ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสารสะสมในเซลล์ระหว่างการผลิตไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30

Impact of temperatures on change in storage substances during rice wine production by *Saccharomyces cerevisiae* M30

ณิพากร สันธนะวิทย์
รวิวรรณ ประโยชน์อุดมเลิศ
วรรณภา แก้วรุ่งเรือง

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสารสะสมในเซลล์ระหว่างการผลิตไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30

Impact of temperatures on change in storage substances during rice wine production by *Saccharomyces cerevisiae* M30

T148855

ณิพากร สันธนะวิทย์
รวิวรรณ ประโยชน์อุดมเลิศ
วรรณภา แก้วรุ่งเรือง

ลายหมู.....
เลขทะเบียน 148855
วัน.เดือน.ปี 30 ก.ค. 2560

.b 12877586
.l.....

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสารสะสมในเซลล์ระหว่างการผลิตไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30

Impact of temperatures on change in storage substances during rice wine production by *Saccharomyces cerevisiae* M30

จัดทำโดย

ณิพากร สันธนะวิทย์ รหัสนักศึกษา 55080097

รวิวรรณ ประโยชน์อุดมเลิศ รหัสนักศึกษา 55080114

วรรณภา แก้วรุ่งเรือง รหัสนักศึกษา 55080116

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา ..... 28 / ก.ค. / 59

(ผศ.ดร.สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสารสะสมในเซลล์ระหว่างการผลิตไวน์ข้าว โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30
ชื่อนักศึกษา	ณิพากร สันธนะวิทย์ รหัสนักศึกษา 55080097
	รวิวรรณ ประโยชน์อุดมเลิศ รหัสนักศึกษา 55080114
	วรรณภา แก้วรุ่งเรือง รหัสนักศึกษา 55080116
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสารที่สะสมในเซลล์ระหว่างการผลิตไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 โดยทำการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส พบว่า การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เกิดการหมักช้ากว่าไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนี้ ไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีปริมาณกรดแลคติกที่มากกว่า แต่มีปริมาณแอลกอฮอล์น้อยกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง และผลการสะสมสารภายในเซลล์ พบว่า ไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีการสะสมไกลโคเจนและเออร์โกสเตอรอลมากกว่าไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิห้องและไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ส่วนไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส มีการสะสมทรีฮาโลสและกลีเซอรอลมากกว่าไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิห้อง และไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

คำสำคัญ : ไวน์ข้าว, ผลของอุณหภูมิ, สารสะสม, Saccharomyces cerevisiae M30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Impact of temperatures on change in storage substances during rice wine production by *Saccharomyces cerevisiae* M30
Student name	Niphakorn Santhanawit Student ID 55080097
	Rawiwan Prayot-udomlert Student ID 55080114
	Wannapa Kaewrungruang Student ID 55080116
Program	Bachelor of Science in Industrial Fementation Technology
Year	2016
advisor	Assist. Prof. Dr. Soisuda Pornpukdeewattana

ABSTRACT

The reserch was studied on the Impact of temperatures on change in storage substances during rice wine production by *Saccharomyces cerevisiae* M30. Rice wine fermentation was conducted at room temperature, 22 ℃ and 15℃. It was found that rice wine fermentation at 22 ℃ and 15 ℃ were fermented slower than rice wine fermented at room temperature. In addition, the lactic acid contents rice wine fermentation fermented at 22 ℃ and 15 ℃ were higher in but alcohol contents were lower than rice wine fermentation at room temperature. The substances accumulated within cells were observed that, rice wine fermentation at 15 ℃ had more glycogen and ergosterol accumulated than that of fermentation at room temperature and 22 ℃. Rice wine fermentation at 22 ℃ had more trehalose and glycerol accumulated than that of fermentation at room temperature and 15 ℃.

Keyword : rice wine, temperature effect, storage substances, *Saccharomyces cerevisiae* M30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การนำเสนอปัญหาพิเศษในหัวข้อผลของสายพันธุ์ยีสต์และอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสารที่สะสมในเซลล์ระหว่างการผลิตไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิตของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งในการจัดทำครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์ของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ที่ได้สละเวลาให้ความรู้ คำแนะนำ ตรวจทาน และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆด้วยความเอาใจใส่ทุกขั้นตอน เพื่อให้การจัดทำรายงานฉบับนี้สมบูรณ์ที่สุด ผู้ศึกษาจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ด้วย และขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทที่คอยให้คำแนะนำ ช่วยให้ปัญหาพิเศษครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดี

ขอขอบคุณ ดร.สุรชัย ใหญ่เย็น ที่อนุเคราะห์ในการวิเคราะห์เออร์โกสเตอรอลและคอยให้คำปรึกษาในขั้นตอนการวิเคราะห์ไกลโคเจนและทรีฮาโลส

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วริพัสย์ อารีกุล ที่อนุเคราะห์เครื่องมือในการวิเคราะห์กลีเซอรอล

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ ครูส่ง ที่อนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์คณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่อำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ สารเคมี การขอใช้เครื่องมือเฉพาะ และการขอใช้ห้องปฏิบัติการนอกเวลาราชการ

ขอขอบคุณ เพื่อน พี่ น้อง และบุคคลที่ไม่สามารถเอ่ยถึงได้ทั้งหมด ที่คอยให้ความช่วยเหลือทั้งในด้านแรงงาน กำลังใจ ข้อคิดเห็น ความรู้ และสิ่งที่ดีที่มอบให้กันตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนในด้านการศึกษา ให้กำลังใจในการทำงานตลอดมาจนรายงานฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ณิพากร สันธนะวิทย์
รวิวรรณ ประโยชน์อุดมเลิศ
วรรณภา แก้วรุ่งเรือง
28 กรกฎาคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II
กิตติกรรมประกาศ III
สารบัญ IV
สารบัญตาราง VI
สารบัญภาพ VII
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาพิเศษ 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา 2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ไวน์ข้าว 3
2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไวน์ข้าว 4
2.3 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักไวน์ข้าว 4
2.4 กรรมวิธีการผลิตไวน์ข้าว 6
2.5 การหมักแอลกอฮอล์ 7
2.6 การเปลี่ยนแปลงสารที่สะสมในเซลล์ระหว่างการผลิตไวน์ข้าว 7
2.7 ผลของอุณหภูมิต่อการหมักไวน์ข้าวและการเปลี่ยนแปลงสารสะสมภายในเซลล์ 15
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 18
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี 18
3.2 อุปกรณ์ 19
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง 20
3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อรา *Amylomyces* sp. ที่เลี้ยงบนรำข้าวสาลีที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 มิลลิโมล 20
3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 21
3.3.3 ผลของเอทานอลต่อการรอดชีวิตของยีสต์ 21
3.3.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสารที่สะสมในเซลล์ระหว่างการผลิตไวน์ข้าว 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.5 การวิเคราะห์ผล 22

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 23

4.1 การศึกษาผลของความทนทานเอทานอลของ *S. cerevisiae* M30 23

4.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการหมักไวน์ข้าว 25

4.2.1 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการหมักไวน์ข้าว 25

4.2.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมักไวน์ข้าว 26

4.2.3 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดในระหว่างการหมักไวน์ข้าว 28

4.2.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว 30

4.2.5 การเจริญและการรอดชีวิตของเชื้อยีสต์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว 31

4.2.6 การเปลี่ยนแปลงของสารสะสมการตอบสนองความเครียดที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง 35

4.2.6.1 ไกลโคเจน 35

4.2.6.2 กลีเซอรอล 38

4.2.6.3 ทรีฮาโลส 41

4.2.6.4 เออร์โกสเตอรอล 45

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ 49

บรรณานุกรม 51

ภาคผนวก 59

ภาคผนวก ก วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 60

ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ 63

ประวัติผู้เขียน 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 องค์ประกอบทางเคมีของไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก..... 35

4.2 น้ำหนักกากข้าวและปริมาตรไวน์ข้าวที่คงเหลือจากกระบวนการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิต่างๆ..... 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ข้าวที่ผ่านกระบวนการย่อยแป้งเป็นเวลา 2 วัน ด้วยเชื้อรา *Amylomyces* sp..... 6
2.2 ขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นแอลกอฮอล์..... 7
2.3 โครงสร้างของทรีฮาโลส..... 8
2.4 วิถีเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและสลายทรีฮาโลส..... 9
2.5 วิถีเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและสลายไกลโคเจน..... 11
2.6 วิถีเมแทบอลิซึมของไกลโคเจนและทรีฮาโลสใน *Saccharomyces cerevisiae*..... 12
2.7 กระบวนการสังเคราะห์เออร์โกสเตอรอล..... 14
4.1 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของ *S. cerevisiae* M30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่มี... ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกัน..... 24
4.2 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* M30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกัน..... 25
4.3 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30..... 26
4.4 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้และน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์..... *S. cerevisiae* M30..... 28
4.5 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติกระหว่างการหมักไวน์ข้าว โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30..... 30
4.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณแอลกอฮอล์ในการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์..... *S. cerevisiae* M30..... 31
4.7 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30..... 33
4.8 ไวน์ข้าวที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิห้อง, อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30..... 34
4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไกลโคเจนและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30..... 36
4.10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไกลโคเจนและน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30..... 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

4.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลีเซอรอลและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 39
4.12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลีเซอรอลและน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 40
4.13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลีเซอรอลและแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง..โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 41
4.14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณทรีฮาโลสและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 42
4.15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณทรีฮาโลสและน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 43
4.16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณทรีฮาโลสและแอลกอฮอล์ที่ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 44
4.17 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเออร์โกสเตอรอลและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 46
4.18 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเออร์โกสเตอรอลและไกลโคเจนในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาพิเศษ

ไวน์ข้าวเป็นแอลกอฮอล์อีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมในวงการอุตสาหกรรมเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ของไทย และมีแนวโน้มของการขยายตัวของไวน์ข้าวในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มากขึ้น ในระหว่างกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์มีการสะสมสารภายในเซลล์ยีสต์ คือ ทรีฮาโลส ไกลโคเจน กลีเซอรอล และเออร์โกสเตอรอล

ทรีฮาโลส เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharide) ในเซลล์ยีสต์จะพบที่บริเวณเซลล์เมมเบรน ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงานให้กับสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ ทรีฮาโลสยังมีส่วนสำคัญในการรักษาเซลล์เมมเบรนและมีบทบาทในการป้องกันเซลล์จากสภาวะกดดันต่างๆ เช่น การสูญเสียน้ำ ความเย็นจัด ความร้อน และแรงดันออสโมติกสูง เป็นต้น (อรุณ, 2558)

ไกลโคเจน มีลักษณะคล้ายกับโมเลกุลแป้งแต่มีกิ่งก้านมากกว่า กรณีสภาวะที่มีน้ำตาลและสารอาหารอื่นจำกัด ยีสต์จะสะสมไกลโคเจน เมื่อเข้าสู่วัฏจักรการแบ่งเซลล์ การใช้ไกลโคเจนที่สะสมอยู่จะใช้ผ่านกระบวนการหมักเพื่อนำไปสร้างเอทีพี ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดต่อไปได้ ซึ่งการย่อยสลายไกลโคเจนไปเป็นกลูโคส-1-ฟอสเฟต (glucose-1-phosphate) เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เพื่อให้สารอาหารกับเซลล์ในยามที่ขาดแคลน (อรุณ, 2558)

กลีเซอรอลสามารถถูกสังเคราะห์ได้ในเซลล์ยีสต์จากน้ำตาลกลูโคส โดยกลูโคสจะสลายตัวในวิถีไกลโคไลซีส และถูกใช้เป็นตัวกลางในการสังเคราะห์กลีเซอรอล เซลล์ยีสต์จะนำกลีเซอรอลที่สังเคราะห์ได้ไปทำปฏิกิริยากับกรดไขมันได้เป็นไตรกลีเซอไรด์ซึ่งใช้เป็นพลังงานสำรอง (ยุวเรศ และพิเชษฐ, 2555)

จุลินทรีย์มีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมภายนอกเพื่อการอยู่รอดได้แตกต่างกัน อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญที่สุดในด้านลบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ การที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงต้องมีกลไกพิเศษช่วยให้มีชีวิตรอด ซึ่งเกี่ยวข้องกับสิ่งสำคัญอยู่ 3 ประการ คือ ความคงตัวของเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ การสร้างองค์ประกอบเซลล์ขึ้นมาทดแทนองค์ประกอบเดิมที่เสียสภาพไป และการที่จุลินทรีย์นั้นทนต่ออุณหภูมิสูงอยู่ก่อนแล้วเกิดวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง (Singleton and Amelunxen, 1973) การให้สารอาหารพิเศษบางชนิดสามารถช่วยให้ยีสต์เจริญที่อุณหภูมิสูงขึ้นได้ เช่น การเติมกรดไขมันอิ่มตัว และเออร์โกสเตอรอลในอาหารหมัก (Ohta and Hayashida, 1983) การที่ยีสต์มีการเจริญลดลงในที่ที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นอาจเนื่องมาจากมีการสังเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สเตอรอลได้น้อยลง (Anderson *et al.*, 1986) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น พบว่า สภาพการเป็นของไหลขององค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์มีแนวโน้มลดลง การมีชีวิตรอดของยีสต์น้อยลง ทั้งนี้เพราะโปรตีนหรือองค์ประกอบของกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ (Swan and Watson, 1997) ที่อุณหภูมิสูงอัตราการเจริญของยีสต์ลดลง มีผลให้ชีวมวลโดยรวมลดลง เพราะฉะนั้น ปริมาณโปรตีน กรดไรโบนิวคลีอิก กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก และกรดอะมิโนอิสระต่างๆภายในเซลล์จึงลดลง และการที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นยังเหนี่ยวนำให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งตัวมากขึ้น ทำให้ความสามารถในการไหลผ่านของสารละลายต่างๆ รวมทั้งสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง (Panchal, 1990) จึงมีผลต่อการลดอัตราการหายใจของยีสต์ แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิสูงเหนี่ยวนำให้ระบบการหายใจของยีสต์บกพร่อง (Van, 1984)

ในการศึกษานี้จึงได้ทำการเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี และสารสะสมในเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ M30 ระหว่างการหมักไวน์ข้าว เพื่อศึกษาแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสารที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ได้แก่ อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีระหว่างการผลิตไวน์ข้าว

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสารสะสมในเซลล์ระหว่างการผลิตไวน์ข้าว

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบถึงอุณหภูมิที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารที่สะสมในเซลล์ระหว่างการผลิตไวน์ข้าว

1.3.2 นำไปประยุกต์ใช้โดยการเลี้ยงยีสต์ในสภาวะกดดัน เช่น มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง หรือมีแอลกอฮอล์ที่สูง การเปลี่ยนแปลงของสารทรีฮาโลส ไกลโคเจน กลีเซอรอล และเออร์โกสเตอรอล ซึ่งล้วนแต่มีประโยชน์กับเซลล์ยีสต์อย่างมาก เพราะสารสะสมบางตัวสามารถทำให้ยีสต์สามารถทนต่อสภาวะกดดันต่างๆ ได้ดีขึ้น เราจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเชื้อยีสต์ให้ทนต่อสภาวะกดดันต่างๆ ที่พบเจอในระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อพัฒนาทำการเลี้ยงให้ยีสต์ทนต่อสภาวะกดดันได้ก็จะเป็นผลดีในการหมักที่อาจทำให้ประสิทธิภาพการหมักดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไวน์ข้าว

ไวน์ข้าว หมายถึง สุราแช่ชนิดหนึ่งที่ทำจากข้าวมาผ่านกรรมวิธีการผลิตสาโท แล้วมีแรงแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรี สำหรับนิยามกรรมวิธีการผลิตสาโท หมายถึง การหมักข้าวต่างๆ ด้วยเชื้อรา และยีสต์ หรือลูกแป้ง เพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งหมักไว้ระยะหนึ่งจากนั้นเติมน้ำสะอาดในอัตราส่วนที่เหมาะสม และอาจมีการเติมน้ำตาลทรายขาวให้เหมาะสมกับการหมักสาโท หมักต่ออีกระยะหนึ่ง เพื่อให้ได้แรงแอลกอฮอล์ตามความต้องการ (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2546)

ไวน์ข้าวของแต่ละประเทศมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป ดังเช่น ไวน์ข้าวของประเทศไทย ได้แก่ สาโท ชื่อ พ้อง เหล้าโท กะแช่ น้ำขาว-น้ำแดง เป็นเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์พื้นบ้านดั้งเดิมของไทย โดยการหมักข้าวเหนียวนึ่งด้วยลูกแป้งเชื้อ สาโทไม่มีการกลั่น มีแรงแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร การหมักหรือการผลิตยังใช้วิธีการดั้งเดิม ไวน์ข้าวของประเทศญี่ปุ่นหรือที่รู้จักกันดีในชื่อของสาเก ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักข้าว มีลักษณะใส สีเหลืองอ่อน มีปริมาณแอลกอฮอล์ 17-20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีกลิ่นรสเฉพาะตัว มีความเป็นกรดและความหวานเล็กน้อย และเป็นเครื่องดื่มประจำชาติของประเทศญี่ปุ่นมากกว่าพันปีมาแล้ว วัตถุดิบหลักที่ใช้ในการผลิตสาเก คือ ข้าวกับน้ำ และมีการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิดเกิดขึ้นพร้อมๆกัน เรียกว่า parallel fermentation คือ มีการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาล และย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน โดยเอนไซม์อะมิเลส (amylase) และโปรติเอส (protease) ที่มีอยู่ในโคจิ ซึ่งเป็นเชื้อ *Aspergillus oryzae* ที่เลี้ยงบนข้าวนึ่งสุกแล้วมีการใช้ยีสต์เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์โดยเกิดการหมักอย่างช้าๆ จึงทำให้ได้สาเกที่มีปริมาณแอลกอฮอล์สูง ไวน์ข้าวของประเทศฟิลิปปินส์ เรียกว่า Tapuy ผลิตโดยใช้เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยแป้ง และยีสต์สายพันธุ์ที่ทนและผลิตเอทานอลได้สูง ในรูปของกล้าเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์ในการผลิต พบว่าไวน์ที่ผลิตได้มีแอลกอฮอล์ 16-18 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ไวน์ข้าวของประเทศเกาหลี เรียกว่า Takju ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อราที่เรียกว่า nuruks ซึ่งอาจใช้ในรูปเชื้อบริสุทธิ์ของ *Mucor racemosus*, *A. oryzae*, *A. kawachill* หรืออาจใช้ในรูปกล้าเชื้อผสม นอกนี้ยังมี Chao-Ching-Chu ของประเทศจีน และ Shonti หรือ Sonti ของประเทศอินเดีย (สร้อยสุดา, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไวน์ข้าว

2.2.1 น้ำ (Yoshizawa, 1985)

น้ำเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการผลิตไวน์ข้าว เพราะไวน์ข้าวมีน้ำเป็นองค์ประกอบประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยน้ำจะช่วยในการละลายเอนไซม์และสารอื่นๆในข้าวและโคจิ เกลือแร่บางชนิดที่มีอยู่ในน้ำจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราในโคจิและยีสต์ และบางชนิดยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยแป้ง ดังนั้นน้ำที่จะนำมาใช้ผลิตควรมีคุณภาพดังต่อไปนี้

2.2.1.1 ไม่มีสี กลิ่น และรสเจือปน

2.2.1.2 มีความเป็นกลางหรือด่างอ่อนๆ

2.2.1.3 มีปริมาณเหล็กน้อยกว่า 0.02 พีพีเอ็ม เนื่องจากเหล็กเป็นองค์ประกอบของ ferrichrysin และเป็นสารที่ให้สีน้ำตาลแดง

2.2.1.4 มีแร่ธาตุ เช่น แอมโมเนีย ไนเตรท รวมทั้งสารอินทรีย์ปะปนในปริมาณน้อยหรือไม่มีเลย

2.2.1.5 ไม่มีจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ปะปนลงไป

2.2.2 ข้าว (สร้อยสุดา, 2557)

ข้าวมีผลต่อการผลิตและคุณภาพของไวน์ที่ได้โดยเฉพาะกลิ่น ดังนั้น การจะตัดสินว่าข้าวประเภทไหนมีคุณภาพอย่างไร สามารถพิจารณาจาก 2 หลักสำคัญ คือ

2.2.2.1 เป็นข้าวที่สามารถย่อยได้โดยเอนไซม์ และสามารถให้ปริมาณน้ำตาลสูง

2.2.2.2 เป็นข้าวที่เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยทั่วไปแล้ว ข้าวที่มีความเหนียวและมีปริมาณอะมิโลสต่ำจะมีปริมาณเอทานอลที่สูงที่สุด

2.3 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักไวน์ข้าว (เจริญ, 2550)

2.3.1 รา

ราเป็นสิ่งมีชีวิตที่ต้องการอากาศในการหายใจ และจะผลิตน้ำย่อยออกมาย่อยแป้งในเมล็ดข้าวให้กลายเป็นน้ำตาล ในการหมักช่วงแรก เชื้อราจะสร้างเส้นใยจำนวนมากแผ่กระจายปกคลุมบนผิวเมล็ดข้าว และแทรกตัวเข้าไปในช่องว่างระหว่างเมล็ดข้าว บางส่วนแทงทะลุเข้าไปในเมล็ดข้าว และย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล แต่เนื่องจากเป็นราสีขาวจึงไม่ทำให้ข้าวเปลี่ยนสี เนื่องจากมองไม่เห็นเส้นใยชัดเจน เมื่อแป้งในข้าวถูกย่อยกลายเป็นน้ำตาลจึงไม่สามารถอุ้มน้ำเอาไว้ได้ และน้ำที่มีอยู่ก็จะซึมออกมาเป็นน้ำเชื่อมข้าว ในช่วงนี้ราจะสร้างกรด ทำให้ข้าวมีความเป็นกรด คือ มีค่าพีเอชต่ำลง ทำให้เกิดสภาพที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์และยับยั้งแบคทีเรียที่จะทำให้ข้าวบูดเน่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในระหว่างการหมักสาโท เชื้อราจะเจริญในช่วง 2 – 3 วันแรกของการหมัก ซึ่งเป็นสภาพการหมักที่ใช้อากาศ เนื่องจากการบรรจุข้าวในถังหมัก จะบรรจุเพียง 1 ใน 4 ของปริมาตร ทำให้ราได้รับออกซิเจนจากอากาศอย่างทั่วถึง จากนั้นเมื่อเกิดน้ำเชื่อมข้าวขึ้นและยีสต์เริ่มการหมัก ทำให้มีปริมาณแอลกอฮอล์และสภาพไร้ออกซิเจน ซึ่งเกิดจากการที่ยีสต์ปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาทำให้ราตายไป

2.3.2 ยีสต์

ยีสต์ เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเซลล์เดียวที่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ซึ่งจะสร้างน้ำย่อยเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ นอกจากนั้นยังผลิตกลิ่นรสของเครื่องดื่ม ทำให้มีกลิ่นชวนดื่ม การเจริญของยีสต์ไม่จำเป็นต้องใช้อากาศในการหายใจ ดังนั้นจึงสามารถหมักในขั้นนี้ในภาชนะปิดได้ แต่ต้องมีช่องระบายก๊าซออก เพราะในการผลิตแอลกอฮอล์นั้นจะมีผลพลอยได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

สำหรับยีสต์ในระยะแรกที่มีอากาศนี้จะยังไม่เกิดกระบวนการหมักแต่จะมีการแตกหน่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วจนมีปริมาณที่มากพอ ประกอบกับสภาวะความเป็นกรดที่ราสร้างให้ ร่วมกับเป็นระยะที่ผู้ผลิตจะเติมน้ำลงไปทำให้เป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ราซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ (Strict Aerobe) ในการเจริญจะหยุดกิจกรรม ส่วนยีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งสองสภาวะ (Facultative Anaerobe) ก็จะเปลี่ยนรูปแบบการสร้างพลังงานจากการหายใจที่ใช้ออกซิเจน (Aerobic Respiration) มาเป็นกระบวนการหมักหรือการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Alcoholic Fermentation หรือ Anaerobic Respiration) ซึ่งเป็นส่วนของขั้นตอนที่สอง ที่เป็นกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยทั่วไปสามารถใช้คุณสมบัติของยีสต์แบบเดียวกับยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ใช้ในการผลิตไวน์และไวน์ผลไม้ก็ย่อมได้ ซึ่งมีคุณสมบัติเหมาะสมในการหมักสาโทเช่นกัน เพราะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทนต่อความเป็นกรด ทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาล และทนต่อระดับแอลกอฮอล์ได้ดี และเมื่อต้องการให้ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ จะต้องปรับสภาวะให้อยู่ในสภาพไร้อากาศ ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักสาโทระยะนี้ คือ

