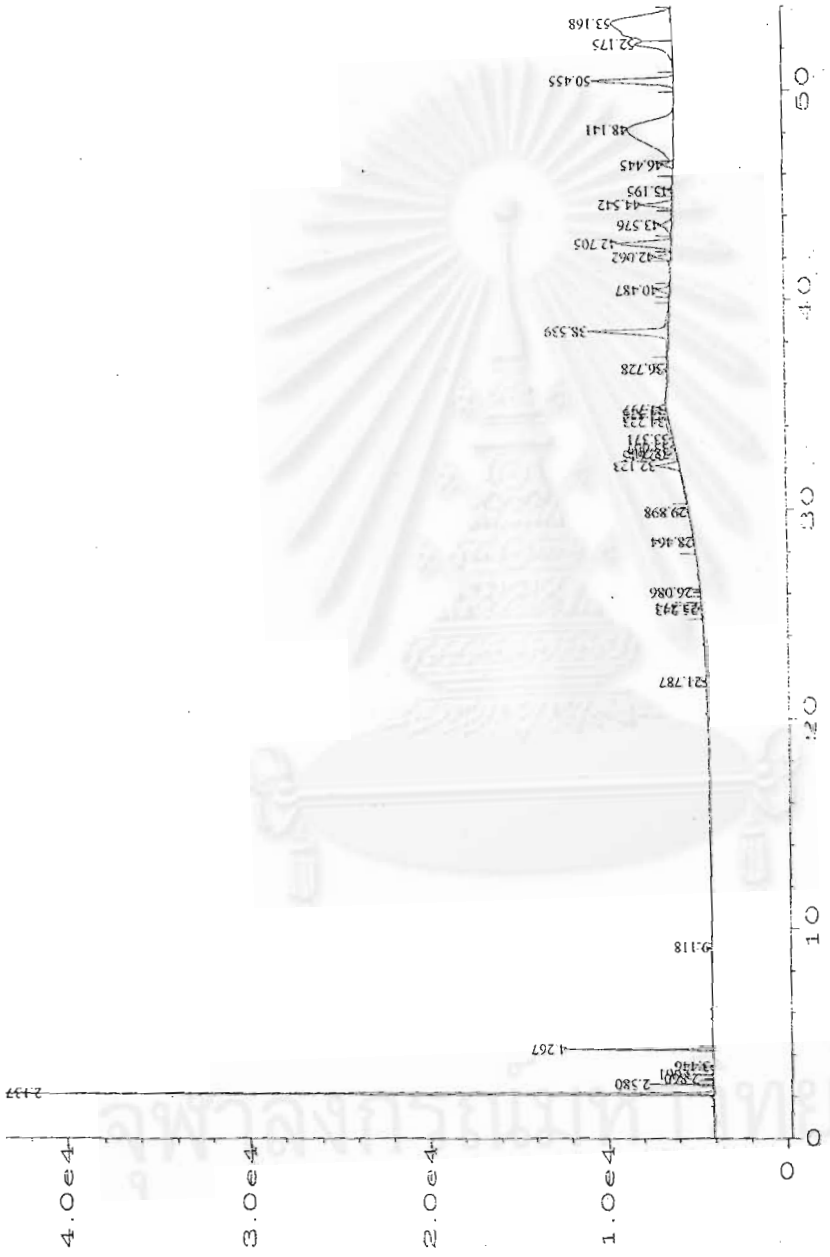
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ข6. โครมาโตแกรมของ Dry autolysed yeast 2000 powder without salt

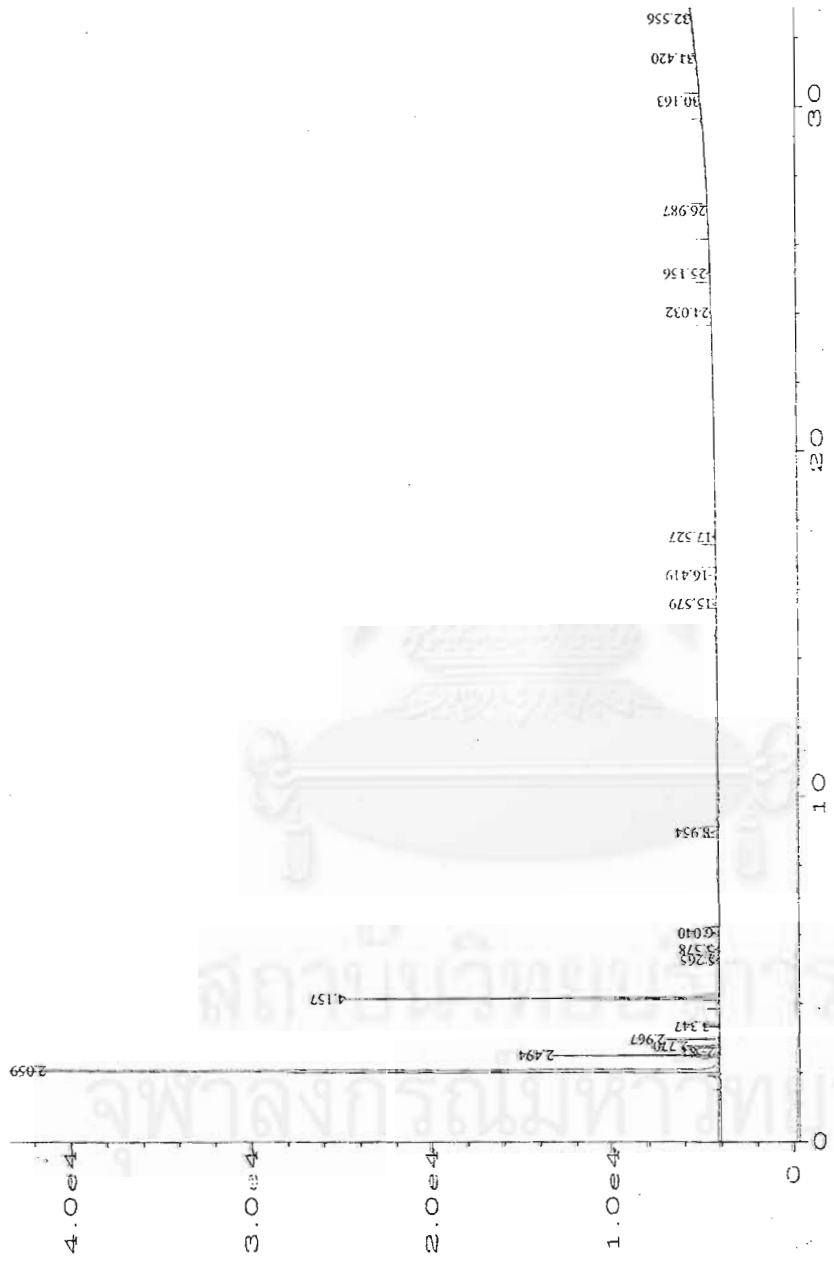


รูปที่ 27. โครมาโตแกรมของ Yeast extract (Merck)

