บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดลองนี้ได้ออกแบบวิธีการแยกแบคทีเรียจากระยะโมโรมิ โดยหลีกเลี่ยงการแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จึงใช้สูตรอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) ที่มี 0-20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ พีเอช 7.0 มิได้ใช้ MRS Agar พีเอช 5.0 ซึ่งเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียประเภทอื่นที่ไม่ใช่แบคทีเรียแลคติกจะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อให้ผลิตโปรติเอสได้ง่ายกว่า เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกเจริญช้าและมักจะเจริญได้ดีในบรรยากาศที่มีออกซิเจนต่ำ ในการทดลองต่อไปควรปรับปรุงวิธีการแยก คือ ควรใช้ TSA ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์และพีเอช 5.0 แทนที่จะเป็นพีเอช 7.0 เพื่อแยกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสแอคติวิตีสูงที่พีเอช 5.0 อย่างไรก็ตาม การแยก *Bacillus* spp. 7 สายพันธุ์ ในการทดลองนี้ได้ผลเป็นที่น่าพอใจระดับหนึ่ง ทั้งนี้เพราะ ***Bacillus megaterium*** K1 ที่แยกได้มี relative protease activity ที่พีเอช 6.0 และ 20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์สูงกว่าแอคติวิตีของ *Bacillus* สายพันธุ์อื่นๆอีก 6 สายพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 8 นอกจากนี้ *Bacillus* spp. ยังเป็นสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีโปรติเอสหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 4 และมีผู้วิจัยเกี่ยวกับพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงสายพันธุ์มาก เหมาะสำหรับเป็นแบคทีเรียตั้งต้น ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ให้ผลิตโปรติเอสที่มีแอคติวิตีสูงในภาวะการหมักระยะโมโรมิ (Wu et al , 1991)

ผลการจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus* spp. ดังเสนอในตารางที่ 6 พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เป็น *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่พบทั่วไปในอาหารตามที่รายงานโดย Seenappa and Kempton (1981) อย่างไรก็ตามควรยืนยันผลการจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus* spp. โดยติดต่อคลังเก็บสายพันธุ์จุลินทรีย์(culture collection) เช่น ATCC เพื่อขอ type specimen ของ *Bacillus* สปีชีต่างๆที่แยก เพื่อนำมาทดสอบทางชีวเคมี เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่แยกได้

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแม้จะไม่มีการเติมโปรติเอสจาก *B.megaterium* K1 ในระยะโมโรมิ ซีอิ๊วที่ได้จากการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้หัวเชื้อ ***Aspergillus oryzae*** (Ozy-Kat1®) และการพาสเตอร์ไรส์ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีก็มีปริมาณโปรตีนและสมบัติอื่นๆตามเกณฑ์ที่จะได้รับตรามาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก. 252-2521) อยู่แล้วดังแสดงในตารางที่ 9 อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนแสดงให้

