บทที่ 3
ทฤษฎี

3.1 ฮอพ (*Humulus lupulus* L.)

ฮอพ เป็นพืชในแฟมิลี่ Cannabinaceae จัดเป็นวัตถุดิบที่สำคัญตัวหนึ่งในการผลิตเบียร์ โดยสารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของฮอพ จะมีผลต่อเบียร์หลายด้าน เช่นกลุ่มที่เป็นแอลฟา หรือ เบต้าแอซิด จะให้สารที่มีรสขมแก่เบียร์ ส่วนสารประเภท essential oil จะมีผลต่อการเกิดกลิ่นหอม ของฮอพ ซึ่งความขมของฮอพนี้จะช่วยป้องกันการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก อีกทั้งยังช่วย เพิ่มความคงทนของฟองเบียร์ (Herman-Lokkerbol and Verpoorte, 1994, Chae et al., 2001, Cortacero-Ramírez et al., 2003, Zhange, Liang, Xiao and Xu, 2004)

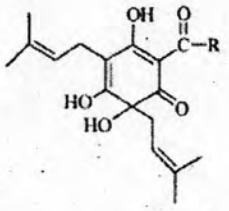
ในกระบวนการผลิตเบียร์จะมีการเติมฮอพลงไปในน้ำเวิร์ต และเมื่อต้มน้ำเวิร์ต จะทำให้ เกิดปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชั่นของแอลฟาแอซิดซึ่งเป็นสารที่ไม่ให้รสชาติ จนได้เป็นไอโซ-แอลฟา แอซิด ที่มีสมบัติละลายน้ำได้ดี และมีรสขมเนื่องจากไอโซ-แอลฟาแอซิดเกิดขึ้น (Cortacero-Ramírez et al., 2003) เมื่อเติมยีสต์ลงไปในกระบวนการหมักเบียร์ก็จะเกิดการดูดซึมของไอโซ-แอลฟาแอซิดที่บริเวณของผนังเซลล์ของยีสต์ด้วยแรงดูดซึม โดยปริมาณของการดูดซึมนั้นจะ ขึ้นกับการเจริญเติบโตของยีสต์ และเวลาที่ยีสต์อยู่ภายในสารละลาย ซึ่งปัจจัยหลักที่สำคัญของการ ดูดซึมของความขมนี้ คือ เวลาที่ยีสต์อยู่ในสารละลาย

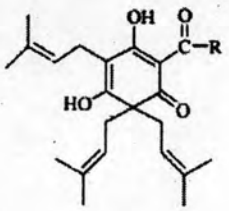
ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบต่างๆภายใน hop cones. (Cortacero-Ramírez et al., 2003)

Major components	Concentration (% w/w)
α-Acids	2–7
β-Acids	2–10
Essential oils	0.5–3.0
Polyphenols, tannins	3–6
Monosaccharides	2
Amino acids	0.1
Proteins	15
Lipids, fatty acids	1–5
Pectins	2
Ash, salts	10
Cellulose, lignins	40–50
Water	8–12

3.2 ความขม

ความขมที่พบในฮอพนั้นเป็นสารประเภท phenolic compound อีกทั้งยังจัดเป็นสารพวก weak acid โดยสารประเภท weak acid หรือ hop acid ที่พบนั้นจะประกอบไปด้วย 2 ส่วนใหญ่ๆ ได้แก่สารที่อยู่ในรูปของแอลฟาแอซิด และ แบต้าแอซิด (Zhange et al., 2004) ดังแสดงในรูปที่ 3.1