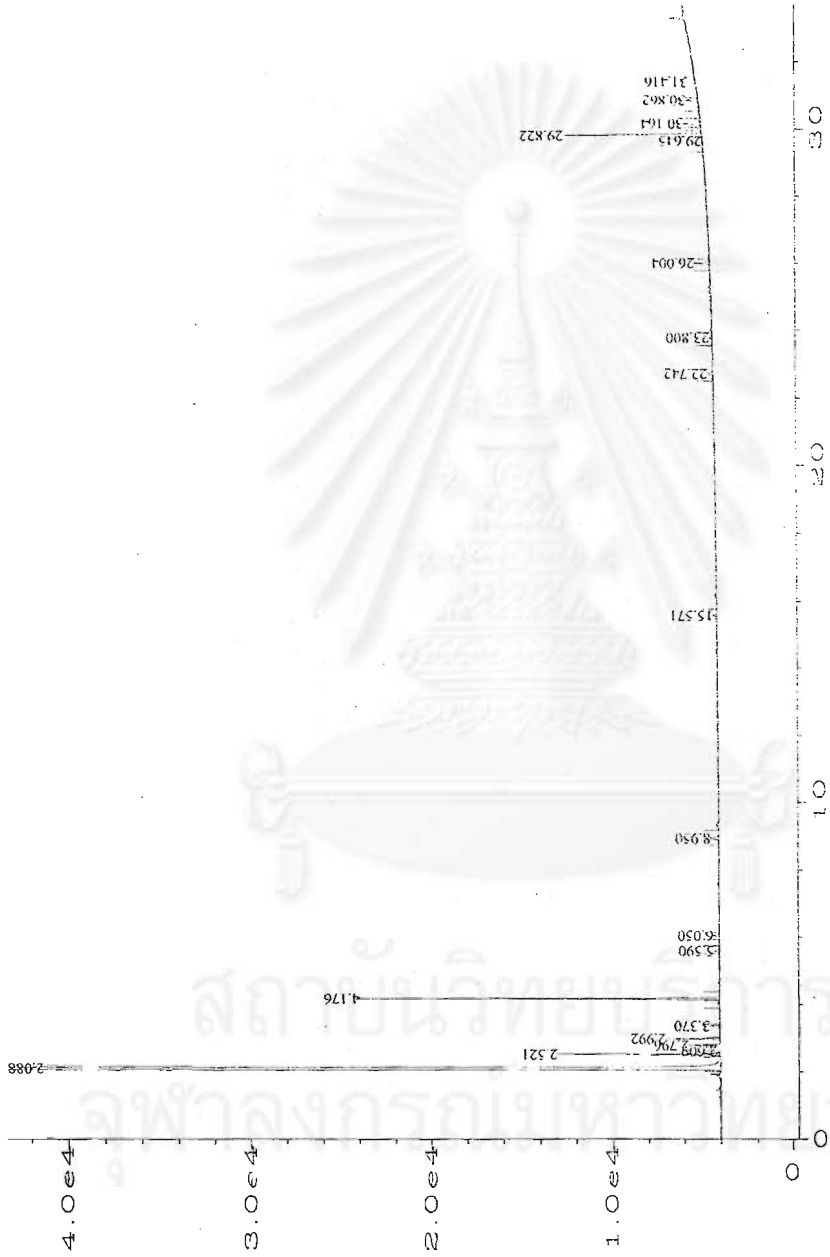


รูปที่ 18. โครมาโตแกรมของ Protibel yeast extract

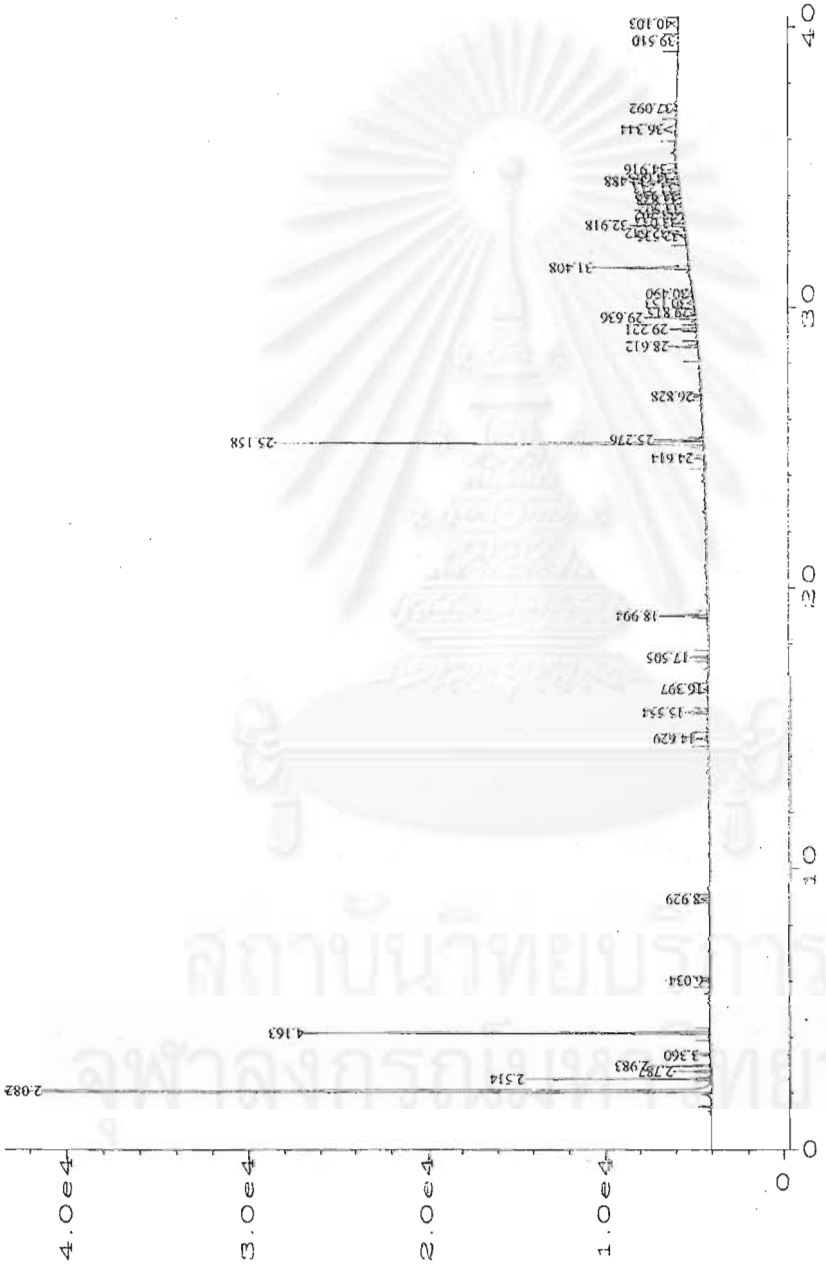
รูปที่ 19. โครมาโตแกรมของ Maxacrome yeast extract (Gistbrocades)



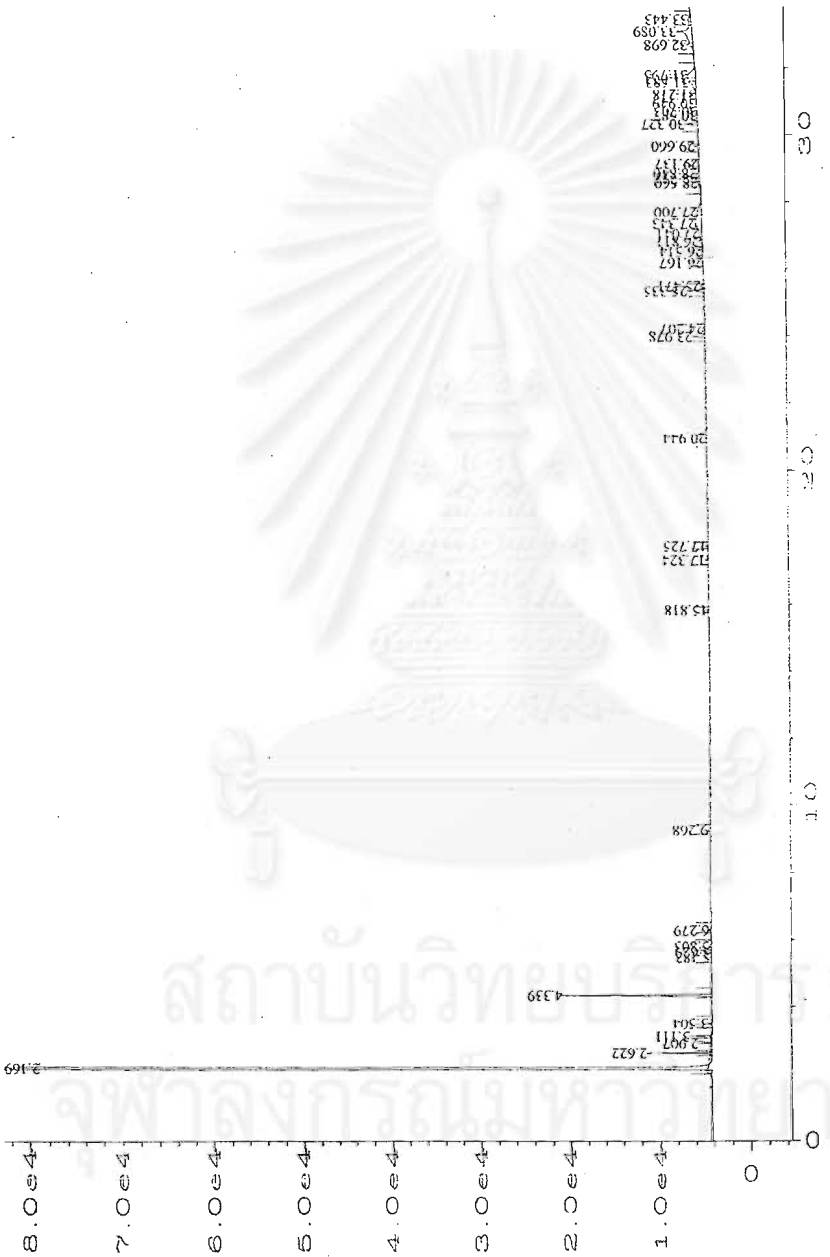
รูปที่ ข10 โครมาโตแกรมของ Yeast extract standard 36 powder



รูปที่ ฑ11 โครมาโตแกรมของ Vegamite concentrated yeast extract

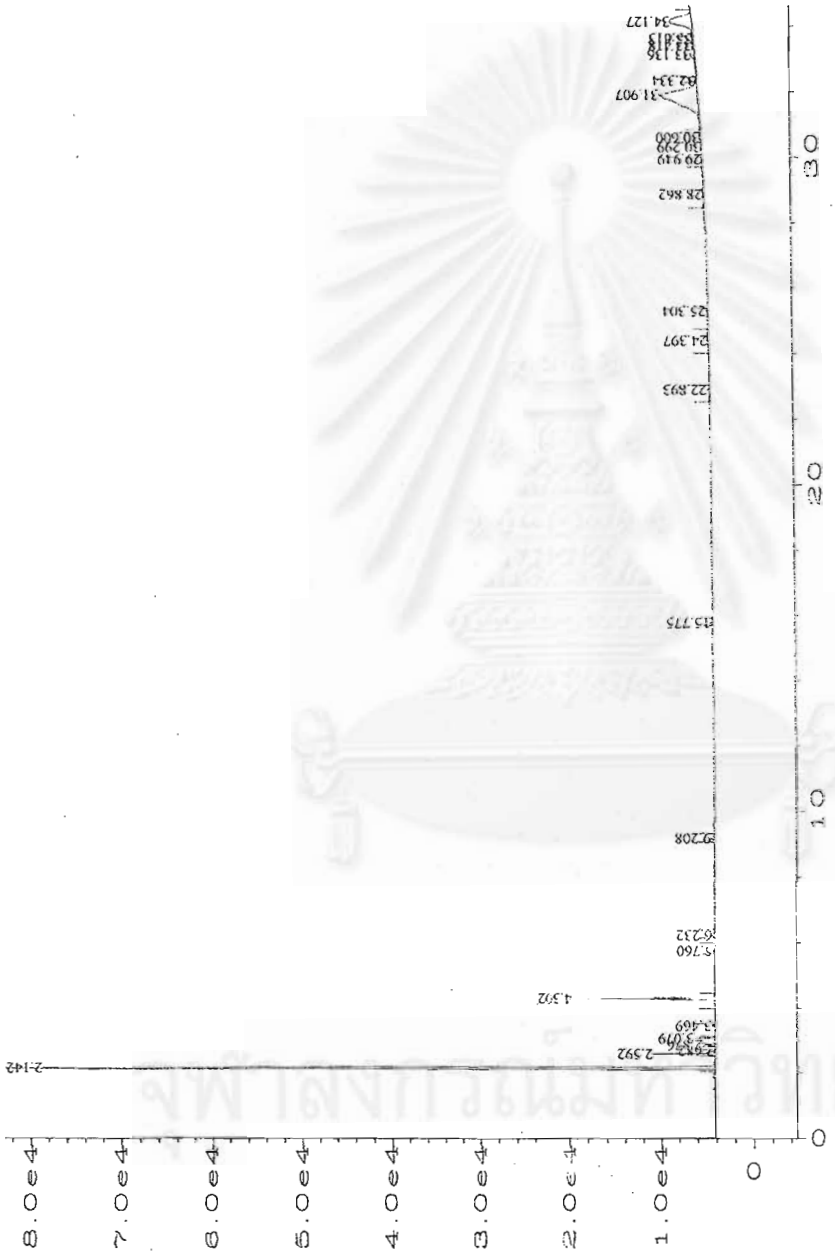


รูปที่ ฆ12. โครมาโตแกรมของ Baker's yeast extract



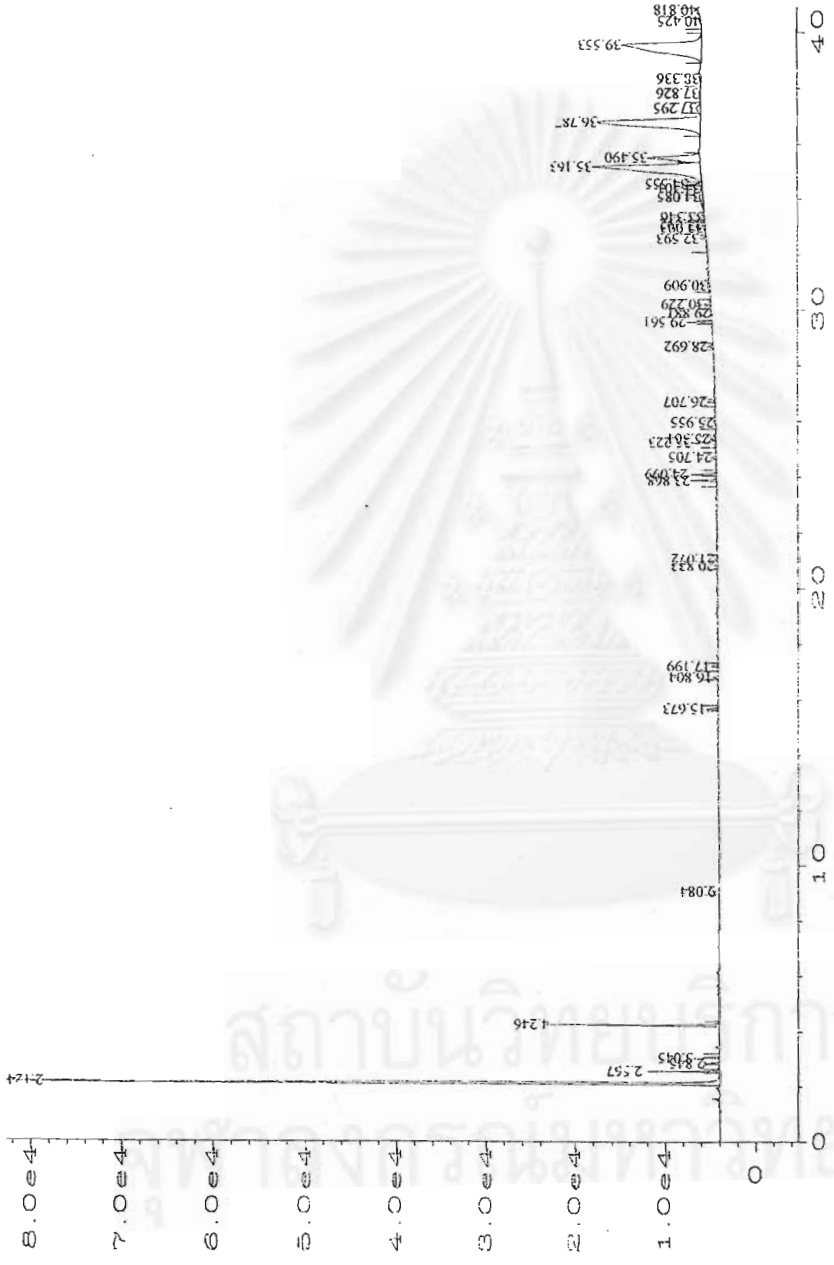
ภาพที่ ฑ13. โครมาโตแกรมของ ยีสต์ดอโตไลเซทที่เติมกลูเตนข้าวสาลี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ฆ14.. โครมาโตแกรมของ Dry food yeast spray dried VS2000