เห็นว่าการเติมผงโปรติเอส 250 ยูนิตต่อลิตรในวันที่ 8 หลังจากระยะโมโรมิ มีผลเพิ่มปริมาณโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้การกวนหรือไม่กวนน้ำหมักไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีน อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นยังน้อยกว่าปริมาณโปรตีนในโคอิคูชิโชยู (11.3 เปอร์เซ็นต์) เป็นที่คาดว่าถ้าเติมโปรติเอสเมื่อโปรติเอสแอคติวิตีในโหลหมักลดลงจะทำให้เพิ่มปริมาณโปรตีนได้อีก (step-wise additions of proteases) ผลการวิเคราะห์สาเหตุของความแปรปรวนของเฉลี่ยค่าคะแนนความชอบผลิตภัณฑ์ พบว่าชนิดของซีอิ๊วมีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการชอบความใสและการชอบผลิตภัณฑ์โดยรวม($p \leq 0.5$) ส่วนความชอบส่วนบุคคล(personal preferences)ของผู้ชิมเป็นสาเหตุของความแปรปรวนในค่าเฉลี่ยของคะแนนความชอบด้านสี กลิ่น และรสชาติของซีอิ๊ว ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสดังแสดงในตารางที่ 13 พบว่าในโหลคอนโทรลที่ไม่เติมผงเอนไซม์ การกวนน้ำหมักซีอิ๊วระยะโมโรมิทำให้ได้น้ำซีอิ๊วที่เป็นที่ชอบของผู้ชิม ทั้งในด้านสี กลิ่น รสชาติ ความใส และความชอบรวม มากกว่าซีอิ๊วจากโหลคอนโทรลที่ไม่มีการกวน อย่างไรก็ตามในโหลหมักซีอิ๊วที่มีการเติมผงโปรติเอสหลังการหมัก 8 วัน การกวนน้ำหมักซีอิ๊วทำให้ได้ซีอิ๊วที่เป็นที่ชอบของผู้ชิมในระดับต่ำกว่าซีอิ๊วที่ได้จากโหลหมักซีอิ๊วที่เติมผงเอนไซม์และไม่มีการกวนน้ำหมัก ผลการทดลองเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าในการผลิตซีอิ๊วที่เป็นที่ชอบของผู้ชิมนั้นในกรณีที่ไม่เติมผงเอนไซม์ควรกวนน้ำหมักซีอิ๊ว ส่วนในกรณีที่เติมผงเอนไซม์ไม่ควรกวนน้ำหมักซีอิ๊ว ผลการทดลองดูเหมือนจะแสดงให้เห็นว่า ควรมีการกวนเพื่อกระจายโปรติเอสในน้ำหมักในโหลคอนโทรล ส่วนการกระจายของผงโปรติเอสและของโปรติเอสที่มีอยู่เดิมในโหลหมักที่มีการเติมผงโปรติเอส โดยกระจายแบบแพร่ (diffusion) เพียงพอแล้วสำหรับการกระจายของโปรติเอสเพื่อเร่งปฏิกิริยาการย่อยเมล็ดถั่วเหลืองในโหลหมัก ผลการทดลองเบื้องต้นที่ได้นี้ ควรมีการยืนยันผลการทดลองโดยใช้ผู้ชิมจำนวนมากขึ้นในการทดสอบความชอบ สี กลิ่น รสชาติ ความใสและความชอบรวมของซีอิ๊วที่ผลิตได้ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อจะได้ข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น ซีอิ๊วที่ผลิตโดยเติมผงโปรติเอส250 ยูนิตต่อลิตรในวันที่ 8 หลังการหมักระยะโมโรมิ โดยไม่มีการกวนน้ำหมักซีอิ๊ว ได้รับคะแนนสูงกว่าซีอิ๊วที่ได้รับตรามาตรฐานอุตสาหกรรม และได้รับคะแนนเฉพาะด้านรสชาติและความใส มากกว่าซีอิ๊วที่นำเข้าจากประเทศญี่ปุ่น ดังนั้นในการทดลองต่อไปควรปรับปรุงด้านสีและกลิ่นของซีอิ๊วที่ผลิตโดยเติมผงโปรติเอสในวันที่ 8 ของการหมักระยะโมโรมิ ทั้งนี้ Yokotsuka (1986) รายงานว่ากลิ่นซีอิ๊วเกิดจาก ปริมาณกรดอะมิโน น้ำตาล แอลกอฮอล์ กลีเซอรีน และกรดอินทรีย์ในปริมาณที่พอเหมาะ ดังนั้นอาจทำการทดลองโดย

เติมและไม่เติมหัวเชื้อยีสต์เช่น *Saccharomyces rouxii* เพื่อเปรียบเทียบปริมาณและชนิดของสารที่ให้กลิ่นเฉพาะของซีอิ๊ว โดยศึกษากลไกการสังเคราะห์สารให้กลิ่นดังกล่าวด้วย

