

ผลของการปรับสภาพที่สภาวะต่างๆ ต่อการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์
และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของกากยีสต์
Effect of Various Pretreatment Conditions on Enzymatic Hydrolysis
and DPPH Free radical Scavenging Activity of Spent Yeast

ณัฐหทัย สุทธิวงษ์¹ และ ปิยดา สุขดี¹
Sutthiwong, N.¹ and Sukdee, P.¹

Abstract

This work aimed to study the effects of various pretreatment conditions including temperature, pressure, and ultrasound on the degree of hydrolysis and antioxidant property of spent yeast hydrolysates. After pretreating with 5 conditions either autoclaving (121 °C, 15 psi, 20 min), ultrasonication for 15 min, ultrasonication for 30 min, boiling at 50 °C for an hour, or boiling at 85 °C for an hour, samples were hydrolyzed by a commercial protease from *Bacillus* sp. at the recommended conditions for 6 h. Spent yeast hydrolysates were then determined for their degree of hydrolysis and DPPH free radical scavenging activity. The best results in terms of the degree of hydrolysis were obtained from pretreating spent yeast using ultrasound for 30 min (58.86%) as well as boiling at 85 °C for an hour (56.50%). The highest antioxidant activity was found in the hydrolysate pretreated using ultrasonic wave for 30 min (66.67%).

Keywords: Spent yeast, Pretreatment, Hydrolysis, Antioxidant

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการปรับสภาพ ด้วย อุณหภูมิ ความดัน และคลื่นอัลตราโซนิก ต่อระดับของการย่อยสลายและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของกากยีสต์ หลังจากปรับสภาพด้วยสภาวะอย่างใดอย่างหนึ่ง คือ การใช้ความร้อนร่วมกับแรงดันไอน้ำ (121 °C, 15 psi, 20 นาที) การใช้คลื่นอัลตราโซนิก(15 นาที) การใช้คลื่นอัลตราโซนิก(30 นาที) การต้มที่อุณหภูมิ 50 °C (60 นาที) หรือการต้มที่ 85 °C (60 นาที) ไฮโดรไลซ์ตัวอย่างโดยเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. ตามสภาวะที่แนะนำเป็นเวลา 6 ชม. จากนั้นวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนและฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของไฮโดรไลเซตที่ได้ ผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีนพบว่ามีความสูงที่สุดจากการเตรียมกากยีสต์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก 30 นาที (58.86%) และการต้มที่อุณหภูมิ 85 °C 60 นาที (56.50%) ขณะที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญในไฮโดรไลเซตที่ปรับสภาพด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก 30 นาที (66.67%)

คำสำคัญ: กากยีสต์ การปรับสภาพ ไฮโดรไลซิส ต้านอนุมูลอิสระ

คำนำ

ปัจจุบันการศึกษาวิจัยการตัดแปรโปรตีนเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เนื่องจากโปรตีนจากแหล่งธรรมชาติส่วนใหญ่มีข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์เพราะมีสมบัติบางประการที่ไม่เหมาะสม การตัดแปรโปรตีนเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยปรับปรุงสมบัติของโปรตีนให้ดีขึ้น ซึ่งจะช่วยเพิ่มความหลากหลายในการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ (อังกูณ เกียรติศักดิ์ และบุรฉัตร, 2557) หลักการของการตัดแปรโปรตีนคือการทำให้พันธะเพปไทด์ของโปรตีนแตกออก ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของโปรตีน ผลผลิตที่ได้จากการตัดแปรโปรตีน เรียกว่า โปรตีนไฮโดรไลเซต (Protein hydrolysate) วิธีการตัดแปรด้วยเอนไซม์เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างยิ่งในปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากมีสภาวะที่ไม่รุนแรง มีความจำเพาะสูง และสามารถควบคุมระดับการย่อยได้ (Tavano, 2013)

หลายปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการนำเทคนิคต่างๆ มาใช้ร่วมกับการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้โปรตีนในวัตถุดิบเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) ซึ่งทำให้เอนไซม์สามารถจับกับโปรตีนได้มากขึ้น ระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงขึ้น จึงส่งผลต่อปริมาณและสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้เทคนิคที่นำมาใช้ส่วนใหญ่จะเป็นการใช้ในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อย (pretreatment) เช่น การให้ความร้อน (thermal denaturation) การ

¹ ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมอาหารสุขภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ปทุมธานี 12120

Expert Centre of Innovative Health Food, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Pathum Thani 12120

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH denaturation) และการให้แรงกล (mechanical denaturation) (Chen และคณะ, 2011; Taheri และคณะ, 2020, Cheison และคณะ, 2011)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสภาวะการปรับสภาพทางกายภาพต่างๆ ของวัตถุดิบ ได้แก่ อุณหภูมิ ความดัน และคลื่นอัลตราโซนิก ต่อระดับของการย่อยสลายของโปรตีนและคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

เตรียมวัตถุดิบ คือ กากยีสต์ ให้อยู่ในรูปสารแขวนลอย โดยการเติมน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:6 (w/v) แล้วนำไปปรับสภาพทางกายภาพที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ (1) การใช้ความร้อนร่วมกับแรงดันไอน้ำ (121°C, 15 psi, 20 นาที) (2) การใช้คลื่นอัลตราโซนิกเป็นเวลา 15 นาที (3) การใช้คลื่นอัลตราโซนิกเป็นเวลา 30 นาที (4) การต้มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 60 นาที และ (5) การต้มที่ 85°C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม Protamex เอนไซม์ทางการค้าจากเชื้อ *Bacillus* sp. ให้ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อโปรตีนในตัวอย่าง ร้อยละ 5 ดัดแปลงจากวิธีของ Chiang และคณะ (2018) ตามสภาวะที่แนะนำ และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 6 ชม. เมื่อครบกำหนดเวลาให้ความร้อนที่ 95-100°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส (hydrolysate) ที่ได้ไปวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีน (Degree of hydrolysis; DH) ตามวิธีของ Frister และคณะ (1988) และฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่มีการปรับสภาพก่อนการย่อย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนจากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้หลังการย่อยตัวอย่างกากยีสต์ที่มีการปรับสภาพ (เตรียมตัวอย่าง) ด้วยกรรมวิธีต่างๆ ด้วยเอนไซม์ Protamex พบว่าการเตรียมกากยีสต์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกเป็นเวลา 30 นาที และการต้มที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง มีระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงที่สุด คือ ร้อยละ 58.86 และ 56.50 ตามลำดับ (Figure 1) จากรายงานของ Majid และคณะ (2015) ระบุว่าคลื่นอัลตราโซนิก (อัลตราซาวด์) สามารถสร้างผลกระทบหลายอย่าง ทั้งผลที่เกิดจากความร้อน (thermal effect) และที่ไม่ใช่ความร้อน (non-thermal effects) เช่น ผลทางกล (mechanical effect) และการเกิดฟองก๊าซในเนื้อเยื่อซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากการสั่นสะเทือนของคลื่นอัลตราซาวด์ (cavitation effect) ผลกระทบเหล่านี้สามารถเปลี่ยนโครงสร้างของโปรตีนได้โดยการเพิ่มความสามารถในการขยายตัวของโปรตีนและทำให้เกิดส่วนที่จับกับเอนไซม์มากขึ้น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนสามารถส่งเสริมกระบวนการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์โดยการเพิ่มการรวมกันของเอนไซม์และโปรตีน ผลของอัลตราซาวด์ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง เช่น กำลัง เวลา ความถี่ของคลื่น และรูปแบบของคลื่น (Jia และคณะ, 2010) เช่นเดียวกับการปรับสภาพตัวอย่างด้วยการใช้ความร้อน ที่พบว่าสามารถส่งเสริมประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีน โดยความร้อนจะทำให้พันธะเพปไทด์เกิดการคลายตัวแล้วทำให้เกิดการเผยหมู่ที่ไม่ชอบน้ำที่อยู่ภายในโครงสร้างของโปรตีน (internal cleavage site) ให้ออกมาอยู่บริเวณผิวหน้าของโปรตีนที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ ซึ่งมีผลต่อสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีน (Zhang และคณะ, 2013)

เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการวิเคราะห์ DPPH scavenging activity พบว่าไฮโดรไลเซตที่ได้จากการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนย่อยด้วยเอนไซม์ ด้วยการ ใช้คลื่นอัลตราโซนิกเป็นเวลา 30 นาที ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (66.67%) อย่างมีนัยสำคัญ (Figure 2) Wang และคณะ (2014) ซึ่งศึกษาผลของการปรับสภาพตัวอย่างด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกต่อกิจกรรมของเพปไทด์ที่ย่อยจากข้าวโอ๊ตที่มีฤทธิ์ยับยั้ง Angiotensin-converting enzyme (ACE) รายงานว่ากำลังของคลื่นอัลตราโซนิกและเวลาที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง มีอิทธิพลอย่างมากต่อระดับของกิจกรรมการยับยั้ง ACE ของเปปไทด์ดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Liang และคณะ, (2017) ที่พบว่าปัจจัยทั้งสองนี้ส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากข้าวโพด

สรุปผล

การใช้เทคนิคต่างๆ เพื่อปรับสภาพวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ กากยีสต์ ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ Protamex ส่งผลต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีน ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่า การเตรียมตัวอย่างก่อนกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกเป็นเวลา 30 นาที ส่งผลให้ DH สูงที่สุด คือ 58.86% และโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (66.67%) เมื่อเปรียบเทียบกับ การปรับสภาพกากยีสต์ด้วยเทคนิคอื่นๆ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ บริษัท ไทยลักซ์ เอ็นเตอร์ไพรส์ (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์วัตถุดิบสำหรับใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์, บูรณ์ธร ศรีทองแท้, 2557, การดัดแปรสมบัติของโปรตีนโดยใช้เอนไซม์โปรตีเอสและการประยุกต์ใช้. *KKU Science Journal*, 42(2): 247-288.
- Tavano, O. L., 2013, Protein Hydrolysis Using Proteases: An Important Tool for Food Biotechnology, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90: 1-11.
- Taheri, M.E., Salimi, E., Saragas, K., Novakovic, J., Barampouti, E.M., Mai, S., Malamis, D., Moustakas, K., and Loizidou, M., 2021, Effect of Pretreatment Techniques on Enzymatic Hydrolysis of Food Waste, *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11: 219-226, <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00729-7>.
- Chen, L., Chen, J., Ren, J., and Zhao, M., 2011, Effects of Ultrasonic Pretreatment on the Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein Isolated and on the Emulsifying Properties of Hydrolysates, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 2600-2609.
- Cheson, S. C., Leeb, E., Toro-Seirra, J., and Kulozik, U., 2011, Influence of Hydrolysis Temperature and pH on the Selective Hydrolysis of Whey Proteins by Trypsin and Potential Recovery of Native Alpha-Lactalbumin, *International Dairy Journal*, 21(3): 166-171.
- Chiang, J. H., Loveday, S. M., Hardacre, A. K., and Parker, M. E., 2018, Effects of Enzymatic Hydrolysis Treatments on the Physicochemical Properties of Beef Bone Extract Using Endo- and Exoproteases, *International Journal of Food Science and Technology*, <https://doi.org/10.1111/ijfs.13911>.
- Frister, H., Meisel, H., and Schlimme, E., 1988, OPA Method Modified by Use of N,N-dimethyl-2-mercaptoethylammonium Chloride as Thiol Component, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 330(7): 631-633, <http://doi.org/10.1007/BF00473782>.
- Majid, I., Nayik, G. H., Nanda, V., and Yildiz, F., 2015, Ultrasonication and Food Technology: A Review, *Cogent Food & Agriculture*, 1(1), <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1071022>.
- Jia, J., Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L., and He, R., 2010, The Use of Ultrasound for Enzymatic Preparation of ACE-Inhibitory Peptides from Wheat Germ Protein, *Food Chemistry*, 119(1): 336-342.
- Zhang, Y., Olsen, K., Grossi, A., and Otte, J., 2013, Effect of Pretreatment on Enzymatic Hydrolysis of Bovine Collagen and Formation of ACE-Inhibitory Peptides, *Food Chemistry*, 14(3): 2343-2354.
- Wang, B., Atungulu, G. G., Khir, R., Geng, J., Ma, H., Li, Y., and Wu, B., 2014, Ultrasonic Treatment Effect on Enzymolysis Kinetics and Activities of ACE-Inhibitory Peptides from Oat-Isolated Protein. *Food Biophysics*, 10: 244-252, <http://doi.org/10.1007/s11483-014-9375-y>.
- Liang, Q., Ren, X., Ma, H., Li, S., Xu, K., and Oladejo, A.O., 2017, Effect of Low-Frequency Ultrasonic-Assisted Enzymolysis on the Physicochemical and Antioxidant Properties of Corn Protein Hydrolysates, *Journal of Food Quality*, Article ID 2784146, <https://doi.org/10.1155/2017/2784146>.

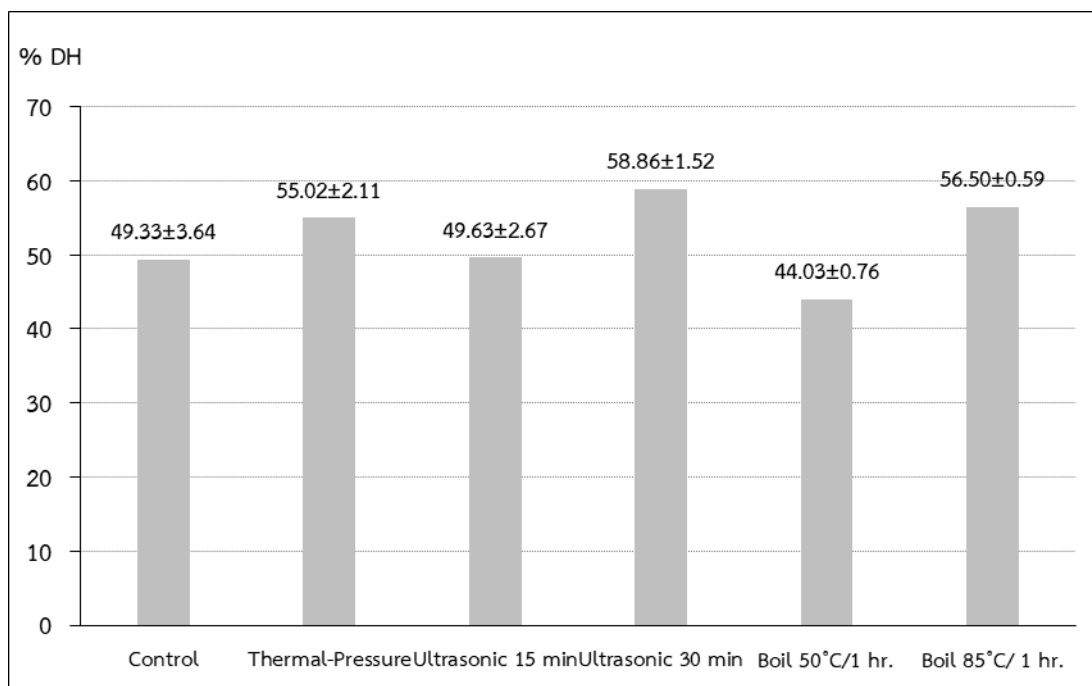


Figure 1 Degree of hydrolysis of spent yeast hydrolysates pretreated with different techniques.

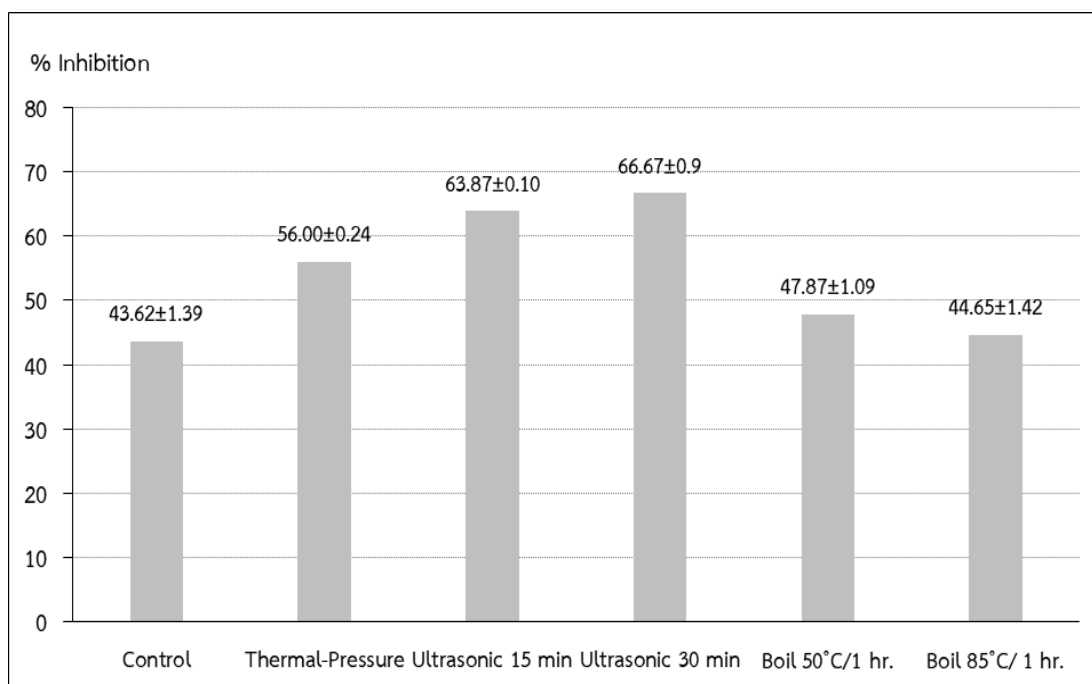


Figure 2 Antioxidant activity of spent yeast hydrolysates pretreated with different techniques.