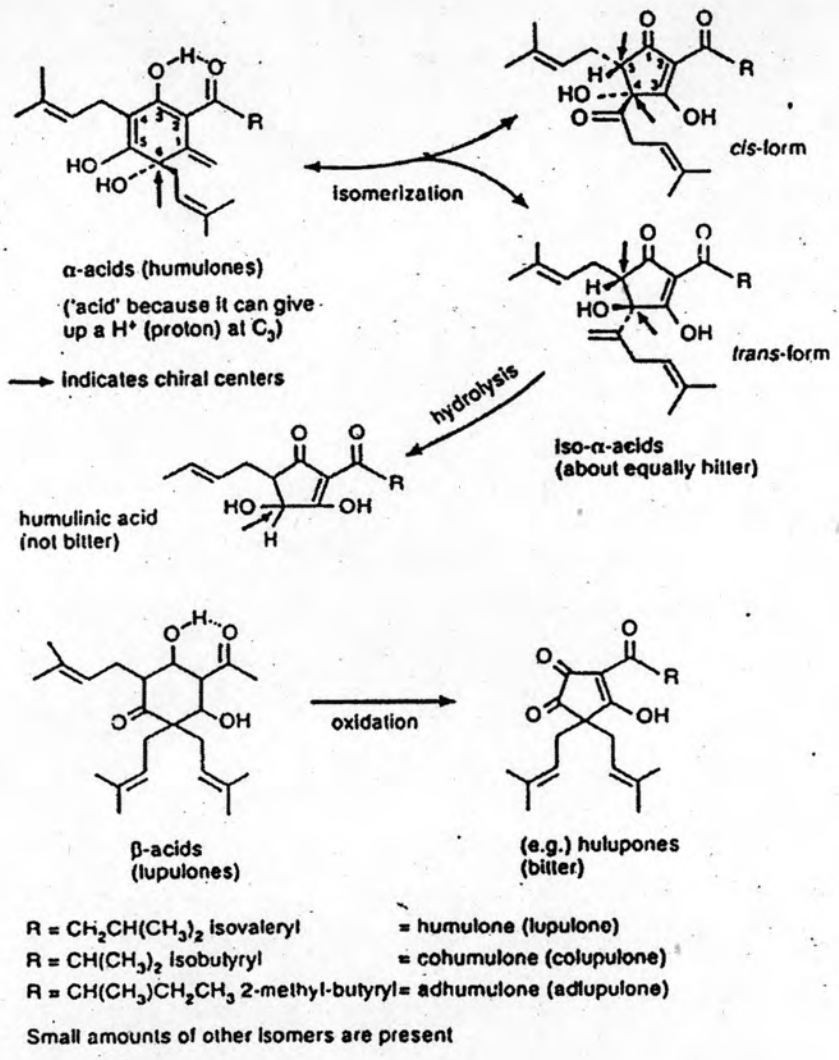
α-acids (humulones) β-acids (lupulones)

R=-CH_2CH_3	posthumulone/postlupulone (post-)
R=-$CH(CH_3)_2$	cohumulone/colupulone (co-)
R=-$CH_2CH(CH_3)_2$	humulone/lupulone (normal-)
R=-$CH(CH_3)CH_2CH_3$	adhumulone/adlupulone (ad-)
R=-$CH_2CH_2CH(CH_3)_2$	prehumulone/prelupulone (pre-)
R=-$CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$	adprehumulone/adprelupulone (adpre-)