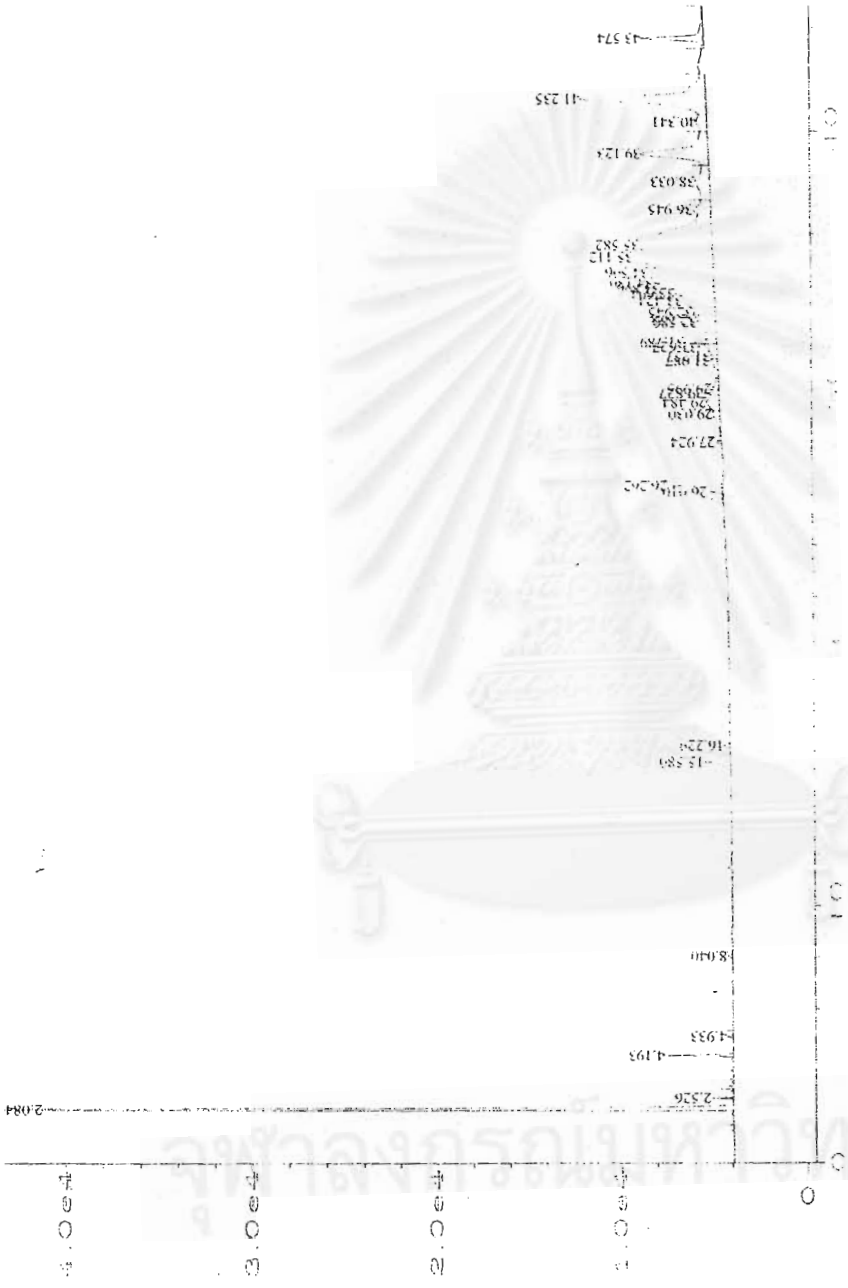
รูปที่ ฆ15. โครมาโตแกรมของ Springarom roasted meat flavour



รูปที่ ข16. โครมาโตแกรมของยีสต์ออโทไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง

รูปที่ ข17. โครงการโดแกรมของ Vegetarian chicken flavor

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ข18. โครมาโตแกรมของ Pork flavor

10. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน (วิธีของ Waters)

AccQ.Tag. เป็นวิธีหากรดอะมิโนที่ Waters พัฒนาขึ้น แต่เดิมการหาปริมาณกรดอะมิโนจะใช้สารเคมีทำอนุพันธ์กับกรดอะมิโนแบบ pre-column ก่อนฉีดตัวอย่างเข้าสู่ separating column แล้วตรวจวัดสัญญาณ (sensitivity) ของแต่ละอนุพันธ์กรดอะมิโนด้วยเครื่องตรวจวัดสัญญาณ สารเคมีที่มักนำมาทำอนุพันธ์กับกรดอะมิโน เช่น OPA (orthophthaldehyde), FMOC-Cl (fluorenyl methyl chloroformate) หรือ PITC (phenylisothiocyanate) แต่การทำอนุพันธ์กรดอะมิโนด้วยสารเคมีดังกล่าวทำให้ได้อนุพันธุ์ที่มักไม่เสถียร และสารเคมีจะทำปฏิกิริยากับ single amino acid เท่านั้น หรือมีการรบกวนจากสารเคมีที่มีมากเกินไปทำให้เกิดการปนเปื้อน (peak interfere) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทำอนุพันธุ์แล้วนำมาวิเคราะห์ใหม่ในแต่ละครั้ง ปริมาณที่วัดได้มักไม่เท่าเดิม จึงทำให้ความเชื่อถือในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนด้วยวิธีการทำอนุพันธุ์ดังกล่าวได้รับความนิยมลดลง AccQ.Tag เป็นการทำอนุพันธุ์กรดอะมิโนด้วยวิธี pre-column แต่จะง่าย สะดวก และใช้สารเคมีน้อยกว่า

สารเคมีที่ใช้ในการทำอนุพันธุ์ได้แก่ AQC. (AccQ-fluor reagent) มีชื่อทางเคมี คือ 6-amino quinolyl-N-hydroxy succinimidyl carbamate ซึ่งสารมารถเกิดอนุพันธุ์กับ primary และ secondary amino acid ได้เป็นอนุพันธุ์ของกรดอะมิโนที่มีความเสถียร สามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน และสามารถแยกได้ง่ายด้วย reverse phase HPLC โดยใช้ column ที่ Waters พัฒนาขึ้น อนุพันธุ์ที่แยกได้สามารถตรวจวัดด้วยเครื่อง fluorescent detector ที่ความยาวคลื่น 395 นาโนเมตร นอกจากนี้สาร AQC. ที่มากเกินพอจะถูก hydrolyse ด้วยน้ำได้เป็น AMQ. (aminoquinline) ที่ตรวจวัดได้น้อย ทำให้ไม่มีการรบกวนจากปริมาณ AQC. ที่มากเกินพอ

เครื่องมือ

1. Waters AccQ-Tag amino acid analysis column ทำหน้าที่แยกอนุพันธุ์ของกรด อะมิโน ซึ่ง column ที่ใช้เป็น Nova-Pak™ C18, 4μ
2. ใช้ Waters AccQ-Tag eluent A concentrate เป็น gradient mobile phase
3. Waters amino acid hydrolysate standard ampoules
4. Waters AccQ. fluor reagent kit ใน 1 ชุด ประกอบด้วยอย่างละ 5 ขวด ของ
   - Waters AccQ. fluor borate buffer
   - Waters AccQ. fluor reagent powder (2A)
   - Waters AccQ. fluor reagent diluent (2B)

วิธีการ

1. การเตรียม Waters AccQ. reagent เพื่อทำอนุพันธุ์

นำ Waters AccQ. fluor reagent (2B) 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Waters AccQ. fluor reagent (2A) ปิดฝาเขย่า 10 วินาที ให้ความร้อน 55°C จนผงใน (2A) ละลายหมด ระวังอย่าให้ความร้อนนานเกิน 10 นาที เมื่อเตรียมเสร็จสามารถเก็บไว้ใน ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 สัปดาห์

2. การเตรียมสารมาตรฐานและอนุพันธุ์ของสารมาตรฐาน

2.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

เติม amino acid hydrolysate standard 40 ไมโครลิตร และ Internal standard stock solution 40 ไมโครลิตร (ละลาย 2-amino butyric acid 6.45 มิลลิกรัม ใน 0.1M. HCl ปริมาณ 25 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°C ได้นาน 6 เดือน) จากนั้นเติม Milli-Q H_2O ลงไป 920 ไมโครลิตร สารมาตรฐานที่เตรียมได้จะประกอบด้วย 100 pmol/ไมโครลิตร ของแต่ละชนิดกรดอะมิโน และ internal standard 100 pmol/ไมโครลิตร

2.2 การเตรียมอนุพันธุ์สารมาตรฐาน

นำสารมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร ที่เตรียมไว้ใน sample tube ขนาด 6x50 มิลลิเมตร เติม Waters AccQ. fluor borate buffer ประมาณ 70 ไมโครลิตร เติม AQC. reagent 20 ไมโครลิตร วางที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10 นาที

3. การเตรียมตัวอย่างและอนุพันธุ์ของตัวอย่าง

ตัวอย่างจะต้องย่อยด้วย pico-tag workstation หรือกรดไฮโดรคลอริก หรือกรด ซัลฟูริก เข้มข้น 6 N. ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำ Internal standard ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ที่เตรียมไว้ใน 20mM. HCl ปริมาณ 980 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารมาตรฐานแบบ Internal standard ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ในตัวอย่าง

