หองสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* var. *montrachet* และชนิดของสารไครโอโปรเทคแทนที่เหมาะสมเพื่อผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

Study on Optimal Cultivation Period of *Saccharomyces cerevisiae* var. *montrachet* and Cryoprotectant for the Production of Active Wine Dry Yeast Using Lyophilization

จัดทำโดย

นางสาวชนิกานต์ ธนูพิทักษ์ รหัสนักศึกษา 45040791

นายอนุชา อรุณมหารัตนกุล รหัสนักศึกษา 45040824

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21101

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* var. *montrachet* และชนิดของสารไครโอโปรเทคแทนที่เหมาะสมเพื่อผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

Study on Optimal Cultivation Period of *Saccharomyces cerevisiae* var. *montrachet* and Cryoprotectant for the Production of Active Wine Dry Yeast Using Lyophilization

T096833

นางสาวชนิกานต์ ธนูพิทักษ์ รหัสนักศึกษา 45040791
นายอนุชา อรุณมหารัศนกุล รหัสนักศึกษา 45040824

ปพ.
ส152ก
2549
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 96833
วัน,เดือน,ปี.....

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นางสาวชนิกานต์ ธนูพิทักษ์ และนายอนุชา อรุณมหารัตนกุล 2549 : การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* var. *montrachet* และชนิดของสารไครโอโปรเทคแทนที่เหมาะสมเพื่อผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ (Study on Optimal Cultivation Period of *Saccharomyces cerevisiae* var. *montrachet* and Cryoprotectant for the Production of Active Wine Dry Yeast Using Lyophilization) โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง กรรมการ : ดร.ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด , อ.สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา

บทคัดย่อ

ยีสต์แห้งมีความสะดวกต่อการใช้งาน มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆน้อย การเก็บรักษาได้ง่ายโดยแช่ตู้เย็น จึงเป็นเหตุผลที่นิยมเลือกใช้ยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ การทำแห้งของยีสต์ด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ต้องศึกษาช่วงเวลาการเจริญของยีสต์ให้อยู่ในสภาพสมบูรณ์ก่อน จึงได้ศึกษาระยะเวลาการเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* var. *montrachet* ในอาหาร YM broth โดยนำเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงต่างๆมาทำการไลโอฟิไลซ์โดยใช้สคิมมิลค์เป็นสารไครโอโปรเทคแทนพบว่าชั่วโมงที่ 60 ก่อนไลโอฟิไลซ์ มีปริมาณยีสต์ในการทำไลโอฟิไลซ์ 6.5×10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร และหลังไลโอฟิไลซ์มีปริมาณยีสต์ 1.9×10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร คิดเป็นการมีชีวิตรอดร้อยละ 29.2 ซึ่งมีการมีชีวิตรอดมากที่สุด จึงเลือกเซลล์ยีสต์ที่อายุ60 ชั่วโมงมาทำการไลโอฟิไลซ์โดยใช้สารไครโอโปรเทคแทน 3 ชนิด คือ สคิมมิลค์ ซูโครสและ ซอร์บิทอล เพื่อเลือกสารไครโปรเทคแทนที่เหมาะสมต่อเซลล์ยีสต์ พบว่า ซูโครสเป็นสารไครโอโปรเทคแทนที่ทำให้เซลล์มีการมีชีวิตรอดมากที่สุดคือร้อยละ 39.3 แต่กลับพบว่ายีสต์ที่ใช้ซอร์บิทอลเป็นสารไครโอโปรเทคแทนมีแอคทิวิตีการหมักดีกว่ายีสต์แห้งชนิดอื่นๆ คือ 0.37 มิลลิโมลของคาร์บอนไดออกไซด์/กรัมยีสต์/ชั่วโมง

ชนิกานต์ ธนูพิทักษ์

อนุชา อรุณมหารัตนกุล

ลายมือชื่อนักศึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

28 มีนาคม 2549

วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การนำเสนอปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีคณะผู้จัดทำ ขอกราบขอบพระคุณ ดร. บุญเทียม พันธุ์เพ็ง อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ที่ท่านได้กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่า ให้คำปรึกษา ชี้แนะเอาใจใส่ และช่วยแก้ไขปรับปรุง ทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์ และสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ที่ให้กำลังใจและกำลังทรัพย์ในการทำปัญหาพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ และขอบคุณเพื่อนๆเทคโนโลยีการหมักทุกคนที่ให้กำลังใจและข้อเสนอแนะต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง นายเกรียงไกร ทองก้อน ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำทดลองครั้งนี้เป็นอย่างมาก

คณะผู้จัดทำ

18 มีนาคม 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. วารสารปริทัศน์	2
3. อุปกรณ์และการทดลอง	11
4. ผลการทดลองและอภิปรายผล	17
5. สรุปผลการทดลอง	24
บรรณานุกรม	25
ภาคผนวก	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงค่าแอคทิวิตีการหมักของยีสต์แห้งชนิดต่างๆ 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แสดงการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหาร YM broth	17
2. แสดงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงต่างๆ	17
3. แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเซลล์ยีสต์ในช่วงเวลา 72 ชั่วโมง	18
4. แสดงระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทำไลโอฟีไลซ์โดยใช้ สคิมมิลค์ เป็นสารไครโอโปรเทคแทน	19
5. แสดงการทำไลโอฟีไลซ์	20
6. แสดงการใช้สารไครโอโปรเทคแทนชนิดต่างๆในการทำไลโอฟีไลซ์	20
7. แสดงยีสต์แห้งที่ใช้สารไครโอโปรเทคแทนชนิดต่างๆ	21
8. แสดงชนิดของสารไครโอโปรเทคแทนที่เหมาะสมต่อการไลโอฟีไลซ์	21
9. แสดงการรีไฮเดรตยีสต์	22
10. แสดงการวัดค่าแอคทิวิตีการหมักด้วยวิธี gasometric method	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

การทำไวน์สิ่งจำเป็นในการผลิตแอลกอฮอล์คือยีสต์ โดยชนิดยีสต์ที่ใช้มีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด คือแบบของเหลวหรืออยู่ในสารอาหารเหลว และ แบบแห้ง ซึ่งส่วนใหญ่ที่นิยมเลือกใช้คือยีสต์แห้งเนื่องจากยีสต์แห้ง สะดวกต่อการใช้ ไม่ต้องยุ่งยากในการเตรียม การขนส่งง่ายเนื่องจากบรรจุในซองหรือกระป๋อง เก็บได้ง่ายในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้อายุการเก็บมากกว่าแบบของเหลว ทั้งหมดนี้จึงเป็นเหตุผลที่เลือกใช้ยีสต์แห้งในการทำไวน์ ลักษณะยีสต์แห้งที่ดีควรปนเปื้อนจากจุลินทรีย์น้อย อาจมีเชื้อแบคทีเรียอื่นปนเปื้อนบ้าง แต่จะไม่มีเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค รวมทั้งเซลล์มีชีวิตรอดหลังผ่านการทำแห้งมากและแอคทิวิตีในการหมักต้องดีด้วย ส่วนใหญ่ยีสต์แห้งที่ใช้ในการทำไวน์ จะนำเข้าจากบริษัทผลิตยีสต์จากต่างประเทศ ทำให้มีราคาแพง จึงมีการศึกษาทดลองการผลิตยีสต์แห้งสำหรับการทำไวน์ขึ้น

การไลโอฟิไลซ์(Lyophilization)เป็นการเก็บรักษาเซลล์จุลินทรีย์ที่ใช้อุณหภูมิต่ำ สามารถเก็บรักษาเชื้อให้รอดชีวิตได้เป็นระยะเวลานาน มีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงของเดิมมากที่สุด นิยมใช้เก็บรักษาเซลล์ของแบคทีเรีย ยีสต์ และราอีกด้วย จึงใช้การไลโอฟิไลซ์กับยีสต์ นอกจากนี้การเลือกใช้สารป้องกันความเย็นหรือสารไครโอโปรเทคแทน(Cryoprotectant)ที่เหมาะสมต่อเชื้อแต่ละประเภท ช่วยให้เชื้อมีชีวิตรอดได้นานแตกต่างกัน ส่วนสารที่นิยมใช้ได้แก่ สกิมมิลค์(skim milk) กลูโคส(glucose) ซูโครส (sucrose)เป็นต้น เพราะมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อย และหาง่าย อีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการทำไลโอฟิไลซ์คือระยะการเจริญของเซลล์ต้องเลือกสภาวะที่เซลล์มีความแข็งแรงและสมบูรณ์เพื่อที่เซลล์จะมีอัตราการรอดภายหลังการทำไลโอฟิไลซ์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาระยะเวลาของการเลี้ยงยีสต์และชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนที่เหมาะสมต่อการทำยีสต์แห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์
2. เพื่อทดสอบสมบัติของยีสต์แห้งที่ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

หากมีการศึกษาทดลองต่อไปจะได้ยีสต์แห้งที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงยีสต์แห้งที่จำหน่ายในทางการค้า และนำแนวทางนี้ใช้พัฒนาสายพันธุยีสต์อื่นๆสำหรับทำไวน์ต่างๆได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 ทฤษฎี

2.1.1 ยีสต์

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตจัดอยู่ในจำพวกราเซลล์เดี่ยว ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทธานอล จะอยู่ในสกุล *Saccharomyces sp.* ซึ่งมีหลายชนิดได้แก่ *S. cerevisiae S. bayanus. S. carlsbergensis* และ *S. fermentati* ยีสต์เหล่านี้สามารถหมักได้อย่างรวดเร็ว ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูง และทนทานต่อสภาวะแวดล้อม เช่น ดีกรีแอลกอฮอล์ อุณหภูมิ และค่าพีเอช นอกจากนี้ยีสต์ที่ดีควรตกตะกอนได้ง่ายเพื่อง่ายต่อการทำให้ไวน์ใส ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถอยู่ได้ทั้งในสภาพมีและไม่มีก๊าซออกซิเจนได้ ในการหมักเริ่มต้นจะใช้ก๊าซออกซิเจนช่วยเพื่อเพิ่มอัตราการแบ่งเซลล์ (แตกหน่อ) เรียกว่า aerobic เมื่อมีการเจริญมากพอระดับหนึ่งแล้วจะไม่ให้อากาศ สภาวะนี้เรียกว่า anaerobic เซลล์ก็จะเริ่มผลิตเอทธานอล หากในช่วงที่มีการผลิตเอทธานอลนี้เซลล์ยีสต์ได้รับออกซิเจนมาก กลไกของเซลล์จะไม่ยอมผลิตเอทธานอลแต่จะสร้างกรดน้ำส้มแทน การเจริญของเซลล์ยีสต์สามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะ คือ

ระยะเริ่มต้น (lag phase) เป็นระยะที่เซลล์กำลังปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่เพื่อเริ่มการเจริญ ระยะนี้จะใช้เวลาสั้นๆ ประมาณ 1-6 ชั่วโมง ขึ้นกับการเตรียมหัวเชื้อ ความแข็งแรงของเซลล์ ความสดใหม่ของเซลล์ และสารอาหารที่มีอยู่ในน้ำผลไม้ เป็นสำคัญ