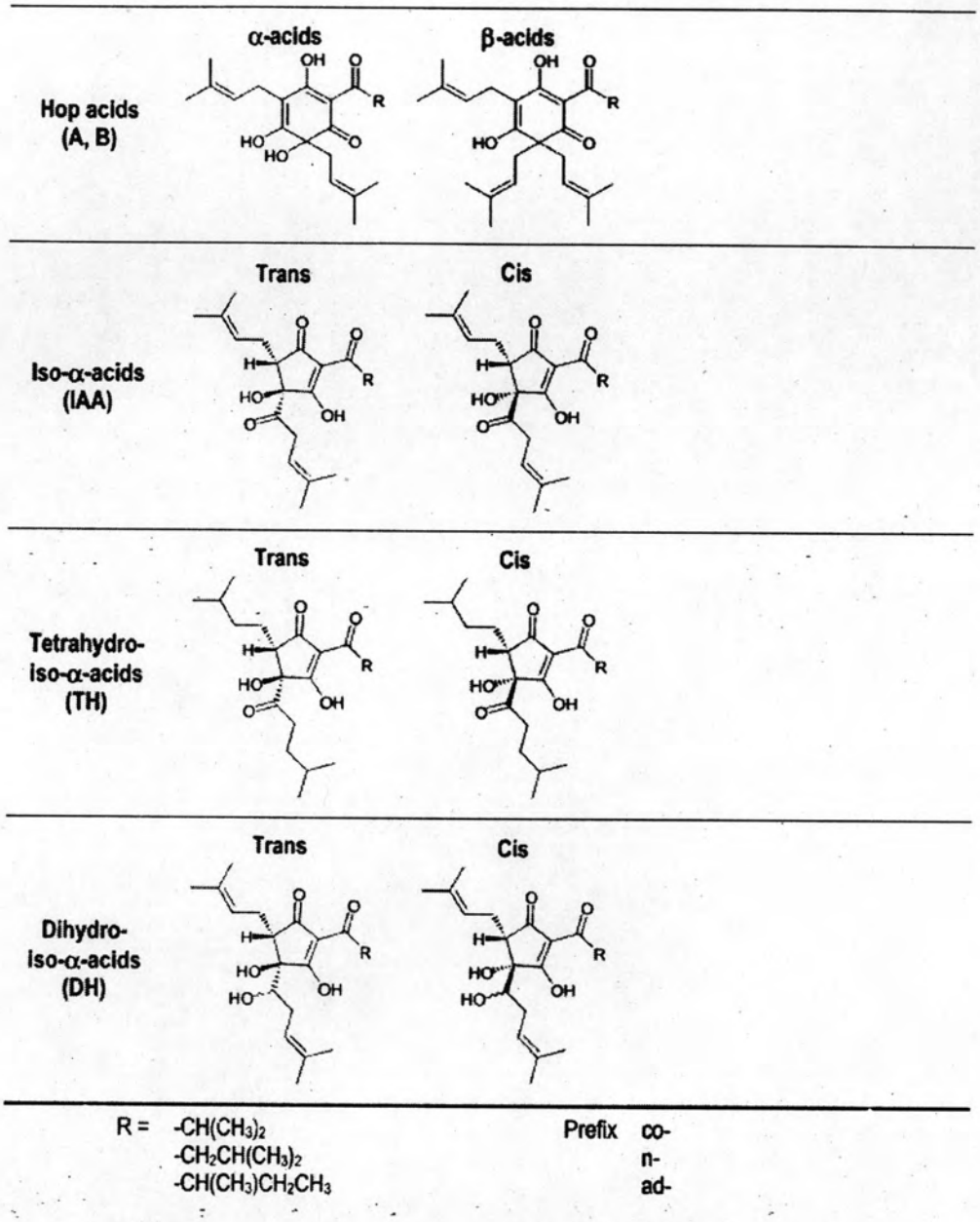
รูปที่ 3.1 โครงสร้างทางเคมีของ hop bitter acids.
(Herman-Lokkerbol and Verpoorte, 1994)

Cortacero-Ramírez et al., 2003 ได้รายงานการตรวจสอบระดับของความขมที่เริ่มรับรู้ได้ด้วยการชิม โดยผลการตรวจสอบความขมด้วยความเข้มข้นของไอโซ-แอลฟาแอซิดที่ละลายในน้ำ พบว่าสามารถเริ่มต้นรับรู้ถึงความขมได้เมื่อมีความเข้มข้นของไอโซ-แอลฟาแอซิดอยู่ที่ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร อีกทั้งยังมีการตรวจสอบค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของไอโซ-แอลฟาแอซิดที่ได้จากการหมักเบียร์พบว่ามีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10 – 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าการละลายของไอโซ-แอลฟาแอซิดในน้ำนั้นมีค่ามากกว่าการละลายของแอลฟาแอซิดเนื่องจากแอลฟาแอซิดมีค่า pK เท่ากับ 3 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าของไอโซ-แอลฟาแอซิด ดังนั้นจึงพบปริมาณของไอโซ-แอลฟาแอซิดมากกว่า

ปริมาณความขมที่วัดได้ในสารละลายจะหมายถึงปริมาณไอโซ-แอลฟาแอซิดที่มีอยู่ในสารละลาย โดยจะแสดงเป็นเลขจำนวนเต็มในหน่วยของ EBU. (European Bitterness Unit) เช่น เบียร์ที่มีความขม 25 EBU. หมายความว่า ใน 1 ลิตรของเบียร์จะมีไอโซ-แอลฟาแอซิดประมาณ 25 มิลลิกรัม (Garet , 1994)



รูปที่ 3.2 The isomerization of α-acid to iso-α-acid. (Lewis and Young, 1995)



รูปที่ 3. 3 Structures for hop acids, iso-α -acids and reduced iso-α -acids.

(Vanhoenacker, Keukeleire and Sandra, 2004)

ในรูปที่ 3.2 และ 3.3 แสดงการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการไอโซเมอไรเซชั่นของแอลฟาแอซิด ไปเป็นสารที่ให้ความขม คือ ไอโซ-แอลฟาแอซิด รวมถึงสารที่เปลี่ยนแปลงจาก ไอโซ-แอลฟาแอซิด และแสดงโครงสร้างทางเคมีของสารต่างๆ

3.3 การกำจัดความขม

สารที่ให้ความขมในฮอพ คือ แอลฟาแอซิด และไอโซ-แอลฟาแอซิดตามที่ได้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ ไอโซ-แอลฟาแอซิดจะเป็นสารที่มีความขมมากกว่า โดยที่สารทั้งสองตัวนี้จะผสมอยู่ในน้ำเบียร์ และพบว่าบางส่วนจะถูกดูดซึมโดยยีสต์ไปอยู่ที่บริเวณของผนังเซลล์ (Pranee et al., 2005) ซึ่งยีสต์จะดูดซึมสารที่ให้ความขมนี้ไว้ที่ผนังเซลล์ด้วยแรงดูดซึม (adsoptive force) ดังนั้นในการกำจัดความขมจึงสามารถทำได้โดยการทำลายแรงยึดเหนี่ยวนี้ ซึ่งวิธีที่ใช้ในการทำลายแรงยึดเหนี่ยวนี้เพื่อการกำจัดความขมนี้สามารถจำแนกออกได้เป็น ดังนี้

3.3.1 การใช้สารละลายอินทรีย์ (organic solvent) เช่นการใช้เฮกเซน

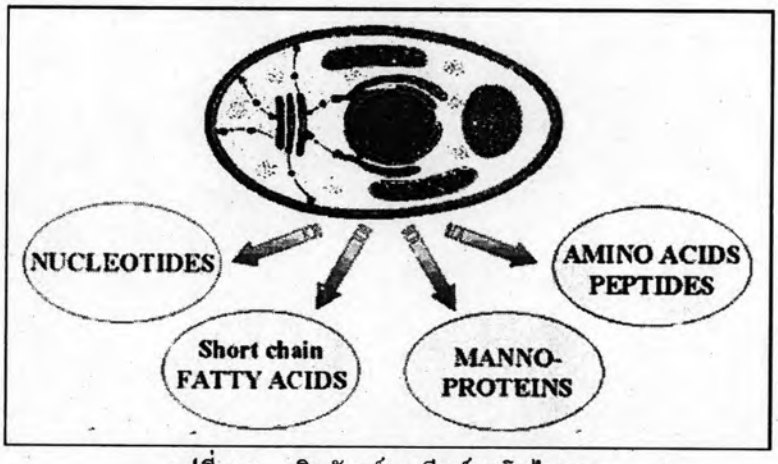
3.3.2 การใช้สารละลายด่าง ได้แก่ การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) , โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) , ยูเรีย (urea) และโปแตสเซียมไทโอไซยาเนต (potassium thiocyanate)

3.3.3 พัฒนาการกำจัดความขมโดยใช้เทคนิคอื่นๆ เช่น โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatography) , โครมาโตกราฟีแบบคัดขนาด (exclusion chromatography) (Godfrey and Reichelt, 1983) , โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography)

3.4 โครงสร้างวิทยาของยีสต์

เซลล์ยีสต์มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธ์ของยีสต์ อีกทั้งยังมีความแตกต่างอันเนื่องมาจากอายุและสภาพแวดล้อม โดยทั่วไปมีความกว้างอยู่ในช่วงตั้งแต่ 1 – 5 ไมโครเมตร และมีความยาวอยู่ในช่วงตั้งแต่ 5 – 30 ไมโครเมตร ผนังเซลล์ของยีสต์จะมีความหนาประมาณ 1/7 ของเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ (สุพจน์, 2529) ซึ่งจะมีความหนาเพิ่มขึ้นตามอายุของยีสต์ โดยความหนาของผนังเซลล์นี้จะช่วยให้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้นกว่าปกติ (Rose and Harrison, 1969)

ภายในเซลล์ของยีสต์จะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นออแกนเนลล์ของเซลล์และส่วนที่เป็นของเหลวที่เรียกว่า ไซโตพลาสซึม ซึ่งจะเป็นส่วนที่มีองค์ประกอบที่เป็นสารอาหารที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีน วิตามินบีรวม เกลือแร่ ไขมัน และเส้นใย ดังแสดงในรูปที่ 3.4 โดยโปรตีนจากยีสต์นั้นเป็นโปรตีนที่ให้กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายอย่างครบถ้วน โดยเฉพาะไลซีนในปริมาณสูง (Reed and Nagodawithana, 1991) จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารสกัดหรือ นำกลับมาใช้ให้เกิดประโยชน์



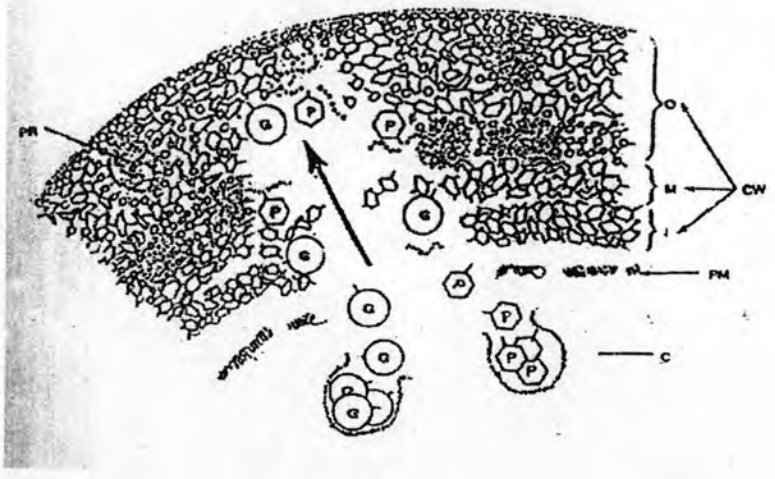
รูปที่ 3.4 ผลิตภัณฑ์จากยีสต์ออโตไลเสท.

3.5 ผนังเซลล์ของยีสต์

ผนังเซลล์ของยีสต์เป็นส่วนที่ความแข็งแรงมากที่สุด เนื่องจากเป็นส่วนที่ประกอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของสารโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) หลายชนิดมาเชื่อมต่อกัน ซึ่งมีมากถึงร้อยละ 80 – 90 ขององค์ประกอบของผนังเซลล์ทั้งหมด ได้แก่ กลูแคน, แมนแนน, โปรตีน, ไขมัน และ ไคติน ส่วนที่มีอยู่มากที่สุด คือ กลูแคน โดยมีอยู่ถึงร้อยละ 55 – 60 ของผนังเซลล์ อีกทั้งยังเป็นกลูแคนสองชนิดที่มีการเชื่อต่อกันด้วยพันธะ β(1-6) และ β(1-3) ส่วนที่เหลือจะเป็นส่วนที่อยู่บริเวณชั้นนอกสุดของผนังเซลล์เป็นส่วนของเนื้อเยื่อแมนแนน-โปรตีน ซึ่งจะมีการเชื่อมต่อกับสารอื่นๆ หรือเกิดการจับกับสารตัวอื่นๆด้วย hydrophobic interaction (Walker, 1999)

ในกระบวนการหมักเบียร์นั้นมักจะเกิดปรากฏการณ์การจับตัวกันของยีสต์ (flocculation) แล้วกองตัวอยู่บริเวณก้นของถังหมัก หรืออาจจะเกิดการลอยตัวเป็นแพ จากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในการหมักเบียร์ด้วยยีสต์นี้เกิดจากสมบัติของ hydrophobic ที่ผนังเซลล์ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดแรง adhesion แบบ hydrophobic adherence (Walker, 1999) ซึ่งจากการศึกษาสามารถจำแนกได้ 3 แบบ

1. พื้นผิวของผนัง หรือ วัตถุที่อยู่นิ่ง เช่น ผนังของถังปฏิกรณ์ (bioreactor)
2. เนื้อเยื่อ เช่น ผิวหนังของคน
3. สารประกอบคาร์บอนที่มีสมบัติไม่ละลายน้ำ เช่น hydrocarbon globules



รูปที่ 3.5 Yeast cell structure and yeast autolysis (Reed and Nagodawithana, 1991)

C :cytoplasm, PR : protein, I : inner glucan , M : middle glucan,

O : outter glycoprotein, P : protease, G : glucanase, PM : plasma membrane

3.6 การย่อยสลายตัวเองของยีสต์

การย่อยสลายตัวเองของยีสต์ เป็นการย่อยสลายตัวเองโดยเอนไซม์ภายในเซลล์ของยีสต์เอง โดยการทำการกระตุ้นกระบวนการเกิดการย่อยสลายตัวเองด้วยการปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ประมาณ 5.5 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาร 45 – 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 36 ชั่วโมง (Reed and Nagodawithana, 1991) จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 – 90 องศาเซลเซียสเพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า ยีสต์ออโตไลเสท ซึ่งถ้านำไปแยกผนังเซลล์ออกจะเรียกว่า ยีสต์สกัด (yeast extract) ซึ่งจะมีคุณภาพที่ดีกว่ายีสต์สกัดจากกระบวนการอื่นๆ คือจะมีกลิ่นคล้ายเนื้อสัตว์ และเป็นสารสกัดที่นิยมนำไปใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมากมายเพื่อเพิ่มกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ (Hough and Maddox, 1970, Knorr et al., 1979, Chae et al., 2001)

ปกติการย่อยสลายตัวเองของยีสต์สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติในไวน์ หรือผลิตภัณฑ์จากการหมักอื่นๆ แต่ก็สามารถกระตุ้นให้กระบวนการนี้เกิดได้เร็วขึ้นด้วยการปรับสภาพให้เหมาะสม (Reed and Nagodawithana, 1991) โดยการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น การเร่งอุณหภูมิ การใช้วิธีทางกลในการทำให้เซลล์แตกก่อน การเติมสารเร่งการย่อยสลายให้เหมาะสม และการเปลี่ยนแปลงทางเคมี เช่น การเปลี่ยนค่าความแรงของประจุ และค่าความเป็นกรด-ด่าง (Roman, Ernest and Vladimir, 1991)

สภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการย่อยสลายตัวเองนั้นจะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของยีสต์ ซึ่งภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ จะมีผลให้ระบบเอนไซม์ซึ่งมีหน้าที่ในการควบคุมเมตาบอลิซึมของยีสต์ทำงานผิดปกติไปและทำให้เซลล์ยีสต์ตายในที่สุด แต่ระบบของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายภายในเซลล์ยีสต์นั้นยังคงทำหน้าที่อยู่ และจะมีการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์อีกด้วย เนื่องจากเอนไซม์ภายในแวคิวโอลที่อยู่ในไซโตพลาสซึมจะถูกปล่อยออกมาเพื่อย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน และกรดนิวคลีอิก ไปเป็นสารโมเลกุลเล็กที่สามารถละลายได้ และเนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในของเซลล์ยีสต์จึงทำให้เกิดการสูญเสียแรงดันออสโมติกซึ่งมีผลให้ผนังเซลล์เกิดการสูญเสียคุณสมบัติในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน และปล่อยให้สารประกอบต่างๆภายในเซลล์ไหลออกมาด้านนอกของเซลล์ได้ (Hough and Maddox, 1970, Chae et al., 2001)

จากที่ได้กล่าวมานั้น จะเห็นได้ว่ากระบวนการย่อยสลายตัวเองของยีสต์นั้นสามารถแบ่งได้เป็นขั้นตอนใหญ่ๆ ได้ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ และการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายตัวเอง และขั้นตอนการย่อยสลายสารประกอบภายในเซลล์ และปล่อยผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกสู่ภายนอก (Tatyana et al., 1981) ซึ่งการทำให้เกิดการเสียเสถียรภาพของความแข็งแรงของผนังเซลล์อันเนื่องมาจากการย่อยสลายตัวเองนั้นจะทำให้เกิดเหตุการณ์ cell bursting ที่ทำเกิดการทะลักของสารที่อยู่ภายในเซลล์ออกมาด้วยอัตราการถ่ายมวลสารที่สูง (Ryan and Ward, 1988)

3.7 การย่อยสลายของผนังเซลล์

การย่อยสลายของผนังเซลล์เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ และการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายตัวเอง ซึ่งรวมถึงการย่อยสลายผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์กลูคาเนส และโปรติเอสที่มีอยู่ภายในเซลล์ และขั้นตอนการปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้สู่ภายนอก ได้มีผู้ที่สนใจศึกษาในส่วนของจลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายของผนังเซลล์จำนวนมาก และได้มีการเสนอแบบจำลองของการย่อยสลายผนังเซลล์มาหลายรูปแบบด้วยกัน

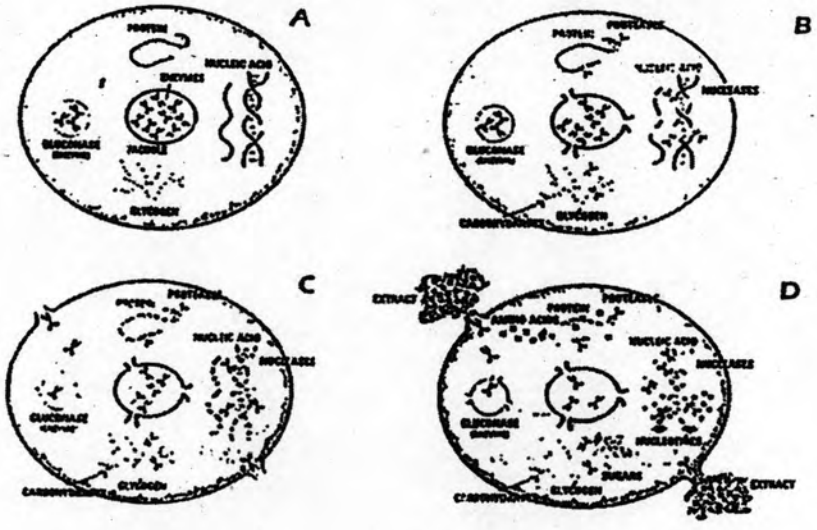
จากที่ได้กล่าวมาเกี่ยวกับองค์ประกอบของผนังเซลล์ของยีสต์ ซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์ที่เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ คือ กลูแคน และ แมนแนน ดังนั้นการที่ผนังเซลล์จะถูกย่อยสลายจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์กลูโคเนส (gluconase) และแมนแนนเนส(mannanase) จึงจะมีผลให้เกิดการสลายตัวของพันธะของโพลีแซคคาไรด์ที่บริเวณผนังเซลล์ จากงานวิจัยของ Hunter and Asenjo (1987) ได้ทำการศึกษาการเร่งการย่อยสลายตัวเองโดยการใช้เอนไซม์โปรติเอส และกลูโคเนสเป็นตัวเร่งจากภายนอกเซลล์ ซึ่งได้สรุปเป็นขั้นตอนไว้คือ

1. เกิดการย่อยสลายของเนื้อเยื่อแมนแนน-โปรตีนที่อยู่ด้านนอกของผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งส่งผลให้เกิดการปล่อยโปรตีนที่เกิดจากการย่อยสลายที่ผนังเซลล์ด้านนอกออกมา
2. เอนไซม์กลูคาเนสจับกับสายโซ่ของกลูแคนที่บริเวณด้านในของผนังเซลล์ ทำให้เกิดการย่อยสลายของเอนไซม์จนมีผลให้กลูแคนมีขนาดเล็กลงและละลายน้ำได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการทำงานร่วมกันของเอนไซม์โปรติเอส และกลูคาเนสมีผลให้ผนังเซลล์ถูกเปิดออกจนเหลือเฉพาะส่วนของพลาสมาแมมเบรน (plasma membrane)

3. เกิดการแตกออกของพลาสมาเมมเบรน ทำให้เกิดการปล่อยขององค์ประกอบภายในเซลล์ออกมา

4. ชิ้นส่วนของผนังเซลล์ที่หลุดออกมาจากขั้นตอน 1 และ 2 และส่วนของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายจากผนังเซลล์ออกมาจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์กลูคาเนส

5. โปรตีนที่หลุดจากผนังเซลล์ และโปรตีนที่ถูกปล่อยออกมาจากภายในเซลล์จะถูกย่อยอีกครั้งด้วยเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งสุดท้ายจะได้โปรตีนที่มีขนาดเล็กและละลายน้ำได้



รูปที่3.6 ยีสต์ออโตไลซิส (Nagodawithana, 1995)

A : เซลล์เริ่มต้น

B : มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับโครงสร้างเซลล์ เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

C : มีการย่อยสลายสารประกอบภายในเซลล์ ผนังเซลล์เริ่มสูญเสียเสถียรภาพ

D : ผลิตภัณฑ์ที่ถูกย่อยถูกปล่อยออกสู่ภายนอก

จะเห็นได้ว่าระบบการย่อยสลายตัวเองของยีสต์นั้นจะประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดมาทำงานด้วยกัน โดเฉพาะในส่วนของการย่อยผนังเซลล์จะมีเอนไซม์กลุ่มที่เป็นหลักในการย่อยสลาย คือ โปรติเอส และ กลูคาเนส ซึ่งจากงานวิจัยของ Hunter and Asenjo (1987) ได้ศึกษาจนพบว่าเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับการย่อยส่วนเนื้อเยื่อของผนังเซลล์ยีสต์ คือ เอนไซม์โปรติเอสที่จำเพาะเจาะจงกับเนื้อเยื่อโปรตีน-แมนแนน และเอนไซม์ β(1-3) กลูคาเนสซึ่งย่อยโพลีเมอร์ของกลูแคนที่เป็นเนื้อเยื่อด้านในของผนังเซลล์

ตารางที่ 3.3 คุณสมบัติของเอนไซม์ Yeast Protease (Reed and Nagodawithana, 1991; Hough and Maddox, 1970)

	Proteinase ysc A	Proteinase ysc B	Carboxypeptidase ysc Y	Carboxypeptidase ysc S
Type	Acid endopeptidase	Serine endopeptidase	Serine exopeptidase	Metallo exopeptidase (Zn^{2+})
Optimum pH	2-6	6-7	4-7	7
Optimum Temperature (^{o}C)	35-40	45-55	45-55	60
Cell Location	Vacuole	Vacuole	Vacuole	Vacuole
Solubility	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Molecular weight	60000	32000-44000	61000	Not determined
Isoelectric point	3.8	5.8	3.6	
Inhibitors	Protein I_3^A Pepstatin, etc.	Protein I_2^{13} Chymostatin, etc.	Protein I^e Hg^{2+}	
Cellular role	Protein degradation	Protein degradation	Protein degradation	Protein degradation