1) อัตราส่วนระหว่างข้าวต่อราและยีสต์

2) ช่วงพัก (Lag Phase) ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณเซลล์ของยีสต์ ณ อุณหภูมิการหมักนั้นๆ

3) องค์ประกอบของสารอาหาร ปริมาณกรดอินทรีย์

4) ปริมาณออกซิเจน

5) ความสามารถในการทนต่อสภาวะต่างๆของยีสต์ เช่น ระดับแอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ รวมทั้งอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นขณะที่เซลล์มีกิจกรรม เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 กรรมวิธีการผลิตไวน์ข้าว (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2546)

การหมักสาโทใช้ข้าวเป็นวัตถุดิบหลัก มีกรรมวิธีการผลิตดังนี้

2.4.1 การล้างข้าว (washing)

เพื่อเป็นการชะล้างสิ่งแปลกปลอม ช่วยลดระดับการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ลง น้ำที่ใช้ล้างและแช่ข้าวจึงต้องเป็นน้ำสะอาดคุณภาพน้ำบริโภค เช่นเดียวกับน้ำที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการหมักสาโท ส่วนการแช่ข้าวมีจุดประสงค์เพื่อให้ข้าวอมน้ำ 25 - 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ก่อนนำไปนึ่งให้สุก น้ำจะซึมผ่านเข้าไปกระจายอยู่ทั่วบริเวณเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าว โดยการแช่ข้าวจะใช้เวลา 3 - 4 ชั่วโมง

2.4.2 การนึ่งข้าว (steaming)

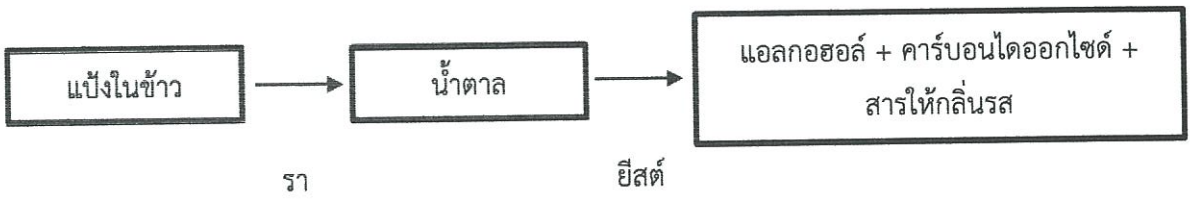
เพื่อทำให้เม็ดแป้งเกิดเจลลาติไนส์ (gelatinization) และทำให้โปรตีนเสียสภาพ (protein denaturation) เพื่อให้ง่ายต่อการเข้าตัดของเอนไซม์ของรา การนึ่งข้าวจะใช้เวลา 30 - 60 นาที หลังจากการนึ่งแล้ว การทำให้ข้าวเย็นตัวลง และเพื่อเป็นการปรับความชื้นข้าวสุกจะใช้วิธีพรมน้ำสะอาด จนได้ความชื้นประมาณ 45 – 55 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำข้าวสุกไปเติมหัวเชื้อหมัก

2.4.3 การหมักด้วยกล้าเชื้อ

นิยมใช้จากลูกแป้งซึ่งเป็นเชื้อผสม กระบวนการหมักเริ่มจากเติมข้าวนึ่งสุก และกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ลงในถังหมัก เชื้อราจะเจริญในช่วง 2 - 3 วันแรกของการหมัก ผลิตเอนไซม์อะไมเลส (amylase) เพื่อย่อยแป้งในข้าวให้เป็นน้ำตาล (saccharification) ได้น้ำหวานเรียกว่า น้ำต้อย ดังแสดงในภาพที่ 2.1 ความหวานสูงสุดของน้ำต้อย วัดบริกซ์ได้ประมาณ 37 - 47 องศาบริกซ์ (ขึ้นกับชนิดของข้าว) จากนั้นเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อและมีคุณภาพน้ำบริโภค เพื่อไปเจือจางความหวานหรือเพื่อปรับค่าบริกซ์ให้มีค่าประมาณ 20 - 22 องศาบริกซ์ การหมักในช่วงหลัง ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และปล่อยให้กระบวนการหมักดำเนินต่อไปอีก 4 - 7 วัน หรือเมื่อวัดระดับแอลกอฮอล์ได้ประมาณ 10 - 12 เปอร์เซ็นต์ ขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นแอลกอฮอล์ ดังแสดงในภาพที่ 2.2

ภาพที่ 2.1 ข้าวที่ผ่านกระบวนการย่อยแป้งเป็นเวลา 2 วัน ด้วยเชื้อรา *Amylomyces* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นแอลกอฮอล์
ที่มา : https://surathai.wordpress.com/2007/06/12/satho-micro/

2.4.4 การหยุดการหมัก

โดยถ่ายเอาเฉพาะส่วนน้ำสาโทออกจากถังหมักไปเก็บในถังพักที่เติมสารเพื่อฆ่าเชื้อและหยุดการทำงานของจุลินทรีย์

2.5 การหมักแอลกอฮอล์ (เจริญ, 2553)

ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลฟรุคโตสให้เป็นแอลกอฮอล์ และมีผลพลอยได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยตามทฤษฎี จะได้แอลกอฮอล์ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณน้ำตาลที่ใช้ แต่ในทางปฏิบัติมักไม่ถึง เพราะจะเกิดผลพลอยได้เป็นสารให้กลิ่นรสอีกหลายชนิด ดังนั้น หากเราหมักน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาล 20 องศาบริกซ์ หรือ 200 กรัมต่อลิตร เราน่าจะได้แอลกอฮอล์ประมาณ 100 กรัมต่อลิตร หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ หรือต่ำกว่านี้เล็กน้อย แต่เมื่อคำนวณเป็นปริมาณเป็นเปอร์เซ็นโดยปริมาตร เราจะต้องใช้ค่าความถ่วงจำเพาะของแอลกอฮอล์มาคำนวณ คือ 0.7893 ทำให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ เช่น ถ้ามีแอลกอฮอล์ 96.3 กรัมต่อลิตร จะได้ 12.2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร (9.63 หาร 0.7893)

ในการหมัก ยีสต์จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 2 – 3 วันแรก หลังจากนั้นการเจริญเติบโตจะช้าลงจนถึงช่วงที่ไม่เพิ่มจำนวนขึ้น แต่ในช่วงนี้ก็ยังมีการเพิ่มปริมาณแอลกอฮอล์ขึ้นเรื่อยๆ และปริมาณน้ำตาลก็ลดลง และมีการสร้างสารให้กลิ่นรสต่างๆในช่วงนี้ด้วย ดังนั้นจึงต้องหมักต่อไปแม้ยีสต์จะหยุดเพิ่มจำนวนแล้ว

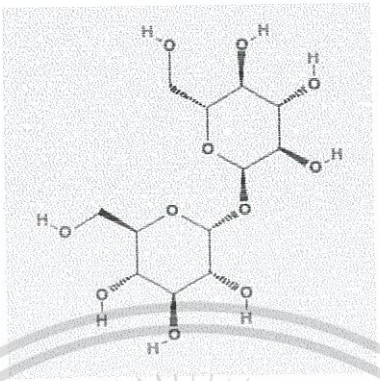
2.6 การเปลี่ยนแปลงสารที่สะสมในเซลล์ระหว่างการผลิตไวน์ข้าว

2.6.1 ทรีฮาโลส (นิรมล และคณะ, 2540)

ทรีฮาโลส (Trehalose; α-D-glucopyranosyl-1, 1-α-D-glucopyranoside ; ภาพที่ 2.3) เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) ประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุล จับกันที่ตำแหน่ง anomeric carbon ด้วยพันธะไกลโคซิดิค (glycosidic bond) ทำให้ทรีฮาโลสมีคุณสมบัติเป็นสารที่มีความคงตัว ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และไม่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งมีความเสถียรสูง เฉื่อยต่อการทำปฏิกิริยากับสารอื่น และไม่เป็นพิษกับสิ่งมีชีวิต จึงถูกนำไปใช้เป็นสารคงตัว (stabilizer) สำหรับเอนไซม์ โปรตีน มวลชีวภาพ



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของทรีฮาโลส

ที่มา : National Center for Biotechnology Information. (n.d.)

ทรีฮาโลสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ยีสต์ แบคทีเรีย แมลง พืช สาหร่าย รา และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ตำแหน่งของทรีฮาโลสในเซลล์จะแตกต่างกันตามชนิดของสิ่งมีชีวิต เช่น ในเซลล์ยีสต์จะพบที่บริเวณเซลล์เมมเบรน ทรีฮาโลสทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงานให้กับสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ ทรีฮาโลสยังมีส่วนสำคัญในการรักษาเซลล์เมมเบรน โดยไฮดรอกซิลกรุ๊ปของทรีฮาโลสสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับฟอสโฟไลปิดของเซลล์เมมเบรน ซึ่งปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแทนที่น้ำ ในขณะที่เซลล์ของสิ่งมีชีวิตผ่านกระบวนการทำแห้งหรืออยู่ในสภาวะแห้งแล้ง ทำให้เซลล์เมมเบรนสามารถคงรูปอยู่ได้และสารภายในเซลล์ไม่รั่วออกมา

สิ่งมีชีวิตหลายชนิดมีความสามารถในการผลิตทรีฮาโลส แต่สิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญในการผลิตทรีฮาโลสมากที่สุด คือ จุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์จำพวกยีสต์และแบคทีเรีย แบคทีเรียพรอพิโอนิกบางสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตทรีฮาโลสและสะสมไว้ภายในเซลล์ (Cardoso *et al.*, 2004) การสะสมทรีฮาโลสภายในเซลล์เกิดขึ้นภายใต้สภาวะเครียดหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิต่ำ ความเข้มข้นของเกลือสูง และสภาวะอื่นที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ (Hugenholtz and Smid, 2002) ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญและทนต่อสภาวะเครียดทั้งหลายได้

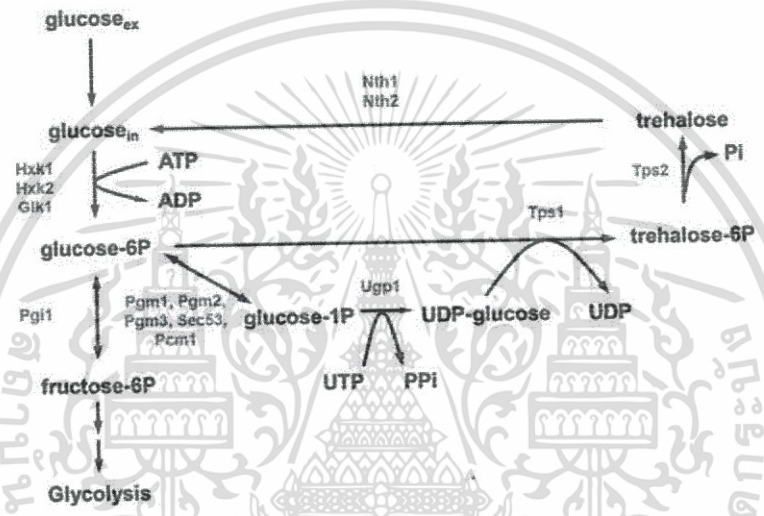
ทรีฮาโลสทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตสะสมไว้ในเซลล์เพื่อใช้ในระหว่างการสร้างสปอร์ และเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะขาดแคลนสารอาหาร นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการป้องกันเซลล์จากสภาวะกดดันต่างๆ เช่น การสูญเสียน้ำ ความเย็นจัด ความร้อน และแรงดันออสโมติกสูง เป็นต้น นอกจากนี้สารเคมีที่เป็นพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น เอทานอล สามารถชักนำให้เกิดการสะสมทรีฮาโลสได้ บทบาทอื่นของทรีฮาโลสในยีสต์ ได้แก่ การควบคุมอัตราการเจริญของยีสต์และการควบคุมเมแทบอลิซึมของกลูโคส (อรุณ, 2558)

2.6.1.1 การสังเคราะห์ทรีฮาโลส (Boulton and Quain, 2001)

ในการสังเคราะห์ทรีฮาโลส เอนไซม์ที่สำคัญ คือ ทรีฮาโลฟอสเฟตซินเทส (trehalose phosphate synthase, TPS) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยากลูโคส-6-ฟอสเฟต(glucose–6–phosphate, G6P) ส่วนเอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase) จับกับกลุ่มฟอสเฟตจึงเหลือทรีฮาโลส วิถีเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและสลายทรีฮาโลส ดังแสดงในภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 วิถีเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและสลายทรีฮาโลส

ที่มา : Walther *et al.*, (2013)

2.6.1.2 การสะสมทรีฮาโลสในเซลล์ยีสต์

ปริมาณของทรีฮาโลสใน *S. cerevisiae* สามารถเป็นไปได้ถึง 23 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่าของน้ำหนักแห้งของเซลล์ ขึ้นอยู่กับสภาพการเจริญเติบโต ในแต่ละช่วงของเซลล์ (Kim *et al.*, 1996) ความเข้มข้นของทรีฮาโลสในยีสต์จะต่ำในระหว่างระยะแบ่งตัวทวีคูณ (log phase) ซึ่งเป็นผลมาจากการขาดแคลนกลูโคส (Boulton and Quain, 2001) ทรีฮาโลสจะเริ่มสะสมในช่วงระยะแบ่งตัวทวีคูณ (log phase) จนถึงระยะคงจำนวนเซลล์ (stationary phase) และเมื่อไกลโคเจนสำรองถูกนำไปใช้ ผลจากการขาดแขลนกลูโคสจะทำให้มีการสังเคราะห์ทรีฮาโลสมากกว่าการสังเคราะห์ไกลโคเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทรีฮาโลสจะสะสมหลังจากไกลโคเจนสังเคราะห์แล้ว หรือ ทรีฮาโลสจะใช้กลูโคสส่วนที่เหลือจากการสังเคราะห์ไกลโคเจน (Steward and Russell, 1993)

2.6.2 ไกลโคเจน (อรุณ, 2558)

ไกลโคเจนประกอบด้วยโมเลกุลของอัลฟา-1,4-กลูแคน (α-1,4-glucan) และมีกิ่งก้าน คือ อัลฟา-1,6-กลูแคน (α-1,6-glucan) มีลักษณะคล้ายกับโมเลกุลแป้งแต่มีกิ่งก้านมากกว่า ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไกลโคเจนเกิดจากการควบคุมของเอนไซม์ไกลโคเจนซินเทส (glycogen synthase) ซึ่งควบคุมการเติมโมเลกุลกลูโคสจากยูดีพี-กลูโคสลงที่บริเวณรับสารพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide acceptor) ในสายของพันธะของพันธะอัลฟา-1,4 และมีเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาสร้างสายกิ่งก้าน (branching enzyme) ซึ่งควบคุมการสร้างพันธะอัลฟา-1,6 กรณีสภาวะที่มีน้ำตาลและสารอาหารอื่นจำกัดยีสต์จะสะสมไกลโคเจน เมื่อเข้าสู่วัฏจักรการแบ่งเซลล์ การใช้ไกลโคเจนที่สะสมอยู่จะใช้ผ่านกระบวนการหมักเพื่อนำไปสร้างเอทีพี ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดต่อ ไปได้ ซึ่งการย่อยสลายไกลโคเจนไปเป็นกลูโคส-1-ฟอสเฟต (glucose-1-phosphate) เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อให้สารอาหารกับเซลล์ในยามที่ขาดแคลนโดยปฏิกิริยาถูกควบคุมด้วยเอนไซม์ไกลโคเจนฟอสโฟริเลส (glycogen phosphorylase) สภาวะที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักเบียร์ พบว่า *Saccharomyces cerevisiae* ย่อยสลายไกลโคเจนที่เก็บไว้อย่างรวดเร็วและสะสมไกลโคเจนอีกครั้งเมื่อกระบวนการหมักเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว

ไกลโคเจนมีบทบาทสำคัญในการอยู่รอดของเซลล์ยีสต์ โดยสัมพันธ์กับวงจรชีวิตของยีสต์ดังต่อไปนี้ (Goldammer, 2000; Smagalski, 2007)

- **ระยะการปรับตัว** (lag phase)

ไกลโคเจนเป็นคาร์โบไฮเดรตสำรองให้ภายในเซลล์ ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญสำหรับการทำงานของเซลล์ในระยะการปรับตัว ไกลโคเจนที่เก็บสะสมไว้สามารถย่อยสลายได้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งถูกนำมาใช้โดยเซลล์ยีสต์สำหรับการขยายพันธุ์

- **ระยะการเจริญเติบโต** (log phase)

ถ้าสารอาหารสำรองภายในเซลล์ยีสต์เพียงพอ ระยะนี้ยีสต์จะปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และจะเกิดฟองก๊าซขึ้นในสาโท

- **ระยะการหมัก** (fermentation phase)

การหมักจะเกิดอย่างรวดเร็วจากระยะการเจริญเติบโต เมื่อออกซิเจนหมด ยีสต์ส่วนใหญ่ในสารแขวนลอยจะกระจายตัว และสัมผัสกับสารแขวนลอย ทำให้เกิดการหมักอย่างรวดเร็ว ยีสต์จะยังคงอยู่ในสารแขวนลอย 3 - 7 วัน หลังจากนั้นจะจับกันและเริ่มตกตะกอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- **ระยะตกตะกอน (sedimentation phase)**

ระยะนี้ยีสต์จะพักตัว และรักษาชีวิตโดยการใช้ไกลโคเจน ซึ่งไกลโคเจนเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการบำรุงรักษาเซลล์ในระหว่างการพักตัว

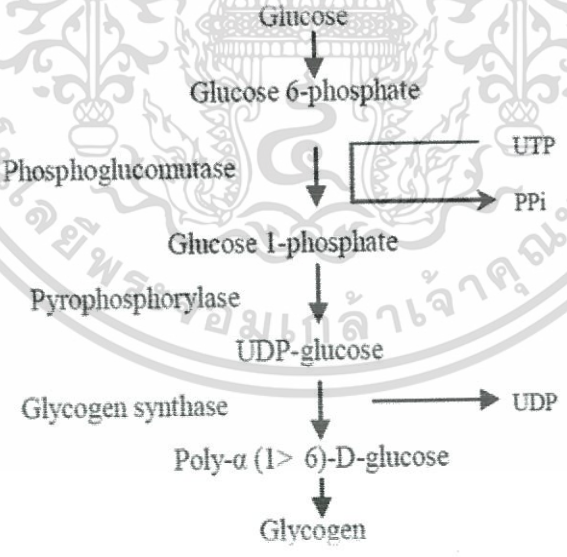
2.6.2.1 การสังเคราะห์ไกลโคเจน (Boulton and Quain, 2001)

ไกลโคเจนถูกสังเคราะห์จากกลูโคส ผ่านกลูโคส-6-ฟอสเฟต (glucose –6– phosphate, G6P) และกลูโคส-1-ฟอสเฟต (glucose –1– phosphate, G1P) วิถีนี้ใช้ยูริดีน ไดฟอสเฟต (uridine diphosphate) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวให้หน่วยกลูโคส ส่วนไกลโคเจนซินเทส (UDP–glucose-glycogen glucosyltransferase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาได้เป็น Poly-α(1>6)-D-glucose และสังเคราะห์ได้ไกลโคเจน

2.6.2.2 การย่อยสลายไกลโคเจน (Boulton and Quain, 2001)

การสลายไกลโคเจนโดยใช้เอนไซม์ glycogen phosphorylase ในการทำปฏิกิริยาของ phosphoric acid และได้กลูโคส-1-ฟอสเฟต (glucose –1– phosphate, G1P) ส่วนเอนไซม์ตัดที่พันธะจะใช้ amylo-α-(1-6)-glucosidase ตัดโซ่กิ่งที่พันธะ α-(1-6)-ไกลโคซิดิก ร่วมกับ phosphorylase เพื่อใช้ประโยชน์จากไกลโคเจนได้อย่างสมบูรณ์

วิถีเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและสลายไกลโคเจน ดังแสดงในภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 วิถีเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและสลายไกลโคเจน

ที่มา : Boulton and Quain (2001)

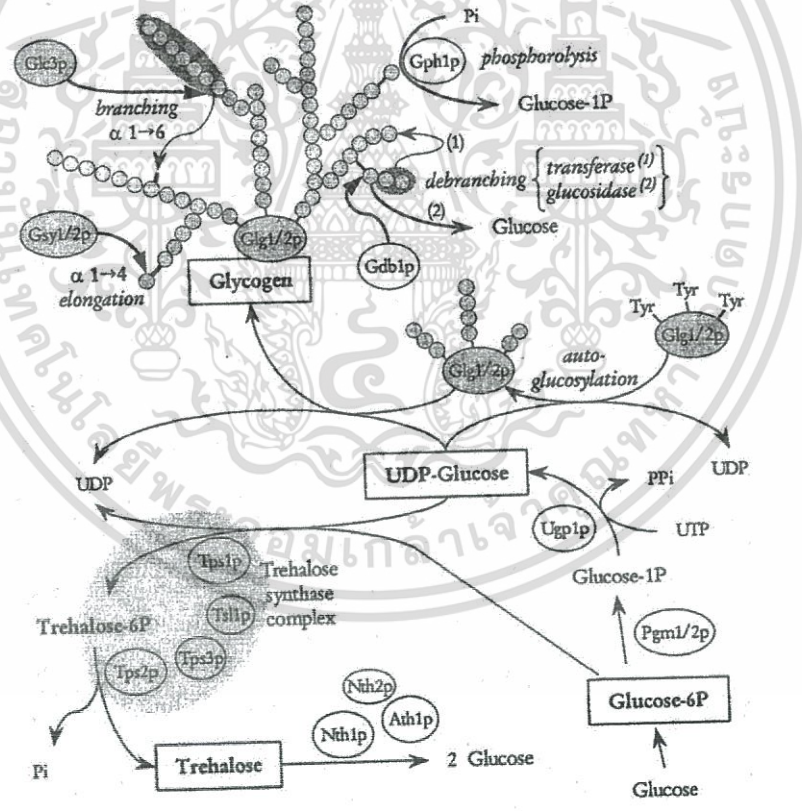
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีสต์ตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมของการหมัก โดยการการสังเคราะห์ไกลโคเจนมี 2 บทบาทสำคัญ คือ

1) มีแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการสังเคราะห์สเตอรอล (sterols) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ในระหว่างขั้นตอนของการหมักแบบให้อากาศ (Boulton and Quain, 2001) เพราะสารเหล่านี้มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ความเข้มข้นของสารเหล่านี้มักจะมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพของการหมัก ดังนั้น ไกลโคเจนเริ่มต้นที่มีอยู่จึงเป็นแหล่งพลังงานในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว อีกทั้งเป็นตัวบ่งชี้ทางอ้อมในการสร้างสารประกอบเหล่านี้ (O'Connor-Cox *et al.*, 1996)

2) เป็นพลังงานเพื่อการบำรุงรักษาเซลล์ระหว่างระยะคงจำนวนเซลล์ของการหมักและในการเจริญ (Boulton and Quain, 2001) เมื่อสารอาหารค่อยๆลดลง ยีสต์จะเริ่มสะสมไกลโคเจนในขณะที่กระบวนการหมักมีการดำเนินอยู่ ทันทีที่สารอาหารหมด การย่อยสลายไกลโคเจนจะเริ่มต้นขึ้นเพื่อให้ยีสต์นำไปใช้ต่อไป (Steward and Russell, 1993)

วิถีเมแทบอลิซึมของไกลโคเจนและทรีฮาโลสใน *S. cerevisiae* M30 ดังแสดงในภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 วิถีเมแทบอลิซึมของไกลโคเจนและทรีฮาโลสใน *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา : Franc°ois and Parrou (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3 กลีเซอรอล (ยุวเรศ และพิเชษฐ, 2555)

กลีเซอรอล (glycerol) อาจเรียกว่า กลีเซอรีน (glycerine หรือ glycerin) มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นพอลิออล (polyol) เป็นสารที่เป็นของเหลว ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีรสหวานเล็กน้อย ในโมเลกุลมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 3 หมู่ จึงทำให้ละลายในน้ำได้ดี มีสมบัติในการดูดจับน้ำได้ดี (hydroscopic) กลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบหลักในโมเลกุลของไตรกลีเซอร์ไรด์ (triglyceride) ซึ่งได้จากการรวมตัวของกลีเซอรอลกับกรดไขมัน (fatty acid) 3 โมเลกุล

เมื่อเซลล์ยีสต์ต้องเผชิญกับความเครียด hyperosmotic เซลล์จะหดตัวลงเป็นผลมาจากการสูญเสียอย่างรวดเร็วของน้ำภายในเซลล์ เพื่อชดเชยการสูญเสียแรงดันที่เกิดภายในเซลล์ เซลล์จะสะสมกลีเซอรอลซึ่งเป็น osmolyte เพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้เซลล์เกิดสภาวะขาดน้ำและเหี่ยว (Hohmann, 1997 ; Nevoigt and Stahl, 1997)

กลีเซอรอลเป็นสารสำคัญในส่วนประกอบยีสต์ ไม่เพียงแต่ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เกิดสภาวะขาดน้ำและเหี่ยวแล้ว ยังช่วยในการเผาผลาญและสังเคราะห์ทำให้เกิดการบำรุงรักษาของสาร ควบคุมสมดุลของการถ่ายโอนอิเล็กตรอน (Ansell *et al.*, 1997) นอกจากนี้กลีเซอรอลยังเป็นสารตั้งต้นของ phospholipids ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อผนังเซลล์

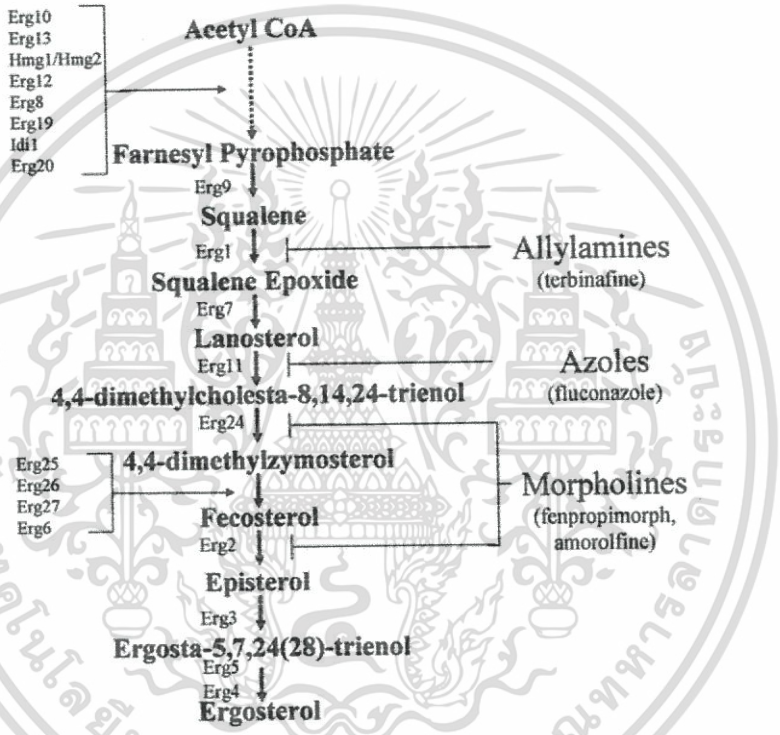
2.6.4 เออร์โกสเตอรอล (ปฏิพล และคณะ, 2555)

จุลินทรีย์มีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมภายนอกเพื่อการอยู่รอดได้แตกต่างกัน อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญที่สุดในด้านลบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ การที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงต้องมีกลไกพิเศษช่วยให้มีชีวิตรอด ซึ่งเกี่ยวข้องกับสิ่งสำคัญอยู่ 3 ประการ คือ ความคงตัวของเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ การสร้างองค์ประกอบเซลล์ขึ้นมาทดแทนองค์ประกอบเดิมที่เสียสภาพไป และการที่จุลินทรีย์นั้นทนต่ออุณหภูมิสูงอยู่ก่อนแล้วเกิดวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง (Singleton and Amelunxen, 1973) การให้สารอาหารพิเศษบางชนิดสามารถช่วยให้ยีสต์เจริญที่อุณหภูมิสูงขึ้นได้ เช่น การเติมกรดไขมันอิ่มตัว และเออร์โกสเตอรอลในอาหารหมัก (Ohta and Hayashida, 1983) การที่ยีสต์มีการเจริญลดลงในที่ที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น อาจเนื่องมาจากมีการสังเคราะห์สเตอรอลได้น้อยลง (Anderson *et al.*, 1986) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น พบว่า สภาพการเป็นของไหลขององค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์มีแนวโน้มลดลง การมีชีวิตรอดของยีสต์น้อยลง ทั้งนี้เพราะโปรตีนหรือองค์ประกอบของกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ (Swan and Watson, 1997) ที่อุณหภูมิสูงอัตราการเจริญของยีสต์ลดลง มีผลให้ชีวมวลโดยรวมลดลง เพราะฉะนั้น ปริมาณโปรตีน กรดไรโบนิวคลีอิก กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก และกรดอะมิโนอิสระต่างๆ ภายในเซลล์จึงลดลง และการที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นยังเหนี่ยวนำให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งตัวมากขึ้น ทำให้ความสามารถในการไหลผ่านของสารละลายต่างๆ รวมทั้งสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง (Panchal, 1990) จึงมีผลต่อการลดอัตราการหายใจของยีสต์ แสดงให้เห็นว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิสูงเหนี่ยวนำให้ระบบการหายใจของยีสต์บกพร่อง นั่นคือ ไมโทคอนเดรียมีบทบาทโดยตรงต่อการทนสภาวะอุณหภูมิสูง (Van, 1984)

สเตอรอลเป็นส่วนประกอบที่จำเป็นของเซลล์ยูแคริโอตทั้งหมด สเตอรอลที่มีบทบาทสำคัญใน *Saccharomyces cerevisiae* คือ เออร์โกสเตอรอล กระบวนการสังเคราะห์ดังแสดงในภาพที่ 2.7 สเตอรอลมีอยู่ใน 2 รูปแบบ คือ ฟรีสเตอรอล ที่ส่วนใหญ่อยู่ในเมมเบรนพลาสมา มีความสำคัญมากต่อการไหล การซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ และมีผลกระทบต่างๆเกี่ยวกับกิจกรรมของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ สเตอรอลอีกรูปแบบ คือ สเตอรอลเอสเทอร์ (Bloch, 1983)



ภาพที่ 2.7 กระบวนการสังเคราะห์เออร์โกสเตอรอล

ที่มา : Chiatogu *et al.*, (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ผลของอุณหภูมิต่อการหมักไวน์ข้าวและการเปลี่ยนแปลงสารสะสมภายในเซลล์

อุณหภูมิเป็นหนึ่งในพารามิเตอร์ทางกายภาพที่สำคัญที่มีอิทธิพลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในกระบวนการหมักของยีสต์ ซึ่งยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตที่เจริญได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิปานกลาง มีความสามารถของการเจริญเติบโตระหว่าง 0 – 48 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่แนะนำสำหรับยีสต์ *Saccharomyces* อยู่ระหว่าง 25 - 35 องศาเซลเซียส (Watson, 1987)

ยีสต์ในห้องปฏิบัติการและในระดับอุตสาหกรรมเจริญได้ดีเมื่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 20 - 30 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อเจริญได้อยู่ในช่วง 35 - 43 องศาเซลเซียส ยีสต์ที่ใช้ผลิตไวน์จะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25 – 33 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิระหว่าง 25 – 30 องศาเซลเซียส เซลล์จะมีการรอดชีวิตมากขึ้น และที่อุณหภูมิ 30 – 37 องศาเซลเซียส จะเหมาะสมกับการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (Walker, 1998) ความทนต่ออุณหภูมิสำหรับการเจริญและการหมักเอทานอลเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ เช่น *S. cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic strain) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ในช่วง 25 - 30 องศาเซลเซียส (Banat and Marchant, 1992; Abdel-Fattha *et al.*, 2000) แต่ยีสต์ทนร้อนเป็นยีสต์ที่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส (Banat and Marchant, 1995)

อุณหภูมิมีผลต่อสัณฐานวิทยาและความอยู่รอดของเซลล์ ยีสต์ที่เจริญในระยะแบ่งตัวทวีคูณ (exponential phase) จะมีความทนต่ออุณหภูมิสูงน้อยกว่ายีสต์ที่อยู่ในระยะคงจำนวนเซลล์ (stationary phase) และพบว่า อุณหภูมิสูงมีผลทำให้การแตกหน่อของยีสต์ผิดปกติ ผนังเซลล์เจริญได้ไม่สมบูรณ์ การเพิ่มขนาดของเซลล์ผิดปกติ มีปริมาณของเหลวในเซลล์เพิ่มขึ้น ความสามารถในการเลือกผ่านสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง ลดกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเมมเบรน ทำให้ความทนต่ออุณหภูมิสูงของเซลล์ลดลง ทำลายพันธะไฮโดรเจนทำให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกเสื่อมสภาพ ขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนหลายชนิด เมื่อมีการสังเคราะห์โปรตีนลดลง จะส่งผลให้กิจกรรมการขนส่งน้ำตาลเข้าเซลล์ยีสต์ลดลงด้วย อีกทั้งยังยับยั้งกระบวนการหายใจและกระบวนการหมัก สำหรับการหมักเอทานอล พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในกระบวนการหมักจะสูงกว่าอุณหภูมิสำหรับการเจริญ 5 - 10 องศาเซลเซียส และกระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์ในที่ที่มีออกซิเจนจะเบนไปทางหมัก เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 25 องศาเซลเซียส เป็น 38 องศาเซลเซียส เนื่องจากเอนไซม์ที่สำคัญสำหรับการออกซิเดชัน 4 ชนิดถูกยับยั้ง จะทำให้เกิดการสะสมไพรูเวทและเอทานอล มีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มเป็น 40 องศาเซลเซียส อัตราการหมักในช่วงแรกจะเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ที่สามารถเกิดได้สูงสุดที่อุณหภูมิใกล้เคียง 40 องศาเซลเซียส (สาวิตรี, 2540) การรักษาประสิทธิภาพการหมักเช่นเดียวกับการอยู่รอดของยีสต์ในการผลิตเอทานอล จะต้องรับมือกับการเปลี่ยนแปลงด้านสิ่งแวดล้อมเหล่านี้ โดยอาศัยกลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่ออัตราการเติบโตของยีสต์และการเผาผลาญอาหารเพิ่มขึ้น จะทำให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้น แต่การย่อยที่ดีควรอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมและจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น (Thevelein, 1984) อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์เป็นช่วงแคบ และการวิเคราะห์การตอบสนองในการเผาผลาญของ *S. cerevisiae* ต่อความเครียดที่เกิดจากความร้อนอย่างต่อเนื่องแสดงให้เห็นว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 43 องศาเซลเซียส เซลล์ยีสต์จะเริ่มสูญเสียความมีชีวิต (Miyazaki *et al.*, 2005)

อุณหภูมิในการหมักไวน์ข้าวมีความสำคัญต่อการผลิตไวน์ข้าว เนื่องจากการที่เชื้อจะสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ดีนั้นจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม ทำให้เชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้ดี และมีความสำคัญต่อกลิ่นและรสชาติของไวน์ข้าว Liu และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิในการผลิตไวน์ข้าวของจีน โดยทำการทดลองหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 5 อุณหภูมิ ได้แก่ 18, 23, 28, 33 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง พบว่า อุณหภูมิมีผลต่อการผลิตเอทานอลในการหมักไวน์ข้าว และยังมีผลต่อค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่เป็นตัวควบคุมคุณภาพของไวน์ข้าว ในการทดลองนี้ พบว่า ในแต่ละอุณหภูมิทำให้เกิดการผลิตเอทานอล น้ำตาล กลีเซอรอล และกรดอินทรีย์ที่แตกต่างกัน โดยอุณหภูมิที่ 23 และ 33 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการผลิตเอทานอลและกลีเซอรอลได้สูงที่สุดและต่ำที่สุด ตามลำดับ ส่วนผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเกิดกรดอินทรีย์ พบว่า แต่ละอุณหภูมิทำให้เกิดกรดอินทรีย์แต่ละชนิดในปริมาณเล็กน้อยแตกต่างกันไป เช่น กรดซัคซินิกจะเกิดขึ้นในปริมาณมากที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส และจะต่ำที่สุดที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส และในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส จะเกิดกรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดทาร์ทาริกได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากที่อุณหภูมิสูง การเจริญของยีสต์จะถูกยับยั้งจากการผลิตเอทานอลที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสับสเตรทและ *Lactobacillus* ที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญและผลิตกรดแลคติกได้ดีที่อุณหภูมิสูง

ธัญวรรณ และสุกัญญา (2558) ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการหมักไวน์ข้าว เปรียบเทียบระหว่างการหมักที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส พบว่า การหมักที่อุณหภูมิห้องจะใช้เวลาในการหมักสั้นกว่าการหมักที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และได้ปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำกว่าการหมักที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสเล็กน้อย ส่วนการหมักที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาในการหมักนานกว่าที่อุณหภูมิห้อง แต่ไวน์ที่ได้จะมีปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงและมีกลิ่นแอลกอฮอล์ที่ฉุนกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในสภาวะการหมักที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีการย่อยแป้งได้ปริมาณน้ำตาลที่สูงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากอุณหภูมิในการหมักไวน์ข้าวเหมาะสำหรับการทำงานของกล้าเชื้อราบริสุทธิ์ แต่การใช้น้ำตาลของ 2 สภาวะนี้ก็รวดเร็วไม่ต่างกัน เนื่องจากในช่วงวันแรกมีการย่อยแป้งได้น้ำตาลในปริมาณที่มาก เชื้อยีสต์จึงสามารถนำน้ำตาลมาใช้ได้มากเช่นกัน ส่วนปริมาณกรดแลคติกจากการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสนั้นมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากยีสต์สามารถทำงานได้ดีตั้งแต่วันแรกของการหมักไวน์ข้าวและมีการสร้างกรดขึ้นมา และกล้าเชื้อราบริสุทธิ์ก็สามารถสร้างกรดได้ด้วยหากมีความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Van Dijck และคณะ (1995) ได้ศึกษากิจกรรมการหมักของยีสต์ขนมปังที่ได้รับอิทธิพลจากอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่อุณหภูมิสูง พบว่า การยืดระยะเวลาการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส มีผลทำให้กิจกรรมการหมักค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า ปริมาณทรีฮาโลสมีอิทธิพลต่อกิจกรรมการหมักของยีสต์ โดยปริมาณทรีฮาโลสที่ลดลงจะส่งผลให้มีกิจกรรมการหมักที่ลดลงด้วย ตามผลของ Van Dijck และคณะ (1995) พบว่า ทรีฮาโลสจะช่วยปกป้องเซลล์ยีสต์จากความเครียด ซึ่งสรุปได้ว่า ปริมาณทรีฮาโลสในขั้นตอนเริ่มต้นของกระบวนการหมักที่มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยให้การหมักมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

148855

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

ข้าวเหนียวเขี้ยวงู พันธุ์ กข6 จากตลาดหัวตะเข้

น้ำดื่ม ตรา สิงห์ จาก TOPS supermaket

น้ำตาลทราย ตรา มิตรผล

รำข้าวสาลี จากร้านแสงทอง จตุจักร

3.1.2 จุลินทรีย์

Amylomyces sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* M30 จากห้องปฏิบัติการสาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.1.3 สารเคมี

Absolute ethanol

Acetic acid

D-glucose standard solution

Ethanol 95% (v/v)

Ferrous ammonium sulfate

Ferrous sulfate

GOPOD reagent buffer

GOPOD reagent enzymes

Heptane

Hydrochloric acid

Magnesium Sulfate

Methylene violet

o-Phenantroline

Phenolphthalein

Potassium dichromate

Potassium hydroxide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Potassium phathalate

Sodium acetate

Sodium carbonate

Sodium chloride 0.9% (w/v)

Sodium citrate

Sodium hydroxide

Sodium phosphate dibasic

Sodium phosphate monobasic

Sodium potassium tartrate

Sulfuric acid

1,10-phenanthroline ferrous sulfate

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)

3.2 อุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์

เครื่องกลั่นแอลกอฮอล์

เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน

เครื่องเขย่า

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ

เครื่องชั่งละเอียด

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

เครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน

เครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอนควบคุมอุณหภูมิ

เครื่องผสมสารละลาย

เครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

เครื่องวัดความหวาน

เตาให้ความร้อน

ตู้เขี่ยเชื้อ

ตู้ดูดไอสารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตู้บ่มเชื้อ
ตู้เย็น
ตู้อบลมร้อน
เทอร์โมมิเตอร์
ผ้าขาวบาง
ผ้าดิบ
ไมโครปิเปต
ไมโครเวฟ
หม้อนึ่งความดันไอ
หม้อลาว
หวดนึ่งข้าวเหนียว
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
ฮีมาไซโตมิเตอร์

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อรา *Amylomyces* sp. ที่เลี้ยงบนรำข้าวสาลีที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 มิลลิโมล

3.3.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อรา *Amylomyces* sp.

เริ่มจากการเตรียมเชื้อราที่เลี้ยงใน Potato Dextrose Agar (PDA) ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยการเขี่ยเส้นใยเชื้อราลงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) ที่บรรจุในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.3.1.2 การเลี้ยงกล้าเชื้อราบนรำข้าวสาลีที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 มิลลิโมล

ชั่งรำข้าวสาลี 12 กรัม บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.2 นอร์มัล ปริมาตร 12 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโลหะไอออนแมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 5 มิลลิโมล ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นของโลหะที่ 0.1 มิลลิโมลต่อฟลาสก์ ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอจนเย็น ใช้เข็มเขี่ยเส้นใยเชื้อราลงในฟลาสก์ที่มีรำข้าวสาลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำกล้าเชื้อราไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ซึ่งประกอบด้วย yeast extract, malt extract, peptone และ glucose นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอจนเย็น ใช้ลูปเขี่ยเชื้อยีสต์จาก stock culture 1 ลูป ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.3 การศึกษาผลของเอทานอลต่อการรอดชีวิตของยีสต์

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YM นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอจนเย็น เติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ให้มีความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยปริมาตรรวมทั้งหมดในฟลาสก์ต้องเท่ากับ 100 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ให้มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้น 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของยีสต์โดยย้อมซิเตรตเมทิลีนไวโอเลตทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสารที่สะสมในเซลล์ระหว่างการผลิตไวน์ข้าว

การทดลองนี้จะศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส โดยใช้เชื้อรา *Amylomyces* sp. ในการย่อยแป้ง ร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30

3.3.4.1 ขั้นตอนการทดลอง

ชั่งข้าวเหนียว 1,200 กรัม ใส่ถาดพลาสติก ล้างข้าวด้วยน้ำสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรก แช่ข้าวด้วยน้ำอุ่นเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นึ่งข้าวให้สุกโดยใช้เวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นนำข้าวเหนียวที่สุกมาพักให้เย็นลงในถาดพลาสติกที่ลวกด้วยน้ำร้อนแล้ว เติมน้ำสิงห์ 1,200 มิลลิลิตร เพื่อแยกเมล็ดข้าวออกจากกัน เติมกล้าเชื้อรา *Amylomyces* sp. ที่เลี้ยงบนรำข้าวสาลีปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าวดิบคลุกเคล้าให้ทั่วแล้วปิดถาดด้วยผ้าดิบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว นำน้ำต้อยที่ได้จากการย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลโดยเชื้อรามาวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ จากนั้นทำการผ่าส่าโดยนำข้าวที่ย่อยได้ใส่ลงในน้ำเชื่อมที่มีความหวาน 15 องศาบริกซ์ ที่มีการเติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP) 0.05 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 1,800 มิลลิลิตร และอาหาร YM ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรไวน์ข้าวทั้งหมด ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมกล้าเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* M30 ให้มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันจนกว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดจะคงที่ โดยตัวอย่างที่เก็บจะนำไปวิเคราะห์หา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ การเจริญของเซลล์ อุณหภูมิ ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดแลคติก) ความเป็นกรดด่าง ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณทรีฮาโลส ปริมาณไกลโคเจน ปริมาณกลีเซอรอล และปริมาณเออร์โกสเตอรอล

3.3.5 การวิเคราะห์ผล

3.3.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller., 1959)

3.3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดแลคติก) (Amerine amd Ough, 1974)

3.3.5.3 การวัดความเป็นกรดด่างโดยใช้ pH meter (AOAC, 2000)

3.3.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์โดยวิธีไดโครเมทออกซิเดชัน (Amerine and Ough., 1974)

3.3.5.5 การวัดอุณหภูมิโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์

3.3.5.6 การนับจำนวนเซลล์ยีสต์โดยใช้ Heamacytometer

3.3.5.7 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายโดย Hand refractometer (AOAC, 2000)

3.3.5.8 การวิเคราะห์ปริมาณทรีฮาโลส (Parrou และ Francois, 1997)

3.3.5.9 การวิเคราะห์ปริมาณไกลโคเจน (Parrou และ Francois, 1997)

3.3.5.10 การวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล (Hounsa และคณะ, 1998)

3.3.5.11 การวิเคราะห์ปริมาณเออร์โกสเตอรอล (Arthington-Skaggs *et al.* 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

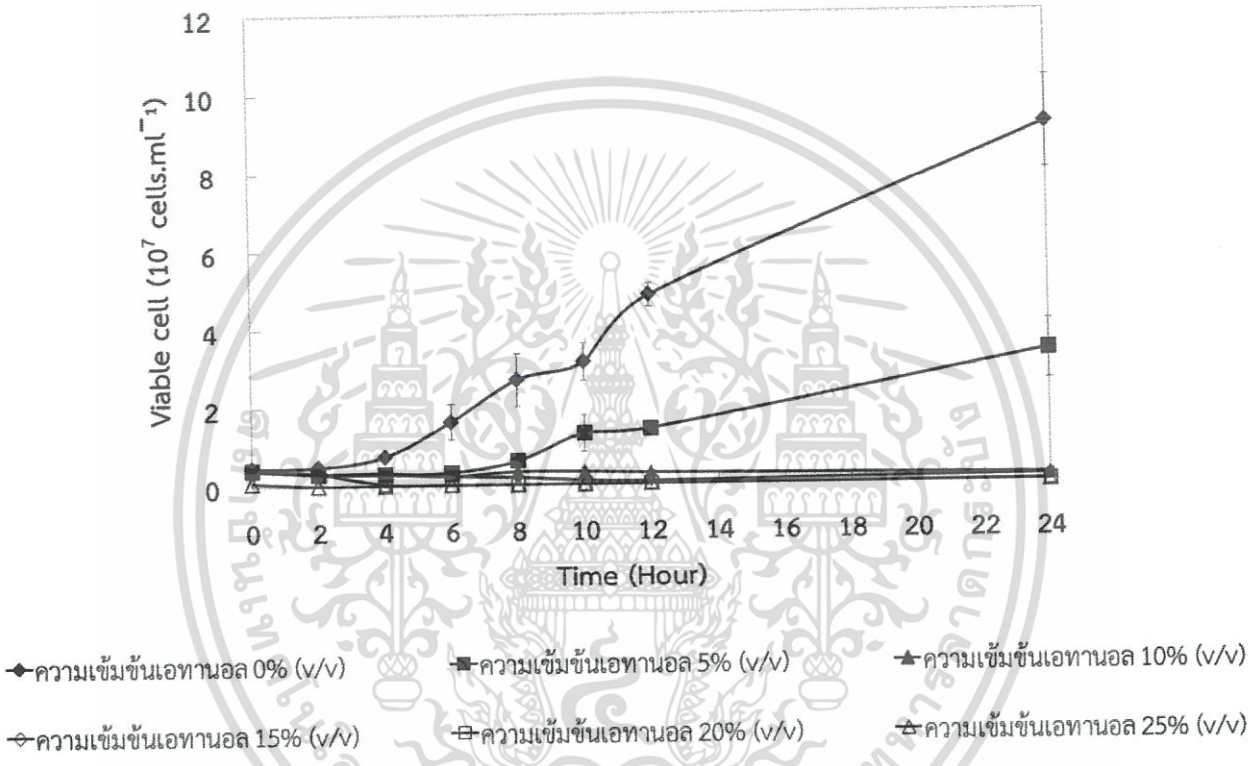
4.1 การศึกษาผลของความทนทานเอทานอลของ *S. cerevisiae* M30

การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาผลของความทนทานเอทานอลของ *S. cerevisiae* M30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยกำหนดความเข้มข้นของเอทานอลที่สภาวะแตกต่างกัน 5 สภาวะ ดังนี้ ความเข้มข้นเอทานอลที่ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยใช้ความเข้มข้นเอทานอลที่ 0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นตัวอย่างควบคุม

จากภาพที่ 4.1 จากการศึกษาพบว่า ที่ความเข้มข้นเอทานอล 0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เซลล์ใช้เวลาในระยะพักตัว 2 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 2 เซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ที่ความเข้มข้นเอทานอล 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เซลล์ใช้ระยะเวลาในการพักตัว 6 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 6 เซลล์มีชีวิตที่ความเข้มข้นเอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่เซลล์มีชีวิตที่ความเข้มข้นเอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 10 แล้วค่อยๆ ลดลง ที่ความเข้มข้นเอทานอล 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เซลล์ใช้เวลาในระยะพักตัว 6 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 6 เซลล์มีชีวิตจะค่อยๆ ลดลง ที่ความเข้มข้นเอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์โดย มีระยะพักตัว 2 ชั่วโมง แต่หลังจากชั่วโมงที่ 2 เซลล์ที่มีชีวิตค่อยๆ ลดลง และที่ความเข้มข้นเอทานอล 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เซลล์ไม่มีระยะพักและเซลล์มีชีวิตลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จึงจะเห็นได้ว่า ที่ความเข้มข้นของเอทานอลที่มาก เซลล์จะใช้เวลาในระยะพักมากกว่าที่ความเข้มข้นเอทานอลที่ต่ำกว่า ส่วนเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตดังภาพที่ 4.2 จะเห็นได้ว่ายิ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นเอทานอลที่สูงขึ้น เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* M30 จะยิ่งลดลง เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่า *S. cerevisiae* M30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ และมีความเข้มข้นเอทานอลที่ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตเหลือ เท่ากับ $9.14 \pm 1.17 \times 10^7$, $3.34 \pm 0.76 \times 10^7$, $0.18 \pm 0.08 \times 10^7$, $0.16 \pm 0.08 \times 10^7$, $0.01 \pm 0.01 \times 10^7$ และ $0.01 \pm 0.01 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เท่ากับ 94.29 ± 0.18, 88.79 ± 1.59, 37.87 ± 14.13, 33.28 ± 12.15, 2.38 ± 2.09 และ 1.53 ± 1.11 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งทำให้เห็นได้ว่า ความเข้มข้นของเอทานอลมีผลต่อการเจริญและการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ เนื่องจาก เซลล์ยีสต์สามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้อย่างจำกัด จึงไม่สามารถทนต่อความเข้มข้นเอทานอลที่สูงได้ เพราะเอทานอลมีผลให้ยีสต์ที่เจริญอยู่ในระยะแบ่งตัวทวีคูณมีอัตราการเจริญลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเอทานอลมีผลต่อการแบ่งเซลล์ ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA โปรตีน ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ ยับยั้งการหมัก โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายหรือมีคุณสมบัติเปลี่ยนไป เหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวของไขมัน

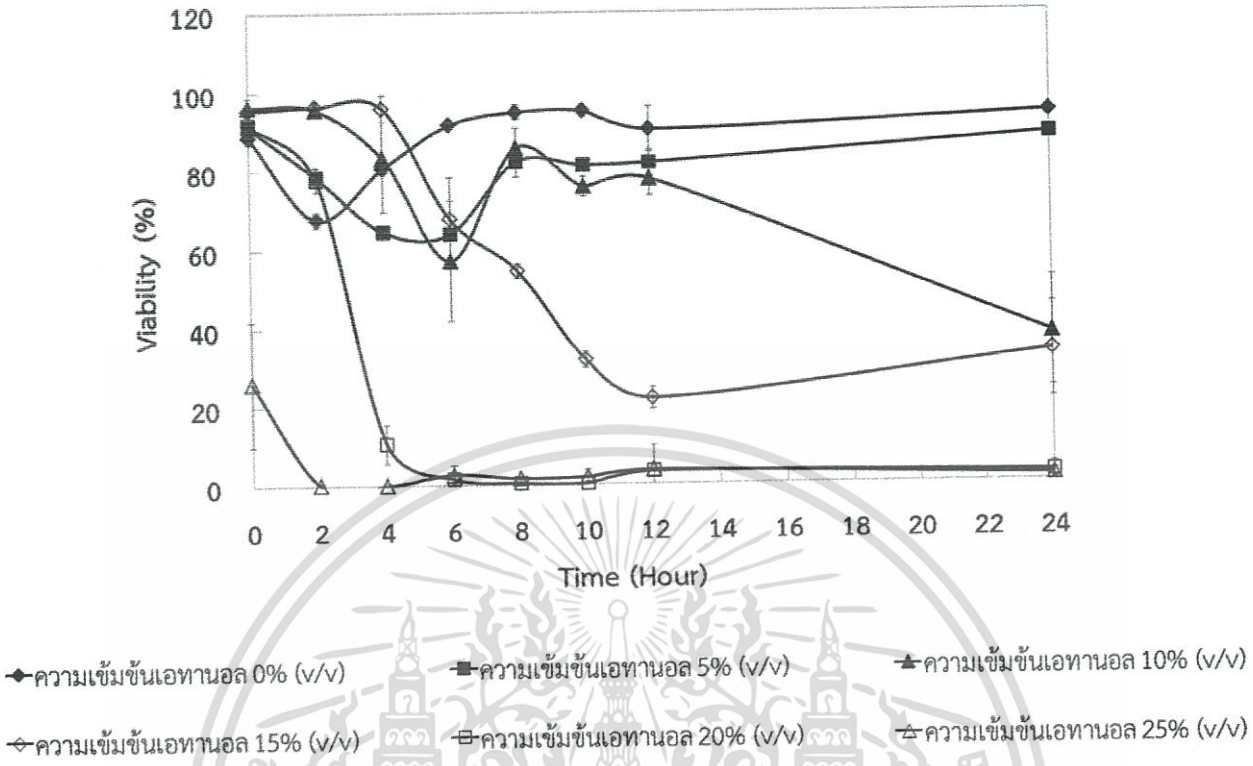
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งการขนถ่ายสารอาหารเข้าสู่เซลล์ เพิ่มความเป็นพิษของออกซิเจน และอาจมีผลต่อเอนไซม์ดีไฮโดรจิเนส (dehydrogenase) และเฮกโซไคเนส (hexokinase) ซึ่งการยับยั้งจะรุนแรงขึ้นเมื่อระดับของอุณหภูมิและความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้น (สาวิตรี, 2540; Walker, 1998) และยิ่งไปกว่านั้น ถ้ามีการเติมเอทานอลในระยะที่เซลล์แบ่งตัวทวีคูณ จะทำให้อัตราการเจริญของยีสต์ลดลงอย่างรวดเร็ว (อาจเป็นผลเนื่องมาจากการสังเคราะห์โปรตีน) ทำให้เซลล์ที่มีชีวิตลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ถูกทำให้เสียสภาพอย่างถาวร (ปฏิพล และคณะ, 2555) ส่งผลให้มีการเจริญลดลงและมีการตายมากขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงขึ้น



ภาพที่ 4.1 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของ *S. cerevisiae* M30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* M30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกัน

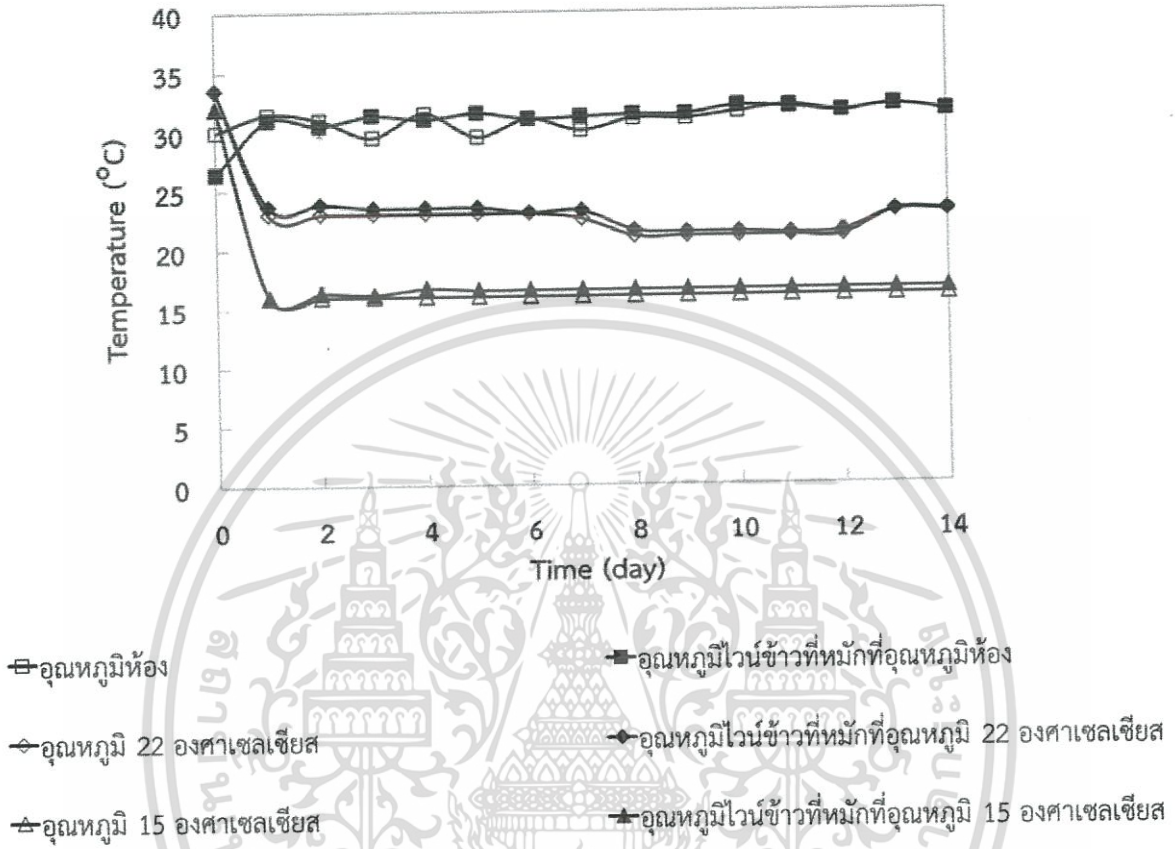
4.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการหมักไวน์ข้าว

4.2.1 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการหมักไวน์ข้าว

อุณหภูมิในการหมักไวน์ข้าวมีความสำคัญต่อการผลิตไวน์ข้าว เนื่องจาก ยีสต์จะสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสม ตามทฤษฎีแล้ว การหมักที่อุณหภูมิสูงจะส่งผลให้เกิดกระบวนการหมักที่รวดเร็วกว่าการหมักที่อุณหภูมิต่ำ โดยในการทดลองนี้ได้ทำการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ซึ่งวัดอุณหภูมิไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิต่างๆ โดยการจุ่มเทอร์โมมิเตอร์ลงในภาชนะที่บรรจุไวน์ข้าว และทำการวัดอุณหภูมิห้องโดยการจุ่มเทอร์โมมิเตอร์ลงในภาชนะที่บรรจุน้ำแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิที่ทำการหมัก เมื่อทำการเปรียบเทียบกับอุณหภูมิของไวน์ข้าวที่อยู่ในระหว่างการหมัก (ภาพที่ 4.3) พบว่า อุณหภูมิการหมักไวน์ข้าวสูงกว่าอุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 องศาเซลเซียส เนื่องจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกระบวนการหมักจะเกิดพลังงานความร้อนขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการที่เซลล์ยีสต์ใช้น้ำตาลไปใช้ในการสร้างแอลกอฮอล์ (ลูกจันทร์, 2551)



ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

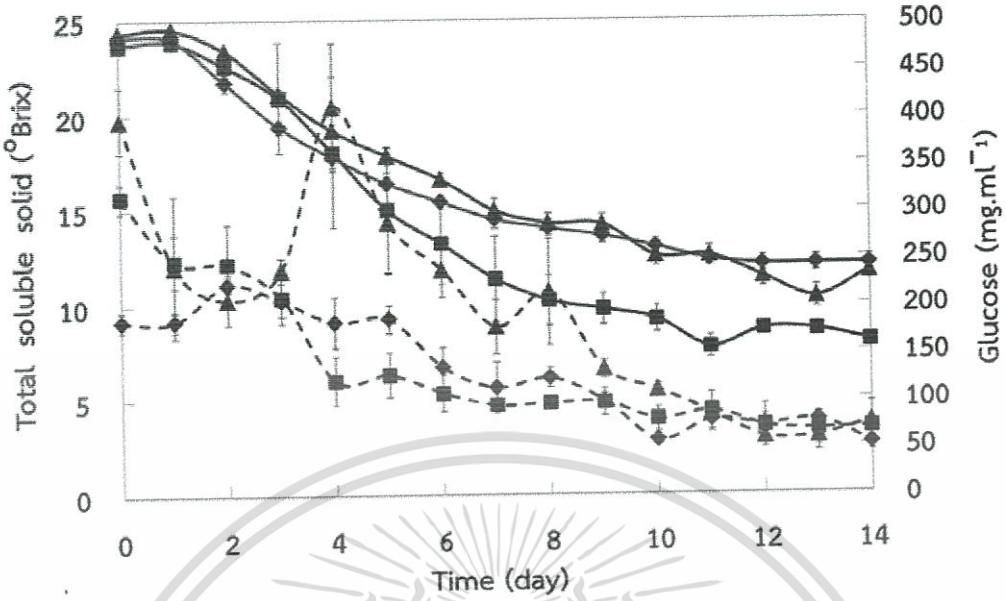
4.2.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมักไวน์ข้าว

ในขั้นตอนการทำไวน์ข้าว จะมีการเติมกล้าเชื้อรา *Amylomyces* sp. เพื่อใช้ในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ได้น้ำหวาน เรียกว่า น้ำต้อย โดยก่อนการผ่าส่า ได้นำน้ำต้อยนี้มาวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 30.47 ± 0.42 องศาบริกซ์ หรือในรูปปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 833.20 ± 12.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 35.07 ± 0.12 องศาบริกซ์ หรือในรูปปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 315.64 ± 16.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลาย เท่ากับ 34.20 ± 0.60 องศาบริกซ์ หรือในรูปปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 321.06 ± 46.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลาย และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แสดงในภาพที่ 4.4 ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลโดยจะเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และผลพลอยได้อื่นๆ เมื่อเวลาผ่านไป พบว่า การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้จะลดลงจากเริ่มต้น 23.73 ± 0.31 องศาบริกซ์ เหลือเพียง 8.00 ± 0.00 องศาบริกซ์ หรือ ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์จาก 313.09 ± 15.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เหลืออยู่ 68.60 ± 24.99 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ปริมาณของแข็งที่ละลายได้จะลดลงจากเริ่มต้น 24.30 ± 0.31 องศาบริกซ์ เหลือเพียง 12.07 ±0.42 องศาบริกซ์ หรือในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ จาก 183.08 ±10.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เหลืออยู่ 51.65 ± 4.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ปริมาณของแข็งที่ละลายได้จะลดลงจากเริ่มต้น 24.33 ± 0.12 องศาบริกซ์ เหลือเพียง 11.67 ± 0.48 องศาบริกซ์ หรือในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ จาก 395.08 ± 34.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เหลืออยู่ 74.13 ±20.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กิจกรรมการเผาผลาญที่อุณหภูมิต่ำโดยทั่วไปก่อให้เกิดการสังเคราะห์แอลกอฮอล์ที่ต่ำกว่า ตรงกันข้ามที่อุณหภูมิสูงกว่าจะเร่งให้เกิดการสร้างแอลกอฮอล์ที่มากที่สุดของกระบวนการหมัก (Liu *et al.*, 2013) จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าในช่วงแรก ไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และ 22 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงมากกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากภาพที่ 4.10 การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีการนำน้ำตาลกลูโคสไปสะสมอยู่ในรูปของไกลโคเจนมากที่สุดในวันที่ 1 จากภาพที่ 4.12 ไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส มีการนำน้ำตาลกลูโคสไปสะสมอยู่ในรูปของกลีเซอรอลมากที่สุดในวันที่ 1 และจากภาพที่ 4.15 มีการนำน้ำตาลกลูโคสไปสะสมอยู่ในรูปของทรีฮาโลสมากที่สุดในวันที่ 1 และการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นหลังจากวันที่ 1 แล้วลดลงในวันที่ 2 เช่นเดียวกับการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นหลังจากวันที่ 3 และลดลงในวันที่ 4 อาจเนื่องมาจากการที่เชื้อรายังสามารถย่อยแป้งเป็นน้ำตาลได้อยู่และยีสต์สามารถดึงน้ำตาลไปใช้ได้ช้า อย่างไรก็ตาม หลังจากวันที่ 3 การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องมีการลดลงเร็วกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส อาจเนื่องจากอัตราการหมักที่อุณหภูมิต่ำ เซลล์จุลินทรีย์สามารถนำน้ำตาลมอลโตสและมอลตาไตรโอสไปใช้ได้อย่างช้าๆ ซึ่งสังเกตได้จากน้ำตาลมอลโตสและมอลตาไตรโอสที่เหลืออยู่มาก (Liu *et al.*, 2013) จึงทำให้การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง ยีสต์มีการดึงน้ำตาลไปใช้ได้เร็วกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ทั้งนี้น้ำตาลที่หายไป ยีสต์ไม่ได้ใช้เพื่อผลิตแอลกอฮอล์ทั้งหมด โดยยีสต์จะนำน้ำตาลส่วนหนึ่งไปใช้ในการเจริญเติบโต บางส่วนจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ผลพลอยได้อื่นๆ เช่น กลีเซอรอล เอสเทอร์ ฟูเซลออยล์ และกรด (สร้อยสุดา, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดที่อุณหภูมิห้อง
ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่อุณหภูมิห้อง
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส
ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส
ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 4.4 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้และน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

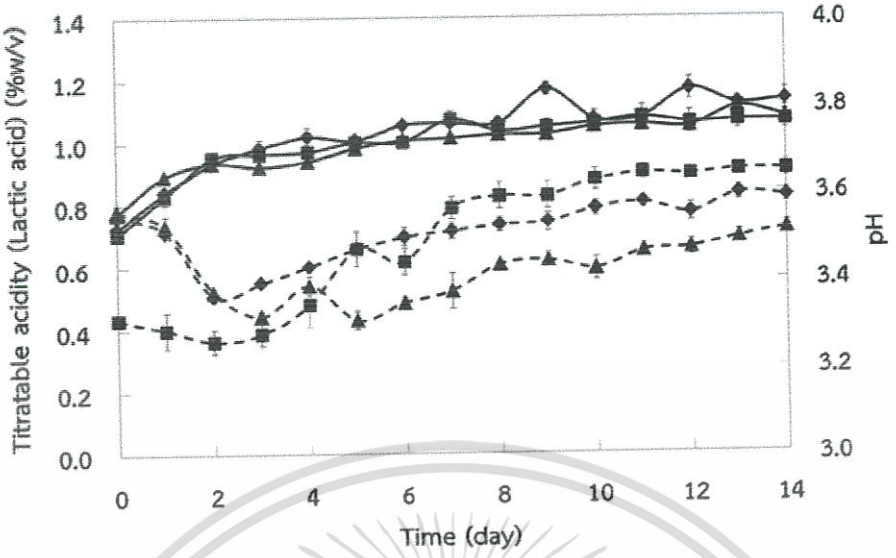
4.2.3 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดในระหว่างการหมักไวน์ข้าว

ในระหว่างกระบวนการหมักไวน์ข้าว ได้มีการติดตามผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก ดังแสดงในภาพที่ 4.5 จากการศึกษา พบว่า เมื่อเติมเชื้อยีสต์ลงไปหมัก ปริมาณกรดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการหมักไวน์ข้าว จากนั้นจะค่อนข้างคงที่ โดยยีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และมีกรดต่างๆ เกิดขึ้นในวัฏจักรเครป ได้แก่ กรดซัคซินิค กรดมาลิก กรดแลคติก และกรดซิตริก (Fleet, 1992) โดยกรดซัคซินิค และกรดแลคติกมีปริมาณใกล้เคียงกันและรวมกันมีปริมาณคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ของกรดอินทรีย์ทั้งหมด (Kodama and Yoshizawa, 1977) จึงทำให้การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชที่ลดลง โดยค่าพีเอชมีความสำคัญอย่างมากโดยเฉพาะการผลิตเอทานอล เนื่องจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีสต์เจริญดีที่พีเอชระหว่าง 4.5 – 6.5 แต่การเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดหรือด่างขึ้นอยู่กับสปีชีส์ (Walker, 1998) ทั้งนี้อัตราการเจริญของ *S. cerevisiae* จะลดลงเมื่อพีเอชลดลง จาก 3.5 เป็น 3.0 และยีสต์ชนิดอื่นๆ ก็มีแนวโน้มเช่นเดียวกัน (ฉัตรชัย และจีราภรณ์, 2547) จากภาพที่ 4.5 พบว่า เมื่อการหมักดำเนินต่อไปจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ค่าพีเอชที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของค่าพีเอชหลังจากการหมักเอทานอลนี้ อาจมีสาเหตุมาจากความเครียด เช่น การเพิ่มอุณหภูมิ และความเข้มข้นของเอทานอล (Lentini *et al.*, 2003) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง ยีสต์จะนำน้ำตาลไปผลิตแอลกอฮอล์ได้มากที่สุด (ดังภาพที่ 4.6) จึงส่งผลให้มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับค่าพีเอชที่อุณหภูมิห้อง ที่มีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และ 15 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติกในทั้ง 3 สภาวะ มีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มสูงขึ้น เป็นผลมาจากการที่เชื้อราที่ใช้ในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลสามารถสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริก และกรดแลคติกได้ ซึ่งทำให้เกิดรสเปรี้ยวในไวน์ข้าว (สร้อยสุดา, 2546) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก พบว่า ไวน์ข้าวที่ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติกมากที่สุด เท่ากับ 1.13 ± 0.04 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และมีค่าพีเอชที่สูงที่สุด เท่ากับ 3.65 ± 0.02 ส่วนไวน์ข้าวที่ทำการหมักที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติกน้อยที่สุด เท่ากับ 1.08 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และมีค่าพีเอชน้อยที่สุด เท่ากับ 3.51 ± 0.02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