ระยะการเจริญ (log phase หรือ exponential phase) หลังระยะเริ่มต้นเสร็จสิ้นประมาณ 30 นาที เซลล์ยีสต์เริ่มแตกหน่อเพื่อเพิ่มจำนวน ระยะนี้จำนวนเซลล์จะเพิ่มอย่างรวดเร็วเป็นทวีคูณหรือเพิ่มแบบค่า log ทางคณิตศาสตร์ จึงเรียกระยะนี้ตามค่าคณิตศาสตร์ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ก็จะเพิ่มมากขึ้น จนทำให้เห็นฟองอากาศผุดขึ้นมามากมาย ขณะเดียวกันเซลล์ยีสต์ก็เริ่มจับกลุ่มกันเองมากขึ้น แอลกอฮอล์จะเริ่มผลิต

ระยะคงที่ (stationary phase) เมื่อสารอาหารเริ่มหมดลงการเจริญหรือการแบ่งเซลล์จะลดน้อยลงด้วย ทำให้จำนวนเซลล์รวมค่อนข้างคงที่ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ก็จะน้อยลง เซลล์ยีสต์เริ่มตกตะกอนมากขึ้น แอลกอฮอล์จะเพิ่มจนสูงสุด

ระยะตาย (death phase) เป็นระยะที่เซลล์ตาย ตะกอนเซลล์จะมีมากขึ้น ปริมาณแอลกอฮอล์จะคงที่ ไวน์ที่ได้จะค่อยๆเริ่มใสขึ้นเรื่อยๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของยีสต์

ยีสต์ที่มีจำหน่ายโดยทั่วไปจะมี 2 ลักษณะคือ แบบของเหลวหรืออยู่ในสารอาหารเหลวและแบบแห้ง ยีสต์แบบของเหลวมักไม่สะดวกต่อการขนส่ง การใช้งาน และการจัดเก็บ เพราะอายุค่อนข้างสั้นและต้องเก็บในที่เย็น มักนิยมใช้แบบแห้งมากกว่า

2.1.1.1 ยีสต์แห้ง (Active Dry Wine Yeast หรือ ADWY) **การใช้ยีสต์แห้งทำไวน์จะได้ไวน์ที่มีคุณภาพดี มีกลิ่นหอมเนื่องจากเป็นยีสต์ที่ถูกคัดเลือกและผสมจากยีสต์หลายๆสายพันธุ์และมีความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการในไวน์ด้วย จึงทำให้การหมักเป็นไปอย่างสมบูรณ์ ไม่เกิดการเน่าเสียง่าย**

ในศตวรรษที่ 19 การใช้ยีสต์ที่มีการคัดเลือกมาเตรียมกล้าเชื้อในน้ำเวิร์ท(wort)และโดขนมปัง(bread dough)นั้นเป็นวิธีการทำที่กว้างขวาง ซึ่งไม่ได้ใช้การหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ทำให้มีพีเอชที่สูง (ประมาณ 5.2) และมีการเจริญของเชื้อที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียที่สูง ในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์การเลือกใช้สายพันธุ์ที่นำมาผลิตยังไม่มีขอบเขตที่แน่ชัดจนถึงศตวรรษที่ 20 ช่วงทศวรรษที่1950 การเลือกใช้สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ทำไวน์เริ่มแพร่หลายใน สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และ ประเทศแอฟริกาใต้ เช่นเดียวกับในยุโรปที่แม้ว่าจะยังไม่เป็นที่ยอมรับ ช่วงทศวรรษที่1960 ยีสต์แห้ง (active dry wine yeast) เริ่มเข้ามาในสหรัฐอเมริกาและเป็นที่แพร่หลายอย่างรวดเร็วไปยัง ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และ ประเทศแอฟริกาใต้ ช่วงปลายทศวรรษที่1970 ยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์เริ่มมีการนำมาใช้ในยุโรป โดยมีการใช้ในเยอรมัน อิตาลี และฝรั่งเศส อีกทั้งเริ่มมีการนำมาใช้ในประเทศอื่นๆที่ผลิตไวน์ในทวีปยุโรปและอเมริกาใต้ในเวลาต่อมา

Ulbrich and Saller (1951) ได้มีการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อใช้เป็นยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ในสภาพให้อากาศและไม่ให้อากาศของยีสต์สำหรับทำไวน์หลายสายพันธุ์พบว่าให้ผลของกำลังการหมัก (fermenting power) ไม่แตกต่าง Caster(1953) ได้เสนอการผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ด้วยวิธีให้อากาศเช่นเดียวกับการผลิตยีสต์ทำขนมปัง Adam (1953/1954) ได้ผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ด้วยถังหมักขนาด 1 ลิตรโดยการให้อากาศแล้วเก็บเกี่ยวเซลล์ยีสต์ทำเป็นยีสต์ก้อน(wet press cake) พบว่าเมื่อเก็บไว้ที่ - 29° ซ สามารถเก็บไว้ได้นานหลายสัปดาห์ Feicher (1963) ได้ผลิตโดยใช้ถังหมักขนาด 10 ลิตรก็ให้ผลเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามขณะนั้นก็ยังไม่มีการนำมาทดลองที่ได้ไปผลิตเป็นการค้า

ต่อมาช่วงทศวรรษ1960 อุตสาหกรรมการผลิตไวน์ของสหรัฐอเมริกาได้ให้ความสนใจในการผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ในปริมาณมากๆและประสบผลสำเร็จในการผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์หลายสายพันธุ์ ซึ่งได้นำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์ตั้งโต๊ะ(table wine) (Thoukis,Reed and Boutilet 1963) การผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ในขนาดใหญ่ระดับอุตสาหกรรมใช้วิธี fed- batch และให้อากาศเช่นเดียวกับวิธีการผลิตยีสต์ขนมปัง (Reed 1974; Kraus,Reed, and Villettaz 1983/1984) การผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์โดยทั่วไปมักเลี้ยงยีสต์ในสภาพที่มีไบซัลไฟท์(bisulfite) เพื่อให้ยีสต์ปรับตัวให้คุ้นเคยกับSO_2 ในน้ำองุ่นที่เตรียมทำไวน์ ยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ที่ผลิตเป็นการค้าแบบที่เป็นยีสต์แห้งมีความชื้นร้อยละ 5-7.5 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องบรรจุในห่อที่เป็นสุญญากาศหรือห่อที่มีบรรยากาศเป็นก๊าซไนโตรเจนหรือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน 1 ปีเป็นอย่างน้อย กล้าเชื้อยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์จะต้องนำมารีไฮเดรต (rehydrate) ก่อนใช้โดยใส่ลงในน้ำอุ่นหรือน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ40° ซ (Kraus, Scopp, and Chen 1981)

สายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ต้องเหมาะสมโดยคุณภาพของยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ขึ้นอยู่กับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตรอด (viability) ความสามารถในการหมัก (fermentation activity) การปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์อื่นน้อย (absence of gross contamination with other microorganisms) Radler, Dietrich, and Schong (1985) ได้รายงานผลการตรวจนับจำนวนเซลล์ยีสต์ในยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ 3 ตรา มีประมาณ 10 ถึง 39 $x10^9$cfu ต่อกรัม

การทดสอบความสามารถในการหมัก(fermentation activity) สามารถทดสอบได้ด้วยวิธี gasometric method เพื่อควบคุมคุณภาพของยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ วิธีนี้ใช้กันมากในการทดสอบยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์โดยใช้ปริมาณมากในระยะเวลาสั้นเพียง 2.5 ชั่วโมง การปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ในยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ Radler, Dietrich, and Schong (1985) ได้รายงานผลว่ามีการปนเปื้อนที่ไม่ใช้เซลล์ *Saccharomyces* น้อยกว่า 10^4 ถึง $6x10^5$ ต่อกรัมในยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ 3 ตรา และปริมาณแบคทีเรียที่ใช้อากาศนับได้ 0.3ถึง $15 x10^6$ ต่อกรัม

ช่วงระยะเวลา 20 ปีแรกของการผลิตไวน์ ยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ได้ผลิตถึง 200 ตัน ในปี1983 โดยบริษัทต่างๆในหลายประเทศ ส่วนใหญ่ทำการเลี้ยงสภาพให้อากาศบนอาหารซึ่งมีแหล่งคาร์บอนที่สามารถนำไปใช้ได้ทันที เช่น กากน้ำตาล เสริมด้วยก๊าซNH, ฟอสเฟต(Phosphate) และสารที่ช่วยในการเจริญต่างๆ การทำแห้งโดยยีสต์จะถูกทำอยู่ในรูปก้อนกลมเล็กๆ หรือเป็นเส้นเล็กๆก่อนบรรจุในสภาพสุญญากาศ โดยเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นอยู่ที่ 1-4 $x10^{10}$ เซลล์ต่อกรัม ยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-7°ซ แต่จะมีปริมาณเลคลงอยู่ที่ต่ำกว่า10^9 ต่อกรัม ถ้าเก็บรักษาที่ 40° ซ เป็นเวลา 6 เดือน

การประเมินคุณภาพยีสต์แห้งทางการค้าด้วยแอคทิวิตีการหมัก แต่เดิมการหมักไวน์ดังเดิมจะใช้ยีสต์ที่เกิดขึ้นเองโดยตามธรรมชาติ ต่อมาใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งแต่ 1963 มีการใช้ยีสต์แห้งที่ผลิตเป็นการค้าแล้วก็ได้มีการเพิ่มการใช้ในผู้ผลิตไวน์ที่สำคัญๆในส่วนต่างๆทั่วโลก ซึ่งจำเป็นจะต้องมีวิธีที่ผู้ทำไวน์ที่จะทราบว่ายีสต์จะใช้มีคุณภาพมากน้อยอย่างไร

ยีสต์แห้งทางการค้ามีลักษณะเป็นก้อนกลมเล็กๆมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร แต่อาจมีรูปแคกต่างกันไปตามวิธีการทำแห้ง ยีสต์มีส่วนประกอบทางเคมีคือ ประกอบด้วยไนโตรเจนประมาณร้อยละ 7 ,P_2O_5 ประมาณ ร้อยละ 2 , มีความชื้นประมาณร้อยละ 7.5 ถึง 8 ยีสต์สำหรับทำไวน์หลายสายพันธุ์จึงถูกนำมาทำเป็นการค้า ในยีสต์บางสายพันธุ์จะถูกคัดแยกและเก็บข้อมูลตามลักษณะ โดยสถาบันที่เก็บรวบรวมที่เป็นสาธารณะ