3.2 การเตรียมอนุพันธุ์ของตัวอย่าง

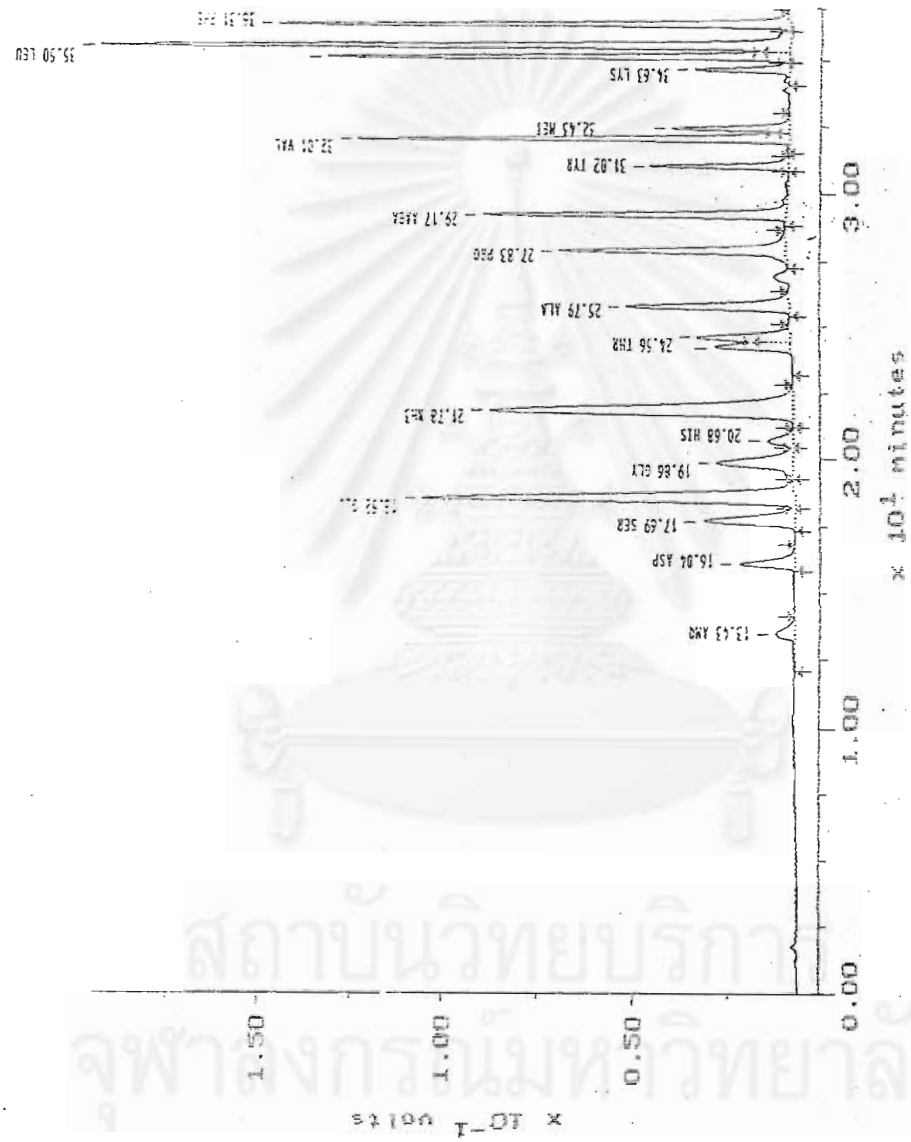
เติม AccQ. fluor borate ปริมาณ 60 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างที่เตรียมไว้ จากนั้นเขย่าให้เข้ากันและเติม AQC. reagent ที่เตรียมไว้ 20 ไมโครลิตร เขย่าเป็นเวลา 10 วินาที ทิ้งไว้ 1 นาที เพื่อรอให้ AQC ที่มากเกินพอถูก hydrolyse ด้วยน้ำไปเป็น AMQ นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10 นาที

3.3 การแยกอนุพันธุ์ของกรดอะมิโนด้วยระบบ

ใช้ปั๊มขับดัน mobile phase เข้ารวมกับตัวอย่างเพื่อพาเข้าสู่ separating column ที่มีอุณหภูมิ 37°C โดย mobile phase ใช้ 3 ชนิด คือ

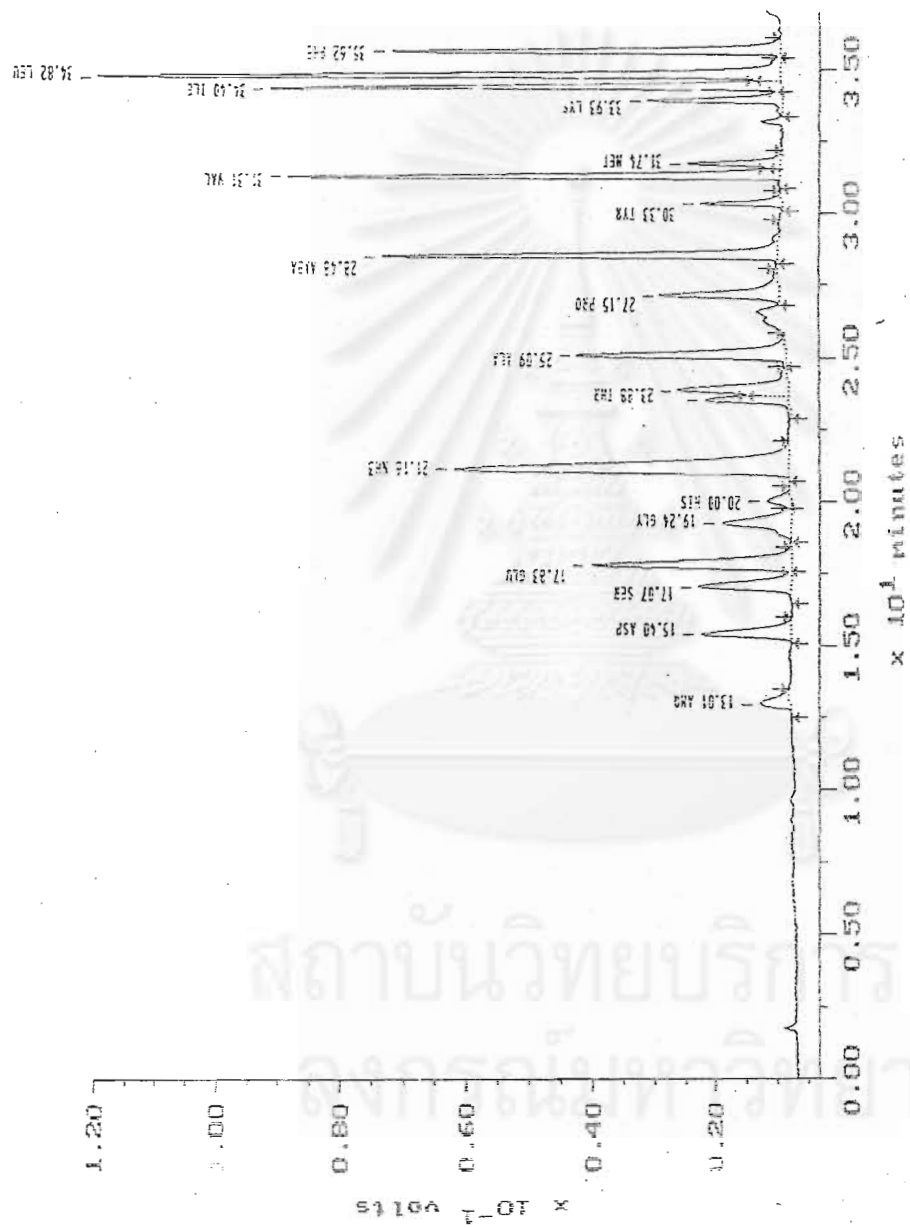
- eluent A เป็น AccQ. Tag eluent 200 มิลลิลิตร ใน Milli-Q 2 ลิตร
- eluent B เป็น Acetronitrile
- eluent C เป็น Milli-Q water

ตรวจวัดด้วย fluorescent detector ที่ความยาวคลื่น 395 นาโนเมตร จากนั้นเครื่องจะประมวลผลและรายงานปริมาณของกรดอะมิโน



รูปที่ ข19. โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนในซีรัมของโคโลเตรอลที่เติมกลูต้าไธโอน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 120. โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนในปัสสาวะโดยใช้เวลาที่เพิ่มมากขึ้นเหนือ

11. การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (ICMSF, 1974)

สารเคมี

Plate Count Agar (PCA)

0.1% peptone water

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ลงใน 0.1% peptone water 90 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10^{-1}
2. เจือจางสารละลายตัวอย่างด้วย 0.1% peptone water ที่มีความเข้มข้น 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4}
3. ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่หลอมและยังอุ่นอยู่ลงในจานเพาะเชื้อเขย่าให้อาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับสารละลายเจือจาง (pour plate)
5. วางไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยเลือกจานที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยคิดเป็นจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมของตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

12. การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อยีสต์และรา (ICMSF, 1974)

สารเคมี

Potato Dextrose Agar (PDA)

0.1% peptone water

tartaric acid

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ลงใน 0.1% peptone water 90 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10^{-1}
2. เจือจางสารละลายตัวอย่างด้วย 0.1% peptone water ที่มีความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-3}
3. ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ปรับ pH เป็น 3.5-4.0 ที่หลอมและยังอุ่นอยู่ลงในจานเพาะเชื้อเขย่าให้อาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับสารละลายเจือจาง (pour plate)
5. วางไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยเลือกจานที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยคิดเป็นจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมของตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค.

การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส

1. **การทำซุปผัก (ดัดแปลงจาก ศรีสมร คงพันธุ์**, 2541 และ Ceseram, Kinton and Foskett, 1995)

ส่วนผสม

หัวหอม	100	กรัม
แครอท	100	กรัม
คื่นฉ่าย	100	กรัม
กะหล่ำปลี	100	กรัม
มะเขือเทศ	50	กรัม
เห็ดฟาง	50	กรัม
พริกไทย 6	กรัม	
ยีสต์ออโตไลเสท	5	กรัม
น้ำ	1.5	ลิตร
เกลือ		
น้ำมัน		

วิธีทำ

1. ผัดหัวหอม แครอท คื่นฉ่าย กะหล่ำปลี ในน้ำมัน
2. นำผักที่ผัดใส่ในหม้อแล้วเติมส่วนผสมอื่นยกเว้นยีสต์ออโตไลเสท ต้ม 1 ชั่วโมง
3. เติมยีสต์ออโตไลเสท คนให้เข้ากัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบบทดสอบกลิ่นรสคล้ายเนื้อของยีสต์ออโตไลเสทในผลิตภัณฑ์ซุปน้ำใส

ชื่อ…… **วันที่**……

คำแนะนำ : โปรดประเมินตัวอย่างต่อไปนี้ในด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ โดยลากเส้นตั้งฉากบนเส้นสเกล

1. รหัส……..

ไม่มีกลิ่น|----------|มีกลิ่นมากที่สุด

2. รหัส……..

ไม่มีกลิ่น|----------|มีกลิ่นมากที่สุด

3. รหัส……..