ในที่สุดนี้ การผลิตโคอิคูชิโชยู ซึ่งเป็นซีอิ๊วชั้นดีของประเทศญี่ปุ่นมีกรรมวิธีการผลิตที่อาจไม่เหมาะสมกับประเทศไทย ทั้งนี้เพราะต้องคั่วข้าวสาลี ปริมาณเท่ากับเมล็ดถั่วเหลือง และบดอย่างหยาบให้ได้ประมาณ 4-5 เสี่ยงต่อเมล็ด ก่อนนำไปใช้ผลิตโคจิ ทั้งนี้ประเทศไทยมิได้เป็นผู้ผลิตข้าวสาลี และการคั่วข้าวสาลีต้องใช้พลังงาน ดังนั้นการผลิตซีอิ๊วโปรตีนสูงที่มีปริมาณโปรตีน สี กลิ่น ความใส และรสชาติ ทัดเทียมกับผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วจากประเทศญี่ปุ่นซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่การยอมรับทั่วโลก อาจไม่ต้องใช้วิธีการผลิตเดียวกันในการปรับปรุงคุณภาพซีอิ๊วที่ผลิตในประเทศไทย อาจปรับปรุงเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ข้าวสาลี และเติมผงโปรติเอสลงในระยะโมโรมิในช่วงระยะเวลาที่โปรติเอสแอคติวิตีในโหลหมักลดลงก็ได้ การเติมผงเอนไซม์มีข้อดีกว่าการเติมหัวเชื้อคือ ไม่ต้องกังวลกับการฆ่าหัวเชื้อในการพาสเตอร์ไรส์ และเอนไซม์ชนิดผงสะดวกในการถ่ายทอดเทคโนโลยีแก่ผู้ประกอบกิจการซีอิ๊วในโรงงานอุตสาหกรรมขนาดย่อม

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมในการทดลองต่อไป

1.เนื่องจากโปรติเอสที่แยกจาก ***B.megaterium*** K1 มีแอคติวิตีเหลืออยู่ 112.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในภาวะ 20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์และพีเอชเท่ากับ 6.0 และเมื่อทำการทดลองหาความเสถียรของเอนไซม์ที่ 20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์พีเอช 5.0 พบว่าโปรติเอสจาก K1 ไม่เสถียรโดยจะลดลงถึง 0 ยูนิตใน 6 วัน ดังนั้นจึงควรแยกและคัดเลือกแบคทีเรียชอบโซเดียมคลอไรด์ที่ผลิตโปรติเอสที่มีแอคติวิตีสูงกว่า แอคติวิตี ของ *B. megaterium* K1 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์และ พีเอช 5.0-5.5 และจะต้องมีความเสถียรที่ภาวะเดียวกันด้วย หากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียชอบโซเดียมคลอไรด์ดังกล่าวผลิตโปรติเอสที่มีแอคติวิตีต่ำกว่า แอคติวิตีของ ***B.megaterium*** K1 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์และ พีเอช 5.0-5.5 อาจใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์ เช่นใส่โปรติเอสยีนส์เข้าไปในเซลของแบคทีเรียชอบโซเดียมคลอไรด์เพื่อให้ผลิตโปรติเอสที่มีแอคติวิตีสูงและมีความเสถียรในภาวะดังกล่าว

2.ทำโปรติเอสจาก ***B.megaterium*** K1 ให้บริสุทธิ์และเปรียบเทียบสมบัติกับโปรติเอสของแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตโปรติเอสที่มีแอคติวิตีสูงในภาวะความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์ และพีเอชเท่ากับ 5.0-5.5 เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ protein engineering ปรับปรุงเอนไซม์จากสายพันธุ์ K1

3. ทดลองผลิตซีอิ๊วแบบขยายส่วน โดยเติมโปรติเอสจากแบคทีเรียที่มีแอคติวิตีสูงที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์และพีเอช 5.0-5.5 ในช่วงเวลาต่างๆของระยะโมโรมิและวิเคราะห์สมบัติทางเคมีพร้อมทั้งผลการยอมรับผลิตภัณฑ์โดยวิธีทางสถิติ

4.วิเคราะห์กรดอะมิโนอิสระและกรดกลูตามิคอิสระในซีอิ๊วที่ผลิตโดยเติมโปรติเอสจาก *B. megaterium* K1 เพื่อเป็นข้อมูลใช้เปรียบเทียบสมบัติของซีอิ๊วที่ผลิตจากการเติมโปรติเอสจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ผลิตโปรติเอสชนิดอื่นที่มีแอคติวิตีสูงที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์และพีเอชเท่ากับ 5.0-5.5 ทั้งนี้เพราะว่า Yokotsuka(1986) รายงานว่าซีอิ๊วญี่ปุ่นที่น่ารับประทาน มีสารประกอบไนโตรเจนมากกว่าครึ่งหนึ่งในรูปของกรดอะมิโนอิสระและมีสารประกอบไนโตรเจนมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์อยู่ในรูปของกรดกลูตามิคอิสระ