การกำหนดแอคทิวิตีการหมักของยีสต์สำหรับทำไวน์ ค่าแอคทิวิตีสามารถบอกด้วยอัตราของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในอาหารที่มีการเติมน้ำตาลลงไป โดยแสดงในรูปของโมลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อชั่วโมงต่อปริมาณยีสต์ที่ใส่ลงไปเป็นกรัม หรือ การเปรียบเทียบกับยีสต์แห้งสำหรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำไวน์มาตรฐาน โดย 2 ทางเลือกนี้เป็นที่นิยมใช้กันเนื่องจากรวดเร็ว ทำได้ง่าย และเหมาะกับยีสต์ โดยในรายงานนี้ใช้ยีสต์แห้งสำหรับทำขนมปังมาเป็นยีสต์มาตรฐาน ยีสต์ที่ใช้ได้บรรจุในถุงอะลูมินัมฟอยด์ (aluminum foil) ที่บรรจุก๊าซไนโตรเจน ซึ่งสามารถเก็บรักษาโดยช่วยให้ไม่สูญเสียแอคทิวิตีของยีสต์เป็นเวลา 1 ปีภายใต้การเก็บในตู้เย็นหรือนานกว่านั้นเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -15°ซ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดสอบแอคทิวิตีของยีสต์จะเหมือนกับอาหารที่ใช้ผลิตทางการค้า ถ้าอาหารนั้นมีองค์ประกอบที่เหมาะสม รายงานนี้ได้ใช้น้ำองุ่นที่ผลิตทางการค้าของ *Vitis labrusca* ปราศจากการเติมน้ำตาล มีความหวานที่ 15 ° บริกซ์ (Brix)

เครื่อง gasometric นำมาใช้วัดแอคทิวิตีของยีสต์ เป็นเครื่องที่บันทึกค่าได้อัตโนมัติ เครื่องชนิดนี้สามารถนำมาใช้กับเครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการได้ สารละลายยีสต์เข้มข้นที่นำมาให้ผลหลังการหมักผ่านไป 2 ชั่วโมง 30 นาที ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ใช้มีประมาณ 360ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตามเป็นปริมาณที่สูงมากเมื่อเทียบกับการหมักไวน์ จากข้อมูลได้แสดงแอคทิวิตีการหมักของยีสต์แห้งทางการค้ามีค่า 10 มิลลิโมลของคาร์บอนไดออกไซด์/กรัมยีสต์/ชั่วโมง

โดยยีสต์แห้งสายพันธุ์ Montrachet ให้ผลที่ดีเมื่อมีการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ โดยผลได้แสดงถึงการไม่ถูกยับยั้งหรือมีเพียงเล็กน้อยต่อซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระที่ปริมาณสูงถึง 50ppm ที่ความเข้มข้นของยีสต์ 0.15 กรัม/30มิลลิลิตรในน้ำองุ่น อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของยีสต์ที่0.05กรัม ที่ 30 มิลลิลิตรในน้ำองุ่น แอคทิวิตีการหมักที่มีSO_2 50 ppm มีการยับยั้งอย่างนัยสำคัญ โดยเฉพาะจะไม่มีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มี SO_2 100 ppm โดยความเข้มข้นของยีสต์ต่ำกว่า 2.5 กรัมต่อ30มิลลิลิตรในน้ำองุ่น ผลการยับยั้งของ SO_2 ในการหมักไวน์มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นของยีสต์ต่ำ

อุณหภูมิของการรีไฮเดรต มีผลต่อแอคทิวิตีของยีสต์ที่ใช้สำหรับทำไวน์เช่นเดียวกัน เป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่งในการรีไฮเดรตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์น้ำ หรือ น้ำผลไม้ที่อุณหภูมิประมาณ 40°ซ ในระหว่างการเพิ่มอุณหภูมิของน้ำยีสต์จะสูญเสียสารละลายแข็งให้กับสารละลายด้วยรอบ ช่วงการสูญเสียที่น้อยที่สุดอยู่ที่ 38 และ 45°ซ ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการรีไฮเดรตดีที่สุด ผลที่ได้จากการระบุในยีสต์ขนมปัง Herrera et al. ได้ประยุกต์ใช้กับยีสต์สำหรับทำไวน์ ตัวอย่างเช่น ปริมาณสารละลายของแข็ง (ร้อยละปริมาณเซลล์ยีสต์ทั้งหมด) มีค่าเท่ากับ ร้อยละ 8.65 ที่ 27 °ซ , ร้อยละ 7.38 ที่ 32°ซ ,ร้อยละ 6.6 ที่ 38 °ซ และร้อยละ 6.21 ที่ 43°ซ

สำหรับช่วงการเก็บรักษาในระยะสั้นของยีสต์แห้งสายพันธุ์ Montrachet ไม่ทำให้สูญเสียแอคทิวิตีการหมักที่อุณหภูมิ 5°ซ นาน 3 สัปดาห์จากการวัดด้วยวิธีข้างต้น การเก็บที่ 37°ซ นาน 3 สัปดาห์มีการสูญเสียร้อยละ 12 และมีการสูญเสียร้อยละ 10 ที่ 48°ซ นาน 2 วัน การเก็บรักษาระยะยาว เมื่อผ่านไป 6เดือนมีการสูญเสียร้อยละ 2ต่อเดือนที่อุณหภูมิห้อง(20-25°ซ) และมีการสูญเสียร้อยละ 0.1ต่อเดือนที่12°ซ

สำหรับการเก็บภายใต้สุญญากาศเกิน12 เดือนยีสต์สายพันธุ์ Montrachet มีการสูญเสียแอคทิวิตีร้อยละ 0. 3 ต่อเดือนที่ 5°ซ , ร้อยละ 1 ต่อเดือนที่ 23°ซ , และสูญเสียทั้งหมดที่ 40°ซ เป็นเวลา 12 เดือน สำหรับการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เก็บเป็นเวลา 12 เดือนของยีสต์สายพันธุ์ Champagne มีการสูญเสียแอคทิวิตีร้อยละ 50 ที่ 5°ซ , ร้อยละ 80 ที่ 23°ซ และสูญเสียทั้งหมดที่ 40°ซ

สรุปได้ว่าการเก็บรักษาเป็นเวลา3เดือนจะไม่ต้องใช้บรรจุภัณฑ์ช่วยป้องกันหรือการเก็บที่อุณหภูมิต่ำแต่แนะนำสำหรับการเก็บระยะยาวให้ใช้บรรจุภัณฑ์ช่วยป้องกัน (สุญญากาศ หรือ ก๊าซไนโตรเจน)และ/หรือเก็บในตู้เย็น

ยีสต์แห้งปัจจุบันบรรจุในซองหรือกระป๋องที่สามารถเก็บไว้ได้นานนับปีในตู้เย็น การใช้ยีสต์แห้งนั้นก่อนใช้ต้องนำยีสต์มารีไฮเดรตโดยแช่น้ำอุ่น อุณหภูมิ 30 – 40 °ซ เขย่าเล็กน้อยนานประมาณ 10 – 20 นาทีเพื่อเป็นการปลุกเซลล์ยีสต์ แล้วนำสารละลายยีสต์มาใส่ในน้ำผลไม้ตามอัตราส่วนของคำแนะนำที่ขึ้นอยู่กับผู้ผลิตกำหนด สารละลายยีสต์นี้ไม่สามารถเก็บไว้นานนักควรรีบใช้ทันที อย่างไรก็ตามยีสต์แห้งควรทดสอบการเจริญเติบโตของยีสต์ก่อน โดยเติมยีสต์ในสารละลายน้ำตาลทรายเล็กน้อย ทิ้งไว้ 2 – 3 ชั่วโมง ให้สังเกตการเกิดฟองและความขุ่นที่มากขึ้น แสดงว่ายีสต์แห้งยังใช้ได้ดี

การใช้ยีสต์แห้งจะสะดวกมากเพราะไม่ต้องเตรียมหัวเชื้อ (starter) สามารถเติมลงไปในน้ำหมักไวน์ได้เลย แต่จะมีราคาค่อนข้างแพง การเตรียมเชื้อยีสต์แห้งปกติใช้ 2 กรัม ต่อน้ำผลไม้ 10 ลิตร โดยนำยีสต์แห้งมาละลายในน้ำอุ่นทิ้งตั้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อรีไฮเดรต ก็สามารถเติมลงไปในน้ำผลไม้โดยตรง

2.1.1.2 ยีสต์สด เป็นยีสต์ที่มีราคาค่อนข้างถูก เพราะใช้ในปริมาณน้อยในการหมักแต่ละครั้ง และสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นได้นาน 3 – 4 เดือน น้ำหมักในไวน์ขนาด 5 ลิตร ใช้ยีสต์สด 1 ขวด หรือ 1 หลอด แต่ถ้าต้องการทำไวน์จำนวนมากต้องเพาะเลี้ยงขยายเชื้อยีสต์ในลักษณะของหัวเชื้อหรือสตาร์ทเตอร์ (starter) เสียก่อน

2.2 ปัจจัยควบคุมการเจริญของยีสต์

ปัจจัยที่ใช้ในการควบคุมการเจริญของยีสต์จึงมีค่อนข้างมาก ได้แก่

2.2.1 ก๊าซออกซิเจน

ในสภาวะที่มีอากาศหรือก๊าซออกซิเจนยีสต์จะแบ่งตัวเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าได้ในเวลาไม่ถึงชั่วโมงในระยะเจริญ และจะได้เซลล์ยีสต์เป็นหลายล้านเซลล์เมื่อเวลาผ่านไปภายใน 24 ชั่วโมง การเจริญของยีสต์ในช่วงนี้แต่จะให้ปริมาณแอลกอฮอล์น้อยมาก อีกประการหนึ่งในสภาวะที่มีอากาศนั้นยีสต์จะผลิตกรดน้ำส้มขึ้นมาแทน ทำให้ไวน์ที่ได้มีรสเปรี้ยวและมีกลิ่นบูด ตรงกันข้าม ในสภาวะที่ไม่มีอากาศยีสต์จะแบ่งเซลล์ได้น้อยกว่าแต่จะให้แอลกอฮอล์ได้ดีกว่า

2.2.2ไนโตรเจน

การเจริญของยีสต์ต้องการสารอาหารจำพวกโปรตีนมากเพื่อใช้สร้างเซลล์ใหม่โปรตีนจะได้จากกการสังเคราะห์ภายในเซลล์ของยีสต์โดยใช้ธาตุไนโตรเจนเป็นหลัก โดยปกติปริมาณของไนโตรเจนในน้ำองุ่นจะมีมากเพียงพอ เช่นเดียวกับผลไม้ชนิดอื่นๆ ในบ้านเราเนื่องจากได้รับแร่ธาตุในดิน อย่างไรก็ตามผลไม้บางชนิดเช่น มะขาม มะยม รวมถึงองุ่นบางสายพันธุ์ บางพื้นที่ปลูกก็อาจมีไนโตรเจนไม่เพียงพอเมื่อหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำผลไม้เหล่านี้ได้สักระยะหนึ่งกระบวนการหมักก็จะหยุดลงทำให้ได้แอลกอฮอล์ต่ำกว่าที่ควร วิธีแก้ไขทำได้ง่ายโดยการเติมสารที่ให้ไนโตรเจน ที่นิยมใช้คือ DAP (Diammonium hydrogen phosphate)ในปริมาณที่แตกต่างกันตามคุณภาพของน้ำองุ่นตั้งแต่ ร้อยละ 0.01 ถึงร้อยละ0.1