ไม่มีกลิ่น|----------|มีกลิ่นมากที่สุด

ข้อเสนอแนะ……

……

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การทำลูกชิ้นมังสวิรัติ

ดัดแปลงจาก อมราภรณ์ วงษ์ฟัก (มปป.) และ วิไลรัตน์ มณีเสถียรรัตนา (2535)

ส่วนผสม

โปรตีนถั่วเหลืองสกัด	80	กรัม
แป้งหมี่กึง	20	กรัม
น้ำตาล	3.5	กรัม
พริกไทย	3.5	กรัม
น้ำ	280	กรัม
เกลือ	1	ช้อนชา

วิธีทำ

1. ละลายเกลือและน้ำตาลในน้ำ
2. ผสมกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัด แป้งหมี่กึง พริกไทย แล้วนวดให้เข้ากันจนเหนียว ประมาณ 20 นาทีด้วยเครื่องผสมหัวนวดรูปตัวเค
3. ปั้นแป้งที่นวดได้เป็นก้อนขนาดตามต้องการ ต้มในน้ำเดือดจนสุก
4. ตักขึ้นแช่ในน้ำเย็น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบบทดสอบกลิ่นรสคล้ายเนื้อของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นมังสวิรัติ

ชื่อ..... **วันที่**.....

คำแนะนำ : โปรดประเมินตัวอย่างต่อไปนี้ในด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ และความยอมรับ โดยลากเส้นตั้งฉากบนเส้นสเกลพร้อมทั้งเขียนรหัสตัวอย่างกำกับ

1. กลิ่นรสคล้ายเนื้อ

ไม่มีกลิ่น|----------|มีกลิ่นมากที่สุด

2. ความยอมรับ

ไม่ยอมรับ|----------|ยอมรับมากที่สุด

ข้อเสนอแนะ.....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง.

การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน

ตารางที่ ง1. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าความขม ในการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

SOV	df	MS	F
ความเข้มข้น NaOH (A)	2	61.050	196.552*
อุณหภูมิ (B)	2	8.547	27.516*
เวลา (C)	2	41.115	132.372*
A*B	4	5.110	16.450*
A*C	4	9.043	29.114*
B*C	4	60.016	193.223*
A*B*C	8	3.531	11.369*
Error	27		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง2. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าการสูญเสียยีสต์ ในการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

SOV	df	MS	F
ความเข้มข้น NaOH (A)	2	109.009	14.852*
อุณหภูมิ (B)	2	773.747	105.418*
เวลา (C)	2	624.038	85.021*
A*B	4	38.242	5.210*
A*C	4	15.688	2.137^{ns}
B*C	4	152.551	20.784*
A*B*C	8	27.810	3.789*
Error	27	7.340	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง3. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าความขม ในการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

SOV	df	MS	F
ความเข้มข้น Na_2CO_3 (A)	2	61.817	48.213*
อุณหภูมิ (B)	2	46.318	36.126*
เวลา (C)	2	68.277	53.252*
A*B	4	7.466	5.823*
A*C	4	7.102	5.539*
B*C	4	19.794	15.439*
A*B*C	8	4.150	3.236*
Error	27	1.282	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง4. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าการสูญเสียยีสต์ ในการล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

SOV	df	MS	F
ความเข้มข้น Na_2CO_3 (A)	2	66.173	2.300^{ns}
อุณหภูมิ (B)	2	450.115	15.644*
เวลา (C)	2	36.310	1.262^{ns}
A*B	4	150.171	5.219*
A*C	4	61.602	2.141^{ns}
B*C	4	21.529	0.748^{ns}
A*B*C	8	23.895	0.830^{ns}
Error	27	28.773	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง5. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าความขม และค่าความสูญเสียของยีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายด่าง น้ำกลั่น และยีสต์ที่ไม่ผ่านการล้าง

SOV	df	MS	F
Bitterness			
Between group	3	1458.709	170.976*
Within group	8	8.532	
Total	11		
Loss			
Between group	3	336.015	206.386*
Within group	8	1.628	
Total	11		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง6. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L

SOV	df	MS	F
ออโตไลเสท			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	4949.312	3293.231*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	331.660	220.684*
ระยะเวลา (C)	2	67.929	45.199*
A*B	4	492.298	327.571*
A*C	4	6.706	4.462*
B*C	4	32.529	21.645*
A*B*C	8	15.249	10.146*
Error	27	1.503	
ปริมาณโปรตีน			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	400.662	354.987*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	855.216	757.721*
ระยะเวลา (C)	2	11.202	9.925*
A*B	4	138.417	122.638*
A*C	4	1.812	1.605^{ns}
B*C	4	2.938	2.603^{ns}
A*B*C	8	2.091	1.853^{ns}
Error	27	1.129	
ปริมาณคาร์โบไฮเดรต			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	115.943	195.752*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	397.373	670.902*
ระยะเวลา (C)	2	3.116	5.261*
A*B	4	23.812	40.202*
A*C	4	2.020	3.410*
B*C	4	1.983	3.348*
A*B*C	8	0.302	0.510^{ns}
Error	27	0.592	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง7. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L

SOV	df	MS	F
ออโตไลเสท			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	4041.099	1797.410*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	178.511	79.399*
ระยะเวลา (C)	2	58.070	25.829*
A*B	4	282.402	125.608*
A*C	4	3.642	1.620^{ns}
B*C	4	4.587	2.040^{ns}
A*B*C	8	3.544	1.576^{ns}
Error	27	2.248	
ปริมาณโปรตีน			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	33.270	50.499*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	1453.261	2205.820*
ระยะเวลา (C)	2	7.634	11.588*
A*B	4	27.694	42.035*
A*C	4	3.620	5.494*
B*C	4	5.921	8.987*
A*B*C	8	1.788	2.713*
Error	27	0.659	
ปริมาณคาร์โบไฮเดรต			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	6.278	22.531*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	48.924	175.595*
ระยะเวลา (C)	2	1.450	5.205*
A*B	4	1.430	5.133*
A*C	4	1.781	6.391*
B*C	4	2.948	10.582*
A*B*C	8	0.813	2.917*
Error	27	0.279	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง8. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L

SOV	df	MS	F
ออโตไลเสท			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	4622.308	3563.632*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	100.147	77.210*
ระยะเวลา (C)	2	66.048	50.921*
A*B	4	383.796	295.893*
A*C	4	9.243	7.126*
B*C	4	2.314	1.784^{ns}
A*B*C	8	3.283	2.531*
Error	27	1.297	
ปริมาณโปรตีน			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	3.349	11.529*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	30.464	104.884*
ระยะเวลา (C)	2	0.550	1.894^{ns}
A*B	4	0.660	2.271^{ns}
A*C	4	0.143	0.491^{ns}
B*C	4	0.821	0.044*
A*B*C	8	0.643	0.059^{ns}
Error	27	0.290	
ปริมาณคาร์โบไฮเดรต			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	9.811	22.746*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	24.640	57.124*
ระยะเวลา (C)	2	1.337	3.099^{ns}
A*B	4	2.173	5.038*
A*C	4	1.928	4.469*
B*C	4	1.381	3.202*
A*B*C	8	0.418	0.9690^{ns}
Error	27	0.431	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง9. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L

SOV	df	MS	F
ออโตไลเสท			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	11753.107	7130.775*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	202.001	122.557*
ระยะเวลา (C)	2	44.470	26.980*
A*B	4	242.693	147.245*
A*C	4	1.857	1.127^{ns}
B*C	4	28.337	17.192*
A*B*C	8	14.136	8.577*
Error	27	1.648	
ปริมาณโปรตีน			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	499.280	483.686*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	837.659	811.496*
ระยะเวลา (C)	2	6.659	6.451*
A*B	4	151.567	146.833*
A*C	4	8.666	8.395*
B*C	4	2.786	2.699^{ns}
A*B*C	8	11.143	10.795*
Error	27	1.032	
ปริมาณคาร์โบไฮเดรต			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	446.318	545.664*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	245.009	299.546*
ระยะเวลา (C)	2	2.767	3.383*
A*B	4	19.627	23.996*
A*C	4	2.617	3.200*
B*C	4	10.241	12.521*
A*B*C	8	5.117	6.256*
Error	27	0.818	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง10. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L

SOV	df	MS	F
ออโตไลเสท			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	8877.134	6126.923*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	197.639	136.409*
ระยะเวลา (C)	2	18.483	12.575*
A*B	4	58.514	40.386*
A*C	4	2.143	1.479ns
B*C	4	6.973	4.813*
A*B*C	8	3.605	2.488*
Error	27	1.449	
ปริมาณโปรตีน			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	19.605	26.453*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	1094.925	1477.340*
ระยะเวลา (C)	2	0.440	0.594ns
A*B	4	23.326	31.474*
A*C	4	9.891	13.354*
B*C	4	4.854	6.549*
A*B*C	8	2.287	3.085*
Error	27	0.741	
ปริมาณคาร์โบไฮเดรต			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	123.328	284.512*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	1.791	4.132*
ระยะเวลา (C)	2	8.653	19.962*
A*B	4	23.361	53.893*
A*C	4	1.686	3.890*
B*C	4	2.331	5.377*
A*B*C	8	3.509	8.094*
Error	27	0.433	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง11. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L

SOV	df	MS	F
ออโตไลเสท			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	8194.426	7606.781*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	1360.827	1263.239*
ระยะเวลา (C)	2	30.299	28.126*
A*B	4	65.054	60.389*
A*C	4	4.014	3.727*
B*C	4	11.625	10.792*
A*B*C	8	9.831	9.126*
Error	27	1.077	
ปริมาณโปรตีน			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	29.863	76.682*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	50.916	130.744*
ระยะเวลา (C)	2	8.155	20.941*
A*B	4	0.491	1.261^{ns}
A*C	4	2.896	7.437*
B*C	4	1.506	3.867*
A*B*C	8	2.116	5.432*
Error	27	0.389	
ปริมาณคาร์โบไฮเดรต			
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	202.129	272.697*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	0.857	1.156^{ns}
ระยะเวลา (C)	2	4.853	6.548*
A*B	4	11.511	15.530*
A*C	4	2.451	3.307*
B*C	4	13.719	18.508*
A*B*C	8	7.522	10.148*
Error	27	0.741	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง12. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L

SOV	df	MS	F
ชุดการทดลอง	2	2.619	1.891*
ผู้ทดสอบ	9	2.424	1.750^{ns}
Error	48	1.385	
Total	60		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง13. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L

SOV	df	MS	F
ชุดการทดลอง	2	20.143	33.447*
ผู้ทดสอบ	9	2.900	4.815*
Error	48	0.602	
Total	60		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง14. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Neutrase® 0.5L

SOV	df	MS	F
ชุดการทดลอง	3	0.156	0.285
ผู้ทดสอบ	9	3.163	6.614*
Error	67	0.546	
Total	80		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง15. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L

SOV	df	MS	F
ชุดการทดลอง	4	5.258	8.743*
ผู้ทดสอบ	9	2.244	3.741*
Error	86	0.601	
Total	100		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง16. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนถั่วเลืองสกัด ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L

SOV	df	MS	F
ชุดการทดลอง	5	18.297	34.105*
ผู้ทดสอบ	9	1.231	2.294*
Error	105	0.537	
Total	120		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง17. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L

SOV	df	MS	F
ชุดการทดลอง	4	4.968	9.183*
ผู้ทดสอบ	9	0.992	1.833^{ns}
Error	86	0.541	
Total	100		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง18. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณออโตไลเสท โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนพืชร่วมกับเอนไซม์จากภายนอก ในระหว่างการย่อยสลายตัวเอง ของยีสต์