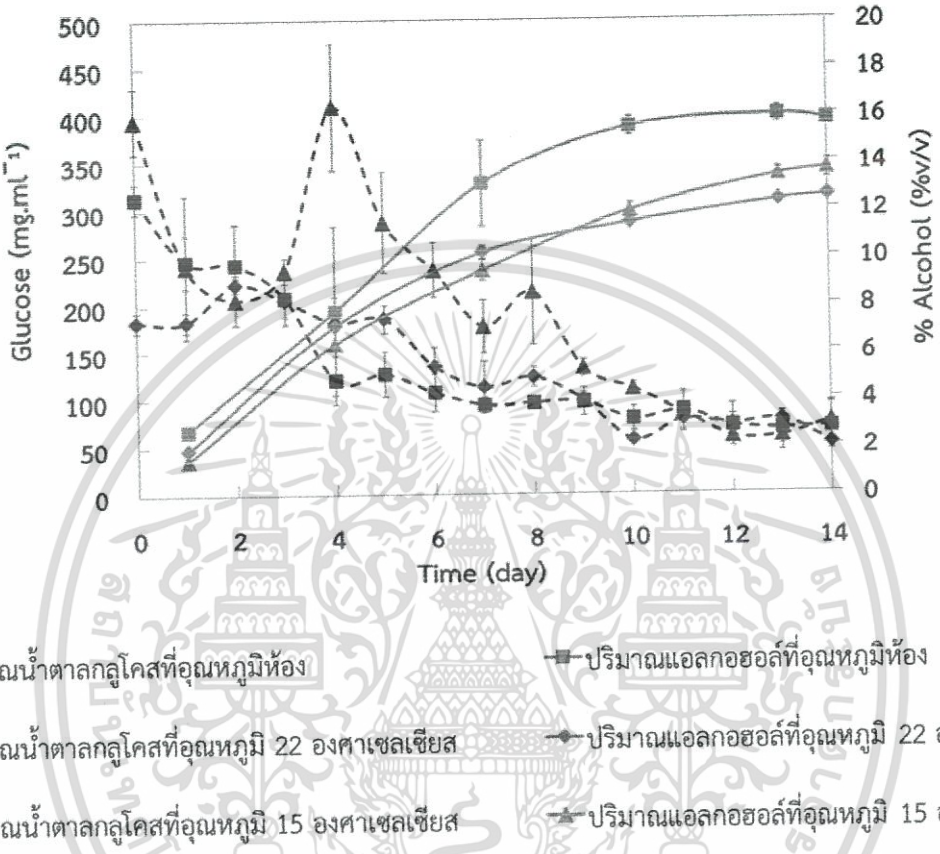
ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติกระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

4.2.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว

จากภาพที่ 4.6 แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส โดยพบว่า มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักจนกระทั่งสิ้นสุดการหมักใน 14 วัน โดยการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องมีปริมาณแอลกอฮอล์วันสุดท้ายอยู่ที่ 15.76 ± 0.18 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในขณะที่การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส มีปริมาณแอลกอฮอล์วันสุดท้ายอยู่ที่ 12.52 ± 0.16 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีปริมาณแอลกอฮอล์วันสุดท้ายอยู่ที่ 13.64 ± 0.40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยทั่วไป ที่อุณหภูมิต่ำก่อให้เกิดการสังเคราะห์แอลกอฮอล์ได้ช้าลง ตรงกันข้ามที่อุณหภูมิสูงกว่าจะเร่งให้เกิดการสร้างแอลกอฮอล์ที่มากที่สุดของกระบวนการหมัก (Liu *et al.*, 2013) จากการศึกษา พบว่าที่อุณหภูมิห้องมีปริมาณแอลกอฮอล์ที่มากกว่าอุณหภูมิ 22 องเซลเซียส และ 15 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงเร็วกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นเป็นผลผลิตหลักของกระบวนการหมัก โดยยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลฟรุคโตสให้เป็นแอลกอฮอล์ และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยตามทฤษฎีจะได้แอลกอฮอล์ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณน้ำตาลที่ใช้ อย่างไรก็ตาม ในทางปฏิบัติมักได้ไม่ถึง เพราะจะเกิดผลพลอยได้เป็นสารให้กลิ่นรสอีกหลายชนิด (เจริญ, 2553)



ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณแอลกอฮอล์ในการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

4.2.5 การเจริญและการรอดชีวิตของเชื้อยีสต์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว

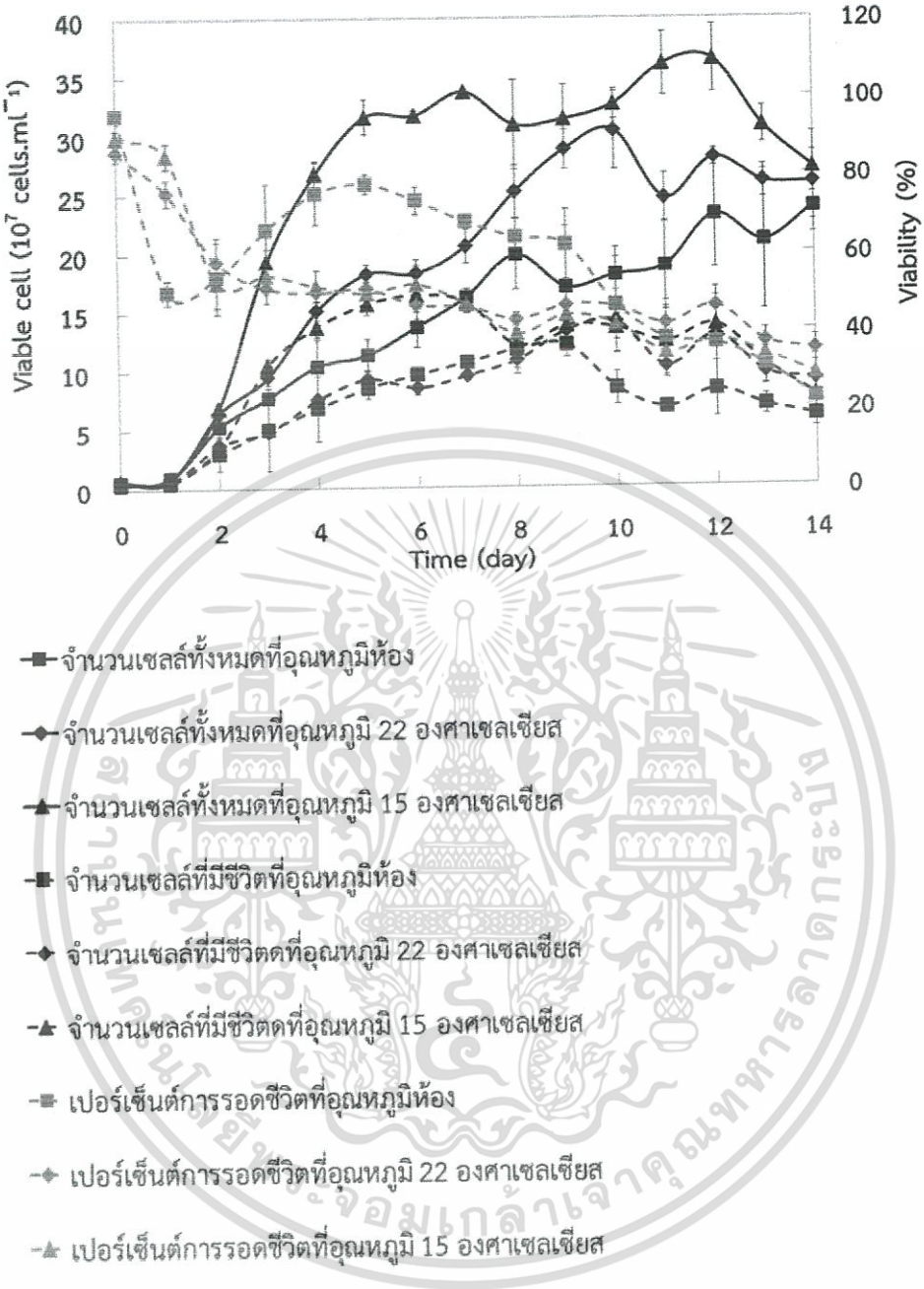
จากการศึกษาได้ทำการติดตามค่าการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวในรูปของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ดังภาพที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่า การหมักไวน์ข้าวทั้ง 3 อุณหภูมิ เชื้อยีสต์เพิ่มจำนวนเซลล์ที่ต่ำในช่วงวันแรกของการหมัก เนื่องมาจากเชื้อยีสต์อยู่ในระหว่างการปรับสภาพจากอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่มีปริมาณกลูโคสเพียง 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มาสู่น้ำหมักไวน์ข้าว ซึ่งมีปริมาณกลูโคสสูงมาก ในระหว่างนี้ เชื้อยีสต์จะปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ และมีการสังเคราะห์โพรโทพลาสซึม เอนไซม์ โคเอนไซม์ ดีเอนเอ และอาร์เอนเอ เพื่อให้เพียงพอต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ จากนั้นเชื้อยีสต์จะมีการเจริญและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว โดยมีการเจริญแบบทวีคูณ ในการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องเชื้อยีสต์มีการเจริญอย่างรวดเร็วในระหว่างวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 ของการหมักไวน์ข้าว จากนั้นอัตราเร็วในการเจริญของเชื้อยีสต์จะลดลงในระหว่างวันที่ 6 ถึงวันที่ 9 ของการหมักไวน์ข้าว ในขณะที่การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส มีการเจริญอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 5 ของการหมักไวน์ข้าว และลดลงเล็กน้อยในวันที่ 6 ของการหมักไวน์ข้าว จากนั้นเพิ่มขึ้นในวันที่ 7 ของการหมักไวน์ข้าว แต่อัตราเร็วในการเจริญของเชื้อยีสต์ลดลงจนถึงวันที่ 9 ของการหมักไวน์ข้าว ส่วนการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีการเจริญอย่างรวดเร็วในระหว่างวันที่ 1 ถึงวันที่ 4 ของการหมักไวน์ข้าว จากนั้นอัตราเร็วในการเจริญของเชื้อยีสต์จะลดลงจนถึงวันที่ 7 ของการหมักไวน์ข้าว หลังจากวันดังกล่าว พบว่า ทั้ง 3 อุณหภูมิมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตมีจำนวนลดน้อยลง (ภาพที่ 4.6) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและแอลกอฮอล์คงที่ (ภาพที่ 4.6) และยังพบอีกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ในช่วงวันที่ 2 ถึงวันที่ 8 มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นผลมาจากปริมาณเอทานอลในช่วงวันที่ 2 ถึงวันที่ 8 ของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณน้อยที่สุด (ภาพที่ 4.6) โดยปริมาณเอทานอลที่สูงเป็นปัจจัยทำให้การอยู่รอดของเซลล์มีอย่างจำกัด (Galeote *et al.*, 2001; Aguilera *et al.*, 2006)

เมื่อพิจารณาในรูปของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต พบว่า ภายหลังจากการเติมกล้าเชื้อยีสต์ ยังคงมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสเท่ากับ 95.58 ± 0.6, 86.12 ± 2.25 และ 89.82 ± 1.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และค่าดังกล่าวลดลงอย่างรวดเร็วจนเหลือเพียง 50.25 ± 3.06 เปอร์เซ็นต์ ของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องวันที่ 1 ส่วนการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ลดลงเพียงเล็กน้อยในวันแรก จากนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้อยีสต์สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ได้แล้ว โดยมีค่าประมาณ 77.65 ± 2.44 และ 50.77 ± 1.11 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 5 ของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ 51.84 ± 4.95 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 ของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่า การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อยีสต์สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ได้แล้ว เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมีค่ามากกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ในช่วง 25 - 30 องศาเซลเซียส (Banat *et al.*, 1992; Abdel-Fattha *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตาม ค่าดังกล่าวนี้กลับลดลงอย่างช้าๆหลังจากวันที่กล่าวไปในข้างต้นของแต่ละอุณหภูมิของการหมักไวน์ข้าวจนสิ้นสุดการหมัก แต่ที่การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องหลังจากวันที่ 9 ของการหมักไวน์ข้าว มีการลดลงของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอย่างรวดเร็วเมื่อสิ้นสุดการหมัก และพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เหลืออยู่เพียง 22.32 ± 5.15, 34.84 ± 3.33 และ 28.30 ± 0.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตนี้มีความสำคัญที่สามารถบอกได้ถึงความแข็งแรงของเซลล์ยีสต์ การที่มีจำนวนเซลล์มีชีวิตต่ำลง เนื่องจากสภาวะเครียดจากหลายสาเหตุในระหว่างการหมักไวน์ข้าว ในช่วงแรกสภาวะเครียดมาจากการที่เชื้อต้องเผชิญกับสภาวะที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงมาก ซึ่งเป็นสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกที่สูง เมื่อเทียบกับช่วงแรกที่ยีสต์ถูกเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ YM ซึ่งน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นเพียง 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ก่อนที่จะถูกถ่ายเชื้อมายังน้ำหมักไวน์ข้าว หลังจากนั้นแรงดันออสโมติกในระบบจะลดลงเนื่องจากน้ำตาลถูกใช้ไป แต่ระบบกลับมีการสะสมความร้อนร่วมกันกับมีสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เกิดขึ้น อาทิเช่น เอทานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิในการหมัก หรืออาหารที่มีอยู่เริ่มหมดไป อีกทั้งในระบบมีเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตาม เซลล์ยีสต์มีการตอบสนองต่อความเครียดดังกล่าวโดยการสะสมสารต่างๆ ภายในเซลล์ สารแต่ละตัวจะสามารถตอบสนองต่อความเครียดที่แตกต่างกัน ในหัวข้อถัดไปจะกล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงของสารสะสมดังกล่าวต่อการตอบสนองความเครียดที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักไวน์ที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 4.8 แสดงลักษณะของไวน์ข้าวที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิห้อง (ก) อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส (ข) และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (ค) เป็นเวลา 14 วัน โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 พบว่าระหว่างการหมักไวน์ข้าวในทุกสภาวะ ข้าวจะลอยตัวอยู่บนผิวหน้าของไวน์ข้าว เนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดระหว่างการหมักจะทำให้กากข้าวลอยขึ้นสู่ผิวหน้าของไวน์ข้าว เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักแล้ว กากข้าวจะตกลงสู่ก้นของภาชนะ จากภาพที่ 4.8 จะเห็นว่า ไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิห้อง (ก) กากข้าวจะถูกย่อยได้ดีกว่าไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส (ข) และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (ค) และกากข้าวทั้งหมดจะตกลงสู่ก้นของภาชนะ แต่ไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส (ข) และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (ค) ยังคงมีข้าวบางส่วนที่ยังลอยตัวอยู่บนผิวหน้าของไวน์ข้าว และมีบางส่วนที่ตกลงสู่ก้นของภาชนะ เนื่องจากมีการหมักที่ช้ากว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง (ก)

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 4.8 ไวน์ข้าวที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิห้อง (ก), อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส (ข) และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (ค) เป็นเวลา 14 วัน โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก

อุณหภูมิที่ทำการหมัก / องค์ประกอบทางเคมี	อุณหภูมิห้อง	อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส	อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์)	8.00 ± 0.00	12.07 ± 0.42	11.67 ± 0.46
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	68.60 ± 24.99	51.65 ± 4.44	74.13 ± 20.74
ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	1.07 ± 0.03	1.13 ± 0.04	1.08 ± 0.03
ค่าพีเอช	3.65 ± 0.02	3.59 ± 0.02	3.51 ± 0.02
ปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	15.76 ± 0.18	12.52 ± 0.16	13.64 ± 0.40

หมายเหตุ – ข้อมูลในตารางแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

4.2.6 การเปลี่ยนแปลงของสารสะสมการตอบสนองความเครียดที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง

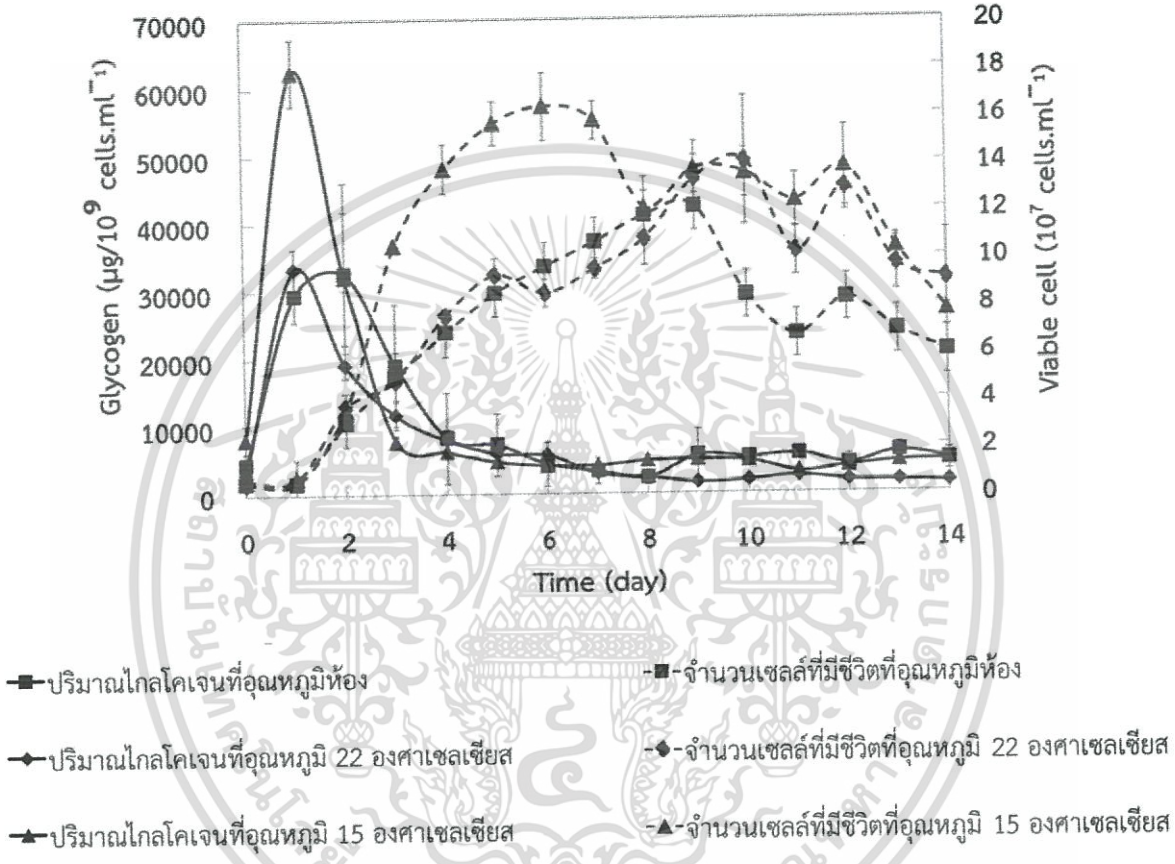
4.2.6.1 ไกลโคเจน

จากการทดลองได้ทำการติดตามผลการเปลี่ยนแปลงของสารไกลโคเจนในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ผลการทดลองที่ได้ติดตาม แสดงดังภาพที่ 4.9 และ 4.10

จากภาพที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของสารไกลโคเจนในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ซึ่งสารดังกล่าวทำหน้าที่เป็นพลังงานสะสมของเซลล์ยามที่เซลล์อยู่ในระยะพักตัวและยามที่ขาดแคลนอาหาร จากการศึกษาจึงพบว่า ในช่วงแรกของการหมักไม่พบการเพิ่มจำนวนของเชื้อ (ภาพที่ 4.9) อันเนื่องมาจากอยู่ในระยะปรับตัวซึ่งเซลล์นั้นยังไม่สามารถนำน้ำตาลที่มีอยู่ไปใช้ได้ อย่างไรก็ตาม ยีสต์สามารถนำไกลโคเจนซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตสำรองภายในเซลล์ และเป็นแหล่งพลังงานสำคัญสำหรับการทำงานของเซลล์ในระยะการปรับตัวไปใช้ได้ ทั้งนี้ไกลโคเจนที่เก็บสะสมไว้สามารถย่อยสลายได้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งถูกนำมาใช้โดยเซลล์ยีสต์สำหรับการขยายพันธุ์ (Smagalski, 2007) อย่างไรก็ตาม จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงของไกลโคเจนในช่วงแรก ไม่พบว่าเชื้อมีปริมาณไกลโคเจนที่ลดลง อาจเนื่องมาจากระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารไกลโคเจนทิ้งช่วงนานเกินไป (ทุก 24 ชั่วโมง) ซึ่งการตอบสนองต่อช่วงระยะพักอาจเกิดขึ้นในเวลาที่รวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตาม การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อสามารถสะสมไกลโคเจนมากกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง ตามลำดับ อาจเนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ในช่วง 25 - 30 องศาเซลเซียส (Banat *et al.*, 1992; Abdel-Fattha *et al.*, 2000) จึงทำให้การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีการสะสมไกลโคเจนมากที่สุดเพื่อนำไปใช้ในการปรับตัวกับสภาพอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเพื่อให้ดำรงชีวิตอยู่ได้

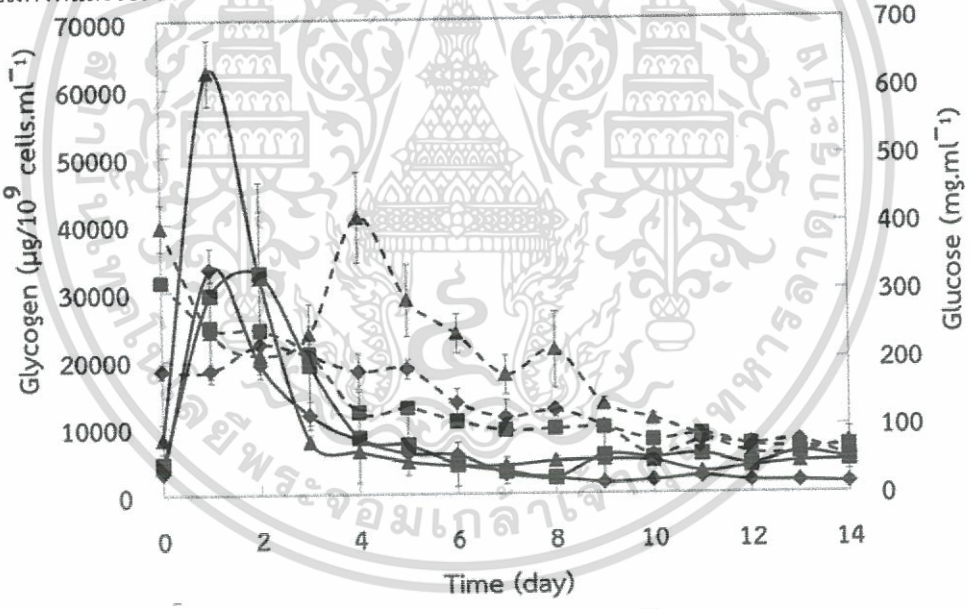


ภาพที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไกลโคเจนและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

นอกจากนี้ จากการศึกษายังพบว่า ยีสต์มีการสะสมน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในกระบวนการหมักไว้ในรูปของไกลโคเจน จากภาพที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่าในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง เซลล์มีการสะสมไกลโคเจนจากน้ำตาลกลูโคสในสองวันแรกของการหมัก (32,670.15 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) จึงเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้น้ำตาลในระบบลดลงนอกเหนือจากเชื้อได้นำไปใช้ในการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ ภายหลังจากวันที่ 3 พบว่า เซลล์นำไกลโคเจนไปใช้ มีการรายงานว่า ยีสต์จะนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไกลโคเจนไปใช้ในยามที่เซลล์เกิดการขาดแคลนน้ำตาล หรือในยามที่ระบบมีน้ำตาลลดน้อยลง โดยยีสต์จะทำการสลายไกลโคเจนกลับมาเป็นน้ำตาลกลูโคสเพื่อให้ยีสต์นำไปใช้ต่อไป (Steward and Russell, 1993) ในขณะที่การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เซลล์มีการสะสมไกลโคเจนจากน้ำตาลกลูโคสในวันแรกของการหมัก เท่ากับ 33,293.38 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 62,404.72 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาของ Novo และคณะ (2003) พบว่า การหมักที่ 25 องศาเซลเซียส เริ่มแรกไกลโคเจนจะมีปริมาณลดลงระหว่างการหมักในวันแรก สำหรับการหมักที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส ไกลโคเจนใช้เวลานานในการสลายตัว และความเข้มข้นของไกลโคเจนจะค่อยๆ ลดลงจนกระทั่งถึงวันที่ 4 ของกระบวนการหมัก โดยจะเห็นได้ว่า จากข้อมูลการศึกษาข้างต้น มีความใกล้เคียงกับด้านอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษา สามารถกล่าวได้ว่า การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีการสะสมไกลโคเจนมากกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องและที่ 22 องศาเซลเซียส อาจมาจากการที่อุณหภูมิต่ำมีการสลายไกลโคเจนที่ช้ากว่า จึงพบปริมาณไกลโคเจนที่หลงเหลือหลังจากช่วงระยะพักมากกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองยังพบว่า การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ในวันที่ 9 ของการหมัก ปริมาณไกลโคเจนเริ่มคงที่และเซลล์มีชีวิตลดลง เนื่องจากสภาวะที่อาหารหมดและไกลโคเจนที่สะสมไว้มีน้อยลง



ภาพที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไกลโคเจนและน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการหมักโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

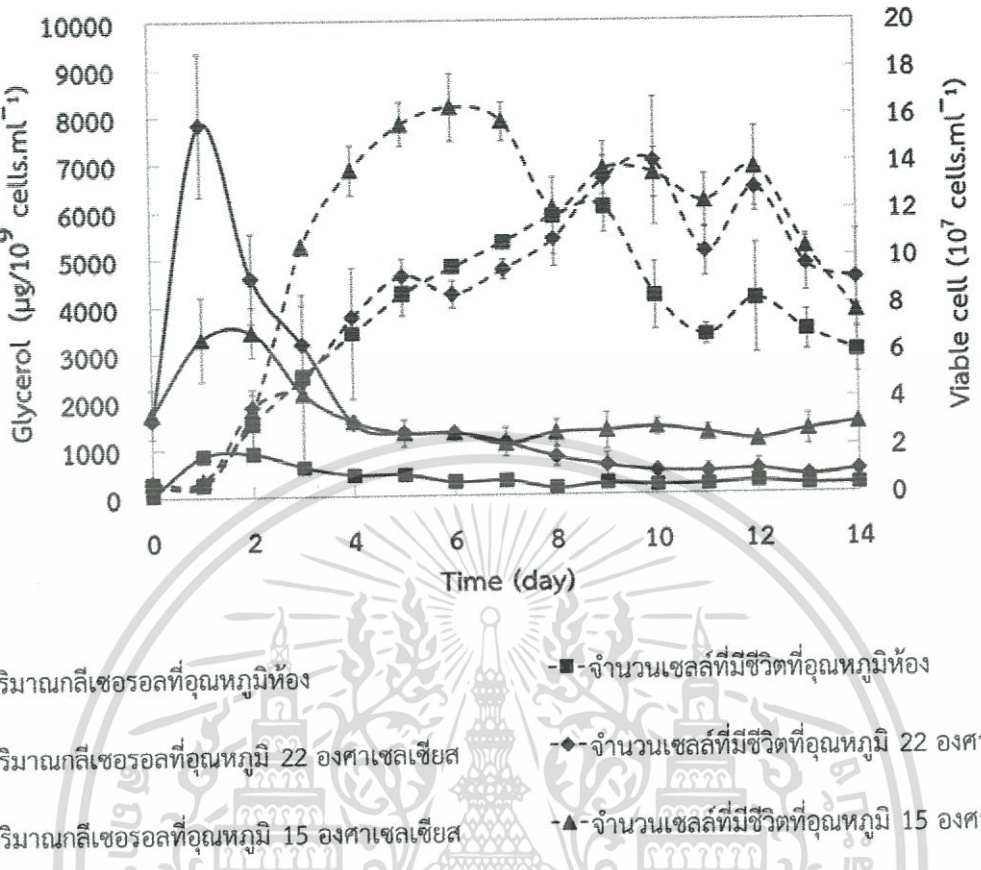
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.6.2 กลีเซอรอล

กลีเซอรอลเป็นสารสำคัญในส่วนประกอบยีสต์ ไม่เพียงแต่ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เกิดสภาวะขาดน้ำและเหี่ยว แต่ยังช่วยในการเผาผลาญและสังเคราะห์ทำให้เกิดการบำรุงรักษาของสาร และควบคุมสมดุลของการถ่ายโอนอิเล็กตรอน นอกจากนี้ กลีเซอรอลยังเป็นสารตั้งต้นของสารฟอสฟอลิปิดซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อผนังเซลล์ (Ansell *et al.*, 1997) การติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลีเซอรอลในเซลล์ยีสต์ระหว่างการหมักไวน์ข้าว แสดงในภาพที่ 4.11 , 4.12 และ 4.13

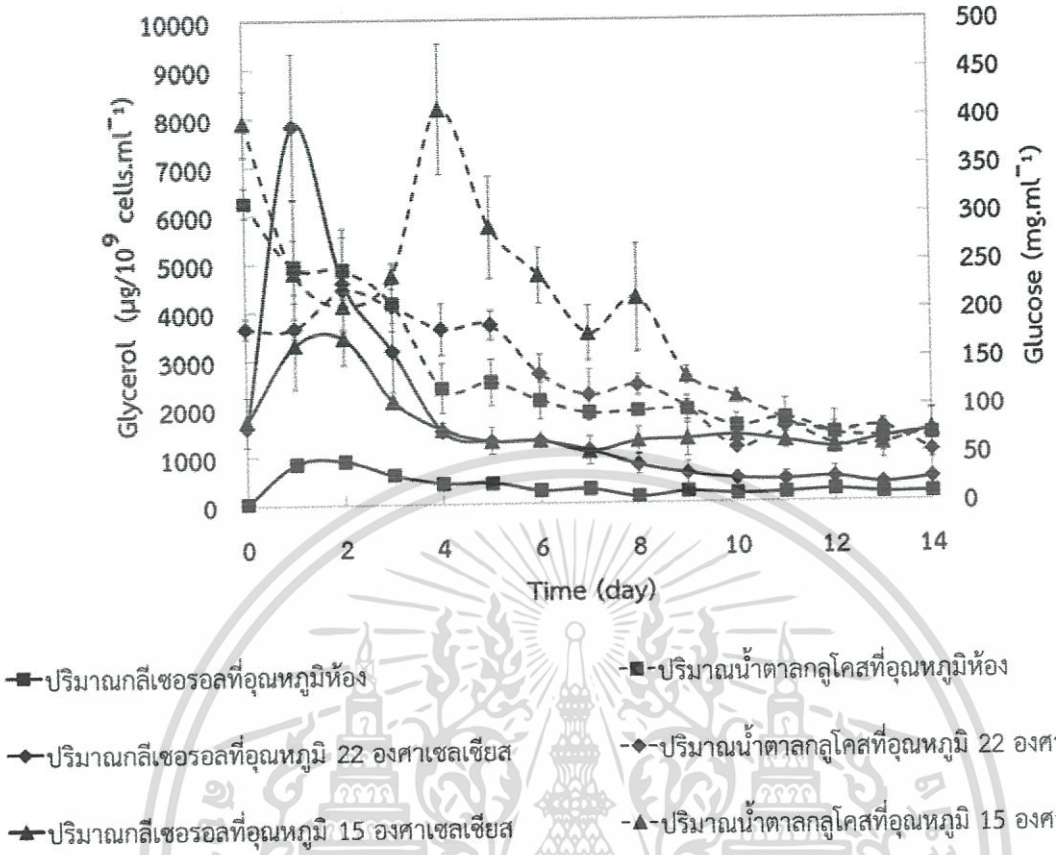
จากการศึกษาพบว่า การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เซลล์ยีสต์เริ่มมีการสะสมกลีเซอรอลภายในเซลล์ตั้งแต่วันที่ 0 ของการหมักไวน์ข้าว และมีปริมาณกลีเซอรอลสูงที่สุดในวันที่ 2 ของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เท่ากับ 904.44 ± 16.14 และ 3,452.17 ± 534.50 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณกลีเซอรอลที่สูงที่สุดของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส คือ วันที่ 1 ของการหมักไวน์ข้าว มีค่าเท่ากับ 7,833.43 ± 1,505.78 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นค่าดังกล่าวจะลดลง เนื่องจากยีสต์นำน้ำตาลไปใช้จึงทำให้แรงดันออสโมติกภายนอกลดลง ทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงขึ้น (ดังภาพที่ 4.11) ส่วนปริมาณกลีเซอรอลที่สูงที่สุดของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส คือ วันที่ 1 ของการหมักไวน์ข้าว มีค่าเท่ากับ 7,833.43 ± 1,505.78 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเป็นปริมาณกลีเซอรอลที่สูงที่สุด เมื่อเทียบกับทั้ง 3 อุณหภูมิ อาจเนื่องมาจากช่วงแรก ยีสต์ของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นำกลูโคสไปใช้ได้ไม่ดี ซึ่งดูได้จากค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในวันที่ 0 ถึงวันที่ 1 มีค่าที่คงที่ (ดังภาพที่ 4.11) ดังนั้นยีสต์จึงสะสมกลีเซอรอลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และยังสะสมกลีเซอรอลเนื่องจากมีแรงดันออสโมติกสูงอีกด้วย (Ansell *et al.*, 1997) หลังจากนั้น ค่าดังกล่าวจะลดลง เช่นเดียวกับการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เมื่อการหมักดำเนินการได้ระยะหนึ่ง พบว่า ปริมาณสารกลีเซอรอลมีการสะสมอีกครั้ง โดยการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องมีปริมาณกลีเซอรอลจาก 130.75 ± 11.57 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของวันที่ 8 เพิ่มขึ้นเป็น 228.25 ± 8.79 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของวันที่ 9 ส่วนการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส มีปริมาณกลีเซอรอลจาก 364.60 ± 77.42 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของวันที่ 13 เพิ่มขึ้นเป็น 466.62 ± 109.15 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของวันที่ 14 และการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีปริมาณกลีเซอรอลจาก 1,067.34 ± 126.45 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของวันที่ 7 เพิ่มขึ้นเป็น 1,287.37 ± 274.89 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของวันที่ 8 ที่ปริมาณกลีเซอรอลนี้มีการสะสมอีกครั้ง อาจเนื่องมาจากในระบบมีปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงขึ้น(ดังภาพที่ 4.13) ซึ่งกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้จากการย่อยน้ำตาลเป็นเอทานอล (Van Dijken *et al.*, 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



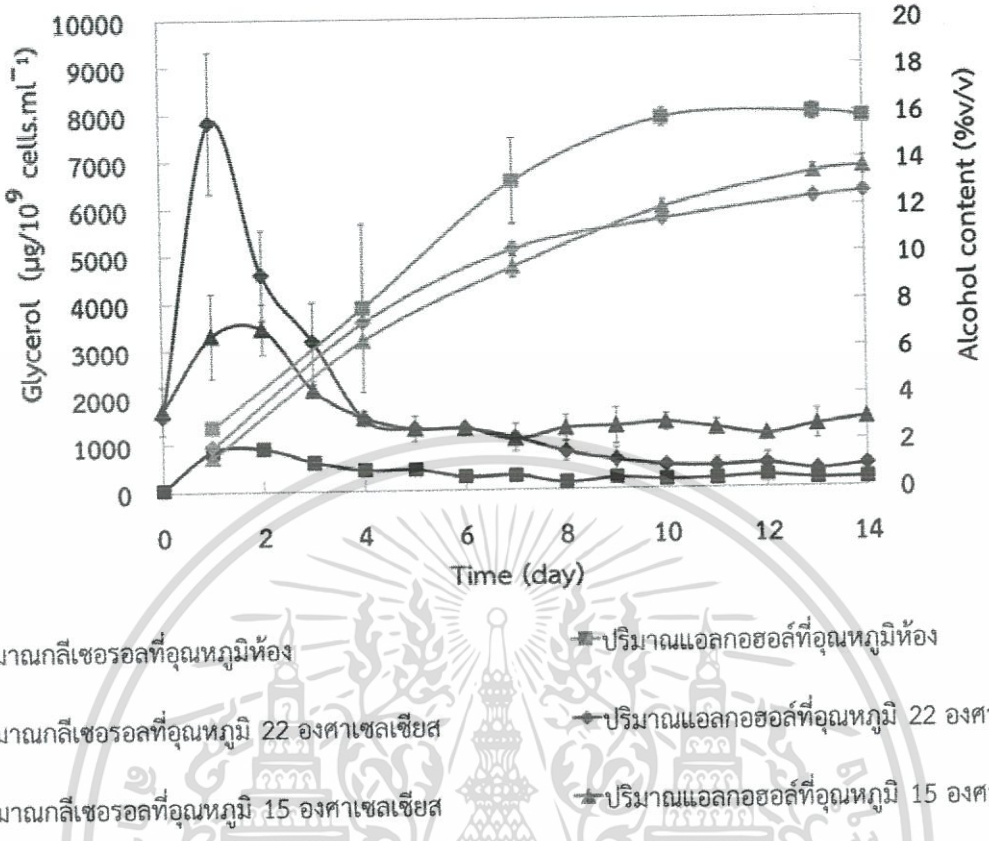
ภาพที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลีเซอรอลและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลีเซอรอลและน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลีเซอรอลและแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

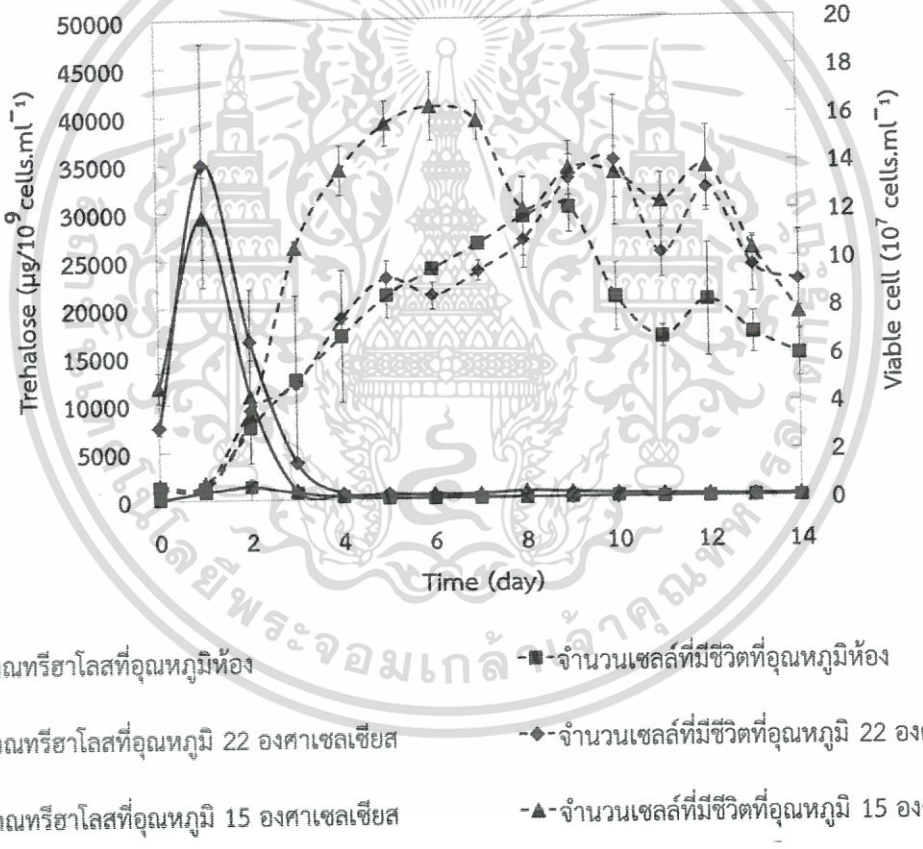
4.2.6.3 ทรีฮาโลส

จากการทดลองได้ทำการติดตามผลการเปลี่ยนแปลงของสารทรีฮาโลสในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ผลการทดลองที่ได้ติดตามแสดงดังภาพที่ 4.14

จากภาพที่ 4.14 แสดงให้เห็นว่า ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เซลล์เริ่มมีการสะสมทรีฮาโลสหลังจากผ่านกระบวนการหมักไวน์ข้าวได้เพียงแค่ 1 วัน อาจเป็นผลมาจากยีสต์ต้องเผชิญกับสภาวะอาหารใหม่ จึงปรับตัวโดยการเร่งสะสมทรีฮาโลสเพื่อการอยู่รอด (Jules *et al*, 2005; Munch *et al*, 1992) และในการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องมีปริมาณทรีฮาโลสสูงที่สุดในวันที่ 2 ของการหมักไวน์ข้าว (1,402.92 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นทรีฮาโลสจะมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วและเริ่มคงที่ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 ของการหมักไวน์ข้าว เพราะเป็นช่วงการเจริญแบบทวีคูณของเซลล์ยีสต์ ซึ่งปริมาณทรีฮาโลสจะลดลงอย่างรวดเร็วเป็นผลมาจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

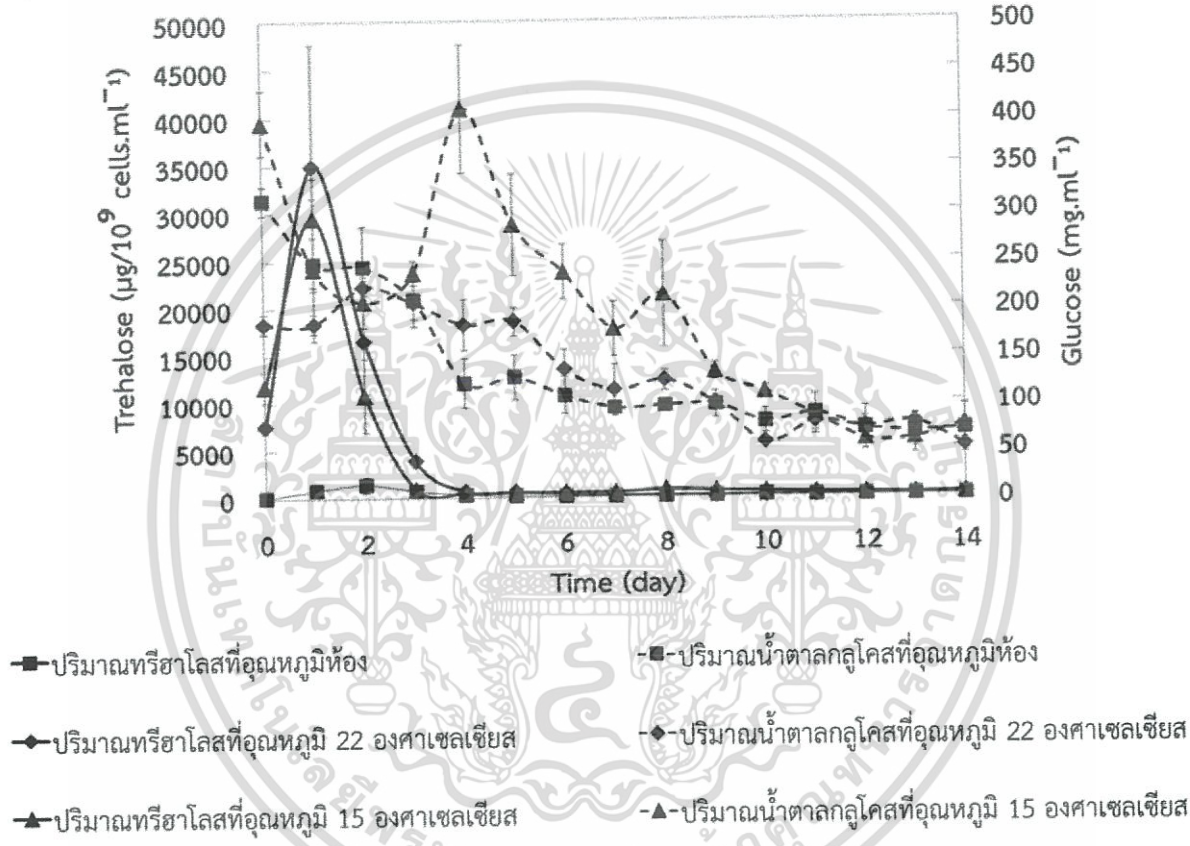
ปริมาณกลูโคสที่ลดลง (Boulton and Quain, 2001) ดังภาพที่ 4.15 เนื่องจากทรีฮาโลภายในเซลล์จะสลายตัวทันทีเมื่อยีสต์อยู่ในสภาวะขาดแหล่งอาหาร (van der Plaat, 1974) และจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตเพิ่มสูงขึ้นจนถึงวันที่ 9 ของการหมักไวน์ข้าว อาจเป็นผลเนื่องมาจากทรีฮาโลสช่วยในการรักษาเซลล์เมมเบรน โดยไฮดรอกซิลกรุ๊ปของทรีฮาโลส สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับฟอสโฟไลปิดของเซลล์เมมเบรน ซึ่งปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแทนที่น้ำ ซึ่งกลูโคสส่วนหนึ่งถูกนำมาใช้สังเคราะห์ทรีฮาโลส (Boulton and Quain, 2001) ในขณะที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส (34,933.79 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (29,427.96 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) มีการสะสมทรีฮาโลสอย่างรวดเร็วและมีปริมาณสูงที่สุดของการหมักไวน์ข้าว ตั้งแต่วันที่ 1 ของการหมัก หลังจากนั้นพบว่า ปริมาณทรีฮาโลสมีการลดลงอย่างรวดเร็วและเริ่มคงที่ ส่วนจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตก็มีจำนวนเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งคล้ายกับการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณทรีฮาโลสและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนปริมาณทรีฮาโลสของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณมากกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นต่ำ จึงสร้างความเครียดให้แก่เซลล์ยีสต์ เซลล์ยีสต์จึงสะสมทรีฮาโลสภายใต้สภาวะเครียดที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งการตอบสนองนี้คล้ายกับการตอบสนองต่อความเครียดที่อุณหภูมิสูง (Sahara *et al*., 2002) โดยช่วยซ่อมแซมโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ที่เสียหายจากการเกิดอุณหภูมิสูง (Hottiger *et al*., 1994)

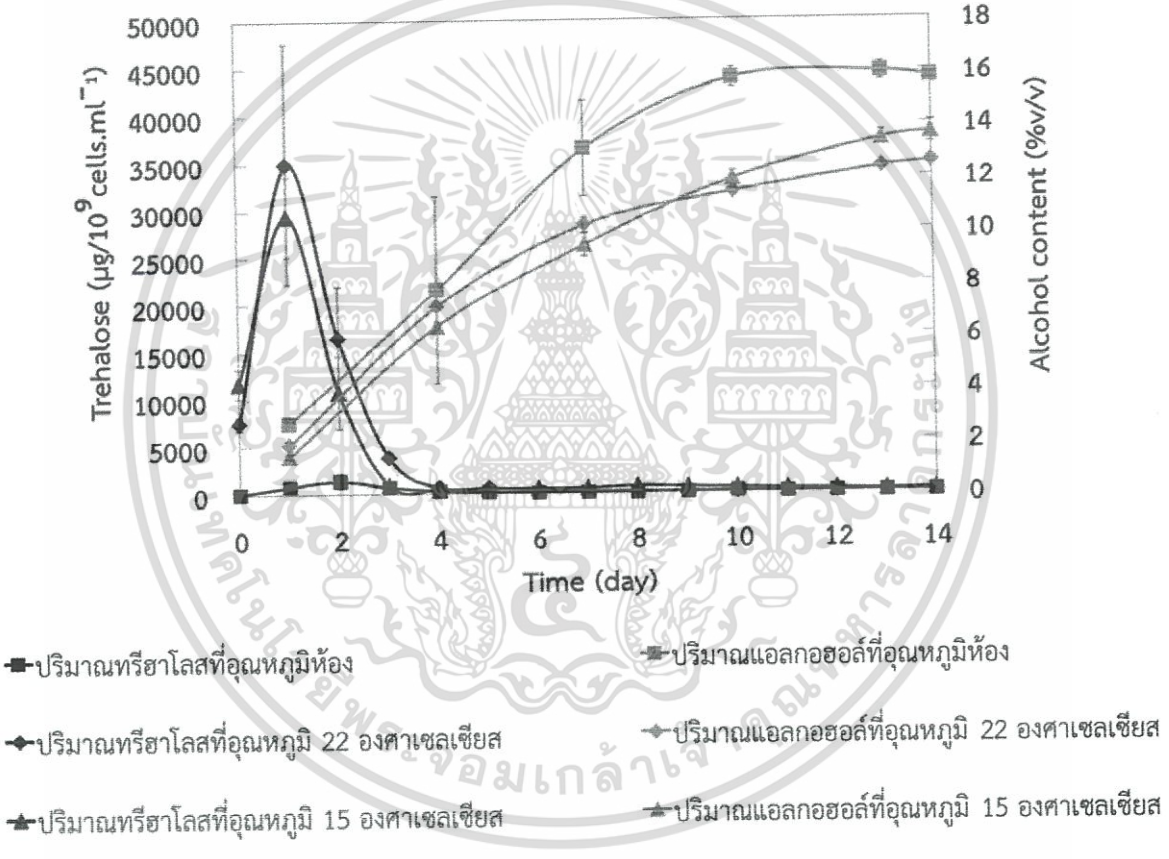


ภาพที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณทรีฮาโลสและน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

ดังภาพที่ 4.16 ได้แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณทรีฮาโลสและปริมาณแอลกอฮอล์ พบว่า ในวันที่ 2 ของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง และวันที่ 1 ของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ปริมาณทรีฮาโลสจะลดลงอย่างรวดเร็วและเริ่มคงที่ ในขณะที่ยีสต์มีการผลิตแอลกอฮอล์อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตาม ในทางทฤษฎีแล้ว ปริมาณทีฮาโลสที่สะสมใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ยีสต์ควรมีการสะสมเพิ่มขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์มากขึ้น เนื่องจากทรีฮาโลสช่วยในการทำให้โปรตีนเสถียร ป้องกันการรวมตัวของโปรตีน โดยการแทนที่น้ำและแอลกอฮอล์ของทรีฮาโลสภายในเซลล์ (อรุณ, 2558) แต่มีบางความเห็นที่ยังขัดแย้งกันอยู่ในบทบาทของทรีฮาโลสต่อความอดทนของเอทานอล (Alexandre *et al.*, 1998; Gomes *et al*, 2002) ว่าในงานวิจัยของ *Schizosaccharomyces prombe* ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างทรีฮาโลสภายในเซลล์สะสม และความสามารถในการมีชีวิตรอดของ *Schizosaccharomyces prombe* ใน 27 สายพันธุ์ที่ถูกนำมาเปรียบเทียบภายใต้ความเครียดของเอทานอล โดยได้ผลว่า สายพันธุ์ที่มีการสะสมของทรีฮาโลสต่ำที่สุดกลับมีเซลล์ที่มีชีวิตมากขึ้นเมื่อต้องเผชิญกับความเครียดที่มีต่อเอทานอล (Gomes *et al.*, 2002)



ภาพที่ 4.16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณทรีฮาโลสและแอลกอฮอล์ที่ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

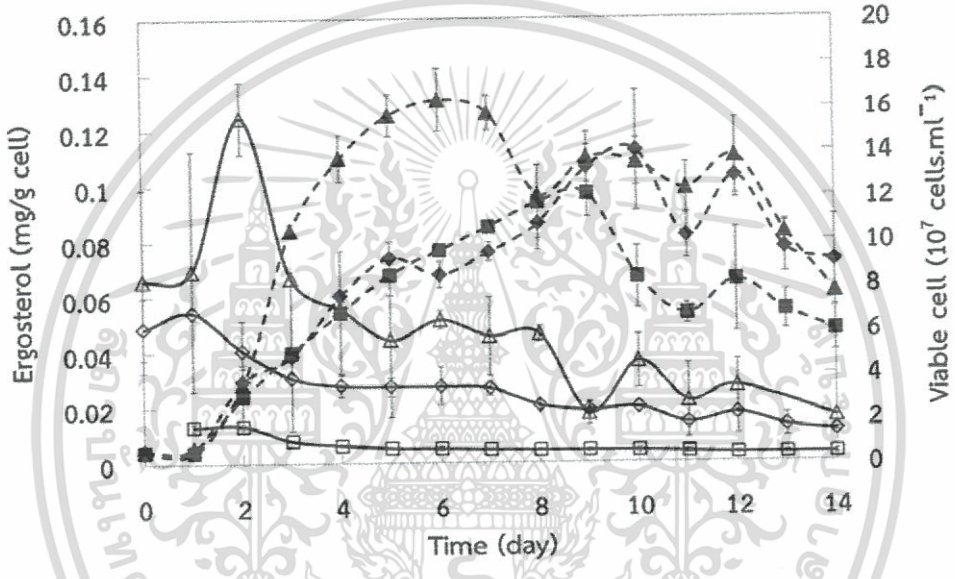
4.2.6.4 เออร์โกสเตอรอล

สเตอรอลเป็นส่วนประกอบที่จำเป็นของเซลล์ยูแคริโอตทั้งหมด สเตอรอลที่มีบทบาทสำคัญใน *S. cerevisiae* คือ เออร์โกสเตอรอล สเตอรอลที่อยู่ในรูปแบบฟรีสเตอรอล ส่วนใหญ่จะอยู่ในพลาสมาเมมเบรน ซึ่งมีความสำคัญมากต่อการไหล การซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ และมีผลกระทบต่างๆเกี่ยวกับกิจกรรมของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Bloch, 1983) การทดลองนี้ได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเออร์โกสเตอรอลที่เซลล์สะสมไว้ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 4.17 และ 4.18

จากภาพที่ 4.17 จากการศึกษาพบว่า การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ในวันที่ 1 และ 2 ของการหมัก พบว่า เซลล์มีปริมาณเออร์โกสเตอรอลสูงถึง 0.0135 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ และ 0.1246 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ แต่การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในวันที่ 0 และ 1 ของการหมัก พบว่า เซลล์มีปริมาณเออร์โกสเตอรอลสูงถึง 0.0546 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ จากนั้นการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส กลับมีปริมาณลดลง ในขณะที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น สารเออร์โกสเตอรอลมีค่าคงที่ในช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดแล้วลดลง โดยปริมาณเออร์โกสเตอรอลภายในเซลล์ของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 0.0031, 0.0111 และ 0.0163 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ เมื่อสิ้นสุดการหมัก จะเห็นได้ว่า การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารเออร์โกสเตอรอลสูงกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องมีการเจริญของยีสต์ต่ำกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส อาจเป็นไปได้ว่า สารดังกล่าวมีบทบาทต่อการทนเอทานอลในยีสต์ *S. cerevisiae* (Swan และ Watson, 1998) เนื่องจากการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีปริมาณแอลกอฮอล์น้อยกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง (ดังภาพที่ 4.6) จึงทำให้การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีปริมาณเออร์โกสเตอรอลมากกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง เอทานอลมีผลต่อการยับยั้งแบบไม่แข่งขันในการขนส่งกลูโคส มอลโทส แอมโมเนีย และกรดอะมิโนต่างๆ ยีสต์สายพันธุ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวปริมาณมาก สามารถมีชีวิตอยู่ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูงๆ มากกว่ายีสต์สายพันธุ์ที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่น้อย (Smart, 2000) การที่ยีสต์มีการเจริญลดลงในที่ที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น อาจเนื่องมาจากมีการสังเคราะห์สเตอรอลได้น้อยลง (Anderson *et al.*, 1986) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น พบว่า สภาพการเป็นของไหลขององค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์มีแนวโน้มลดลง การมีชีวิตรอดของยีสต์น้อยลง ทั้งนี้เพราะโปรตีนหรือองค์ประกอบของกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ (Swan and Watson, 1997) ที่อุณหภูมิสูงอัตราการเจริญของยีสต์ลดลง มีผลให้ชีวมวลโดยรวมลดลง เพราะฉะนั้น ปริมาณโปรตีน กรดไรโบนิวคลีอิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก และกรดอะมิโนอิสระต่างๆ ภายในเซลล์จึงลดลง และการที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นยังเหนี่ยวนำให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งตัวมากขึ้น ทำให้ความสามารถในการไหลผ่านของสารละลายต่างๆ รวมทั้งสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง (Panchal, 1990) เนื่องจากว่า เออร์โกสเตอรอลเป็นสเตอรอลที่พบอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ และจำเป็นสำหรับรักษาสมบัติความเป็นเยื่อเลือกผ่าน และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความแข็งแรง ในการสังเคราะห์สเตอรอลนั้นจำเป็นต้องมีออกซิเจน อย่างไรก็ตาม ในระหว่างการหมักนั้น ออกซิเจนจะหมดไป เซลล์จึงไม่สามารถสังเคราะห์สารดังกล่าวนี้ได้ แต่ในช่วงนี้เซลล์จะนำไกลโคเจนไปใช้ในการสร้างสารสเตอรอล (Boulton and Quain, 2001) หรืออาจเติมสารเออร์โกสเตอรอลในอาหารหมัก (Ohta and Hayashida, 1983)



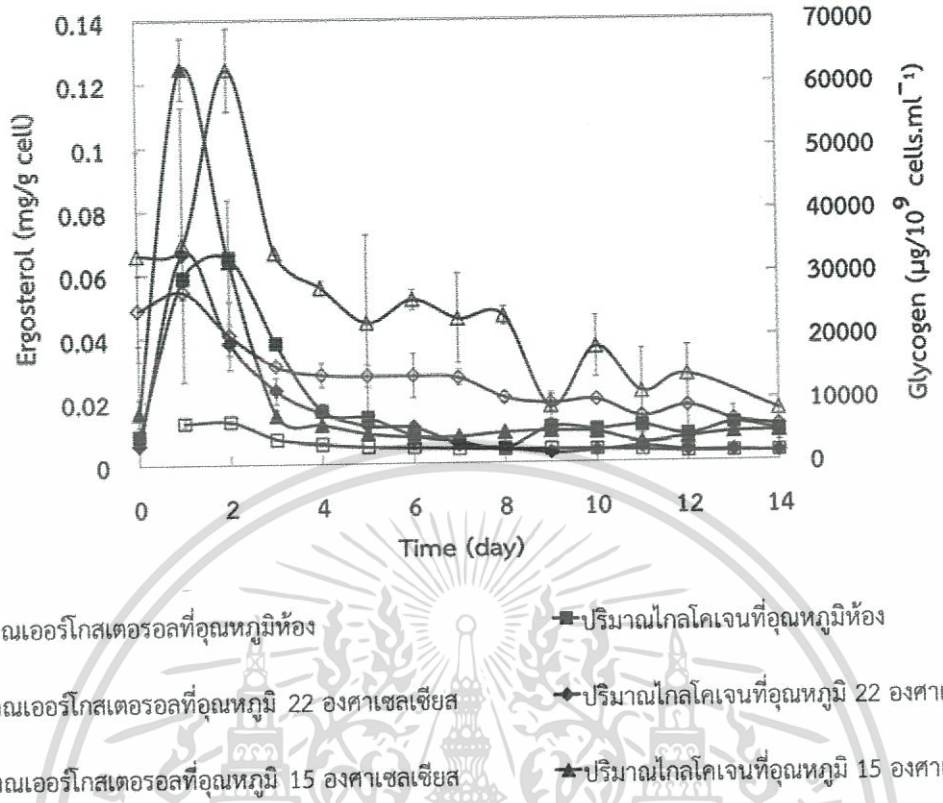
ภาพที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเออร์โกสเตอรอลและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

จากภาพที่ 4.18 จากการศึกษา พบว่า การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีปริมาณเออร์โกสเตอรอลกับไกลโคเจนมากกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เนื่องจากว่าเออร์โกสเตอรอล เป็นสเตอรอลที่พบอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ และจำเป็นสำหรับรักษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบัติความเป็นเยื่อเลือกผ่าน และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความแข็งแรง ในการสังเคราะห์สเตอรอลนั้นจำเป็นต้องมีออกซิเจน อย่างไรก็ตาม ในระหว่างการหมักนั้น ออกซิเจนจะหมดไป เซลล์จึงไม่สามารถสังเคราะห์สารดังกล่าวนี้ได้ แต่ในช่วงนี้เซลล์จะนำไกลโคเจนไปใช้ในการสร้างสารสเตอรอล (Boulton and Quain, 2001) ไกลโคเจนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำหรับการสังเคราะห์สเตอรอล และกรดไขมันไม่อิ่มตัว ในระหว่างขั้นตอนของการหมักแบบให้อากาศ (Boulton and Quain, 2001) เพราะสารเหล่านี้มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ความเข้มข้นของสารเหล่านี้มักจะมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพของการหมัก ดังนั้น ไกลโคเจนเริ่มต้นที่มีอยู่จึงเป็นแหล่งพลังงานในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว อีกทั้งเป็นตัวบ่งชี้ทางอ้อมในการสร้างสารประกอบเหล่านี้ (O'Connor-Cox *et al*, 1996) จึงพบว่า ยีสต์มีการสลายไกลโคเจนไปสร้างเออโกสเตอรอล โดยจะเห็นว่า การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส มีการเพิ่มขึ้นของไกลโคเจนพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของเออร์โกสเตอรอลในวันที่ 1 แต่การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ปริมาณไกลโคเจนมีการลดลงหลังวันที่ 1 ปริมาณเออร์โกสเตอรอลมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นหลังวันที่ 1 เนื่องจากในช่วงเริ่มต้นในการหมักการสลายไกลโคเจนถือว่าเป็นแหล่งพลังงานสำคัญภายในสิ่งมีชีวิตสำหรับการสังเคราะห์สเตอรอลและกรดไขมันไม่อิ่มตัว (O'Connor-Cox *et al*., 1996) การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีปริมาณเออร์โกสเตอรอลและไกลโคเจนลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 และลดลงอย่างคงที่หลังวันที่ 3 ส่วนการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส มีปริมาณเออร์โกสเตอรอลและไกลโคเจนลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และลดลงอย่างคงที่หลังวันที่ 3 พบว่า การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องมีการสลายไกลโคเจนแล้วไม่สามารถนำไปสร้างเออร์โกสเตอรอลได้ดีกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เนื่องจากการที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นยังเหนี่ยวนำให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งตัวมากขึ้น ทำให้ความสามารถในการไหลผ่านของสารละลายต่างๆ รวมทั้งสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง (Panchal, 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเออร์โกสเตอรอลและไกลโคเจนในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

ตารางที่ 4.2 น้ำหนักกากข้าวและปริมาตรไวน์ข้าวที่คงเหลือจากกระบวนการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิต่างๆ

	อุณหภูมิห้อง	อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส	อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส
น้ำหนักกากข้าว (กรัม)	88.95 ± 8.15	84.39 ± 4.07	139.42 ± 3.66
ปริมาตรไวน์ข้าว (มิลลิลิตร)	2,706.67 ± 98.66	2,986.67 ± 23.09	3,273.33 ± 20.82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ศึกษาเพื่อให้เข้าใจถึงการตอบสนองของเซลล์ยีสต์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักไวน์ข้าวซึ่งมีสภาวะต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของเซลล์ยีสต์ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้ติดตามผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสารที่สะสมในเซลล์ระหว่างการผลิตไวน์ข้าว เมื่อต้องเผชิญกับสภาวะเครียด

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ปริมาณกลีเซอรอลสูงที่สุดอยู่ในช่วงแรกของการหมักไวน์ข้าวทั้ง 3 อุณหภูมิ เนื่องจากเซลล์ยีสต์ได้เผชิญกับสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกสูง เซลล์จึงมีการตอบสนองต่อความเครียดนี้โดยการสะสมกลีเซอรอลเพื่อช่วยคงความสมดุลของแรงดันออสโมติกระหว่างภายนอกและภายในเซลล์ จากนั้นแรงดันออสโมติกนี้จะลดลง เนื่องจากเซลล์ยีสต์ใช้น้ำตาลในการเจริญ และผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น แอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ ในระหว่างนั้น เซลล์มีการสะสมสารกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งอาจมีส่วนในการช่วยปกป้องเซลล์จากความเป็นพิษของเอทานอล

ปริมาณทรีฮาโลสของการหมักไวน์ข้าวในแต่ละอุณหภูมิมีความแตกต่างกันมากในช่วงแรก โดยการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีปริมาณทรีฮาโลสมากกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นการหมักไวน์ข้าวด้วยอุณหภูมิต่ำ จึงสร้างความเครียดให้แก่เซลล์ยีสต์ เซลล์ยีสต์จึงสะสมทรีฮาโลสภายใต้สภาวะเครียด นอกจากนี้สารเคมีที่เป็นพิษ เช่น เอทานอล และสภาวะอื่นที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ก็มีผลต่อการสะสมทรีฮาโลสเช่นกัน ดังนั้นในช่วงใกล้สิ้นสุดการหมัก ปริมาณทรีฮาโลสทั้ง 3 อุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อาจเกี่ยวเนื่องกับปริมาณแอลกอฮอล์ก็เป็นได้

ปริมาณเออร์โกสเตอรอลในช่วงแรกของการหมักไวน์ข้าวทั้ง 3 อุณหภูมิมีความแตกต่างกัน โดยที่การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสมีปริมาณเออโกสเตอรอลมากกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งเป็นผลมาจากการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องเป็นการหมักไวน์ข้าวด้วยอุณหภูมิสูง จึงทำให้ยีสต์เจริญได้น้อยและมีการผลิตเออร์โกสเตอรอลได้น้อย ดังนั้น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น สภาพการเป็นของไหลในองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์มีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้เพราะโปรตีนหรือองค์ประกอบของกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ และอาจเป็นไปได้ว่าสารดังกล่าวมีบทบาทต่อการทนเอทานอลในยีสต์ *S. cerevisiae* เพราะการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องมีปริมาณแอลกอฮอล์มากกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

22 องศาเซลเซียสและที่ 15 องศาเซลเซียส แต่ปริมาณสารเออร์โกสเตอรอลของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องมีปริมาณน้อยกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และ15 องศาเซลเซียส

สำหรับสารไกลโคเจนซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำรองของเซลล์ที่สำคัญ โดยเซลล์ยีสต์มีการนำน้ำตาลกลูโคสในช่วงแรกของการหมักมาเพื่อสะสมไกลโคเจน และจะนำไกลโคเจนไปใช้ในยามที่น้ำตาลเริ่มลดลง การหมักไวน์ข้าวในแต่ละอุณหภูมิมีการสะสมสารไกลโคเจนต่างกัน โดยในช่วงแรกการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง มีการสะสมสารไกลโคเจนที่ใกล้เคียงกัน แต่การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสมีการสะสมสาร ไกลโคเจนสูงสุด หลังจากที่เซลล์สะสมไกลโคเจนในช่วงแรกแล้ว ไกลโคเจนส่วนหนึ่งจะถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารเออโกสเตอรอลต่อไป

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารต่างๆ ที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 ในการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักไวน์ข้าว รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของสารสะสมเหล่านี้ อาจมีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่น และเมื่อเลี้ยงในสับเสตรทที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า รูปแบบการตอบสนองต่อสภาวะเครียดนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์ และสับเสตรทที่ใช้ในการศึกษา

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาขั้นต่อควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นที่ผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารสะสมในระหว่างการผลิตไวน์ข้าว เช่น ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่ต่างกัน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

เจริญ เจริญชัย. 2550. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักสาโท. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://surathai.wordpress.com/2007/06/12/satho-micro/. 22 พฤศจิกายน 2558.

เจริญ เจริญชัย. 2553. การหมักแอลกอฮอล์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://surathai.wordpress.com/2010/06/12/yeastwine/. 22 พฤศจิกายน 2558.

ฉัตรชัย และจีราภรณ์ สังข์ผุด. 2547. เทคโนโลยีกล้าเชื้อลูกแป้งยีสต์และกระบวนการหมักน้ำตาลจากสำหรับผลิตสุราขาว. งานวิจัย. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

ธัญวรรณ ศรีจันทร์ม่วง และสุกัญญา ต๊ะปวง. 2558. การพัฒนากระบวนการผลิตไวน์ข้าวโดยใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ *Amylomyces* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* M30. ปริญญานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต.สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นิรมล บุณยสนธิกุล, ยุวพิน เลิศวีระพัฒน์, สุดารัตน์ ตรีเพชรกุล, และดุษฎี อุตภาพ. 2540. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดทรีฮาโลสจากยีสต์ขนมปัง. วารสารสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 29: 11-25.

ปฏิพล ชัยเทพ, ไพรัช สาใจ และ รัชฎาภรณ์ ปวงก๋องตั๋น. 2555. การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ทนร้อน ETHANOL PRODUCTION FROM MOLASSES USING A THERMOTOLERANT YEAST. ปริญญานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต. สาขาวิศวกรรมอาหาร. วิทยาลัยเทคโนโลยีและสหวิทยาการ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. ม.ป.ป. สาโท. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3091/ . 22 พฤศจิกายน 2558.

ยุวเรศ เรืองพานิช และ พิเชษฐ ศรีบุญยงค์. 2555. กลีเซอรอล หนึ่งพลังงานทางเลือกเพื่อการผลิตอาหารสัตว์กระเพาะเดี่ยว. งานวิจัย. ภาควิชาสัตวบาล. คณะเกษตรกำแพงแสน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์. 2551. คู่มือการอบรมโครงการฝึกอบรมเพื่อพัฒนาคุณภาพสุราชนิดผลไม้และสุราพื้นบ้านที่มีแรงแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรีและผลิตภัณฑ์จากผลผลิตทางการเกษตร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา. 2546. การผลิตไวน์ข้าวจากข้าวนาปรัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา. 2557. เอกสารประกอบคำสอนวิชาอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (Non-Distillation Alcoholic Beverage Industry). สาขาเทคโนโลยีการหมัก. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. หน้า 304. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ภาควิชาจุลชีววิทยา.

สุคนธ์ทิพย์ เสือเฒ่า, สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา, และประมุข ภระกูลสุขสถิตย์. 2550. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทรีฮาโลสโดย Propionibacterium acidipropionici. งานวิจัย. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมัลลิกา โมรากุล. 2545. การพัฒนากรรมวิธีผลิตไวน์ข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอตุสาหกรรม. 2546. มาตรฐานผลติภัณฑ์ชุมชนสาโท มผช.3/2546. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://app.tisi.go.th/otop/otop.html. 22 พฤศจิกายน 2558.

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. 2558. ยีสต์และเทคโนโลยีของยีสต์. หน้า 166-168. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ

Abdel-Fattah, W.R., Fadil, M., Nigam, P. and Banat, I.M. 2000. Isolation of thermotolerrant ethanologenic yeasts and use of selected strains in industrial scale fermentation inan Egyptian distillery. Biotechnology and Bioengineering. 68: 531-535.

Aguilera, F., Peinado, R.A., Millan, C., Ortega, J.M. and Mauricio, J.C. 2006. Relationship between ethanol tolerance, H+ -ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. International Journal of Food Microbiology. 110: 34–42.

Amerine, M.A. and C.S. Ough. 1974. Method for Analysis of Must and Wines. John Wiley and Sons, Incorporation. New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anderson, P.J., Mcneil, K. and Watson, K. 1986. High-efficiency carbohydrate fermentation of ethanol at temperature above 40°C by *Kluveromyces marxianus* var. marxianus isolated from sugar mills. Applied Environment Microbiology. 51: 1314-1320.

Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., and Adler, L. 1997. The two isoenzymes for yeast NAD1-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. EMBO Journal. 16: 2179-2187.

AOAC. 1990. Official Method of Analysis. 15th ed. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemistry.

AOAC. 2000. Official Method of Analysis. 17th ed. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemistry.

Arthington-Skaggs, B.A., Jradi, H., Desa,i T., Morrison, C.J. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of Candida albicans. Journal of Clinical Microbiology. 1999; 37: 3332–3337.

Banat, I.M. and Marchant, R. 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeast growing at 52 °C and producing ethanol at 45 °C and 50 °C. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8: 259-263.

Banat, I.M. and Marchant, R. 1995. Characterization and potential industrial applications of five novel, thermotolerant, fermentative yeast strains. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 11: 304–306.

Bloch, K.E. 1983. Sterol structure and membrane function. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 14: 47–92.

Boulton C. and Quain D. 2001. Brewing Yeast and Fermentation. Blackwell Science Limited. Oxford. United Kingdom.

Cardoso, F.S., Gaspar P., Hugenholtz L., Ramos A. and Santos H. 2004. Enhancement of trehalose production in dairy propionibacteria through manipulation of environmental conditions. International Journal of Food Microbiology. 91: 195-204.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fleet, G.H. 1992. Wine Micro and Biotechnology. Horwood Acedemic Publishers, Switzerland.

François, J. and Parrou, J.L. 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae.* FEMS Microbiology Reviews. 25: 125-145.

Galeote, V.A., Blondin, B., Dequin, S. and Sablayrolles, J.M. 2001. Stress effects of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae.* Biotechnology Letters. 23: 677–681.

Gibson, B.R., Lawrence, S.J., Leclaire, J. P.R., Powell, C.D. and Smart, K.A. 2007. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. FEMS Microbiology Reviews. 31: 535-569.

Goldammer, T. 2000. The Brewers' Handbook. Apex Publishers. United Kingdom. 472 pages.

Grosshans, B.L., Andreeva, A., Gangar, A., Niessen, S., Yates, III. J.R., Brennwald, P., and Ncvick, P. 2006. The yeast lgl family member Sro7p is an effector of the secretory Rab GTPase Sec4p. The Journal of Cell Biology. 172: 55–66.

Hohmann, S. 1997. Shaping up: The responses of yeast to osmotic stress. In Yeast Stress Responses. Hohmann, S., and Mager, W.H. (eds). Lexington, TX: R.G. Landes Company. pp: 101-146.

Hottiger, T., Virgilio, C., Hall, N.M., Boller, T. and Wiemken, A. 1994. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increasing the thermal stability of proteins.

Hounsa, C.G., Brandt, E.V., Thevelein, J. 1998. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. Microbiology. 144: 671-680.

Hugenholtz, J. and Smid, E.J. 2002. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. Curr. Opin. Biotechnology. 13(5): 497-507.

Jiang, G. and Zhang, B.B. 2003. Glucagon and regulation of glucose metabolism. American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism. 284: E67-E678.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jules, M., Francois, J., and Parrou, J.L. 2005. Autonomous oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* during batch cultures on trehalose. FEBS Journal. 272: 1490–1500.

Kim, J., Alizadeh, P., Harding T., Hefner-Gravnik A. and Klionsky D.J. 1996. Disruption of the yeast ATH1 gene confers better survival after dehydration, freezing and ethanol shock: potential commercial application. Applied and Environmental Microbiology. 62(5): 1563–1569.

Kodama, K. and K. Yoshizawa. 1977. Sake, pp.423-475. In A.H. Rost. Alcoholic Beverages. Vol.1. Academic Press, London.

Lentini, A., Rogers, P., Higgins, V., Dawes, I., Chandler, M., Stanley, G. and Chambers, P. 2003. The impact of ethanol stress on yeast physiology. In: Brewing Yeast Fermentation Performance, 2nd ed, pp. 24-38 (Ed. K.A. Smart) Blackwell Science, Oxford.

Liu, D., Tao Zhang, H., Xiong, W., Hu, J., Xu, B., Chung Lin, C., Xu, L., Jiang, L. 2014. Effect of temperature on Chinese rice wine brewing with high concentration presteamed whole sticky rice. BioMed Research International.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31: 1017-1020.

Miyazaki, S., Nevo, E. and Bohnert, H.J. 2005. Adaptive oxidative stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*: interslope genetic divergence in 'Evolution Canyon'. Biological Journal of the Linnean Society 84: 103–11.

Munch, T., Sonnleitner, B., and Fiechter, A. 1992. The decisive role of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle behaviour for dynamic growth characterization. J. Biotechnology. 22: 329–351.

National Center for Biotechnology Information. n.d. Trehalose - compound summary (CID 7427). [Online]. Available Source: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid= 7427. 24 November 2015.

Nevoigt, E. and Stahl, U. 1997. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews. 21: 231-241.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Novo, M.T., Beltran, G., Torija, M.J., Poblet, M., Rozes, N., Guillamon, J.M. and Mas, A. 2003. Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation, rehydration and low temperature fermentations. International Journal of Food Microbiology. 86: 153-161.

O'Connor-Cox, E.S.C., Majara, M., Lodolo, E.J., Mochaba, F.M. and Axcell, B.C. 1996. The Use of Yeast Glycogen and Trehalose Contents as Indicators for Process Optimisation. Ferment. 9: 321–328.

Onyewu, C., Blankenship, J. R., Del Poeta, M. & Heitman, J. 2003. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against Candida albicans, Candida glabrata, and Candida krusei. Antimicrob Agents Chemother. 47: 956–964.

Ohta, K. and Hayashida S. 1983. Role of tween 80 and monoolin in a lipid – sterol - protein complex which enhances ethanol tolerance of sake yeast. Applied Environmental Microbiology. 46: 821-825.

Panchal, C.J. 1990. Yeast Strain Selection. VetroGen Corporation. London. Ontario. Canada. Marcel Dekker. incorporation. New York and Basel.

Parrou, J.L. and Francois, J. 1997. A simplifiled procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. Analytical Biochemistry. 248: 186-188.

Responsible Business - European e-Learning Module (REBEL). 2009. Yeast as candidate for ethanol production. [Online]. Available Source: http://www.responsiblebusiness.eu/display/rebwp7/Yeast+physiology+in+ethanol+production. 13 December 2015.

Sahara, T., Goda, T. and Ohgiya, S. 2002. Comprehensive Expression Analysis of Time-dependent Genetic Responses in Yeast Cells to Low Temperature. Journal of Biological Chemistry. 277: 50015–50021.

Singleton, R., Jr. and Amelunxen, R.E. 1973. Protein from thermophilic microorganism. Bacteriology. 37: 320-342.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Smagalski, C. n.d. The magic of brewers' yeast. Beer and Brewing Site. Bella Online's Beer and Brewing Editor.

Smart, K. A., Chambers, K. M., Lambert, I. and Jenkins, C. 1999. Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality. Journal of the American Society of Brewing Chemists. 57: 18-23.

Smart, K. 2000. Brewing Yeast Fermentation Performance. 2nd ed. Oxford: Oxford Bookes University.

Steward G. and Russell I. 1993. Fermentation – The "Black Box" of the Brewing Process. Master Brewers Association of Americas Technical Quarterly. 30: 159–168.

Swan, T. and Watson, K. 1997. Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameter of stress tolerance in yeast. Canadian Journal of Microbiology. 43: 70-77.

Thevelein, J.M. 1984. Regulation of Trehalose Mobilisation in Fungi. Microbiology. 1: 42 - 59

Van, U.N. 1984. Effects of ethanol on the temperature relations of viability and growth in yeast. Critical Reviews in Analytical Chemistry. Biotechnology. 1: 263.

Van der Plaat, J.B. 1974. Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate stimulates trehalose degradation in baker's yeast. Biochemical and Biophysical Research Communications. 62: 553–560.

Van Dijck, P., Colavizza, D., Smet, P., Trevelei, J. 1995. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and non-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. Applied and Environmental Microbiology. 61: 109 - 115.

Van Dijken, J.P. and Scheffers, W.A. 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. FEMS Microbiology. 32: 199–224.

Walker, G.M. 1998. Yeast Physiology and Piotechnology. (3th ed). pp. 144-183. Chichester : John Wiley and Sons, Incorporation. New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Walther, T., Mtimet, N., Alkim, C., Vax, A., Loret, M., Ullah, A., Gancedo, C., Smits, G.J. and Francois, J.M. 2013. Metabolic phenotypes of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with alteredtrehalose 6-phosphate dynamics. Biochemical Society. 454: 227-237.

Watson, K. 1987. Temperature relations. In The Yeasts. Vol. 2 (eds A.H. Rose and J.S. Harrison). 41-72. Academic Press. London.

Yoshizawa, K. 1985. Rice in brewing. pp. 619 - 645. In B.O. Juliano. ed. Rice Chemistry and Technology. The American Association of Cereal Chemists Incorporation. Minnessota.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 Potato Dextrose Agar (PDA)

1. สารอาหาร

Potato Dextrose Agar (PDA)

2. ขั้นตอนการเตรียม

นำ Potato Dextrose Agar (PDA) 3.9 กรัม ละลายในน้ำกรอง 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากัน ปิเปตสารอาหารใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิดขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ปริมาตรหลอดละ 7 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.2 Potato Dextrose Broth (PDB)

1. สารอาหาร

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

2. ขั้นตอนการเตรียม

ปอกเปลือกมันฝรั่งและล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มในน้ำกรอง 500 มิลลิลิตร จนสุกไม่เละจนเกินไป กรองเนื้อมันฝรั่งออกด้วยผ้ากรอง เก็บส่วนน้ำเอาไว้ เติม Dextrose 20 กรัม คนให้ละลายเข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้ได้ 1 ลิตร ปิเปตสารอาหารใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิดขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.3 Yeast Malt Agar Medium (YM Agar)

1. สารอาหาร

Glucose	10	กรัม
Peptone	5	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Agar	20	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

2. ขั้นตอนการเตรียม

ผสมองค์ประกอบทั้งหมด ละลายในน้ำกรอง 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ปริมาตรหลอดละ 7 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.4 Yeast Malt Broth Medium (YM broth)

1. สารอาหาร

Glucose	10	กรัม
Peptone	5	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

2. ขั้นตอนการเตรียม

ผสมองค์ประกอบทั้งหมด ละลายในน้ำกรอง 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร คนส่วนผสมให้เข้ากัน บรรจุใส่ฟลาสก์แล้วทำการปิดฟลาสก์ด้วยจุกสำลี นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่มีความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกัน

1. สารอาหาร

อาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth เช่นเดียวกันกับข้อ ก.4

เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

2. ขั้นตอนการเตรียม

เตรียมอาหาร YM broth เช่นเดียวกันกับข้อ ก.4 บรรจุลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรดังในตารางที่ ก.1 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรดังในตารางที่ ก.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.1 สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ YM และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ในแต่ละความเข้มข้นของเอทานอล

ความเข้มข้นของเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร)	อาหาร YM (มิลลิลิตร)	เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตร)
0	100	0
5	94.74	5.26
10	89.47	10.53
15	84.21	15.79
20	78.95	21.05
25	73.68	26.32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
สารเคมีและวิธีวิเคราะห์

ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดแลคติก) (Amerine amd Ough, 1974)

1. สารเคมี

1.1 น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เตรียมโดยต้มน้ำกลั่นให้เดือด 20 นาที

1.2 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 4 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำมาหาความเข้มข้นก่อนใช้

1.3 สารละลายฟีนอฟธาลีน เตรียมโดยชั่งฟีนอฟธาลีน 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยชั่งโพแทสเซียมพาทาเลต ที่อบที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น อย่างละเอียด 0.3 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (นอร์มัล)} = \frac{\text{น้ำหนักโพแทสเซียมพาทาเลต (กรัม)} \times 1000}{\text{ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (มิลลิลิตร)} \times 204.229}$$

2. วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่างไวน์ข้าว 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล จนกระทั่งถึงจุดยุติ โดยสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู คำนวณปริมาณกรดในรูปกรัมกรดแลคติกต่อปริมาตรไวน์ข้าว 100 มิลลิลิตร

$$\text{ปริมาณกรดแลคติก (กรัม/100 มล.)} = \frac{\text{ปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์} \times \text{ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์} \times 90 \times 100}{1000 \times \text{ปริมาตรไวน์ข้าว}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

1. สารเคมี

3,5 – dinitrosalicylic acid (DNS) เตรียมโดยละลาย DNS 20 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างลงไปทีละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 32 กรัม ละลายในน้ำ 300 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากัน นำไปอังบนอ่างน้ำร้อนจนสารละลายใส แล้วเติมโพแทสเซียมโซเดียมทาเทรตลงไปทีละน้อยจนครบ 600 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 2,000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2. วิธีวิเคราะห์

2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.2 เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.3 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

2.4 นำไปแช่ในอ่างน้ำเย็น

2.5 เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0.1 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

3. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

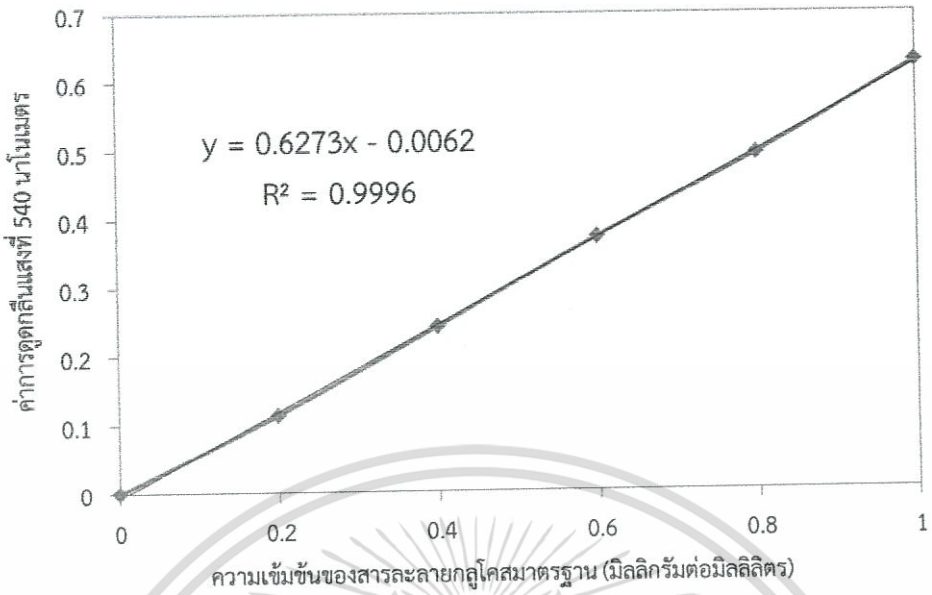
เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลายน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร นำสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์ตามวิธีในข้อที่ 2. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ดังแสดงในภาพที่ ข.1

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชัน}}$$

ตารางที่ ข.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกลูโคส (มิลลิลิตร)
0.2	0.8	0.2
0.4	0.6	0.4
0.6	0.4	0.6
0.8	0.2	0.8
1.0	0	1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร

ข.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์โดยวิธีไดโครเมทออกซิเดชัน (Amerine and Ough, 1974)

1. เครื่องมือ

1.1 ชุดกลั่น

1.2 บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร

1.3 ปิเปตแบบวัดปริมาตร ขนาด 1 มิลลิลิตร และ 25 มิลลิลิตร

1.4 ขวดรูปชมพู่ (erlenmayer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

1.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

2. สารเคมี

2.1 สารละลายโปแทสเซียมไดโครเมท เตรียมโดยละลายละลายโปแทสเซียมไดโครเมท ($K_2Cr_2O_7$) 33.77 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 325 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร เก็บในขวดสีชา

2.2 สารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต เตรียมโดยละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_2)_2.6H_2O$) 135 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 750 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร ลงไปอย่างช้าๆ ทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร ด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 สารละลาย 1 , 10 ฟีแนนโทรลีนเฟอร์รัสซัลเฟต เตรียมโดยละลายเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) 0.70 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมออโธฟีแนนโทรลีน (o- phenanthroline) 149 กรัม คนให้ละลายแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3. วิธีวิเคราะห์

3.1 เติมน้ำกลั่นลงในฟลาสก์สำหรับกลั่น 100 มิลลิลิตร

3.2 ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์สำหรับกลั่น ทำการต่อชุดกลั่น

3.3 ปิเปตสารละลายโปแทสเซียมไดโครเมท 25 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปวางไว้ที่ปลายส่วนควบแน่น (condensor) โดยให้ปลายของส่วนควบแน่นจุ่มลงในสารละลาย

3.4 กลั่นด้วยความร้อนต่ำจนได้ส่วน distillate รวมกับสารละลายโปแทสเซียมไดโครเมทจนมีปริมาตรประมาณ 40 – 45 มิลลิลิตร จึงหยุดกลั่น

3.5 ฉีดล้างส่วนควบแน่นด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยให้ลงไปรวมอยู่ในฟลาสก์ที่มีสารละลายโปแทสเซียมไดโครเมท

3.6 นำฟลาสก์สารละลายที่ได้ไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60-65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาที เพื่อให้แอลกอฮอล์ทำปฏิกิริยากับโปแทสเซียมไดโครเมทที่อยู่ในสารละลายอย่างสมบูรณ์

3.7 ไตเตรทกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียวใส เติมสารละลาย 1–10 ฟีแนนโทรลีนเฟอร์รัสซัลเฟต ลงไปประมาณ 10 หยด แล้วไตเตรทต่อจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จดปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไปเป็นค่า V_A

3.8 ทำ blank โดยปิเปตน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายโปแทสเซียมไดโครเมท 25 มิลลิลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที นำมาไตเตรทกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตตามข้อ 3.7 จดปริมาตรสารละลายที่ใช้เป็น V_B

3.9. นำค่า V_A และ V_B ที่ได้ มาคำนวณหาปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่าง

$$\text{ปริมาณแอลกอฮอล์ (\%v/v)} = 25 - \frac{25 \times V_A}{V_B}$$

ข.4 การหาค่าร้อยละของการมีชีวิตของยีสต์โดยวิธีซิเตรตเมทิลลีนไวโอเลต (Smart *et al.*, 1999)

1. สารเคมี

1.1 สารละลายโซเดียมซิเตรตความเข้มข้น 2% (w/v) เตรียมโดยชั่งโซเดียมซิเตรต 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 สารละลายเมทิลลีนไวโอเลต 0.01% (w/v) เตรียมโดยชั่งเมทิลลีนไวโอเลต (Methylene Violet 3RAX) 0.01 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมซิเตรต 100 มิลลิลิตร จากข้อ 1.1

2. วิธีวิเคราะห์

2.1 เก็บตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.2 แยกส่วนใสออก แล้วนำตะกอนเซลล์ยีสต์มาแขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร ให้มีความหนาแน่นของเซลล์ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.3 ผสมสารแขวนลอยเซลล์ที่มีความหนาแน่นประมาณ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลายเมทิลลีนไวโอเลต 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.4 นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตหลัง 5 นาที โดยเซลล์ที่ย้อมติดสี คือ เซลล์ที่ไม่มีชีวิต เพื่อให้ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่หาได้มีความน่าเชื่อถือควรนับเซลล์อย่างน้อย 500 เซลล์

2.5 รายงานผลในรูปของร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต โดยคำนวณจาก

$$\text{ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{เซลล์ที่มีชีวิต} \times 100}{\text{เซลล์ทั้งหมด}}$$

ข.5 การวิเคราะห์ปริมาณทรีฮาโลส (Parrou และ Francois, 1997)

1. สารเคมี

1.1 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.25 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 26.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เตรียมโดยใช้กรดอะซิติก (CH_3COOH) 5.74 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.3 สารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยใช้สารละลายในข้อ 1.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

1.4 สารละลายโซเดียมอะซิเตท 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa) 27.22 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วยสารละลายในข้อที่ 1.3 ให้ได้ค่าพีเอช เท่ากับ 5.2 แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5 เอนไซม์ทรีฮาเลส (trehalase)

1.6 GOPOD reagent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิธีวิเคราะห์

2.1 เก็บตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ 1 x 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.2 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.25 โมลาร์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร

2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

2.4 ทำการ break cell โดยการนำเซลล์ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำมาละลายที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เป็นจำนวน 4 รอบ เซลล์ที่ได้จะมีความหนืดเพิ่มขึ้น

2.5 เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร

2.6 เติมสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร

2.7 ดูดตัวอย่างใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

2.8 เติมเอนไซม์ทรีฮาเลส 0.01 มิลลิลิตร

2.9 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง

2.10 นำตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2.11 แยกส่วนใสออกใส่หลอดทดลอง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

2.12 เติม GOPOD reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

2.13 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.14 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร

2.15 ทำ blank โดยปิเปตน้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม GOPOD reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.16 ทำ standard โดยใช้ D-Glucose standard ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติม GOPOD reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.17 รายงานผลปริมาณทรีฮาโลสโดยคำนวณจาก

$$\text{D-Glucose (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตรของตัวอย่าง x 1000}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตรของ D-Glucose standard}}$$

$$\text{ปริมาณทรีฮาโลส (ไมโครกรัมต่อ}10^9\text{เซลล์ต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{D-Glucose (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) x จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่เก็บตัวอย่าง}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.6 การวิเคราะห์ปริมาณไกลโคเจน (Parrou และ Francois, 1997)

1. สารเคมี

1.1 สารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตไดเบสิค

1.1.1 ชั่งสารไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส 35.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

1.1.2 ชั่งสารโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

1.1.3 นำสารที่ได้จากข้อ 1.1.1 ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 400 มิลิลิตร

1.1.4 นำสารที่ได้จากข้อ 1.1.2 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 150 มิลลิลิตร

1.1.5 ปรับพีเอชสารในข้อ 1.1.3 ให้ได้พีเอชเท่ากับ 7 โดยใช้สารในข้อ 1.1.4

1.2 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.25 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 26.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 สารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เตรียมโดยใช้กรดอะซิติก (CH_3COOH) 5.74 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.4 สารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยใช้สารละลายในข้อ 1.3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

1.5 สารละลายโซเดียมอะซิเตท 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa) 27.22 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วยสารละลายในข้อที่ 1.3 ให้ได้ค่าพีเอช เท่ากับ 5.2 แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.6 เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) เตรียมโดยชั่งเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 0.01 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมอะซิเตท 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.7 GOPOD reagent

2. วิธีวิเคราะห์

2.1 เก็บตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ 1×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.2 เติมสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตไดเบสิค ปริมาตร 4.9 มิลลิลิตร

2.3 เติมเอนไซม์เดกซ์ทราเนส ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 เติมเอนไซม์แอลฟา-อะมิเลส ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร

2.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 3-5 ชั่วโมง

2.6 นำตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยล้างเซลล์ 2 รอบด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตไดเบสิค ปริมาตร 4.9 มิลลิลิตร เพื่อให้ตะกอนฟุ้ง

2.7 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.25 โมลาร์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร

2.8 บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

2.9 ทำการ break cell โดยการนำเซลล์ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำมาละลายที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เป็นจำนวน 4 รอบ เซลล์ที่ได้จะมีความหนืดเพิ่มขึ้น

2.10 เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร

2.11 เติมสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร

2.12 ดูดตัวอย่างใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

2.13 เติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 0.01 มิลลิลิตร

2.14 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง

2.15 นำตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2.16 แยกส่วนใสออกใส่หลอดทดลอง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

2.17 เติม GOPOD ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

2.18 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.19 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร

2.20 ทำ blank โดยปิเปตน้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม GOPOD ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.21 ทำ standard โดยใช้ D-Glucose standard ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติม GOPOD reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.22 รายงานผลปริมาณไกลโคเจนโดยคำนวณจาก

$$\text{D-Glucose (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตรของตัวอย่าง} \times 1000}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตรของ D-Glucose standard}}$$

$$\text{ปริมาณไกลโคเจน (ไมโครกรัมต่อ109เซลล์ต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{D-Glucose (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} \times \text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่เก็บตัวอย่าง}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.7 การวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล (Hounsa และคณะ, 1998)

วิเคราะห์ตามวิธีในชุด Kit ของบริษัท Megazyme

ข.8 การวิเคราะห์ปริมาณเออร์โกสเตอรอล (Arthington-Skaggs *et al.* 1999)

1. สารเคมี

1.1 สารละลายแอลกอฮอล์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เตรียมโดยผสม 50 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์และแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ ในอัตราส่วน 2 ต่อ 3

1.2 เฮปเทน (Heptane)

1.3 แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (Absolute Ethanol)

2. วิธีวิเคราะห์

2.1 เก็บตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ 5 กรัมเซลล์เปียก มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.2 นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อระเหยน้ำออก แล้วทำการชั่งน้ำหนักตะกอนเซลล์แห้ง

2.3 เติมสารละลายแอลกอฮอล์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 มิลลิลิตร

2.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.5 เติมเฮปเทน 10 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าผสมให้เข้ากันเป็นเวลาประมาณ 1 นาที

2.6 ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น โดยเฮปเทนจะอยู่ด้านบน ทำการดึงตัวอย่างในชั้นเฮปเทนออกมา 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 4.5 มิลลิลิตร

2.7 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 230 นาโนเมตร และ 281 นาโนเมตร

2.8 รายงานผลปริมาณเออร์โกสเตอรอลโดยคำนวณจาก

$$\text{ปริมาณเออร์โกสเตอรอล (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)} = \left(\frac{OD_{281\ nm}}{290} - \frac{OD_{230\ nm}}{518}\right) \times \text{เจือจาง}$$

ข.9 การเตรียมโลหะไอออนแมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 5 มิลลิโมล

เตรียมโดยชั่งแมกนีเซียมซัลเฟต 123.2350 กรัม แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ข.10 การเตรียมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มัล

เตรียมโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก 0.83 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	ณิพากร สันธนะวิทย์
วัน เดือน ปี เกิด	17 ตุลาคม 2536
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) คณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2559

ชื่อ-นามสกุล	รวิวรรณ ประโยชน์อุดมเลิศ
วัน เดือน ปี เกิด	15 กันยายน 2536
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) คณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2559

ชื่อ-นามสกุล	วรรณภา แก้วรุ่งเรือง
วัน เดือน ปี เกิด	15 กันยายน 2536
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) คณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้