2.2.3 สารอาหารเสริม (micronutrients)

เช่นเดียวกับไนโตรเจน ยีสต์ต้องการสารอาหารเสริมเพื่อใช้เป็นสารช่วยเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆ ในเซลล์ สารอาหารเสริมเหล่านี้ ได้แก่ วิตามิน และแร่ธาตุ ปริมาณที่เซลล์ยีสต์ต้องต้องการนั้นน้อยมาก ซึ่งส่วนมากมักมีอยู่แล้วในน้ำองุ่นและน้ำผลไม้ต่างๆอย่างไรก็ตามบางพื้นที่ปลูกสภาพพื้นดินขาดสารอาหารเหล่านี้ซึ่งสามารถแสดงออกได้จากอาการของโรคต่างๆในต้น ผลผลิตเหล่านี้เมื่อนำมาทำเป็นไวน์จึงจำเป็นต้องเพิ่มด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเตรียมหัวเชื้อยีสต์ก่อนการหมักจริง มีผู้ผลิตสารอาหารเสริมเหล่านี้เป็นจำนวนมาก นักทำไวน์อาจหาซื้อมาทดลองใช้ก็ได้

2.3 กระบวนการไลโอฟิไลเซชั่น

ไลโอฟิไลเซชั่น คือ กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยการดึงน้ำออกจากผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในสภาพเยือกแข็ง ภายใต้สภาวะที่เป็นสูญญากาศ เพื่อใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์
ไลโอฟิไลเซชั่น อาจเรียกได้ว่ากระบวนการ freeze drying ในทางชีววิทยา ซึ่งเป็นจำพวกวัตถุดิบที่มีความบอบบาง สูญเสียกิจกรรมและปฏิกิริยาเคมีได้เมื่อโดนความร้อน
การทำแห้งแบบไลโอฟิไลเซชั่น มีกระบวนการ 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.3.1 การแช่แข็งหรือเยือกแข็ง(Freezing) เป็นการทำให้ตัวอย่างเยือกแข็งแต่จะมีน้ำที่ยึดติดกับแข็งไม่แข็งตัว การแช่แข็งจะเกิดผลต่อตัวอย่าง 3 ประการคือ

ตัวอย่างถูกขจัดน้ำออกบางส่วน (partial dehydration)
ความแข็งตึงของโครงร่างของตัวอย่าง (stiffening of structure)
สัณฐานวิทยาของตัวอย่าง (sample morphology)

2.3.2 การระเหิด (sublimation) คือ การกลายเป็นไอของน้ำแข็งโดยไม่ผ่านสภาวะของเหลว การระเหิดไม่เกี่ยวข้องกับน้ำที่ไม่แข็งตัวที่ยึดติดกับของแข็ง ผลึกน้ำแข็งต้องการพลังงาน คือ ความร้อนในการเปลี่ยนเป็นไอ ไอน้ำจะถูกนำออกไปโดยการขนส่งมวล ซึ่งมีปั๊มดูดอากาศช่วยนำออก

2.3.3การคาย (desorption) เป็นขั้นตอนทำให้น้ำที่ยึดติดอยู่กับของแข็งถูกเปลี่ยนเป็นไอ

2.4 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilizer)

เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง มีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ ปั๊มดูดอากาศต่อเชื่อมไปยังระบบความเย็นของเครื่องควบแน่นซึ่งทำหน้าที่ช่วยจับไอน้ำด้านหน้าของเครื่องมีปุ่มควบคุมและมิเตอร์บอกความกดดันและอุณหภูมิ การทำแห้งแบบไลโอฟิไลเซชั่น จะใช้กับผลิตภัณฑ์ดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 Non-biological products เช่นผลิตภัณฑ์ยาฉีดชนิดผงสำหรับละลายน้ำ การเตรียมผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรในรูปผงแห้ง โดยจะคงสภาพสารสำคัญไว้ในสมุนไพรได้ เช่น น้ำมันหอมระเหย , เม็ดสี, ไฟรโตนิวเทรียน(phytonutrients), โพลีแซคคาไรด์, และเอนไซม์

2.4.2 Non-living bio products โดยแบ่งเป็น

เอนไซม์,ฮอร์โมน,ยาปฏิชีวนะ,วิตามิน,เลือด,กระดูก,เนื้อเยื่อของร่างกาย, แอนติบอดี, ซึ่งใช้ในการวินิจฉัย และการรักษา

ยาใหม่ที่ได้จากเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งมักเป็นสารประกอบประเภทเปปไทด์หรือโปรตีน

อาหาร เช่น ผัก ผลไม้ นม กาแฟโดยยังคงสภาพเดิมทั้งรูปร่าง สี ขนาด พื้นผิว รส กลิ่นอาหาร

2.4.3 Living organisms เช่น ยีสต์ ราและแบคทีเรีย รวมทั้งวัคซีน โดยหลังจากการทำให้แห้งแล้ว สิ่งมีชีวิตจะสามารถเจริญและสืบพันธุ์ได้

โดยในการเก็บรักษายีสต์ด้วยวิธีไลโอฟิไลเซชั่นจะต้องมีการเติมสาร ไครโอโปรเทคแทน ก่อนการทำการแช่แข็ง เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายในขณะทำการแช่แข็งก่อนนำมาทำการไลโอฟิไลซ์

2.5 สารไครโอโปรเทคแทน (cryoprotectant)

เป็นสารประกอบใดๆ ที่สามารถช่วยป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนในระหว่างการเก็บรักษาแบบเยือกแข็ง ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มอายุการเก็บรักษาและการทำให้กิจกรรมของสิ่งมีชีวิตดำเนินไปได้อย่างตามปกติ สาร ไครโอโปรเทคแทน จำแนกออกเป็น 2 ประเภท คือ

2.5.1 ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ กล่าวคือ สารเคมีเหล่านี้จำต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดขึ้นในขณะแช่แข็งเซลล์ ตัวอย่างสารกลุ่มนี้ ได้แก่ กลีเซอรอล(glycerol), ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide)และแอลกอฮอล์อีกหลายตัว เช่น เมธานอล(methanol) , ethanol , โพรเพนไดออล (propanediol)เป็นต้น สารเคมีกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายได้ดี เมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์แอลกอฮอล์มีอัตราการแพร่สูงที่สุด รองมาได้แก่ไดเมธิลซัลฟอกไซด์และ กลีเซอรอล ตามลำดับ สารเคมีในกลุ่มนี้มีข้อเสียอยู่ประการหนึ่ง คือ เป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ

2.5.2 ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่ภายนอกเซลล์และใช้ได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าพวกแรก และมีความเป็นพิษน้อยกว่า ตัวอย่างสารกลุ่มนี้ ได้แก่ โพลีไวนิลไพโรลิดอน(polyvinylpyrolidon , PVP) และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น ซูโครส ,กลูโคส, แมนนิทอล(manitol) เป็นต้น

ซูโครสเป็นน้ำตาลตัวหนึ่งที่นิยมใช้ เพราะหาง่าย และราคาไม่แพง ส่วนกลูโคส เป็นน้ำตาลโมเลกุลขนาดเล็ก บางส่วนจึงจัดน้ำตาลกลูโคสเป็น ไครโอโปรเทคแทน ประเภทที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ด้วย

อย่างไรก็ตามเป็นที่เข้าใจกันดีว่าสารไครโอโปรเทคแทนเหล่านี้จะมีผลกระทบต่อคุณสมบัติของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์โดยเมื่อเติมสารเหล่านี้เป็นเหตุให้จุดเยือกแข็งลดลง คุณสมบัติข้อนี้มีความสำคัญมากในการออกฤทธิ์ของสารเคมีเหล่านี้ ปกติที่แรงดัน 1 บรรยากาศ น้ำจะแข็งตัวที่ 0 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส ซึ่งตามธรรมชาติของของเหลวภายในเซลล์ จะมีจุดเยือกแข็งต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส และถ้ามีการเติมสารไครโอโปรเทคแทน เข้าไปด้วยแล้ว จะยิ่งทำให้จุดเยือกแข็งต่ำลงอีก ของเหลวภายในเซลล์จึงเย็นจัด (supercool)ก่อนที่จะเกิดผลึกน้ำแข็งและสารไครโอโปรเทคแทน จะช่วยเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถในการแพร่เข้าสู่เซลล์ได้มากน้อยหรือไม่ได้เลยด้วยการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเหลวสองประการนี้ จะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาแบบเยือกแข็งได้ เนื่องจาก ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ เป็นผลเนื่องมาจาก การเติมสารไครโอโปรเทคแทน ทำให้ของเหลวภายในเซลล์แข็งตัวช้า หรือแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่าที่ไม่เติมสารไครโอโปรเทคแทน ด้วยเหตุนี้เซลล์จะสูญเสียน้ำออกสู่นอกเซลล์ ถ้าสูญเสียน้ำไปมาก น้ำก็ย่อมเหลืออยู่ในเซลล์น้อย การเกิดผลึกน้ำแข็งก็ย่อมเกิดน้อยตามไปด้วย ซึ่งการสูญเสียน้ำมากหรือน้ำน้อยขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิ สารไครโอโปรเทคแทน ช่วยป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ 2 วิธี คือ ทำให้ของเหลวแข็งตัวช้าและทำให้น้ำในเซลล์มีน้อยลง ป้องกันการลดขนาดของเซลล์ การแพร่ของสารไครโอโปรเทคแทน เข้าสู่เซลล์สารนี้ไปแทนที่น้ำที่แพร่ออกจากเซลล์เพราะความแตกต่างของแรงดันออสโมติกที่เปลี่ยนไป เนื่องจากเกิดผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ก่อนที่ของเหลวภายในเซลล์จะแข็งตัวและช่วยคงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์

2.6 การไลโอฟิไลซ์ยีสต์

การไลโอฟิไลซ์ยีสต์ ทำได้โดยการนำยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลปริมาณมากเกินพอ แล้วจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยง(centrifuge) ตะกอนยีสต์ที่ได้จะถูกทำให้แขวนลอยอีกครั้งกับสารไครโอโปรเทคแทนที่เหมาะสม เช่น สกิมมิลค์ที่ผสมกับโซเดียมกลูตาเมท (sodium glutamate) หรือ สกิมมิลค์ผสมกับทรีฮาโลส (trehalose) หรือ สารละลายเปปโทนร้อยละ 4 แล้วทำให้แข็งอย่างรวดเร็วที่ – 40° ซ ที่อัตรา 3° ซ ต่อนาที น้ำแข็งจะถูกทำให้ระเหิดและถูกแยกออกไป โดยการให้ความร้อนกับเซลล์ที่ถูกทำให้แข็งอย่างช้าๆภายใต้สุญญากาศ