SOV	df	MS	F
ออโตไลเสท			
Between group	7	327.730	235.464*
Within group	8	1.392	
Total	15		
ปริมาณโปรตีน			
Between group	7	210.964	34.438*
Within group	8	0.438	
Total	15		
ปริมาณคาร์โบไฮเดรต			
Between group	7	31.209	34.438*
Within group	8	0.906	
Total	15		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง19. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้านการทดสอบกลิ่นรสคล้ายเนื้อ ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมโปรตีนพืชร่วมกับเอนไซม์จากภายนอก ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

SOV	Df	MS	F
ชุดการทดลอง	7	18.852	15.036*
ผู้ทดสอบ	9	0.805	0.642^{ns}
Error	143	1.254	
Total	160		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง20. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณ RNA เมื่อเติมเอนไซม์ PDE ที่ปริมาณอุณหภูมิ และระยะเวลาต่างๆ ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี

SOV	Df	MS	F
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	5.789	57.955*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	127.677	1278.279*
ระยะเวลา (C)	2	3.392	33.955*
A*B	4	3.210	32.139*
A*C	4	0.300	3.002^{ns}
B*C	4	0.637	6.376*
A*B*C	8	0.07687	0.770^{ns}
Error	27	0.09988	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง21. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณ RNA เมื่อเติมเอนไซม์ PDE ที่ปริมาณอุณหภูมิ และระยะเวลาต่างๆ ในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง

SOV	Df	MS	F
ความเข้มข้นเอนไซม์ (A)	2	5.602	22.297*
ปริมาณโปรตีนพืช (B)	2	120.58	481.439*
ระยะเวลา (C)	2	3.160	12.579*
A*B	4	3.564	14.187*
A*C	4	0.188	0.748^{ns}
B*C	4	0.887	3.530*
A*B*C	8	0.186	0.742^{ns}
Error	27	0.251	

* แตกต่างอย่างมีนับสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง22. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ที่มีในยีสต์ออโตไลเสทที่เติมและไม่เติมเอนไซม์ PDE

SOV	Df	MS	F
5'-AMP			
Between group	5	112256.3	116.806*
Within group	12	961.246	
Total	17		
5'-GMP			
Between group	5	2957.383	119.789*
Within group	12	24.690	
Total	17		
5'-IMP			
Between group	5	185.727	0.379^{ns}
Within group	12	490.488	
Total	17		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง23. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ เมื่อเติมเมทไธโอนีน ซิสเตอีน และไทอามีน ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L

SOV	Df	MS	F
ชุดการทดลอง	17	5.294	7.921*
ผู้ทดสอบ	9	6.703	10.029*
Error	333	0.668	
Total	360		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง24. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อ เมื่อเติมเมทไธโอนีน ซิสเตอีน และไทอามีน ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L

SOV	Df	MS	F
ชุดการทดลอง	17	4.967	5.431*
ผู้ทดสอบ	9	1.360	1.487^{ns}
Error	333	0.915	
Total	360		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง25. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อและความยอมรับของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นมังสวิรัติ เมื่อเติมยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลีร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L

SOV	Df	MS	F
กลิ่นรสคล้ายเนื้อ			
ชุดการทดลอง	2	8.561	15.249*
ผู้ทดสอบ	9	0.595	1.060^{ns}
Error	48	0.561	
Total	60		
ความยอมรับ			
ชุดการทดลอง	2	20.263	33.042*
ผู้ทดสอบ	9	0.981	1.599^{ns}
Error	48	0.613	
Total	60		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง26. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดสอบด้านกลิ่นรสคล้ายเนื้อและความยอมรับของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นมังสวิรัติ เมื่อเติมยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลืองร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L

SOV	df	MS	F
กลิ่นรสคล้ายเนื้อ			
ชุดการทดลอง	2	13.465	26.514*
ผู้ทดสอบ	9	0.824	1.623^{ns}
Error	48	0.508	
Total	60		
ความยอมรับ			
ชุดการทดลอง	2	9.525	26.087*
ผู้ทดสอบ	9	0.456	1.250^{ns}
Error	48	0.365	
Total	60		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ.

การเตรียมกากถั่วเหลือง

การเตรียมกากถั่วเหลือง (วารยา บุษปธำรง, 2539.)

วัตถุดิบ

กากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมัน

วิธีการ

กากถั่วแห้ง

⇓

บดลดขนาดจนสามารถร่อนผ่านตะแกรงขนาด 25 เมช

⇓

เติมน้ำในอัตราส่วนกากป่น:น้ำ เป็น 1:9

⇓

นึ่งด้วยไอน้ำ 100°C ที่ความดันบรรยากาศ นาน 60 นาที

⇓

ทำให้เย็น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ.

การย่อยสลาย RNA ในยีสต์ออโตไลเสท

ตารางที่ ฉ1. ปริมาณ RNA ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี เมื่อเติมเอนไซม์ PDE

% PDE	Temp (^{o}C)	Time (hrs.)	RNA (mg./ml.)
0.2	45	2	9.62 ± 0.98
0.2	45	4	8.50 ± 1.03
0.2	45	6	7.61 ± 0.49
0.2	55	2	2.62 ± 0.14
0.2	55	4	2.11 ± 0.13
0.2	55	6	2.00 ± 0.10
0.2	65	2	3.58 ± 0.40
0.2	65	4	3.39 ± 0.21
0.2	65	6	2.97 ± 0.36
0.5	45	2	7.26 ± 0.39
0.5	45	4	6.54 ± 0.34
0.5	45	6	6.48 ± 0.23
0.5	55	2	2.10 ± 0.71
0.5	55	4	2.22 ± 0.78
0.5	55	6	2.03 ± 0.13
0.5	65	2	2.43 ± 0.14
0.5	65	4	2.28 ± 0.88
0.5	65	6	2.18 ± 0.16^{ij}
1.0	45	2	6.95 ± 0.11
1.0	45	4	6.24 ± 0.16
1.0	45	6	4.88 ± 0.86
1.0	55	2	2.92 ± 0.78
1.0	55	4	2.50 ± 0.42
1.0	55	6	2.19 ± 0.10
1.0	65	2	2.49 ± 0.45
1.0	65	4	2.61 ± 0.16
1.0	65	6	2.31 ± 0.64

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ฉ2. ปริมาณ RNA ของยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง เมื่อเติมเอนไซม์ PDE

% PDE	Temp (^{o}C)	Time (hrs.)	RNA (mg./ml.)
0.2	45	2	9.11 ± 1.04
0.2	45	4	9.37 ± 0.85
0.2	45	6	7.40 ± 0.67
0.2	55	2	2.33 ± 0.89
0.2	55	4	2.29 ± 0.61
0.2	55	6	2.16 ± 0.31
0.2	65	2	3.37 ± 0.21
0.2	65	4	3.13 ± 0.38
0.2	65	6	2.89 ± 0.90
0.5	45	2	7.19 ± 0.66
0.5	45	4	6.11 ± 0.37
0.5	45	6	5.98 ± 0.20
0.5	55	2	2.46 ± 0.35
0.5	55	4	2.22 ± 0.10
0.5	55	6	1.97 ± 0.61
0.5	65	2	2.89 ± 0.90
0.5	65	4	2.43 ± 0.87
0.5	65	6	2.27 ± 0.48
1.0	45	2	6.94 ± 0.86
1.0	45	4	6.16 ± 0.67
1.0	45	6	4.82 ± 0.55
1.0	55	2	2.57 ± 0.38
1.0	55	4	2.37 ± 0.92
1.0	55	6	2.24 ± 0.45
1.0	65	2	2.84 ± 0.85
1.0	65	4	2.77 ± 0.20
1.0	65	6	2.51 ± 0.63

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ฉ3. ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และ RNA ในยีสต์ออโตไลเสทหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C นาน 2 ชั่วโมง

เวลา (hrs.)	ยีสต์ออโตไลเสท	ปริมาณ (mg./ml.)		
		โปรตีน	คาร์โบไฮเดรต	RNA
0	ยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช	6.13 ± 0.87	2.25 ± 0.13	10.45 ± 0.22
	ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี	25.26 ± 1.14	11.39 ± 0.26	10.15 ± 0.45
	ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง	10.52 ± 0.62	8.43 ± 0.39	10.23 ± 0.44
24	ยีสต์ออโตไลเสทที่ไม่เติมโปรตีนพืช	6.73 ± 0.55	1.98 ± 0.25	10.32 ± 0.53
	ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี	26.62 ± 0.89	10.46 ± 0.74	10.29 ± 0.21
	ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง	9.94 ± 0.44	9.05 ± 0.67	10.18 ± 0.16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ช.

การวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์

การวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ Neutrase® 0.5L หรือ Flavourzyme® 1000L
(Scopes, 1987)

สารเคมี

Coomassie brilliant blue G250

95% เอทานอล

85% กรดฟอสฟอริค

Bovine serum albumin (BSA)

วิธีการ

1. นำ Coomassie brilliant blue G250 ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ละลายใน 95% เอทานอล 50 มิลลิลิตร คนจนละลายหมด เติมกรดฟอสฟอริค 85% 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น
2. เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดยนำ BSA 0.25 กรัม ละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ได้เป็นสารละลาย BSA 1.0%
3. นำสารละลาย BSA 1.0% มาเติมเอนไซม์ Neutrase® 0.5L หรือ Flavourzyme® 1000L 0.1% (v/v) ที่อุณหภูมิ45°C pH 5.5 เป็นเวลา 30 นาที วัดปริมาณโปรตีนในสารละลาย BSA โดยใช้สารละลายตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายที่ได้ 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Coomassie brilliant blue G250 ปริมาณ10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร วัดปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวนระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis, DH)

$$\% DH = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

เมื่อ A = ปริมาณโปรตีนในสารละลาย BSA

B = ปริมาณโปรตีนในสารละลาย BSA ที่ผ่านการย่อย

ตารางที่ ช1. ค่าระดับการย่อยสลายของสารละลาย BSA เมื่อเติม เอนไซม์ Neutrase® 0.5L หรือ Flavourzyme® 1000L

ตัวอย่าง	โปรตีน (μg.)	DH
สารละลาย BSA 0.1%	14.58	-
สารละลาย BSA 0.1% ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Neutrase® 0.5L	7.30	49.93
สารละลาย BSA 0.1% ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L	6.36	56.38

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ซ.