การมีชีวิตรอดขึ้นอยู่กับการเตรียมเซลล์ยีสต์และการใช้สารไครโอโปรเทคแทนที่เหมาะสม โดยการมีชีวิตรอดของเซลล์ยีสต์จะลดลงตามระยะเวลาในการเก็บ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเก็บที่อุณหภูมิห้อง อย่างไรก็ตามมันสามารถเก็บไว้ได้ประมาณ 3-5 ปี แต่มียีสต์บางสายพันธุ์เท่านั้นที่จะนำมาทำไลโอฟิไลซ์ได้ บางสายพันธุ์มีอัตราการรอดถึงร้อยละ 60 แต่บางสายพันธุ์มีปริมาณเซลล์ตายถึงร้อยละ95ในระหว่างการทำ 24 ชั่วโมงแรก หลังจากการทำไลโอฟิไลซ์ยีสต์แล้ว คือการทำรีไฮเดรต ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ทันทีหรือนำไปเตรียมเป็นกล้าเชื้อในน้ำผลไม้ต่อไป

ได้กล่าวว่าการรีไฮเดรตที่ 0° ซ จะทำให้เอนไซม์ ไกลโคไลติก(glycolytic enzyme)บางชนิดเสียสภาพไปและมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากของการซึมผ่านโมเลกุลขนาดเล็กของเซลล์เมมเบรน

การไลโอฟิไลซ์เป็นวิธีการเก็บรักษาเชื้อที่บริสุทธิ์อีกวิธีหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิจัยในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะช่วยป้องกันการกลายพันธุ์และการปนเปื้อนเชื้อที่ไม่ต้องการ แรงกดดันจากการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช็อคด้วยความร้อน(thermal shock) สามารถทำเกิดการยับยั้งหรือเกิดการกระตุ้นยีนบางตัว รวมทั้งทำให้เกิดการสูญเสียพลาสมิด(plasmid) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดี เทคนิคนี้ค่อนข้างที่จะแพงที่จะนำมาใช้ในการเตรียมเซลล์ยีสต์ให้มีปริมาณมากเพื่อจำหน่ายในอุตสาหกรรมผลิตไวน์

ได้เสนอว่าการเติมสคิมมิลค์ร้อยละ 10 เป็นสารไครโอโปรเทคแทน โดยทำการเยือกแข็งลงมาที่ -25° ซ และทำการเยือกแข็งภายใต้ความดันต่อไปจนถึง -55° ซ ด้วย ก๊าซไนโตรเจนหรือ ก๊าซอาร์กอนอิ่มตัว ยีสต์ที่ได้สามารถเก็บรักษาไว้ที่ 4° ซ โดยไม่ทำให้คุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป การใช้ 0.010M ซัคซิเนตบัฟเฟอร์ (succinate buffer) พีเอช 4.6 เป็นสารช่วยคงตัว (stabilizer) พบว่าเหมาะสมที่สุดสำหรับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัตถุดิบและสารเคมี

1. ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. *montrachet*
2. อาหาร YM broth
3. สับปะรดพันธุ์ศรีราชา
4. น้ำตาลทรายขาว
5. สคิมมิลค์
6. ซูโครส
7. ซอร์บิทอล
8. น้ำแข็งแห้ง
9. สารละลาย0.003Mฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2
10. กรดซัลฟูริกเข้มข้น

อุปกรณ์

1. ขวดหมักขนาด 200 มิลลิลิตร
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Auto clave)
3. เครื่องคั้นน้ำผลไม้
4. สำลี
5. ปิเปต
6. หม้อ
7. ขวดแก้วรูปชมพู่ (Flask)
8. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
9. หลอดทดลอง
10. บีกเกอร์
11. จานเพาะเชื้อ
12. rack
13. ตัวกรองเชื้อ
14. กระบอกเข็มฉีดยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. ขวดปรับปริมาตร (Volumetic flask)
16. หลอดไลโอฟิไลซ์
17. ขวดไลโอฟิไลซ์
18. แท่งแก้วสามเหลี่ยม
19. ขวดแอลกอฮอล์ 95%
20. สไลด์
21. ปิเปตอัตโนมัติและทริป
22. ฮีมาไซโตมิเตอร์
23. จุกดักก๊าซ
24. ตู้บ่มเชื้อ
25. เครื่องวัดpH(pH meter)
26. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
27. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
28. ตู้เขี่ยเชื้อ
29. เครื่องชั่งน้ำหนัก
30. กล้องจุลทรรศน์
31. กล้องดิจิตอล

วิธีการทดลอง

3.1 การศึกษาการเจริญของยีสต์

3.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

Saccharomyces cerevisiae var. *montrachet* จาก stock culture ถ่ายเชื้อลงในYM agar slant บ่มไว้ 2 วัน ถ่ายเชื้อลงในอาหารYM brothปริมาตร150 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรเขย่าในอัตรา 200รอบ / นาที นาน 24 ชั่วโมง

Saccharomyces cerevisiae var. *montrachet* จาก stock culture

↓

ถ่ายเชื้อลงในYM agar slant บ่มไว้ 2 วัน

↓

ถ่ายเชื้อลงในอาหารYM brothปริมาตร150 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าในอัตรา200รอบ / นาที นาน 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 การเลี้ยงเชื้อยีสต์

ถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ในอัตราร้อยละ 5 ลงในอาหารYM broth ปริมาตร 300 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ / นาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 12 ,36, 39, 42 ,45, 60 ,72 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

ถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ในอัตราร้อยละ5ลงในอาหารYM broth ปริมาตร300มิลลิลิตร
ในขวดรูปชมพู่ขนาด500มิลลิลิตร
↓
เขย่าด้วยความเร็ว200รอบ/นาที
↓
เก็บตัวอย่างที่เวลา 12 ,36, 39, 42 ,45, 60 ,72 ชั่วโมง
นับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

3.2 การศึกษาระยะเวลาของการเลี้ยงยีสต์ที่เหมาะสมต่อการทำยีสต์แห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์โดยใช้สกิมมิลค์เป็นสารไครโอโปรเทคแทน

ถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ในอัตราร้อยละ 5 ลงในอาหารYM broth ปริมาตร 300 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ / นาทีเก็บตัวอย่างที่เวลา 12, 36, 39, 42 ,45, 60, 72 ชั่วโมง นำมาหมุนเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็ว 5000 รอบ / นาที เป็นเวลา 15 นาทีล้างตะกอนเซลล์ยีสต์ด้วย 0.003Mฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ผสม 0.003Mฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2ปริมาตร10 มิลลิลิตรกับตะกอนเซลล์ยีสต์ นำสารละลายยีสต์ผสมกับ สกิมมิลค์ ร้อยละ20 ในอัตราส่วน 1 : 1 นับปริมาณยีสต์ที่มีชีวิตด้วยวิธี spread plate ก่อนทำไลโอฟิไลซ์ และนำส่วนที่เหลือปิเปตใส่ลงหลอดไลโอฟิไลซ์หลอดละ 0.15 มิลลิลิตร นำไปทำไลโอฟิไลซ์ด้วยเครื่อง ไลโอฟิไลซ์ นับปริมาณยีสต์ที่มีชีวิตด้วยวิธี spread plate หลังทำไลโอฟิไลซ์

ถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ในอัตราร้อยละ5ลงในอาหารYM broth ปริมาตร300มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร
↓
เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ / นาที
↓
เก็บตัวอย่างที่เวลา 12, 36, 39, 42 ,45, 60, 72 ชั่วโมง
↓
นำมาหมุนเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็ว 5000 รอบ / นาที เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ล้างตะกอนเซลล์ยีสต์ด้วย 0.003Mฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2
ผสม 0.003Mฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2ปริมาตร10 มิลลิลิตรกับตะกอนเซลล์ยีสต์
↓
นำสารละลายยีสต์ผสมกับ สคิมมิลค์ ร้อยละ20 ในอัตราส่วน 1 : 1
↓
นับปริมาณเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต ก่อนทำไลโอฟิไลซ์
ปิเปตใส่ลงหลอดไลโอฟิไลซ์ หลอดละ 0.15มิลลิลิตร
↓
นำไปทำไลโอฟิไลซ์ด้วยเครื่อง ไลโอฟิไลซ์
↓
นับปริมาณเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตหลังทำไลโอฟิไลซ์

3.3 การศึกษาชนิดของสารไครโอโปรเทคแทนที่เหมาะสมต่อการทำไลโอฟิไลซ์

ถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ในอัตราร้อยละ 5 ลงในอาหารYM broth ปริมาตร300มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 500มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว200รอบ/นาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 60 ชั่วโมง นำมาหมุนเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็ว5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนเซลล์ยีสต์ด้วย 0.003Mฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ผสม 0.003Mฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ปริมาตร40มิลลิลิตรกับตะกอนเซลล์ยีสต์ นำสารละลายยีสต์ผสมกับสารไครโอโปรเทคแทน 3 ชนิด คือ สคิมมิลค์ ซูโครสและซอร์บิทอล ในอัตราส่วน 1 : 1โดยใช้ สคิมมิลค์ ร้อยละ20 ซูโครสร้อยละ 24 และซอร์บิทอล ร้อยละ24 นับปริมาณยีสต์ที่มีชีวิตด้วยวิธี spread plate ก่อนทำไลโอฟิไลซ์ และนำส่วนที่เหลือใส่ลงขวดไลโอฟิไลซ์ขวดละ 80 มิลลิลิตร นำไปทำไลโอฟิไลซ์ด้วยเครื่อง ไลโอฟิไลซ์ นับปริมาณยีสต์ที่มีชีวิตด้วยวิธี spread plateหลัง ทำไลโอฟิไลซ์

ถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ในอัตราร้อยละ 5ลงในอาหารYM broth ปริมาตร 300 มิลลิลิตร
ในขวดรูปชมพู่ขนาด500มิลลิลิตร
↓
เขย่าด้วยความเร็ว200รอบ / นาที
↓
เก็บตัวอย่างที่เวลา 60 ชั่วโมง
↓
นำมาหมุนเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็ว5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที
↓
ล้างตะกอนเซลล์ยีสต์ด้วย0.003Mฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสม 0.003Mฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ปริมาตร40มิลลิลิตรกับตะกอนเซลล์ยีสต์

นำสารละลายยีสต์ผสมกับ สคิมมิลค์ ร้อยละ20 ซูโครส ร้อยละ 24 ซอร์บิทอล ร้อยละ 24

นับปริมาณยีสต์ที่มีชีวิต ด้วยวิธี spread plateก่อนทำไลโอฟิไลซ์

ใส่ลงขวดไลโอฟิไลซ์ ขวดละ 80 มิลลิลิตร

นำไปทำไลโอฟิไลซ์ด้วยเครื่อง ไลโอฟิไลซ์

นับปริมาณยีสต์ที่มีชีวิตด้วยวิธี spread plateหลัง ทำไลโอฟิไลซ์

3.4 การทดสอบแอคทิวิตีการหมักของยีสต์แห้ง ดัดแปลงจาก G.Reed. and S. L. Chen., 1978

3.4.1 การรีไฮเดรต ยีสต์

ชั่งยีสต์แห้ง 1.5 กรัม ลงในน้ำปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 43องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 15 นาทีนำมาปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร เขย่าที่140รอบ / นาที นาน 15 นาที

ชั่งยีสต์แห้ง 1.5 กรัม ลงในน้ำปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส

ทิ้งไว้ 15 นาที

นำมาปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร

เขย่าที่140รอบ / นาที นาน 15 นาที

3.4.2 การทดสอบการหมัก

นำสารละลายเชื้อจากข้อ 3.4.1ปริมาตร 5 มิลลิลิตรถ่ายลงในน้ำสับปะรดสำหรับทำไวน์เข้มข้น 16 องศาบริกซ์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรในขวดหมักขนาด 200 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกที่บรรจุกรดซัลฟูริกเข้มข้นเพื่อดักไอน้ำและก๊าซอื่นๆยกเว้นCO_2 เขย่าด้วยเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็ว140 รอบ / นาที นำขวดหมักออกมาชั่งทุกๆ 30 นาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำสารละลายเชื้อจากข้อ 3.4.1ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

↓

ถ่ายลงในน้ำสับปะรดสำหรับทำไวน์เข้มข้น 16 องศาบริกซ์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
ในขวดหมักขนาด 200 มิลลิลิตร

↓

ปิดด้วยจุกที่บรรจุกรดซัลฟูริกเข้มข้นเพื่อดักไอน้ำและก๊าซอื่นๆยกเว้นCO_2

↓

เขย่าด้วยเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็ว140 รอบ / นาที

↓

นำขวดหมักออกมาชั่งทุกๆ 30 นาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

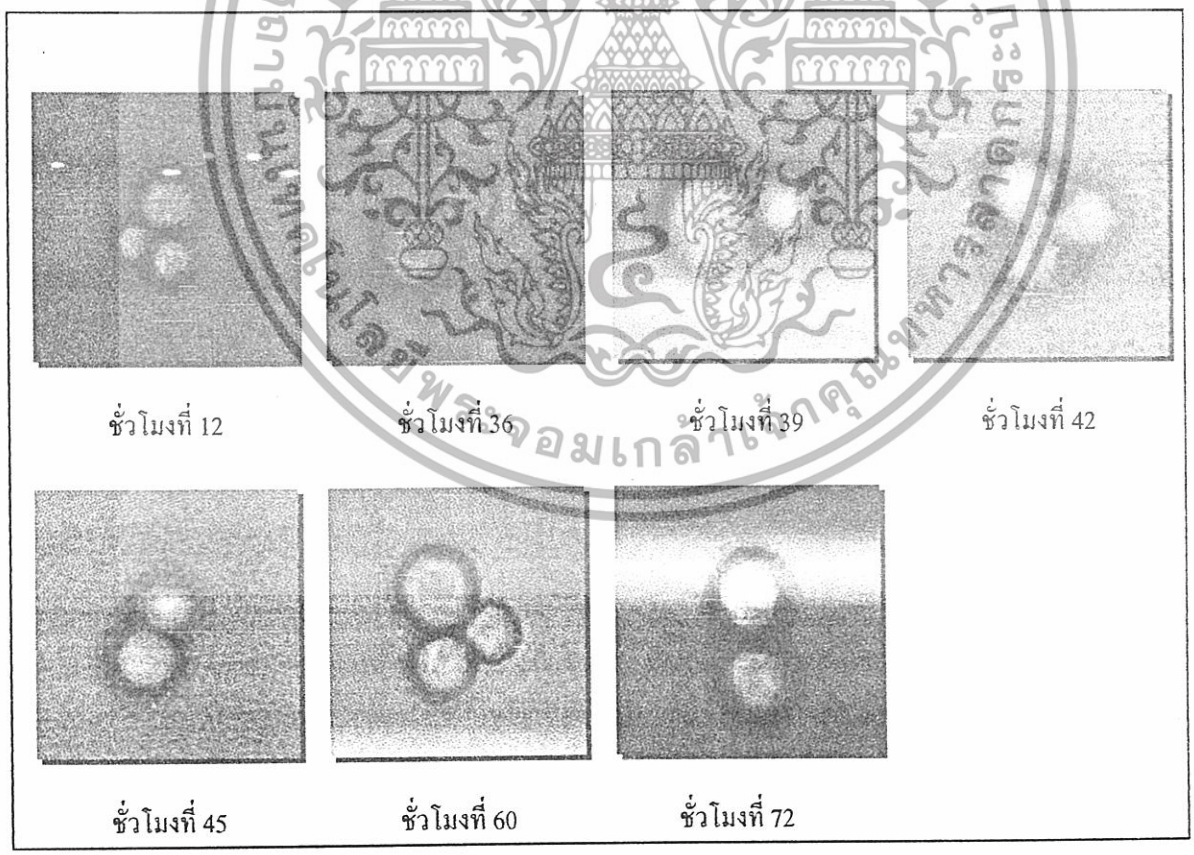
ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาการเจริญของยีสต์

ลักษณะการเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. *montrachet* ในอาหารYM broth ดังแสดงในภาพที่ 1

เนื่องจากยีสต์มีการใช้สารอาหารและจำนวนเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้น จึงทำให้อาหารYM broth เปลี่ยนจากสีเหลืองใสเป็นสีเหลืองขุ่นเมื่อเวลาผ่านไป

ภาพที่ 1 แสดงการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหารYM broth



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96833

เมื่อเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ มาส่องดูลักษณะของเซลล์ยีสต์และนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ พบว่า เซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 12 ลักษณะตัวเซลล์ยีสต์มีการแตกหน่ออยู่มากและเกาะกลุ่มกัน ขนาดตัวเซลล์ยีสต์ยังไม่มีความสม่ำเสมอและการแตกหน่อค่อยๆลดลง เมื่อถึงชั่วโมงที่ 36 เซลล์ยีสต์มีลักษณะที่ใหญ่ขึ้นและจำนวนเซลล์เดี่ยวเริ่มมากขึ้นแต่ก็ยังมีการแตกหน่อของเซลล์จนถึงชั่วโมงที่ 72 ลักษณะเซลล์กลมและเป็นเซลล์เดี่ยว ดังแสดงภาพที่ 2

ผลการศึกษาการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. *montrachet* ในอาหาร YM broth แล้วทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ที่ช่วงเวลาต่างๆ (ดังภาพที่ 3)

ภาพที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเซลล์ยีสต์ในช่วงเวลา 72 ชั่วโมง

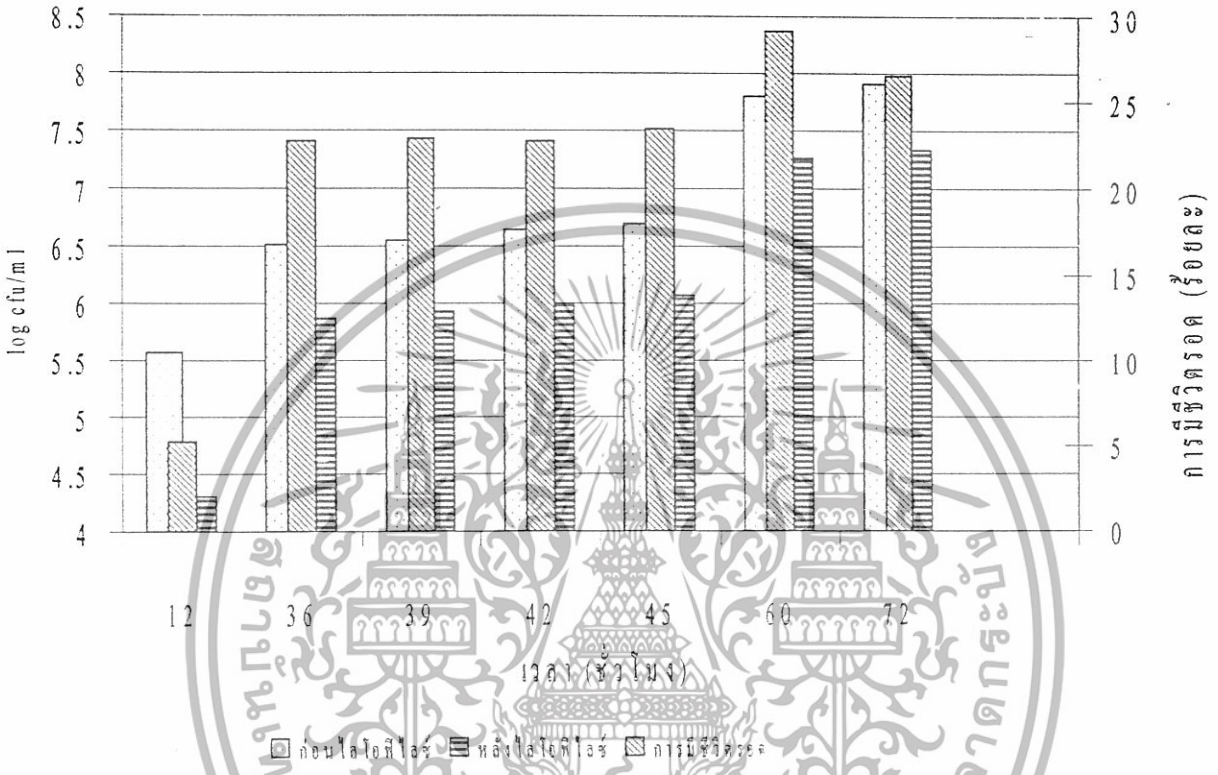
จากกราฟ ที่ชั่วโมงที่ 12 มีจำนวนเซลล์ 8.3 x10^7 โคโลนี / มิลลิลิตรและมีจำนวนเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนถึงชั่วโมงที่ 36 มีจำนวนเซลล์ 3.0 x10^9 โคโลนี / มิลลิลิตร หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ยีสต์ค่อนข้างคงที่คืออยู่ในช่วง 3.1 x10^9 ถึง 6.7 x10^9 โคโลนี / มิลลิลิตร โดยที่ชั่วโมงที่ 60 มีจำนวนเซลล์ 6.7 x10^7 โคโลนี /มิลลิลิตร

แสดงว่าที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง เซลล์ยีสต์อยู่ในระยะการเจริญและตั้งแต่ 36 ชั่วโมงเป็นต้นไป เซลล์ยีสต์เข้าสู่ระยะคงที่ ซึ่งเห็นได้ดังกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาระยะเวลาของการเลี้ยงยีสต์ที่เหมาะสมต่อการทำยีสต์แห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์โดยใช้ สคิมมิลค์ เป็นสารไครโอโปรเทคแทน

จากการเลี้ยงเซลล์ยีสต์แล้วทำการนำเซลล์ยีสต์ชั่วโมงที่ 12, 36, 39, 42, 45, 60, 72 มาทำการแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ มีผลดังนี้



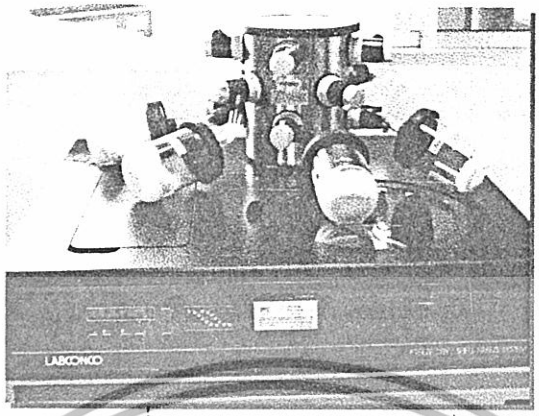
ภาพที่ 4 แสดงระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทำไลโอฟิไลซ์โดยใช้ สคิมมิลค์ เป็นสารไครโอโปรเทคแทน

จากกราฟ ชั่วโมงที่ 12 ก่อนไลโอฟิไลซ์ มีปริมาณยีสต์ 3.8 x10^5 โคโลนี / มิลลิลิตร หลังไลโอฟิไลซ์ มีปริมาณยีสต์ที่มีชีวิตรอด 2.0 x10^4 โคโลนี / มิลลิลิตร การมีชีวิตรอด ร้อยละ 5.2 ซึ่งต่ำมากเมื่อเทียบกับอายุของเซลล์ที่ชั่วโมงที่ 60 โดยก่อนไลโอฟิไลซ์ มีปริมาณยีสต์ 6.5 x10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร หลังไลโอฟิไลซ์ มีปริมาณยีสต์ที่มีชีวิตรอด 1.9 x10^7 โคโลนี / มิลลิลิตร การมีชีวิตรอด ร้อยละ 29.2 ซึ่งจะเห็นว่าที่ชั่วโมงที่ 60 นี้มีการมีชีวิตรอดมากที่สุด

ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอายุของเซลล์มีผลต่อการทำไลโอฟิไลซ์ ดังนั้นจึงเลือกอายุเซลล์ที่ระยะเวลา60 ชั่วโมงมาทำไลโอฟิไลซ์เพื่อเลือกสารไครโอโปรเทคแทนที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาชนิดของสารไครโอโปรเทคแทนที่เหมาะสมต่อการทำไลโอฟิไลซ์



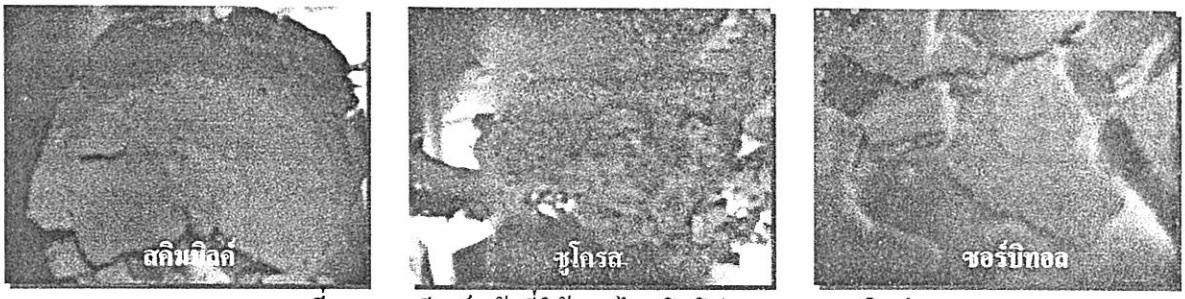
ภาพที่ 5 แสดงการทำไลโอฟิไลซ์

ภาพที่ 6 แสดงการใช้ชนิดต่างๆเป็นสารไคร โอโปรเทคแทนในการทำไลโอฟิไลซ์

ลักษณะการทำไลโอฟิไลซ์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. *montrachet* โดยใช้สคิมมิลค์ ซูโครส และซอร์บิทอล เป็นสารไคร โอโปรเทคแทน โดยลักษณะของยีสต์ที่ใช้สคิมมิลค์เป็นสารไคร โอโปรเทคแทน มีลักษณะเป็นแผ่นสีขาว และเมื่อนำมาบดจะได้เป็นผงละเอียด ยีสต์ที่ใช้ซูโครสเป็นสารไคร โอโปรเทคแทน มีลักษณะเป็นแผ่นผลึกสีน้ำตาล มีขนาดฟองอากาศที่ไม่สม่ำเสมอบนผิวหน้าจำนวนมาก มีความเหนียวที่เกิดจากซูโครส และยีสต์ที่ใช้ซอร์บิทอลเป็นสารไคร โอโปรเทคแทน มีลักษณะเป็นแผ่นสีน้ำตาล ลักษณะคล้ายยีสต์ที่ใช้ซูโครสเป็นสารไคร โอโปรเทคแทน แต่มีความสม่ำเสมอของฟองอากาศบนผิวหน้ามากกว่า ดังแสดงในภาพที่ 7

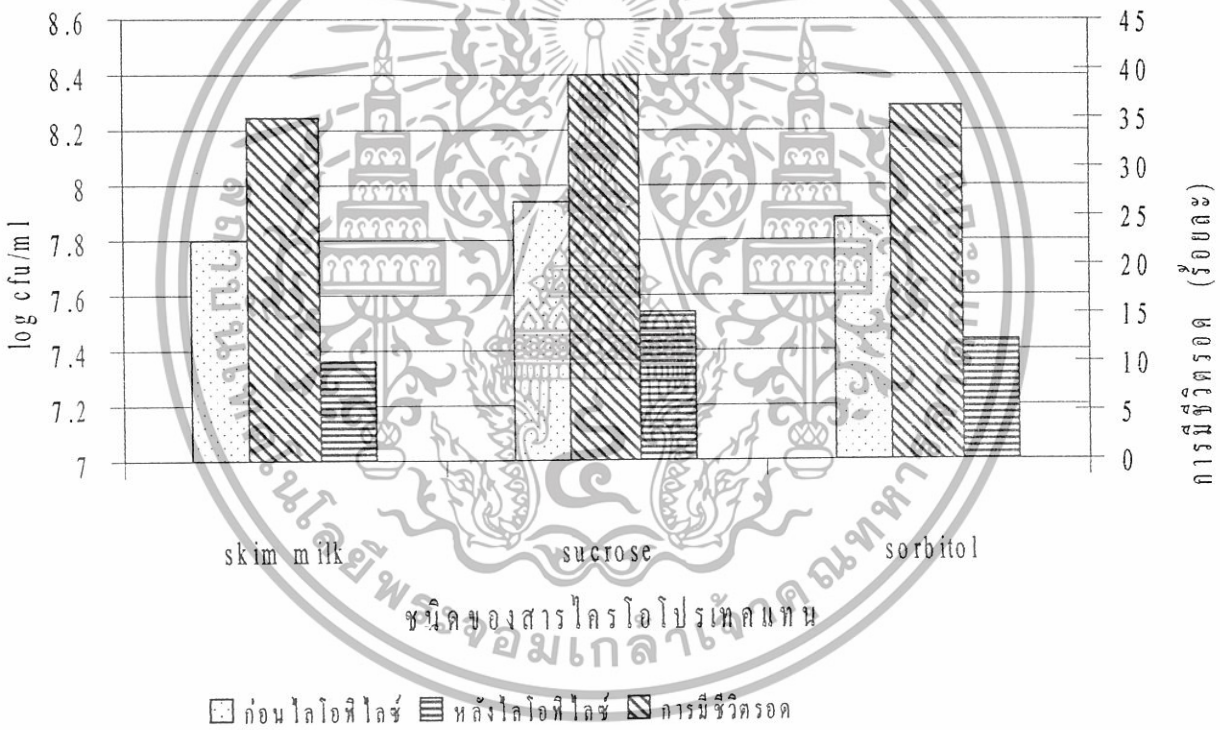
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21101



ภาพที่ 7 แสดงยีสต์แห้งที่ใช้สารไครโอโปรเทคแทนชนิดต่างๆ

ที่ระยะการเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. *montrachet* ที่ชั่วโมง 60 แล้วนำมาผสมกับสารไครโอโปรเทคแทน 3 ชนิด คือ สคิมมิลค์ ซูโครส ซอร์บิทอล แล้วนำไปทำไลโอฟิไลซ์เพื่อหาชนิดสารไครโอโปรเทคแทน ที่เหมาะสมต่างๆ



ภาพที่ 8 แสดงชนิดของสารไครโอโปรเทคแทนที่เหมาะสมต่อการไลโอฟิไลซ์

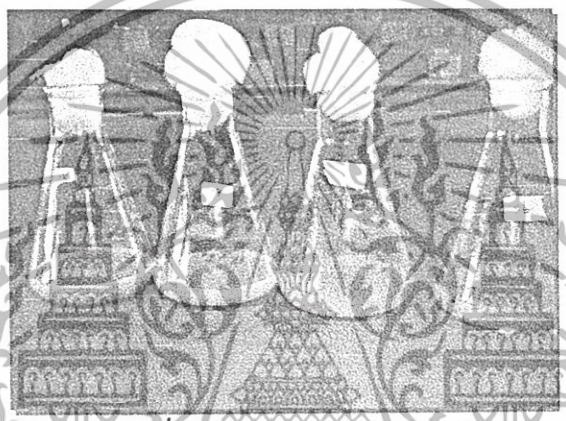
จากกราฟ ซูโครสเป็นสารไครโอโปรเทคแทน ก่อนไลโอฟิไลซ์มีปริมาณยีสต์ 8.9 x10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร หลังไลโอฟิไลซ์ มีปริมาณยีสต์ 3.5 x10^7โคโลนี/มิลลิลิตร การมีชีวิตรอด ร้อยละ 39.3 ส่วนสคิมมิลค์เป็นสารไครโอโปรเทคแทน ก่อนไลโอฟิไลซ์มีปริมาณยีสต์ 6.4 x10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร หลังไลโอฟิไลซ์ มีปริมาณยีสต์ 2.3 x10^7โคโลนี/มิลลิลิตร มีการมีชีวิตรอดร้อยละ35.0 และซอร์บิทอลเป็นสารไครโอโปรเทคแทน ก่อนไลโอฟิไลซ์มีปริมาณยีสต์ 7.7 x10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร หลังไลโอฟิไลซ์ มีปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

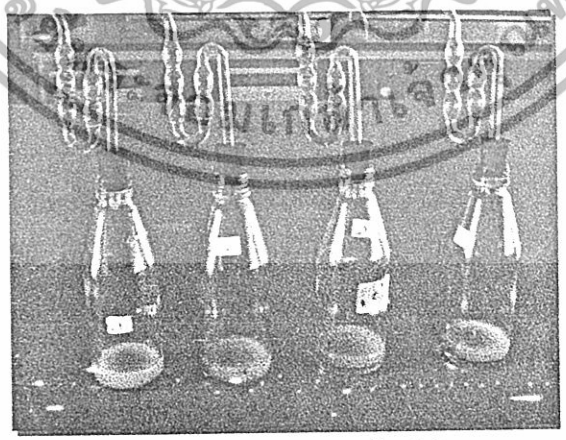
ยีสต์ 2.8 x10^7โคโลนี/มิลลิลิตร การมีชีวิตรอด ร้อยละ 36.3 แสดงว่าซูโครสเป็นสารไครโอโปรเทคแทนที่ทำให้อัตราการมีชีวิตรอดสูงที่สุด