กรดอะมิโนในโปรตีนพืช

ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนพืช

ตารางที่ ซ1. ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในโปรตีนถั่วเหลืองสกัด กลูเต็นข้าวสาลี และกากถั่วเหลือง

กรดอะมิโน	ปริมาณ		
	กลูเต็นข้าวสาลี[a]	โปรตีนถั่วเหลืองสกัด[b]	กากถั่วเหลือง[c]
Alanine	30	2.55	3.9
Arginine	20	5.13	7.0
Aspartic acid	22	10.13	10.2
Cysteine	14	1.09	0.7
Glutamic acid	290	13.56	16.5
Glycine	47	4.05	3.8
Histidine	15	2.20	2.4
Isoleucine *	33	4.10	4.2
Leucine *	59	7.34	7.0
Lysine*	9	4.99	5.8
Methionine *	12	1.34	1.1
Phenylalanine*	32	9.79	4.5
Proline	137	4.05	4.8
Serine	40	4.60	5.0
Threonine *	21	4.13	4.3
Tryptophan *	6	1.45	1.2
Tyrosine	20	3.24	3.1
Valine *	45	2.58	4.3

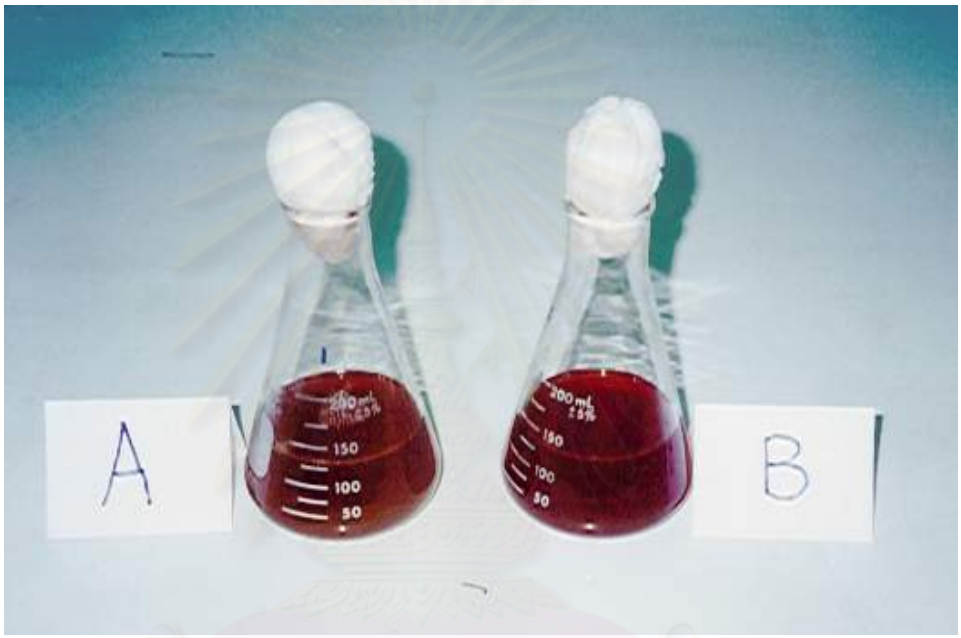
* กรดอะมิโนจำเป็น

a = โมลของกรดอะมิโนต่อ 10^5 กรัม โปรตีน (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2538)

b = g./100 g. of 100%protein (Maltz, 1981) c = g./16 g.N (Maltz, 1981)

ภาคผนวก ญ

ผลิตภัณฑ์ยีสต์ออโตไลเสท



รูปที่ ญ1. ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L (A) และยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L (B)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ญ2. ยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกลูเต็นข้าวสาลี ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ที่ผ่านการอบแห้ง (A) และยีสต์ออโตไลเสทที่เติมกากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000L ที่ผ่านการอบแห้ง (B)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ด
เอกสารประกอบเอนไซม์

Neutrase® 0.5L (Novo Nordisk A/S, 1996)

Flavourzyme® 1000L (Novo Nordisk A/S, 1998)

5'-Phosphodiesterase RP®-1 (Amano enzyme Inc, 2001)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Neutrase®

Description

Neutrase is an endo-protease which can be used in most cases where proteins have to be broken down either moderately or more extensively to peptides.

Neutrase is a bacterial protease produced by a selected strain of *Bacillus amyloliquefaciens*.

Neutrase contains only the neutral part of *B. amyloliquefaciens* proteases, whereas most other commercial preparations also contain the alkaline protease.

Neutrase is a metallo protease (Zn), which is stabilized with Ca^{2+} and consequently inhibited by EDTA.

Neutrase contains a non-standardized amount of beta-glucanase and is free of any alpha-amylase activity.

Applications

Neutrase is used to upgrade proteins of vegetable and animal origin.

Detailed recommendations with respect to applications are given in separate papers which are available on request.

Activity

Neutrase is available in the following standard strengths:

Liquid:	Neutrase 0.5 L	0.5 AU/g
Granulate:	Neutrase 1.5 MG	1.5 AU/g

The products are standardized in Anson Units (AU). The analytical method, AF 4, which is based on denatured hemoglobin in a 0.02 M Ca^{2+} buffer, is available on request.

Product Types

Neutrase 0.5 L is a clear brown liquid with a density of approx. 1.25 g/ml.

Neutrase 1.5 MG is a light brown, free flowing, non-dusting microgranulate with an average particle size of approx. 300 microns.

Product Specification

Neutrase complies with FAO/WHO JECFA and FCC recommended specifications for food grade enzymes, supplemented with maximum limits of 5×10^4/g for total viable count and 10^2/g for moulds.

Product Characteristics

The optimal working conditions for Neutrase are at 45-55>C and pH 5.5-7.5. The activities shown in Figures 1-3 are measured according to a modified Anson method in aqueous solutions without the stabilizing effect of proteinaceous matter.

The stability of Neutrase at a certain temperature is influenced by the type and concentration of the proteins present.

Examples of stability expressed as decimation time (t_D) at different temperatures at pH 7 and 8% protein concentration for different substrates are shown in Figure 4. t_D is the time required to reduce the activity to 1/10. Inactivation is obtained at $3 \times t_D$. Addition of Ca^{2+} to these natural substrates does not influence the stability of Neutrase.

Neutrase can be inactivated by heat treatment, e.g. 2 minutes at 85°C.

Packing

Neutrase 0.5 L is available in jerry cans containing 30 kg or in steel drums with 250 kg.

Neutrase 1.5 MG is supplied in 60-litre drums containing 40 kg.

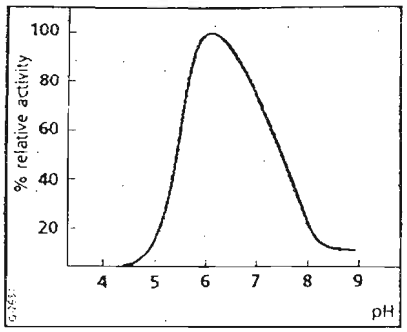


Fig. 1. The influence of pH on the activity of Neutrase at 45°C.

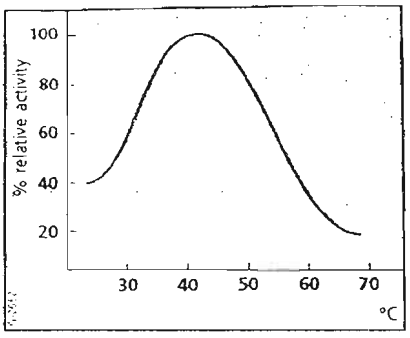


Fig. 2. The influence of temperature on the activity of Neutrase at pH 6.0.

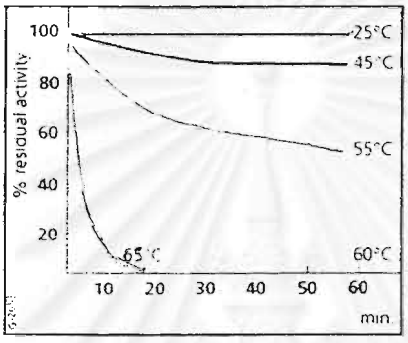


Fig. 3. The stabilities at pH 6.0 (phosphate buffer) of Neutrase at various temperatures.

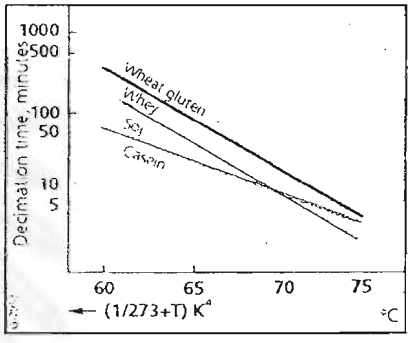


Fig. 4. Inactivation of Neutrase: t_D at pH 7 and 8% protein.

Solubility

The active components of Neutrase are readily soluble in water at all concentrations that occur in normal usage.

Handling Precautions

Neutrase is formulated in a way that gives the highest degree of safety during handling.

The product is non-flammable, completely miscible with water, and safe when used according to directions. Proteolytic enzymes may irritate skin or eyes, and enzyme dust may cause sensitization when inhaled.

Observe standard handling precautions to avoid direct contact with the product or inhalation of dust from the dried product. In case of spillage and accidental contact with the skin or eyes, rinse promptly with water.

Separate leaflets, "How to handle liquid Novo Nordisk enzymes safely" and "How to handle powder/granulated Novo Nordisk enzymes - safely", are available on request.

Storage

When stored at 5°C, the products will maintain the declared activity for at least 1 year. When stored at 25°C, the products will maintain the declared activity for at least 3 months.

Neutrase 0.5 L should be stored at temperatures above -10°C.

Neutrase 1.5 MG should be stored in a dry place and at constant temperature in order to avoid condensation of water inside the drum, which could accelerate the activity decrease.

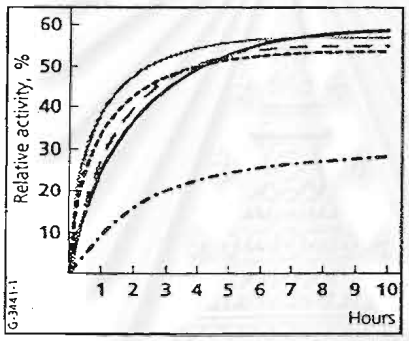
Flavourzyme™

Application

Flavourzyme is a fungal protease/peptidase complex developed for hydrolysis of proteins under neutral or slightly acidic conditions. Flavourzyme can be used for debittering of bitter protein hydrolysates at low degrees of hydrolysis and for extensive hydrolysis of proteins resulting in taste development.

For debittering, Flavourzyme can be used at dosages of 5-10 LAPU/g protein. For extensive hydrolysis, dosages of 10-50 LAPU/g protein are recommended.

The optimal dosages must be determined in each individual case. For further information on the use of Flavourzyme, please see the leaflet "Extensive Hydrolysis of Proteins with Flavourzyme" (B 829), which is available on request.



Substrate conc.:	8% protein
Enzyme conc.:	37 LAPU/g protein
Initial pH:	7.0 (no adjustment of pH during hydrolysis)
Temperature:	50°C
Method:	TNBS
Soya isolate	———
Minced beef	———
Wheat gluten	— — —
Sodium caseinate	- - - - -
Gelatine	-·-·-·-

Fig. 3. Hydrolysis of various proteins with Flavourzyme.

Description

Flavourzyme is produced by fermentation of a selected strain of *Aspergillus oryzae* and contains both endoprotease and exopeptidase activities.

The optimal pH for the enzyme complex is in the range of 5.0-7.0. The optimal pH for the exopeptidase is approx. 7.0, as determined by application trials. The optimal pH for debittering is also approx. 7.0.

The optimal temperature for the enzyme complex as well as for the exopeptidase is around 50°C.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

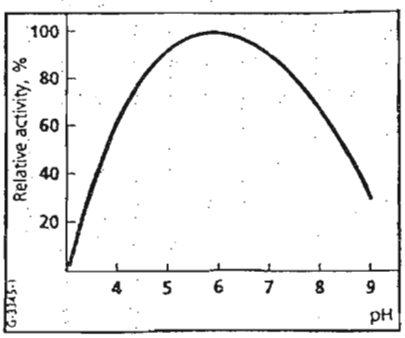


Fig. 1. Influence of pH on the activity of Flavourzyme.