4.4 การทดสอบแอคทิวิตีการหมักของยีสต์แห้ง

เมื่อนำยีสต์แห้งที่ได้จากการทำไลโอฟิไลซ์โดยใช้ สคิมมิลค์ ซูโครส และซอร์บิทอลเป็นสารไครโอโปรเทคแทน จากการทดลองที่ 4.3 มารีไฮเดรตและวัดแอคทิวิตี มีลักษณะดังภาพที่ 9 และ 10



ภาพที่ 9 แสดงการรีไฮเดรตยีสต์



ภาพที่ 10 แสดงการวัดค่าแอคทิวิตีการหมักด้วยวิธี gasometric method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบแอคทิวิตีการหมักของยีสต์แห้งโดยการนำยีสต์แห้งที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์มาทำการทดสอบด้วยวิธี gasometric method แล้วนำมาเปรียบเทียบกับค่าแอคทิวิตีการหมักของยีสต์แห้งทางการค้า

ตารางที่ 1 แสดงค่าแอคทิวิตีการหมักของยีสต์แห้งชนิดต่างๆ

ชนิดของยีสต์แห้ง	**แอคทิวิตีการหมัก** (มิลลิโมลของคาร์บอนไดออกไซด์/กรัมยีสต์/ชั่วโมง)
*Saccharomyces cerevisiae*ที่ใช้สคิมมิลค์เป็นสารไครโอโปรเทคแทน	0.15
*Saccharomyces cerevisiae*ที่ใช้ซูโครสเป็นสารไครโอโปรเทคแทน	0.22
*Saccharomyces cerevisiae*ที่ใช้ซอร์บิทอลเป็นสารไครโอโปรเทคแทน	0.37
ยีสต์แห้งทางการค้า *S. cerevisiae* V 1116	0.22

จากตารางแสดงแอคทิวิตีการหมักของยีสต์แห้งที่ได้และยีสต์แห้งทางการค้า พบว่ายีสต์ที่ใช้ซอร์บิทอลเป็นสารไครโอโปรเทคแทนมีแอคทิวิตีการหมัก 0.37 มิลลิโมลของคาร์บอนไดออกไซด์/กรัมยีสต์/ชั่วโมง ยีสต์ที่ใช้สคิมมิลค์และซูโครสเป็นสารไครโอโปรเทคแทนมีแอคทิวิตีการหมัก 0.15 และ 0.22 มิลลิโมลของคาร์บอนไดออกไซด์/กรัมยีสต์/ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนยีสต์แห้งทางการค้ามีแอคทิวิตีการหมัก 0.22 มิลลิโมลของคาร์บอนไดออกไซด์/กรัมยีสต์/ชั่วโมงซึ่งเท่ากับสคิมมิลค์ โดยยีสต์ที่ใช้ซอร์บิทอลเป็นสารไครโอโปรเทคแทนมีแอคทิวิตีการหมักดีกว่ายีสต์แห้งทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าแม้ยีสต์ที่ใช้ซูโครสเป็นสารไครโอโปรเทคแทนจะให้อัตราการมีชีวิตรอดสูงที่สุด แต่กลับพบว่าแอคทิวิตีการหมักต่ำกว่ายีสต์ที่ใช้ซอร์บิทอลเป็นสารไครโอโปรเทคแทน ทำให้ทราบว่าการมีชีวิตรอดที่สูงไม่ได้ทำให้แอคทิวิตีการหมักสูงเสมอไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

เลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* var. *montrachet* ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร YM broth ที่ชั่วโมงต่างๆ เมื่อนำมาทำการไลโอฟิไลซ์โดยใช้สคิมมิลค์เป็นสารไครโอโปรเทคแทนพบว่าเซลล์ยีสต์ที่มีระยะเวลาการเลี้ยง 60 ชั่วโมง มีปริมาณยีสต์เริ่มต้นก่อนทำไลโอฟิไลซ์ 6.5x 10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร และเมื่อผ่านการทำไลโอฟิไลซ์ มีปริมาณยีสต์ที่มีชีวิตรอด 1.9x10^7 โคโลนี / มิลลิลิตร คิดเป็นการมีชีวิตรอดร้อยละ 29.2 ซึ่งมีการมีชีวิตรอดมากที่สุด จึงเลือกเซลล์ยีสต์ที่อายุ 60 ชั่วโมงมาทำการไลโอฟิไลซ์โดยใช้สารไครโอโปรเทคแทน 3 ชนิด คือ สคิมมิลค์ ซูโครสและ ซอร์บิทอล เพื่อเลือกสารไครโปรเทคแทนที่เหมาะสมต่อเซลล์ยีสต์ พบว่าการมีชีวิตรอดของยีสต์ที่ใช้สคิมมิลค์ ซูโครสและ ซอร์บิทอลเป็นสารไครโปรเทคแทน คิดเป็นร้อยละ 35.0, 39.3 และ 36.3 ตามลำดับ โดยซูโครสเป็นสารไครโปรเทคแทนที่ทำให้เซลล์มีการมีชีวิตรอดมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบแอคทิวิตีการหมักระหว่างยีสต์ที่ใช้สคิมมิลค์ ซูโครส และซอร์บิทอลเป็นสารไครโปรเทคแทน รวมทั้งยีสต์แห้งทางการค้า แอคทิวิตีการหมักที่ได้คือ 0.15 , 0.22 , 0.37 และ 0.22 มิลลิโมลของคาร์บอนไดออกไซด์/กรัมยีสต์/ชั่วโมง ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแม้ยีสต์ที่ใช้ซูโครสเป็นสารไครโปรเทคแทนจะทำให้การมีชีวิตรอดสูงที่สุด แต่กลับพบว่ายีสต์ที่ใช้ซอร์บิทอลเป็นสารไครโปรเทคแทนให้แอคทิวิตีการหมักสูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

โชคชัย วนภู นันทกร บุญเกิด และลำไพร ดิษฐ์วิบูลย์. 2546. **คนทำไวน์: WIMEMAKER 1.** นครราชสีมา. : สมบูรณ์พริ้นติ้ง.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2539. **เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์: Preservation techniques of microorganisms.** สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Chandra, J. P. 1992. **Yeast Strain Selection.** New York and Basel. : Marcel Dekker,Inc.

Delfini, C.and Formica, J.V. 2001. " Wine Microbiology ". 292-293. in **Science and Technology.** New York. : Marcel Dekker,Inc.

Gerald, R. and Nagodawithana,T.W. 1991. **Yeast Technology.** New York. : The AV1 Pulisher.

Reed, G.and Chen, S.L. 1978. " Evaluating commercial active dry wine yeasts by fermentation activity". **Am. J. Enol. Vitic. 29(3) :** 165-168.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและการวิเคราะห์

1. yeast extract – malt extract (YM broth)

yeast extract	3 กรัม
malt extract	3 กรัม
peptone	5 กรัม
กลูโคส	10 กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2. สคิมมิลค์ ร้อยละ 20

สคิมมิลค์	20 กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	100 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำไปแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ 1 คืน แล้วนำมาฆ่าเชื้ออีกรอบ รอให้เย็นแล้วนำไปเก็บในตู้เย็น

3. ซูโครส ร้อยละ 24

ซูโครส	24 กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	100 มิลลิลิตร

กรองเชื้อโดยนำสารละลายซูโครสเทผ่านตัวกรองเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปิดปากขวดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม นำไปเก็บในตู้เย็น

4. ซอร์บิทอล ร้อยละ 24

ทำเช่นเดียวกับซูโครสร้อยละ 24 แต่เปลี่ยนจากซูโครสเป็นซอร์บิทอล

5. Phosphate buffered dilution blank (PBB) pH 7.2

เตรียม Stock solution

ชั่ง KH_2PO_4 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ปรับpHให้ได้ 7.2 โดยใช้สารละลาย 1 N NaOH ถ่ายใส่ฟลาสก์ตวงปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียม Working solution

ในการเตรียม Phosphate buffered dilution blank (PBB) pH 7.2 หรือ Working solution ให้ปิเปต stock solution 1.25 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ตวงปริมาตรขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แบ่งบรรจุในภาชนะปริมาตรตามต้องการ แล้วทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

6. วิธีวิเคราะห์

6.1 การหาปริมาณของยีสต์ โดยการนับโดยตรงด้วย Heamacytometer

6.2 การหาปริมาณเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตด้วยวิธี spread plate

6.3 การวัดค่าแอคทิวิตีการหมักของยีสต์ด้วยวิธี gasometric method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงผลการศึกษาการเจริญของยีสต์ในอาหาร YM broth

ชั่วโมงที่	ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต (โคโลนี/มิลลิลิตร)
12	8.3×10^7
36	3×10^9
39	3.1×10^9
42	4.4×10^9
45	5.4×10^9
60	6.6×10^9
72	6.7×10^9

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทำไลโอฟิไลซ์โดยใช้สกิมมิลก์ เป็นสารไครโอโปรเทคแทน

ชั่วโมงที่	ปริมาณเซลล์(โคโลนี/มิลลิลิตร)		ร้อยละการมีชีวิต
	ก่อนไลโอฟิไลซ์	หลังไลโอฟิไลซ์	
12	3.8×10^5	2.0×10^4	5.2
36	3.3×10^6	7.5×10^5	22.7
39	3.7×10^6	8.5×10^5	22.9
42	4.4×10^6	1.0×10^6	22.7
45	5.1×10^6	1.2×10^6	23.5
60	6.5×10^7	1.9×10^7	29.2
72	8.3×10^7	2.2×10^7	26.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงการศึกษาชนิดของสารไครโปรเทคแทน

ชนิดของสารไครโอโปรเทคแทน	ปริมาณเซลล์(โคโลนี/มิลลิลิตร)		ร้อยละการมีชีวิต
	ก่อนไลโอฟิไลซ์	หลังไลโอฟิไลซ์	
สคิมมิลค์	6.4×10^7	2.3×10^7	35.0
ซูโครส	8.9×10^7	3.5×10^7	39.3
ซอร์บิทอล	7.7×10^7	2.8×10^7	36.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวชนิกานต์ ธนูพิทักษ์ เกิดวันที่ 1 มิถุนายน 2527 จบมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนดอนเมืองทหารอากาศบำรุง จังหวัดกรุงเทพมหานคร และระดับปริญญาตรี โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเทคโนโลยีการหมัก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นายอนุชา อรุณมหารัตนกุล เกิดวันที่ 5 กุมภาพันธ์ 2527 จบมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนลาซาลบางนา จังหวัดกรุงเทพมหานคร และระดับปริญญาตรี โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเทคโนโลยีการหมัก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้