Substrate:	8% soy protein isolate
Enzyme conc.:	33 LAPU/g protein
Temperature:	50°C
Method:	TNBS

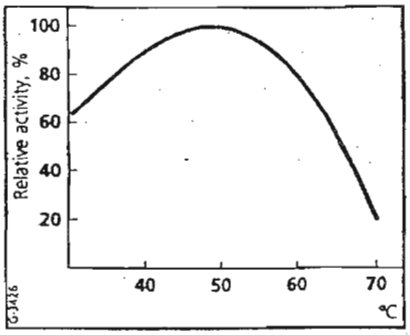


Fig. 2. Influence of temperature on the activity of Flavourzyme.

Substrate:	8% soy protein isolate
Enzyme conc.:	33 LAPU/g protein
pH:	7.0
Method:	TNBS

Specifications

Flavourzyme is available as:
Flavourzyme 1000 L is a liquid formulation.

Flavourzyme 500 MG is a brown, free-flowing, non-dusting microgranulate, granulated on NaCl.

Flavourzyme 500 MG as well as Flavourzyme 1000 L are readily soluble in water.

Activity

Flavourzyme 500 MG has a declared activity of 500 LAPU/g whereas Flavourzyme 1000 L have a declared activity of 1,000 LAPU/g. One LAPU (Leucine Aminopeptidase Unit) is the amount of enzyme which hydrolyzes 1 mmole of L-leucine-p-nitroanilide per minute in Novo Nordisk's analytical method AF 298/1, which is available on request.. The product complies with FAO/WHO JECFA and FCC recommended specifications for food grade enzymes, supplemented with maximum limits of 5 x 10^4/g for total viable count. The product is GRAS.

Inactivation

When using Flavourzyme for production of protein hydrolysates, the safety in use for the consumer is documented only if the production includes processing steps in which Flavourzyme is removed and/or inactivated.
Flavourzyme can be inactivated in 5 minutes at 85°C (or 5 seconds at 120°C) or higher when the pH is 4, and in 5 minutes at 85°C or higher when the pH is 7.
However, the inactivation is very much dependent on the substrate (substrate concentration, pH, etc.). Thus, the documentation for efficient elimination of Flavourzyme must be based on actual analysis for detection of residual activity.
A method (A-06468) for detection of residual protease activity in protein hydrolysate is available upon request.

Handling

The product is non-flammable and safe when used according to directions. Proteolytic enzymes may irritate skin and eyes and enzyme dust or enzyme-containing aerosol may cause sensitization when inhaled. Observe standard handling precautions to avoid direct contact with the product or inhalation of dust from the dried product. In case of accidental spillage and contact with the skin or eyes, rinse promptly with water.
A separate leaflet, "How to handle powder/granulated Novo Nordisk enzymes – safely" (B 143), is available on request.

Storage

Flavourzyme 500 MG should be kept cool and dry.
Flavourzyme 1000 L must be kept at a temperature of max. 5°C.

Packing

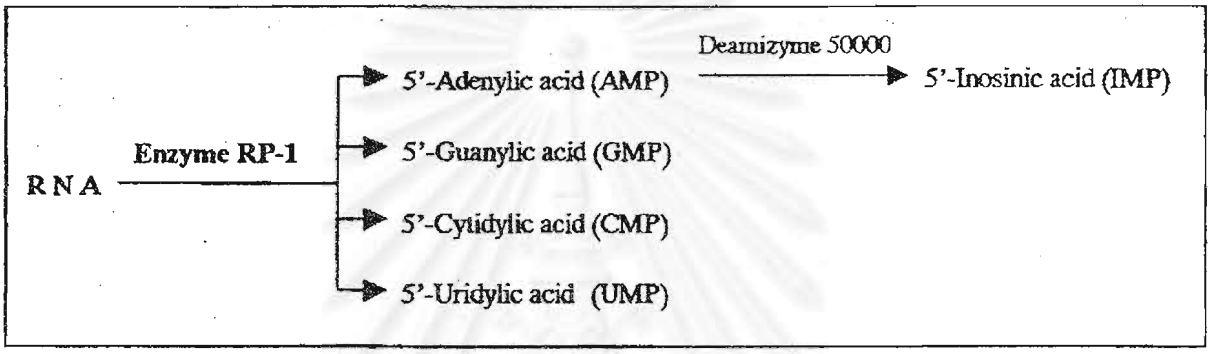
Flavourzyme 500 MG is available in 40-kg fibre drums.
Flavourzyme 1000 L is available in 25-kg jerry cans.

ฟาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Enzyme RP-1

Enzyme RP-1 is a 5'-Phosphodiesterase preparation produced by Penicillium citrinum fermentation. Enzyme RP-1 can hydrolyze RNA to 5'-nucleotides. The nucleotide 5'-GMP is a well known natural flavour enhancer. Together with Amano's Deamizyme 50000 which converts the nucleotide 5'-AMP to the flavour enhancer 5'-IMP, Enzyme RP-1 can transform yeast extracts to natural flavour enhancer.

Action



Specifications

5'-Phosphodiesterase activity (pH4.8)	Not less than 13,000 units / mg. (One unit is the amount of enzyme which increases of optical density 0.001 at 260 nm for 30 minutes.)
Loss on drying	Not more than 10 %
Total microbial count	Not more than 1,000 c/g.
E. coli	Negative in 25 g.
Coliforms	Not more than 30 c/g.
Salmonella	Negative in 25 g.

Characteristics

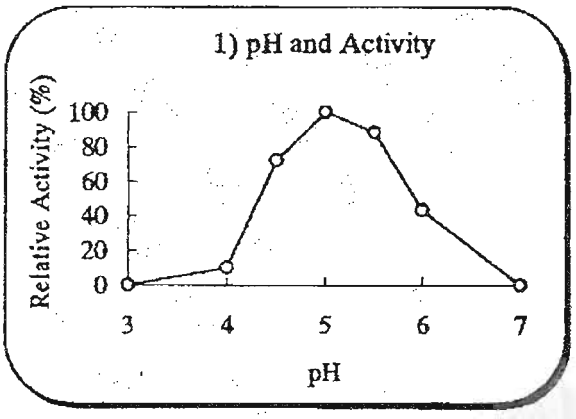
1) Light yellowish-light brownish powder
2) Optimum pH : 5.0
3) Optimum temperature : 70°C
4) Stable pH range : 4.0~7.0

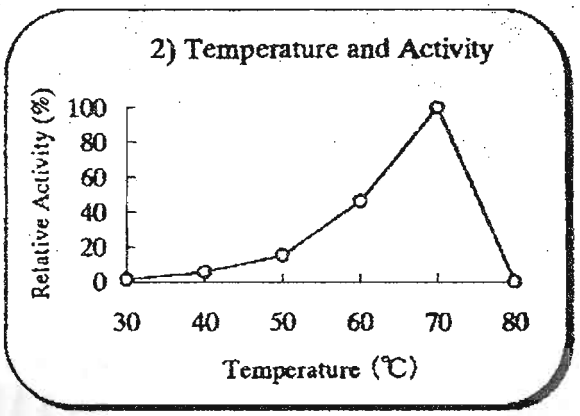
Regulatory Positions

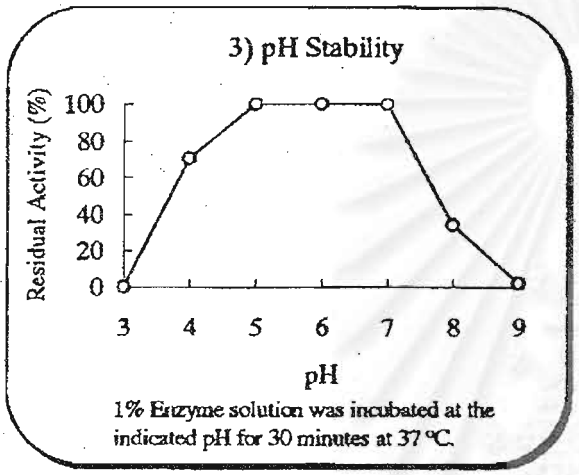
1) Certified as the Existing Food Additives (The Ministry of Health and Welfare, Japan)

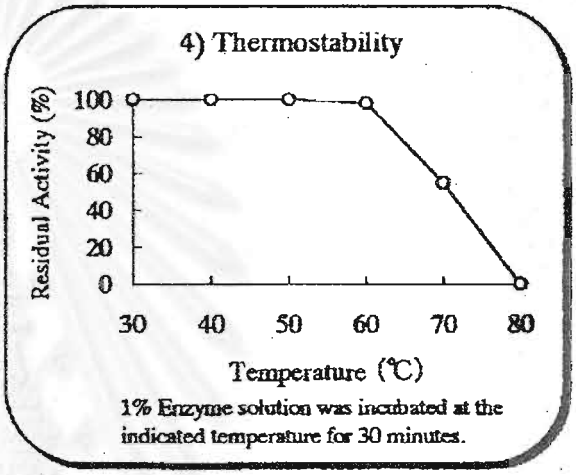
Performance Characteristics

Properties









*) Enzyme RP-1 has included phosphatase activity, which is inactivated at 70 ℃

Packing

Available in a 60-litre drum (each contains 15 kgs of this enzyme preparation)
[The fiber drum : 390 mm (in diameter) × 598 mm (in height)]

Handling

The enzyme preparation may irritate the skin and eyes. The dust may cause sensitization when inhaled. Please take precautions to avoid direct contact with the product. In case of contact with the skin or eyes, rinse promptly with copious amount of water. Consult your physician if lung irritation occurs.

Storage

The product should be kept under cool and dry conditions.

The information and recommendations contained herein are to the best of our knowledge reliable according to the current scientific and technical level. However, depending upon use applied and/or condition, anything herein is to be construed as a warranty or representation in respect otherwise, including freedom from patent infringement. Users shall make their own full and investigation for their particular purpose. We do not accept any liability for any loss, damage or infringement arising from the use of information and recommendations contained herein.

AMANO ENZYME EUROPE LTD.
Roundway House
Cromwell Park, Chipping Norton
Oxfordshire OX7 5SR U.K.
Tel: 44-1908-374117
Fax: 44-1908-378886

AMANO ENZYME U.S.A. CO., LTD.
1157 North Main St.
Lombard, IL 60148, U.S.A.
Tel: 1-708-953-1891
1-800-446-7652
Fax: 1-708-953-1895

AMANO ENZYME Inc.
Head Office
2-7, 1-chome, Nishiki
Naka-ku, Nagoya 460-8630 Japan
Tel: 81-52-211-3032
Fax: 81-52-211-3054

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายธีรวุฒิ ฤทธิ์เดชา เกิดเมื่อวันที่ 15 ตุลาคม พ.ศ. 2520 สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรีสาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย จากนั้นเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2541

<u>ผลงานทางวิชาการ</u>

- การเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ เรื่อง "การผลิตกลิ่นรสเนื้อจากยีสต์ออโตไลเสทและการประยุกต์ใช้ในอาหารมังสวิรัติ" ใน การประชุมทางวิชาการอุตสาหกรรมเกษตร ครั้งที่ 4 THAIFEX&THAIMEX 2002 : อาหารไทยเพื่อการพัฒนาประเทศและการส่งออก วันที่ 31 พฤษภาคม – 1 มิถุนายน 2545 ณ. ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทคบางนา กรุงเทพฯ.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย