ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว

Effect of temperature on storage substances in *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai during rice wine fermentation

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงของสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว

Effect of temperature on storage substances in *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai during rice wine fermentation

T148863

ปาริชาติ ศรีละโคตร

ศิริรวรรณ ใจมา

b.12876574
i.
สาขาวิชา
เลขทะเบียน 148863
วัน.เดือน.ปี 30 มิ.ย. 2560

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงของสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ปาริชาติ ศรีละโคตร รหัสนักศึกษา 55080105
	นางสาว ศิริวรรณ ใจมา รหัสนักศึกษา 55080124
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา

บทคัดย่อ

อุณหภูมิเป็นหนึ่งในตัวแปรที่สำคัญสำหรับการผลิตไวน์ข้าว เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมี และสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์ งานวิจัยนี้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวภายในเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว คือ การใช้กล้าเชื้อรา *Amylomyces sp.* ในการย่อยข้าวเหนียว และเติมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ โดยทำการหมักที่ อุณหภูมิห้อง และ 22 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส ยีสต์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าวสูงกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนี้ยีสต์ยังแสดงการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดภายใต้อุณหภูมิต่ำได้อย่างชัดเจน เช่น การสะสมสารกลีเซอรอลในการตอบสนองต่อแรงดันออสโมติก การสะสมทรีฮาโลส เออร์โกสเตอรอลในการต้านทานความเป็นพิษของแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก

คำสำคัญ: ไวน์ข้าว *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai สารสะสมภายในเซลล์ อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงของสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว

Effect of temperature on storage substances in *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai during rice wine fermentation

จัดทำโดย

ปาริชาติ ศรีละโคตร รหัสนักศึกษา 55080105

ศิริวรรณ ใจมา รหัสนักศึกษา 55080124

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

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

(ผศ.ดร. สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงของสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ปาริชาติ ศรีละโคตร รหัสนักศึกษา 55080105
	นางสาว ศิริวรรณ ใจมา รหัสนักศึกษา 55080124
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา

บทคัดย่อ

อุณหภูมิเป็นหนึ่งในตัวแปรที่สำคัญสำหรับการผลิตไวน์ข้าว เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมี และสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์ งานวิจัยนี้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวภายในเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว คือ การใช้กล้าเชื้อรา *Amylomyces sp.* ในการย่อยข้าวเหนียว และเติมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ โดยทำการหมักที่ อุณหภูมิห้อง และ 22 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส ยีสต์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าวสูงกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนี้ยีสต์ยังแสดงการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดภายใต้อุณหภูมิต่ำได้อย่างชัดเจน เช่น การสะสมสารกลีเซอรอลในการตอบสนองต่อแรงดันออสโมติก การสะสมทรีฮาโลส เออร์โกสเตอรอลในการต้านทานความเป็นพิษของแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก

คำสำคัญ: ไวน์ข้าว *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai สารสะสมภายในเซลล์ อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem	Effect of temperature on storage substances in *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai during rice wine fermentation
Student name	PARICHAT SEELAKOTE Student ID 55080105
	SIRIWAN JAIMA Student ID 55080124
Program	Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology
Year	2016
Advisor	Assist.Prof.Dr. Soisuda Pornpukdeewattana

ABSTRACT

Temperature is one of the most important factors in rice wine production. Since temperature affected the changing of chemical properties and the accumulated substances in yeast cells. This research studied on the effect of temperature on the changing of accumulated substances in *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai during the rice wine fermentations. A pure culture of Amyromyces sp. was used for saccarification and added yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai for fermentation. Rice wine fermentation was conducted at room temperature and 22 °C. The results showed that rice wine fermented at 22°C had the percentage viability of yeast during fermentation higher than fermented at room temperature. Yeast also presented obviously a stress response under low temperatures for example, the accumulated glycerol for osmotic pressure, the accumulated trehalose and, ergosterol for the resistance to the toxicity of the alcohol formed during the fermentation process.

Keywords: rice wine, *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai, storage substances, temperature

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำปัญหาพิเศษในหัวข้อเรื่อง “ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงของสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว” ในการจัดทำครั้งนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยความอนุเคราะห์เป็นอย่างดีของ ผศ.ดร.สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิชาปัญหาพิเศษ ท่านได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และวิธีการแก้ไขข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน เพื่อให้รายงานฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้จัดทำจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สุรชัย ใหญ่เย็น ให้ความช่วยเหลือ และข้อเสนอแนะต่างๆในการแก้ไขปัญหาในระหว่างการดำเนินงาน

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วริพัสย์ อารีกุล ที่อนุเคราะห์เครื่องมือในการวิเคราะห์กลีเซอรอล

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง ที่ให้การสนับสนุนในเรื่องอุปกรณ์ และสารเคมีในการปฏิบัติงาน เพื่อให้การดำเนินงานสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ ที่เข้าร่วมในการฟังการนำเสนอปัญหาพิเศษ

ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโท ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้ความรู้เพิ่มเติม ตลอดจนแนะนำวิธีการปฏิบัติงานต่างๆ เพื่อให้ดำเนินงานได้อย่างราบรื่นยิ่งขึ้น ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่ให้คำแนะนำ ทั้งยังอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆเพื่อใช้ในการปฏิบัติงานในครั้งนี้

ท้ายที่สุดผู้จัดทำขอขอบพระคุณ คุณบิดามารดา และญาติ พี่ น้อง ทุกๆท่าน ที่ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษา ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ เป็นแรงผลักดันให้ในการจัดทำปัญหาพิเศษให้เสร็จสมบูรณ์

ปาริชาติ ศรีละโคตร
ศิริวรรณ ใจมา

15 กรกฎาคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญภาพ	V
สารบัญตาราง	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ไวน์ข้าว	3
2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักไวน์ข้าว	4
2.3 วิธีการผลิตไวน์ข้าว	8
2.4 ผลของอุณหภูมิต่อการหมักไวน์	8
2.5 สารสะสมสารประเภทคาร์โบไฮเดรต	9
2.6 สารสะสมสารประเภทลิพิด	11
2.7 อุณหภูมิมีผลต่อสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์	13
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	14
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี	14
3.2 อุปกรณ์	15
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	17
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	20
4.1 ผลของอุณหภูมิการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีของไวน์ข้าว	20
4.2 การเจริญเติบโตของยีสต์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว	25
4.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์	28
บทที่ 5 สรุปผล	40
ข้อเสนอแนะ	41
บรรณานุกรม	42
ภาคผนวก	46
ภาคผนวก ก	47
ภาคผนวก ข	49
ภาคผนวก ค	53
ประวัติผู้เขียน	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 รายย่อยแป้งในข้าวเป็นน้ำตาล และยีสต์ย่อยน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์	5
2.2 *Amylomyces* sp	5
2.3 .เซลล์ของยีสต์และการแตกหน่อของ *Saccharomyces cerevisiae*	6
2.4 โครงสร้างไกลโคเจน	9
2.5 โครงสร้างทรีฮาโลส	10
2.6 แสดงทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของน้ำผ่านเซลล์สัตว์ซึ่งไม่มีผนังเซลล์ และเซลล์พืชซึ่งมีผนังเซลล์	11
2.7 แผนผังแสดงการรีดอกซ์ และเอทีพี	12
2.8 แสดงโครงสร้างของเออโกสเตอรอล	12
4.1 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการหมักไวน์โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง	21
4.2 การย่อยข้าวเหนียวด้วยเชื้อรา *Amylomyces* sp. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	22
4.3 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้และน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างการหมักไวน์โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง	22
4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติคและค่าพีเอชในระหว่างการหมักไวน์ โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง	23
4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักไวน์โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง	24
4.6 ปริมาณเกิดแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักไวน์โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง	25
4.7 การเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง	26
4.8 การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องและ 22 องศาเซลเซียส	27
4.9 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไกลโคลเจนและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่าง การหมักไวน์ข้าวโดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง	30
4.10 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไกลโคลเจนและน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการหมักไวน์ข้าว โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง	31
4.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณทรีฮาโลสและปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณทรีฮาโลส และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าว โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง 32

4.13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณทรีฮาโลส และน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการหมักไวน์ข้าว โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22.13±0.35 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง 33

4.14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลีเซอรอล และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าว โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง 35

4.15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลีเซอรอล และน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการหมักไวน์ข้าว โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง 36

4.16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลีเซอรอล และปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง 37

4.17 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเออร์โกสเตอรอล และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้เชื้อ S. cereviae var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง 38

4.18 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเออร์โกสเตอรอล และปริมาณไกลโคเจนในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้เชื้อ S. cereviae var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ผลผลิตไวน์ข้าวเมื่อสิ้นสุดการหมัก (14 วัน) โดยใช้อุณหภูมิการหมักที่ต่างกัน 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวเริ่มต้นจากการใช้กล้าเชื้อรา *Amylomyces sp.* ทำการย่อยข้าวเหนียวโดยอาศัยเอนไซม์จากเชื้อราเพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล (saccharification) และช่วงที่สองอาศัยยีสต์ *Saccharomyces* เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ (fermentation) การทำงานของเชื้อจุลินทรีย์สองชนิดนี้เกิดขึ้นพร้อมกันเรียกว่า parallel fermentation นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถย่อยกรดอะมิโนบางส่วนได้ ทั้งโปรตีนและกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นเป็นตัวให้รสชาติกับไวน์ข้าว (Yoshizawa, 1999) อีกทั้งในระหว่างการหมักเกิดการเปลี่ยนสารต่างๆมากมาย ที่สำคัญคือเกิดสารสะสมซึ่งเป็นสารที่ให้พลังงาน และป้องกันสภาวะความเครียดจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็วแก่เซลล์ยีสต์ ซึ่งสารสะสม ได้แก่ ไกลโคลเจน เป็นพอลีแซ็กคาไรด์ประเภทฮอโมพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 และแอลฟา 1-6 (พิมพ์เพ็ญ, ม.ป.ป) และเป็นคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำรองให้กับเซลล์ (Irina, 2008) ทรีฮาโลส เป็นน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล ต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่งแอลฟา-1,1 (พิมพ์เพ็ญ, ม.ป.ป) ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตสะสมไว้ในเซลล์เพื่อใช้ในการสสร้างสปอร์ และเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะขาดแคลนสารอาหาร นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันเซลล์จากสภาวะกดดันต่างๆ เช่น ความร้อน การสูญเสียน้ำ เป็นต้น (อรุณ, 2558) กลีเซลรอล สามารถป้องกันเซลล์จากสภาพความเครียดได้แก่ แรงดันออสโมติก เออโกสเตอรอล เป็นสเตอรอลซึ่งเป็นไขมันชนิดหนึ่งที่ประกอบไปด้วยโซ่ไขมันไม่อิ่มตัวที่มีความสามารถในการทนต่อสภาพความเครียดจากแอลกอฮอล์ได้มากกว่าโซ่ไขมันอิ่มตัว ซึ่งสารสะสมที่กล่าวมานั้นเป็นคาร์โบไฮเดรต และไขมัน องค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ ที่ประกอบไปด้วย ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต

นอกจากนี้อุณหภูมิเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมัก เนื่องจากผลของอุณหภูมิจะส่งผลกระทบต่อการผลิตกลีเซอรอล และการเกิดเอทานอล และยังส่งผลต่อความเข้มข้นของน้ำตาล ค่าพีเอช ซึ่งมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ (Dengfeng *et al.*, 2014) จึงเป็นทำให้ยีสต์นั้นตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม หรือสภาวะความเครียดที่เกิดขึ้นโดยการสะสมสารไกลโคลเจน ทรีฮาโลส กลีเซอรอล และเออร์โกสเตอรอล เพื่อป้องกันและรักษาสภาพให้เซลล์สามารถอยู่รอดและเจริญต่อไปได้

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงของสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์*Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว เพื่อเป็นการตรวจติดตามผลการสะสมของสารดังกล่าวว่ามีการเปลี่ยนแปลงในแนวโน้มมากหรือน้อยอย่างไรในระหว่างการหมักไวน์ข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีของไวน์ข้าวที่ผลิตโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของไวน์ข้าวโดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai ที่อุณหภูมิห้อง และ 22 องศาเซลเซียสในระหว่างการหมักไวน์ข้าว

1.3.2 ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของสารที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์ ได้แก่ ไกลโคเจน ทรีฮาโลส กลีเซอรอล และเออร์โกสเตอรอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไวน์ข้าว

ไวน์ข้าว อาทิ สาโท กระแช่ อุ มีความเกี่ยวข้องและมีความสำคัญต่อสังคมไทย โดยเป็นเครื่องดื่มที่นิยมกันอย่างกว้างขวางในสมัยก่อน โดยเป็นเครื่องดื่มที่มีลักษณะขาวขุ่น มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบมีกลิ่นเฉพาะตัว กระบวนการผลิตไวน์ข้าวนั้นไม่ยุ่งยากซับซ้อนและวัตถุดิบก็สามารถหาได้ทั่วไปในท้องถิ่นประกอบด้วย ข้าว น้ำ และลูกแป้ง (หัวเชื้อ) โดยปกติจะนำเอาข้าวเหนียวมาหุงให้สุกแล้วนำไปคลุกกับลูกแป้งและทิ้งให้ราจากลูกแป้งย่อยสลายแป้งจากข้าวให้เป็นน้ำตาล หลังจากหมักได้ 1-3 วัน จะเติมน้ำลงไป เพื่อให้ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ (นรินทร, 2543)

ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ประเทศที่ผลิตข้าว จะมีการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยใช้ข้าวเป็นวัตถุดิบ เช่น กระแช่ของไทยที่ผลิตจากข้าวเหนียว Shao-shing wine ของจีนผลิตจาก หัวเชื้อ ที่ทำจากข้าวขาวและข้าวสาลี และนำหัวเชื้อนี้ไปผลิตเหล้าต่อ โดยใช้ข้าวเหนียว สำหรับสาเก ของญี่ปุ่นนั้นจัดเป็นไวน์ข้าวชนิดหนึ่งผลิตจากข้าวเจ้า Japonica การผลิตสาเกของญี่ปุ่น ข้าวขาวที่ใช้ในการหมักได้ผ่านการขัดสีเอาผิวนอกออกมากกว่า 20-30%ของน้ำหนักข้าวกล้อง โดยเฉพาะสาเกคุณภาพสูง การขัดสีอาจสูงถึง 40-50% หรือเหลือเป็นเนื้อข้าว 50-60% แล้วนำไปผ่านกระบวนการหมัก

สำหรับไวน์ข้าว ของไทยส่วนใหญ่ผลิตจากข้าวเหนียว เช่น อุ น้ำขาว หรือกระแช่ ซึ่งมีวิธีการทำต่อเนื่องจากข้าวหมาก โดยนำข้าวเหนียวมาแช่ค้างคืน นึ่งสุก ล้างข้าวเหนียวให้หมดยาง ผสมกับลูกแป้งที่มีทั้งเชื้อราและเชื้อยีสต์ เมื่อทำการหมัก เชื้อราจะเปลี่ยนแป้งในข้าวให้เป็นน้ำตาล จากนั้นเชื้อยีสต์ก็เปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ เมื่อได้เป็นข้าวหมาก เติมน้ำลงไป และหมักต่ออีก 5-14 วัน กรอง จะได้น้ำขาว ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เก่าแก่ของไทย ส่วนน้ำอุ เตรียมโดยใช้ข้าวสารเหนียวกับข้าวเปลือกเหนียว ในอัตราส่วน 1:3 แล้วทำการหมักในหม้อดิน ได้เป็นเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์เช่นกัน นอกจากนี้ จากการศึกษาใช้ข้าวเจ้าในการผลิตไวน์ข้าว พบว่าข้าวเจ้าชนิดอะมิโลสต่ำ และข้าวเหนียว จะให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงกว่าข้าวอะมิโลสปานกลาง และสูง นอกจากนี้การนำข้าวหอมมะลิมาผลิตไวน์ข้าว ยังช่วยให้รสชาติผลิตภัณฑ์ดีขึ้น น้ำส้มสายชูหมักจากข้าว มีขั้นตอนการเตรียมทำนองเดียวกันกับการทำน้ำขาว แต่เติมเชื้อน้ำส้มลงในน้ำหมักนานประมาณ 3-8 เดือน จึงกรองแยกน้ำใสเป็นน้ำส้มสายชูหมัก ซึ่งมีปริมาณกรดอะซีติกประมาณ 4 % (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 วัตถุดิบที่ใช้หมักไวน์ข้าว

2.2.1.1 น้ำ (Yoshizawa, 1999)

น้ำเป็นส่วนประกอบหลักในการผลิตไวน์ข้าว โดยมีน้ำเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 80 โดยปริมาตร น้ำช่วยในการละลายเอนไซม์และสารอื่นๆ ซึ่งน้ำที่นำมาควรมีคุณสมบัติดังนี้

1) ไม่มีสี กลิ่น และรสเจือปน
2) มีความเป็นกลางหรือด่างอ่อนๆ
3) มีปริมาณเหล็กน้อยกว่า 0.02 พีพีเอ็ม
4) มีแร่ธาตุ
5) ไม่มีจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์

2.2.1.2 ข้าว

วัตถุดิบหลักคือ ข้าวเหนียว สายพันธุ์ที่ใช้ควรมีคุณลักษณะทางเคมี ฟิสิกส์ที่เหมาะสม เช่น สัดส่วนของอะไมโลส และ อะไมโลเพคติน อัตราการดูดซึมน้ำ เมล็ดข้าวหลังนึ่ง และระหว่างการหมักไม่เละยุ่ย ตลอดจนมีคุณสมบัติทางด้านสีกลิ่นรสที่พึงประสงค์ จะได้ไวน์ข้าวที่มีคุณภาพดี (ไพบูลย์, 2549)

2.2.1.3 หลักการบ่งบอกคุณภาพของข้าวสามารถพิจารณาได้จาก (สร้อยสุดา, 2557)

1) เป็นข้าวที่สามารถย่อยได้โดยเอนไซม์ และให้น้ำตาลสูง
2) เป็นข้าวที่เชื้อราเติบโตได้

2.2.1.4 ข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงู

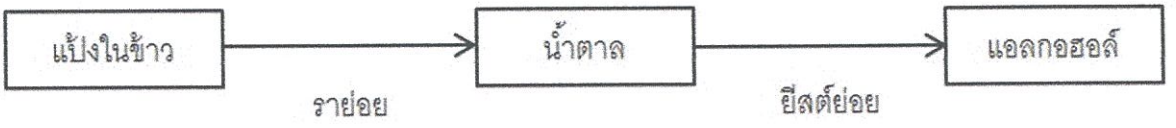
ข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงู เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองดั้งเดิมมีลักษณะเมล็ดเล็ก เรียวยาว แยกเป็นเมล็ด ไม่เกาะตัวแน่น สวยงาม เมื่อนึ่งสุกแล้วข้าวมีสีขาว เนื้อสัมผัสนุ่มและมีกลิ่นหอม มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ในรูปของวิตามินอีเด่นเป็นพิเศษ โดยเฉพาะวิตามินอีในรูปแบบที่เรียกว่า Mixed tocopherols (ศูนย์วิจัยข้าวเชียงราย, 2552)

2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักไวน์ข้าว (ไพบูลย์, 2549)

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ ราและยีสต์ จุลินทรีย์กลุ่มราจะทำหน้าที่เปลี่ยนแป้งที่เป็นองค์ประกอบในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เรียกปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงนี้ว่าแซคคาริฟิเคชั่น (saccharification) โดยราจะสร้างเอมไซม์กลุ่มอะไมเลส ซึ่งประกอบด้วยแอลฟาอะไมเลส เบตาอะไมเลส และกลูดคอะไมเลส เพื่อย่อยสลายโครงสร้างของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมเลกุลแป้งให้เป็นน้ำตาล ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งโดยราให้เป็นแอลกอฮอล์ (ภาพที่ 2.1) โดยผ่านกระบวนการหมักที่เรียกว่า กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งปฏิกิริยานี้เกิดได้ดีในสภาวะไร้อากาศ

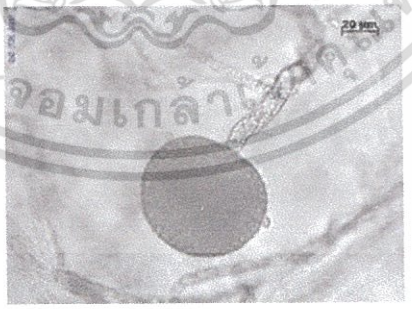


ภาพที่ 2.1 รา ย่อยแป้งในข้าวเป็นน้ำตาล และยีสต์ย่อยน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์

2.2.1 รา

รามีบทบาทสำคัญและสร้างเอนไซม์ในปริมาณมากได้แก่ราใน Class Zygomycetes ซึ่งราที่สำคัญในกลุ่มนี้คือ *Rhizopus* sp. *Mucor* sp. และ *Amylomyces* sp. และราใน Class Deuteromycetes ซึ่งราที่สำคัญในกลุ่มนี้คือ *Aspergillus* sp. ราในกลุ่มแรกสารมารถสร้างเอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูง และสร้างกรดอินทรีย์บางชนิดที่ทำให้เกิดรสเปรี้ยวในสาโท เช่น กรดซิตริก กรดแลคติก และกรดฟูมาลิก แต่ราในกลุ่มนี้มีข้อเสียคือ การย่อยแป้งจะเกิดไม่สมบูรณ์ นั่นคือเมื่อย่อยแป้งแล้วจะให้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวน้อยกว่าราในกลุ่มที่สอง ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดรสเปรี้ยวในสาโท

Amylomyces sp. มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลสูง และสร้างกรดในปริมาณที่เหมาะสม ในการปรับสภาพข้าวให้เหมาะกับ การเจริญของ ยีสต์ในการหมักช่วงต่อไป แต่ไม่เกิดรสเปรี้ยวมากเกินไป (ไร่กล้อมแกล้ม, 2553) *Amylomyces* sp. เป็นราสีขาว (ภาพที่ 2.2) ในการหมักช่วงแรก เชื้อราจะสร้างเส้นใย ชอนไชไปทั่วข้าว และย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล แต่เนื่องจากเป็นราสีขาว จึงไม่ทำให้ข้าวเปลี่ยนสี เนื่องจากมองไม่เห็นเส้นใยชัดเจน ต่างจากการหมักซีอิ๊วเต้าเจี้ยว ที่ใช้ราสีเขียว (สุราไทย, 2550)



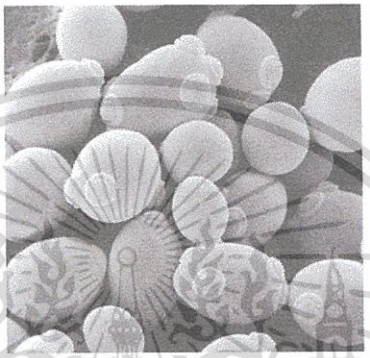
ภาพที่ 2.2 *Amylomyces* sp.
ที่มา: https://id.wikipedia.org/wiki/Berkas:Amylomycesrouxii1.jpg

การใช้จุลินทรีย์ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีความชื้นอยู่เพื่อเป็นแหล่งของเอนไซม์ในการย่อยข้าว อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ได้แก่ ข้าว รำข้าว รำข้าวสาลี เป็นต้น โดยคลุกสปอร์เชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำไปเกลี่ยบนถาด และบ่มในตู้บ่ม (สร้อยสุดา, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ยีสต์

Saccharomyces cerevisiae มีลักษณะเซลล์รูปกลม รูปรี ทรงกระบอกหรือยาว (ภาพที่ 2.3) สืบพันธ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อรอบเซลล์ อาจสร้างซูโดไมซิเลียม แต่ไม่พบไมซิเลียมจริง สร้างแอสโคสปอร์ รูปกลมหรือรูปไข่ ส่วนผนังเรียบ มีบางชนิดที่ผนังสปอร์อาจมีปุ่ม โดยปกติมีจำนวน 1-4 สปอร์ต่อแอสคัส สปอร์หลุดออกจากแอสคัสได้ยาก ทุกชนิดหมักได้รวดเร็ว ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อการหมัก เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ ใช้เป็นสารให้ขึ้นฟู ในขนมปัง และใช้ผลิตสารสกัดจากยีสต์ (ไร่กล้อมแกล้ม, 2553)



ภาพที่ 2.3 เซลล์ของยีสต์และการแตกหน่อ ของ *Saccharomyces cerevisiae*
ที่มา: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1509/saccharomyces-cerevisiae

2.2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญยีสต์ (นิรนาม, 2558)

1.) อาหาร

อาหารที่ยีสต์ใช้ได้ดีได้แก่ น้ำตาล โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทส ยีสต์บางชนิดสามารถใช้ไดแซ็กคาไรด์พวกมอลโทส ซูโครส หรือ แลกโทสได้ ส่วนพอลีแซ็กคาไรด์ที่ยีสต์บางชนิดใช้ได้ คือ แป้ง มียีสต์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถให้น้ำตาลเพนโทสได้ดีกว่าน้ำตาลเฮกโซส ในสภาพไม่มีออกซิเจนน้ำตาลจะเข้าสู่กระบวนการหมักได้เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ แต่การหมักให้ได้เอทานอลนี้ไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะในสภาพไม่มีออกซิเจนเท่านั้น อาจเกิดขึ้นได้เมื่อเลี้ยงยีสต์ในน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงแม้อยู่ในสภาพที่มีออกซิเจนทั้งนี้อาจเป็นเพราะกลูโคสที่มีความเข้มข้นมากกว่า 5 % จะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการหายใจ แต่ถ้าหากไม่มีน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเป็นการกระตุ้นหรือเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ในวัฏจักรเครบส์ นอกจากนี้การมีน้ำตาลยังยับยั้งการสร้างไมโทคอนเดรียอีกด้วย ในสภาพมีออกซิเจนและความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำๆยีสต์จะใช้น้ำตาลไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำหรือเกิดกระบวนการหายใจเช่นเดียวกับในพืชและสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.) อุณหภูมิ

ยีสต์แต่ละชนิดเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกมีโซไฟล์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์ยังสามารถเจริญเติบโตได้ประมาณ 35-47 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญเติบโตได้อยู่ระหว่าง 0-5 องศาเซลเซียส แต่ยีสต์บางชนิดที่เป็นพวกไซโครไฟล์สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 15 องศาเซลเซียส และไม่สามารถเติบโตที่อุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส หรือจัดเป็นพวก ออบลิเกต ไซโครไฟล์ สำหรับยีสต์ที่เป็นเทอร์โมไฟล์ หรือสามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียสไม่พบ นอกจากอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตแล้ว ยังมีผลต่อการสร้างแอสโครสปอร์ของยีสต์อีกด้วย อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแอสโครสปอร์ของยีสต์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น *Saccharomyces cerevisiae* อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส สูงสุดประมาณ 35 องศาเซลเซียส ต่ำสุด 11-12 องศาเซลเซียส

3.) ออกซิเจน

ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกเฟคัลเททีฟ แอนแอโรบ แต่ยีสต์เติบโตในสภาพมีออกซิเจนได้ดีส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจนเติบโตได้ช้า ในสภาพมีออกซิเจนยีสต์ใช้น้ำตาล โดยการออกซิเดชันโดยสมบูรณ์ได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจนยีสต์ใช้น้ำตาล โดยการหมักส่วนใหญ่เป็นการให้ เอทานอล ในการหมักโดยยีสต์ให้ได้เอทานอลนั้น หากมีออกซิเจนยีสต์จะใช้น้ำตาลให้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แทนการหมักให้เอทานอล หรือการหมักถูกยับยั้งโดยการหายใจเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Pasteur effect ในสภาพมีออกซิเจนแต่ถ้าหากมีน้ำตาลความเข้มสูง ยีสต์สามารถหมักน้ำตาลให้เอทานอลแทนการหายใจให้คาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ หรือการหายใจถูกยับยั้งด้วยการหมัก

4.) ค่าพีเอช

ยีสต์เติบโตได้ในพีเอชช่วงกว้างพีเอชต่ำสุดที่ยีสต์สามารถเติบโตได้คือ 1.5 ส่วนพีเอช สูงสุด 8.0-8.5 สำหรับพีเอชที่เหมาะสม สำหรับการเติบโตของยีสต์แตกต่างกัน ส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่าง 4.0-4.5 ยีสต์ส่วนใหญ่จะเติบโตไม่ดีในสภาพที่เป็นด่าง นอกจากพีเอชมีผลต่อการเติบโตแล้วยังมีผลต่อการสร้างแอสโคสปอร์ของยีสต์อีกด้วยพีเอชในการสร้างสปอร์ของยีสต์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น *Saccharomyces cerevisiae* พีเอชสูงสุด 9.1-9.2 พีเอชต่ำสุด 2.4-2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 วิธีการผลิตไวน์ข้าว (วิษณุ, 2556)

2.3.1 การล้างและการแช่ข้าว

การล้างข้าวเป็นการขะล้างเอาส่วนที่เป็นรำข้าวซึ่งติดอยู่บริเวณผิวข้าวที่ขัดแล้วออกไปพร้อมกับเศษสิ่งเจือปนอื่นๆ ได้แก่แกลบ ฟาง และอาจช่วยลดระดับการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ลงได้บ้าง น้ำที่ใช้ล้างและแช่ข้าวจึงต้องเป็นน้ำสะอาดคุณภาพน้ำบริโภค เช่นเดียวกับน้ำที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการหมักสาโท ส่วนการแช่ข้าวมีจุดประสงค์เพื่อให้ข้าวอมน้ำ 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักก่อนนำไปนึ่งให้สุก น้ำจะซึมผ่านเข้าไปกระจายอยู่ทั่วบริเวณเอนโสเปิร์มของเมล็ดข้าว เป็นตัวนำความร้อนไปทำให้เม็ดแป้งเกิดเจลลาติไนส์ระหว่างการนึ่ง และยังเป็นการปรับปรุงอนุภาคของแป้งในเมล็ดข้าวให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น โดยการแช่ข้าวจะใช้เวลา 3 ชั่วโมง

2.3.2 การนึ่งข้าว

การนึ่งข้าวมีจุดประสงค์เพื่อทำให้แป้งเกิดเจลาติไนซ์ ที่มีการจัดโครงสร้างของแป้งให้อยู่ในรูป alpha form และทำให้โปรตีนเสียสภาพอยู่ในฟอร์มที่ง่ายต่อการเข้าตัดของเอนไซม์ของรา การนึ่งข้าวจะใช้เวลา 30 นาที หลังจากการนึ่งแล้ว การทำให้ข้าวเย็นตัวลง และเพื่อเป็นการปรับความชื้นข้าวสุกจะใช้วิธีพรมน้ำสะอาด จนได้ความชื้นประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณก่อนนำข้าวสุกไปเติมหัวเชื้อหมัก

2.3.3 การหมัก

เตรียมข้าวนึ่งสุกตามปริมาณที่ต้องการแล้วทิ้งให้เย็น ที่อุณหภูมิห้อง นำเชื้อราที่เจริญบนรำข้าวสาลีที่เตรียมไว้ลงไปบนข้าวนึ่ง คลุกเคล้าให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ประมาณ 2 วัน เป็นกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล และหลังจากนั้นเติมยีสต์ จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลฟรุคโตส ให้เป็นแอลกอฮอล์ และมีผลพลอยได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

2.4 ผลของอุณหภูมิต่อการหมักไวน์

อุณหภูมิ ในขั้นตอนระหว่างการหมักจะมีพลังงานความร้อนเกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการที่ยีสต์ใช้น้ำตาลซูโครสในการหมักไวน์ ความร้อนมีผลต่อการเจริญของยีสต์ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำหมักและอัตราการหมักของเอธานอล ยีสต์จะสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง แต่ถ้าใช้อุณหภูมิที่สูงมากเกินไปจะทำให้การเจริญของยีสต์และอัตราการผลิตเอธานอลต่ำกว่าที่อุณหภูมิการหมักปกติ โดยทั่วไปจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 18-20 องศาเซลเซียส (ปิยะรัชช์, 2551)

การควบคุมอุณหภูมิเป็นสิ่งสำคัญมากในระหว่างการหมัก ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตและจะตายถ้าเกิดสภาวะเครียดเกินไป ทั้งปริมาณแอลกอฮอล์และอุณหภูมินั้นต่างก็เป็นสภาวะเครียด โดยปกติแล้วสภาพที่ไม่มีแอลกอฮอล์ยีสต์ก็จะเจริญและจะไม่ตายจนกว่าจะถึงอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีแอลกอฮอล์ 14% ก็จะตายที่ 33 องศาเซลเซียสและในสภาวะที่มีแอลกอฮอล์ 20% ก็จะตายที่ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้การหมักที่อุณหภูมิต่ำยังจะส่งผลให้เกิดสารระเหยน้อย เมื่อหมักอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 30

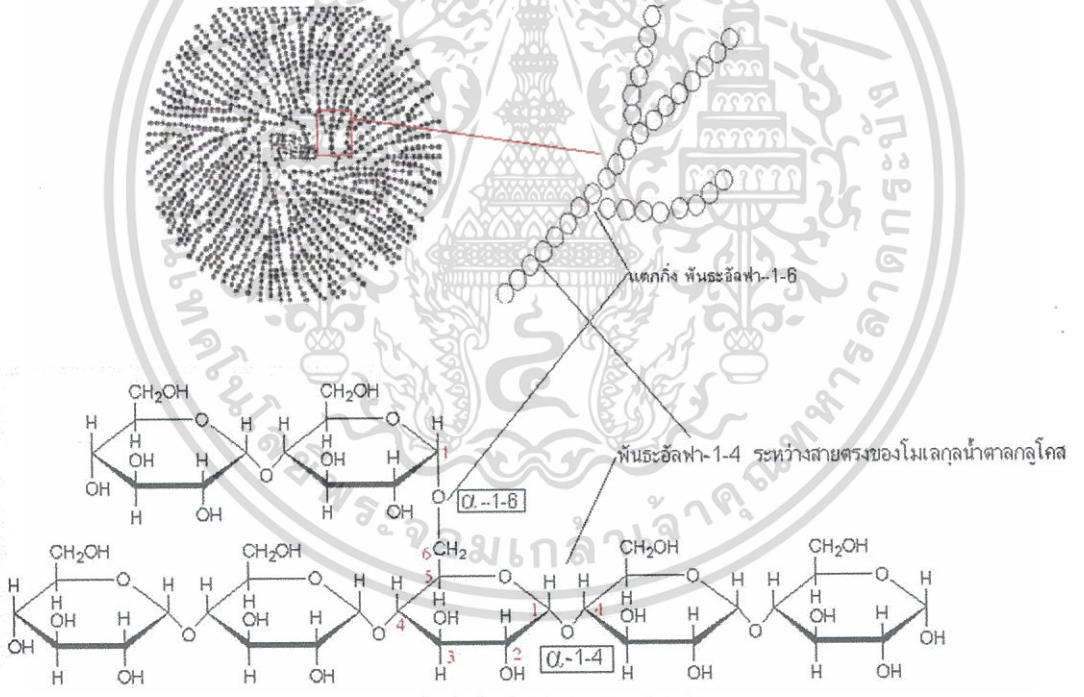
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียสการผลิตน้ำมันฟูเซลมีน้อยและมีขนาดเล็กมากถ้าหมักไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส (Anonymous, 2015)

2.5 สารสะสมสารประเภทคาร์โบไฮเดรต

2.5.1 ไกลโคเจน

ไกลโคเจน เป็นพอลีแซ็กคาไรด์ประเภทฮอโมพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส ประมาณ 10,000-30,000 โมเลกุล เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 และแอลฟา มีโครงสร้างเป็นกิ่งก้านคล้ายอะไมโลเพกทิน ในสตาร์ช แต่ขนาดโมเลกุลใหญ่กว่ามาก และมีการแตกกิ่งมากกว่าจึงอาจเรียกว่า สตาร์ชสัตว์ โซ่หลักของอะไมโลเพกทิน มีการแตกกิ่งทุกๆ 12 ถึง 25 โมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส ขณะที่ไกลโคเจนจะมีการแตกกิ่งทุกๆ 8 ถึง 10 โมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส และโซ่กิ่งประกอบด้วยกลูโคส 8 ถึง 12 โมเลกุลต่อกัน (ภาพที่ 2.4) (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2556)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างไกลโคเจน

ที่มา: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1321/glycogen

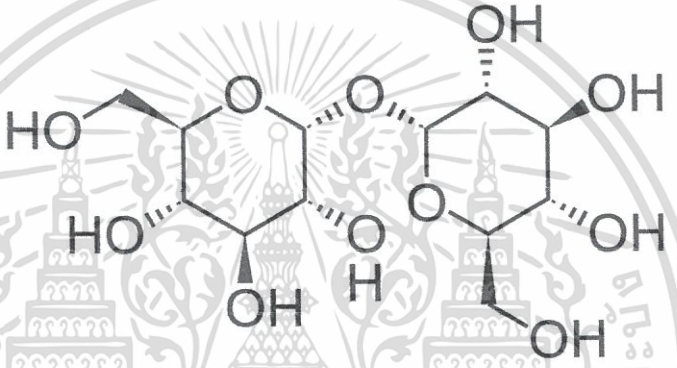
ไกลโคเจนเป็นแหล่งพลังงานสำรองสำหรับยีสต์ ในระยะของปรับตัว (lag phase) ระดับไกลโคลเจนจะลดลง ไกลโคลเจนถูกสังเคราะห์มาจากกลูโคส และไกลโคลเจนยังสามารถใช้บำรุงรักษาสภาพของเซลล์ตัว (Irina, 2008) โดยในช่วงแรกของการหมักยีสต์จะใช้ไกลโคเจนเป็นแหล่งพลังงาน เพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาวะใหม่ที่มีปริมาณน้ำตาลสูง ในสภาวะที่มีน้ำตาลและสารอาหารอื่นจำกัดยีสต์จะสะสมไกลโคเจนไว้ เมื่อเข้าสู่วัฏจักรการแบ่งเซลล์การใช้ไกลโคเจนที่สะสมอยู่จะใช้ผ่านกระบวนการหมักเพื่อนำไปสร้าง

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลังงานให้เซลล์มีชีวิตรอดต่อไป ซึ่งการย่อยสลายไกลโคเจนไปเป็น กลูโคส-1-ฟอสเฟต เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อให้สารอาหารกับเซลล์ในยามที่ขาดแคลนโดยปฏิกิริยาถูกควบคุมด้วยเอนไซม์ไกลโคเจนฟอสโฟริเลส (อรุณ, 2558)

2.5.2 ทรีฮาโลส

ทรีฮาโลสจัดเป็นน้ำตาลไดแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นระหว่างหน่วยย่อยอัลฟากลูโคส พบมากในเซลล์ยีสต์ระยะพักตัวและภายใต้สภาวะกดดัน ทรีฮาโลส-ฟอสเฟต ถูกสังเคราะห์จาก กลูโคส-6-ฟอสเฟต และยูดีพี-กลูโคสที่ควบคุมปฏิกิริยาโดย ทรีฮาโลส-6-ฟอสเฟตซินทีเทส แล้วจึงเปลี่ยนไปเป็นทรีฮาโลสโดยเอนไซม์ฟอสฟาเทส (ภาพที่ 2.5) (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2556)



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทรีฮาโลส

ที่มา:https://en.wikipedia.org/wiki/Trehalose#/media/File:Trehalose.svg

ทรีฮาโลสทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตสะสมไว้ในเซลล์เพื่อใช้ในระหว่างการสร้างสปอร์และเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะขาดแคลนสารอาหาร ทรีฮาโลสจะต่ำเมื่อเซลล์ยีสต์อยู่ในช่วงของระยะการเจริญสูงสุด (Exponential phase หรือ log phase) เนื่องจากผลการยับยั้งกลูโคส การสะสมของทรีฮาโลสเริ่มระหว่างระยะการเจริญสูงสุด ไปยังระยะคงที่ (Stationary phase) ทรีฮาโลสจะถูกสะสมหลังการผลิตไกลโคลเจนเท่านั้น ซึ่งกลูโคสส่วนหนึ่งถูกนำมาใช้สังเคราะห์ทรีฮาโลส หน้าที่ของทรีฮาโลสคือสามารถป้องกันเซลล์จากสภาพเครียดต่างๆ ทรีฮาโลสสามารถป้องกันเซลล์จากสภาพเครียด ได้แก่ ทำให้โครงสร้างโปรตีนมีความเสถียร คงทนต่อสภาวะเครียดนอกจากนี้ยังสามารถช่วยป้องกันเซลล์จากอุณหภูมิที่สูง (Extremes temperature) โดยทำให้โครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์มีความเสถียรมากขึ้น (Irina, 2008) นอกจากนี้สารเคมีที่เป็นพิษสามารถชักนำให้เกิดการสะสมทรีฮาโลสได้ บทบาทอื่นๆ ของทรีฮาโลสในยีสต์ ได้แก่ การควบคุมอัตราการเจริญของยีสต์และการควบคุมเมแทบอลิซึมของกลูโคส (อรุณ, 2558)

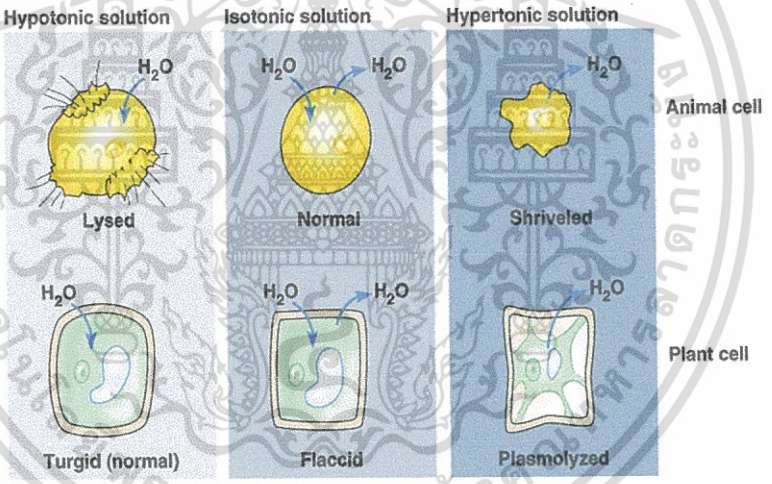
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 สารสะสมสารประเภทลิพิด

2.6.1 กลีเซอรอล

ยีสต์ที่ใช้ทำไวน์สามารถเปลี่ยนกลูโคสโดยวิธีการหมักกลีเซอโรไพรูวิก ให้ได้กลีเซอรอล และไพรูเวท โดยการเกิดกลีเซอรอลนั้นส่วนใหญ่จะเกิดในระยะเริ่มต้นของกระบวนการหมัก ซึ่งกลีเซอรอลจะมากน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์และปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์เริ่มต้น (ไพบูลย์, 2549)

แรงดันออสโมติก คือ แรงที่ใช้ในการต้านทานการเคลื่อนที่ของน้ำไม่ให้น้ำเคลื่อนที่จากบริเวณที่มีน้ำมาก (ภายในเซลล์) ไปยังบริเวณที่มีน้ำน้อย (ที่ความเข้มข้นกลูโคสหรือสารละลายสูง) เนื่องจากน้ำมีแรงดันออสโมติกต่ำที่สุด ทำให้น้ำสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้อิสระ ดังนั้นกลีเซอรอลเป็นสารที่สามารถช่วยป้องกันการเกิดแรงต้านทานนี้ขึ้น เพราะกลูโคสเป็นสารละลายที่มีแรงดันออสโมติกสูง จึงทำให้เกิดสภาพเซลล์ที่เป็น hypertonic solution เป็นสาเหตุของเซลล์เหี่ยวหรือลดขนาดลง (ภาพที่ 2.6) (วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์, ม.ป.ป; นิรนาม, 2554; Kattie et al., 1995)



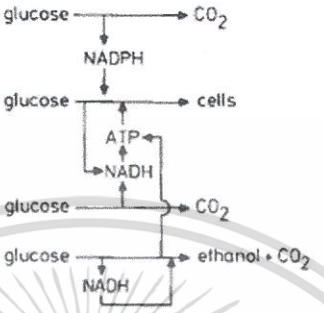
ภาพที่ 2.6 แสดงทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของน้ำผ่านเซลล์สัตว์ซึ่งไม่มีผนังเซลล์และเซลล์พืชซึ่งมีผนังเซลล์

ที่มา: วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ (ม.ป.ป)

นอกจากนี้กลีเซลรอลซึ่งเป็นผลผลิตมาจากยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ในระหว่างกระบวนการหมักของน้ำตาลกลูโคสให้ได้เอทานอลนั้นเกิดขึ้นเพื่อรักษาสมดุลรีดอกซ์(Redox balance) ภายในเซลล์ ในกระบวนการเมแทบอลิซึม นิโคตินาไมด์ อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (Nicotinamide adenine dinucleotide;NAD^+) เป็นโคเอนไซม์ สามารถรับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นและเปลี่ยนเป็น NADH (สามารถให้อิเล็กตรอนแก่สารอื่นได้) ดังนั้นหน้าที่สำคัญของ NAD^+ และ NADH คือ รับอิเล็กตรอนจากสารอื่น และส่งต่ออิเล็กตรอนนั้นให้กับสารตัวอื่น หรือส่งเข้ากระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transport system) เพื่อนำไปสร้างอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (Adenosine

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

triphosphate:ATP) สำหรับโคตินาไมด์ อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ ฟอสเฟต (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate:NADP+) เป็นโคเอนไซม์เช่นกัน เพื่อช่วยในกระบวนการรีดักขั่นสารเข้าสู่เซลล์มากกว่า การสร้างสร้างอะดีโนซีนไตรฟอสเฟตโดยตรงอย่างของโคตินาไมด์ อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 2.6) (นิรนาม, 2552; Johannes and Alexander, 1986; Zheng-Xiang *et al.*, 2001)

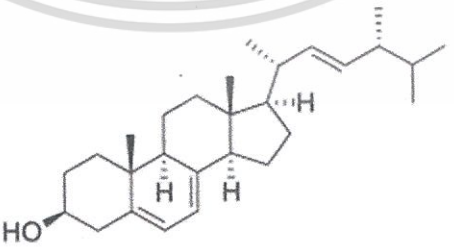


ภาพที่ 2.7 แผนผังแสดงการรีดอกซ์ และเอทีพี
ที่มา: Johannes and Alexander (1986)

2.6.2 เออโกสเตอรอล

เออโกสเตอรอล เป็นสเตอรอลที่พบอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ และจำเป็นสำหรับรักษาสมบัติความเป็นเยื่อเลือกผ่าน ทำหน้าที่คล้ายคลอเลสเตอรอลในสัตว์ และเป็นไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีความทนต่อสภาวะที่แอลกอฮอล์สูง ซึ่งเป็นภาวะเครียดอย่างหนึ่ง ได้มากกว่ากรดไขมันอิ่มตัว ส่วนใหญ่แล้วยีสต์จะมีสเตอรอลคือ เออโกสเตอรอล (Thomas *et al.*, 1978) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนยีสต์จะไม่สังเคราะห์เออโกสเตอรอล และเจริญได้ไม่ดีนักในอาหารที่ขาดสเตอรอล (อรุณ, 2558)

ยีสต์ต้องการออกซิเจนเพื่อผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว และสเตอรอล ซึ่งโมเลกุลทั้งสองนี้เป็นส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ยีสต์ แต่สเตอรอล เช่น เออโกสเตรอล (ภาพที่ 2.8) จะมีความเข้มข้นต่ำกว่า สเตอรอลจะช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์สามารถโค้งงอหรือบิดรูปร่างได้ง่ายขึ้น (Brew Science, 2013)



ภาพที่ 2.8 แสดงโครงสร้างของเออโกสเตอรอล
ที่มา: Brew Science (2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ผลอุณหภูมิต่อสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์

2.7.1 ไกลโคเจน

เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ไกลโคเจนจะย่อยสลายได้เร็วกว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากในสภาวะที่อุณหภูมิสูงทำให้ยีสต์อยู่ในสภาวะเครียด ยีสต์จำใช้ไกลโคเจนเป็นแหล่งพลังงานเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมนั้น (Pérez *et al*., 2002)

2.7.2 ทรีฮาโลส

การสังเคราะห์ทรีฮาโลสเกิดจากซินธีเทสทรีฮาโลส และฟอสฟาเทสทรีฮาโลส ในสภาวะอุณหภูมิสูงไม่มีผลต่อการสะสมทรีฮาโลส (Perez *et al*., 2002)

2.7.3 กลีเซอรอล

ในสภาวะอุณหภูมิต่ำจะมีการสะสมของกลีเซอรอล เนื่องจากภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ยีสต์เกิดสภาวะเครียด ซึ่งส่งผลทำให้กระตุ้นให้ผลิตกลีเซอรอลมากขึ้น (Gang *et al*., 2012)

2.7.4 เออร์โกสเตอรอล

เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ยีสต์ ถือว่าเป็นองค์ประกอบสำคัญของความสามารถในการหมักยีสต์ที่จะได้รับการเรียกว่า "ปัจจัยความอยู่รอด" ปริมาณความเข้มข้นของเออร์โกสเตอรอลจะสูงที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 15 ° C เออร์โกสเตอรอลความเข้มข้นสูง ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับความทนต่อเอทานอล และเสร็จสิ้นการหมัก (Clark *et al*., 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

รำข้าวสาลี

ข้าวเหนียว สายพันธุ์ กข-6

น้ำตาลทรายขาว ตรามิตรผล จากบริษัท น้ำตาลมิตรผล จำกัด

น้ำดื่ม ตราสิงห์ จากบริษัท สิงห์ คอร์เปอเรชั่น จำกัด ในเครือบริษัท บุญรอด บริวเวอรี่ จำกัด, ประเทศไทย

3.1.2 จุลินทรีย์

Amylomyces sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai จากห้องปฏิบัติการสาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.1.3 สารเคมี

3.1.2.1 สารเคมีเพื่อวิเคราะห์

3,5-dinitrosalicylic acid

Glucose anhydrous

Potassium dichromate

Ferrous ammonium sulphate

Sulfuric acid

o-Phenantroline

Methylene violet

Sodium hydroxide

Magnesium sulfate

Hydrochloric acid

Diammonium phosphate

Ethanol 95%

Phenylalanine

Sodium chloride

น้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกรอง

3.1.2.2 สารอาหารเลี้ยงเชื้อ

D-glucose

Yeast extract

Malt extract

Peptone

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.3.2.1 อุปกรณ์

ปิเปตแก้ว ขนาด 1, 5 และ10 มิลลิลิตร

ปิเปตแบบปริมตร ขนาด 25 มิลลิลิตร

ขวดปรับปริมาตร ขนาด 50, 100 และ1,000 มิลลิลิตร

หลอดหยด

บีกเกอร์ ขนาด 50, 250, 600, 1000 และ2000 มิลลิลิตร

ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250, 500 และ1000 มิลลิลิตร

แท่งแก้วคน

หลอดทดลอง ขนาด 13×100 และ16×100 มิลลิลิตร

จานสำหรับเพาะเชื้อ

ขวดดูแรน ขนาด 500, 1000 และ5000 มิลลิลิตร

กระบอกตวง ขนาด 50, 100, 500 และ1000 มิลลิลิตร

ลูกยาง

บิวเรต

ขาตั้งและแคลมป์

ตะเกียงแอลกอฮอล์

เข็มเขี่ยเชื้อ

ลูปเขี่ยเชื้อ

โถดูดความชื้น

กระบอกฉีดน้ำกลั่น

ขวดเซนตริฟิว ขนาด 250 มิลลิลิตร

หลอดเซนตริฟิวพลาสติก ขนาด 1, 15, และ50 มิลลิลิตร

คิวเวตแก้ว

ช้อนตักสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล่องเก็บไมโครทิวป์
ไมโครทิวป์
ที่ตั้งหลอดทดลอง
กระบะพลาสติก
ผ้าดิบ
หม้อลาว
หวดนึ่งข้าว
หลอดกลั่น

3.3.2.2 เครื่องมือ

ฮีมาไซโตมิเตอร์
เทอร์โมมิเตอร์แท่งแก้ว
ออโต้ปิเปต
กล้องจุลทรรศน์
เครื่องปั่นเหวี่ยง
เครื่องปั่นเหวี่ยง ชนิดควบคุมอุณหภูมิ
เครื่องชั่ง ชนิด 2 ตำแหน่ง และ4 ตำแหน่ง
รีแฟลคโตมิเตอร์
ตู้บ่มเชื้อ
ตู้อบ
หม้อนึ่งความดันฆ่าเชื้อ
เครื่องผสมสารละลาย
อาบควบคุมอุณหภูมิ
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
เครื่องกลั่นแอลกอฮอล์
เครื่องเขย่า
เตาไมโครเวฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมเชื้อรา *Amylomyces* sp.

เขี่ยเส้นใยที่เลี้ยงใน Potato Dextrose Agar (PDA) ลง Potato Dextrose Broth (PDB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง

3.3.2 การเลี้ยงกล้าเชื้อรา *Amylomyces* sp. บนรำข้าวสาลี โดยมีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 มิลลิโมล และกรดไฮโดรคลอลิค 0.2 นอร์มอล

ชั่งรำข้าวสาลี 12 กรัมบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมแมกนีเซียมซัลเฟตจาก Stock solution ที่ความเข้มข้น 5 โมลาร์ (เตรียมโดยชั่งแมกนีเซียมซัลเฟต 123.2350 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเป็น 0.1 มิลลิโมลต่อฟลาสก์ และเติมกรดไฮโดรคลอลิคความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล 12 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที รอเย็นเชื้อราที่เลี้ยงใน PDB ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ใช้เข็มเขี่ยเส้นใยแล้วนำมาคลุกเคล้าให้เข้ารำข้าวสาลีที่เตรียมไว้ในตอนต้นซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วนำกล้าเชื้อราที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.3.3 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai

ใช้สูตรอาหารเลี้ยงยีสต์คือ YM Broth ประกอบไปด้วยสารอาหารดังนี้ glucose, peptone, yeast extract, malt extract จำนวน 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เสร็จแล้วรอเย็น ถ่ายเชื้อจาก stock culture slant ปริมาณ 1 ลูปเขี่ยเชื้อ ถ่ายลงไปใน YM Broth ที่เตรียมไว้ในตอนต้น แล้วนำไปให้อากาศโดยการใช้เครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.4 การย่อยข้าวให้เป็นน้ำตาลโดยเชื้อรา *Amylomyces* sp. ที่เลี้ยงบนรำข้าวสาลี

ชั่งข้าวเหนียว 1,200 กรัม ล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง แล้วนำข้าวแช่ด้วยน้ำอุ่นทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง จึงนำมานึ่งให้ข้าวเหนียวสุก โดยใช้เวลา 30 นาที เมื่อสุกแล้วนำไปพักไว้ในกระบะพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ข้าวเหนียวที่นึ่งสุกนั้นเย็นสนิท เติมน้ำดื่มสิงห์ จำนวน 1,200 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เม็ดข้าวเหนียวแยกตัวออกจากกัน จากนั้นเติมกล้าเชื้อ *Amylomyces* sp. ที่เลี้ยงบนรำข้าวสาลี 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ให้กระจายทั่วๆกระบะพลาสติกและคุลกเคล้าให้เข้ากัน ปิดด้วยผ้าดิบที่ผ่านการฆ่าเชื้อบนปากกระบะพลาสติก บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้น้ำต้อย และทำการวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปของน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

148863

3.3.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงของสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว

การศึกษานี้ใช้กล้าเชื้อสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai และ โดยศึกษาการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง และ22 องศาเซลเซียส

3.3.5.1 ขั้นตอนการทดลอง

นำข้าวเหนียวที่ผ่านการย่อยด้วยกล้าเชื้อรามาโดยใช้น้ำเชื่อมความเข้มข้น 15 องศาบริกซ์ ปริมาตร 1,800 มิลลิลิตร ทำการปรับค่าความเข้มข้นให้เป็น 24 องศาบริกซ์ ด้วยน้ำดื่มสิงห์ หรือน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ จากนั้นจึงเติมหัวเชื้อยีสต์ให้มีความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตอยู่ประมาณ 5×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร สารอาหาร YM ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร การหมักไวน์ข้าวทำในขวดแก้วขนาด 5,000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง 22 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์การเจริญของยีสต์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณกลีเซลรอล ปริมาณไกลโคลเจน ปริมาณทรีฮาโลส และปริมาณเออโกสเตอรอล

3.3.6 การวิเคราะห์ผล

3.3.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกออฮอล์โดยวิธีไดโครเมทออกซิเดชัน (Wiliams, 1950)

3.3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

3.3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกโดยการไตเตรท (AOAC, 1990)

3.3.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดโดยใช้แฮนด์รีแฟลคโตมิเตอร์ (AOAC, 1990)

3.3.6.5 การนับจำนวนเซลล์ยีสต์โดยฮีมาไซโตมิเตอร์

3.3.6.6 การวิเคราะห์ปริมาณไกลโคลเจนภายในเซลล์ ตามวิธีของ Parrou และ Francois (1997)

3.3.6.7 การวิเคราะห์ปริมาณทรีฮาโลสภายในเซลล์ ตามวิธีของ Parrou และ Francois (1997)

3.3.6.9 การวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลภายในเซลล์ ตามวิธีของ Hounsa และคณะ (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6.10 การวิเคราะห์ปริมาณเออโกสเตอรอลภายในเซลล์ ตามวิธีของ He และคณะ (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีของไวน์ข้าวที่ผลิตโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai

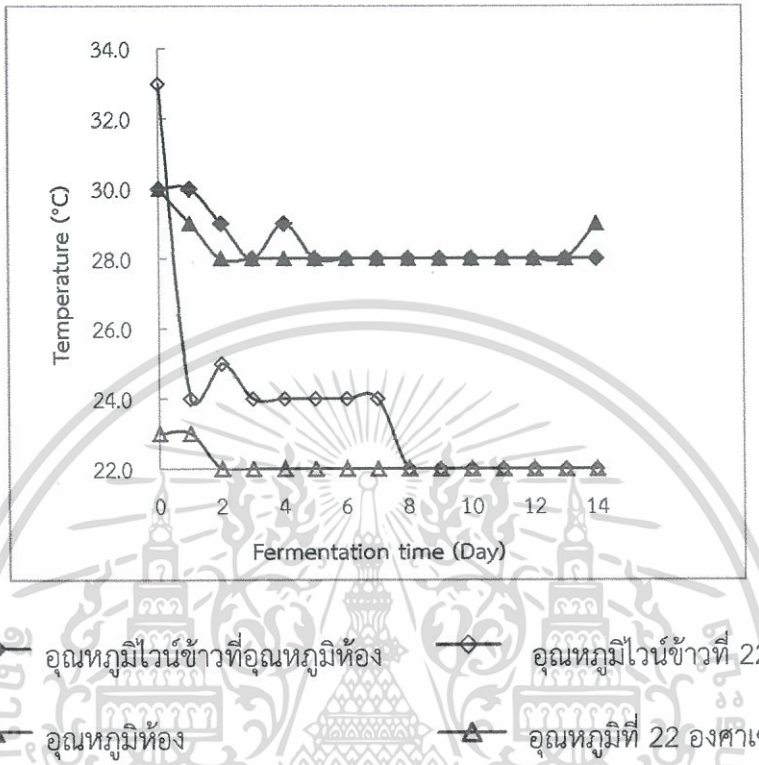
การทดลองย่อยข้าวโดยเชื้อรา *Amylomyces* sp.เป็นเวลา 2 วัน เพื่อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล และผ่าส่าเติมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai เติมน้ำเชื่อมปรับค่าของแข็งที่ละลายได้เป็น 24 องศาบริกซ์ ศึกษาที่สภาวะอุณหภูมิห้อง และ 22 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวัน นำมาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติค ค่าพีเอช ปริมาณแอลกอฮอล์ จำนวนเซลล์ยีสต์ ปริมาณไกลโคเจน ปริมาณทรีฮาโลส ปริมาณกลีเซอรอล และปริมาณเออโกสเตอรอล

4.1.1 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการหมักไวน์ข้าว

อุณหภูมิการหมักไวน์มีผลต่ออัตราการเจริญของยีสต์และระยะเวลาของการหมัก การทดลองหมักไวน์ข้าวที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (28.27±0.59 องศาเซลเซียส) และ 22.13±0.35 องศาเซลเซียส วัดอุณหภูมิการหมักที่สภาวะต่างๆโดยอาศัยเทอร์โมมิเตอร์แช่ในภาชนะที่บรรจุน้ำ และวัดอุณหภูมิไวน์ข้าวที่สภาวะต่างๆโดยจุ่มเทอร์โมมิเตอร์ในภาชนะที่บรรจุไวน์ข้าว พบว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องวันที่ 0 (ผ่าส่า+เติมยีสต์) จนถึงการหมักวันที่ 14 อุณหภูมิของไวน์ข้าวมีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง ส่วนการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในวันที่ 1 อุณหภูมิของไวน์ข้าวเท่ากับ 24 องศาเซลเซียส และลดลงเหลือ 22 องศาเซลเซียสในการหมักวันที่ 8 ถึงวันที่ 14 จากภาพ 4.1 จะเห็นว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องจะใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้หมักไวน์ควรควบคุมอุณหภูมิการหมักในช่วง 15-25 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงจะมีผลทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นได้เร็ว โดยยีสต์ผลิตเอธานอล ปริมาณสูงในช่วงระยะเวลาหมักที่สั้น โดยเอธานอลที่สูงจะไปทำอันตรายกับเซลล์ยีสต์ที่มีสภาพไม่แข็งแรงเนื่องจากช่วงอุณหภูมิไม่เหมาะสมต่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญ ส่งผลให้ยีสต์ตายการหมักจึงหยุดชะงักก่อนถึงระยะเวลาที่เหมาะสม ทำให้ระดับความแข็งแรงแอลกอฮอล์ต่ำกว่าที่สภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม (ลูกจันทร์, 2551)



ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการหมักไวน์โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

4.1.2 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

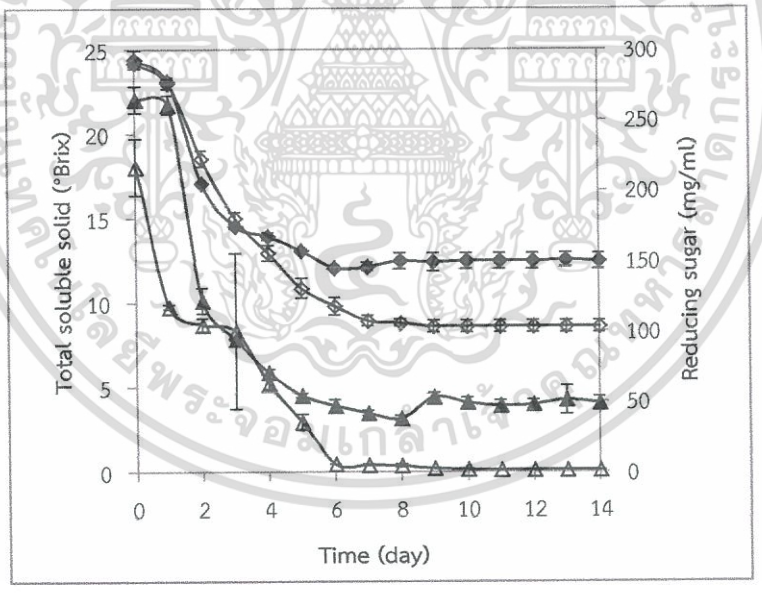
น้ำตาล โดยเฉพาะกลูโคส และฟรุกโทสมีความสำคัญต่อการผลิตไวน์ เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนของยีสต์ในการเปลี่ยนแปลงเป็นแอลกอฮอล์ (นิรนาม, 2556) การหมักไวน์ข้าวทั้ง 2 สภาวะมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้จากการย่อยข้าวโดยเชื้อราประมาณ 33 องศาบริกซ์ และปรับให้เท่ากับ 24 องศาบริกซ์ วัดโดยรีแฟรกโตมิเตอร์ การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง (28.27±0.59 องศาเซลเซียส) มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้นวันที่ 0 (ผ่าส่า+เติมยีสต์) เท่ากับ 24.4±0.53 องศาบริกซ์ มีแนวโน้มลดลงเหลือ 12.5±0.46 องศาบริกซ์ ในการหมักวันที่14 ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 264.26±9.59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลดลงเหลือ 48.71±4.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22องศาเซลเซียส มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้น เท่ากับ 24.2±0.20 องศาบริกซ์ และลดลงเหลือ 8.6±0.35 องศาบริกซ์ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 216.33±20.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลดลงเหลือ 1.11±0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4.3 จะเห็นว่าการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียสปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และปริมาณน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รีดิวซ์ ลดลงมากกว่าการหมักที่อุณหภูมิห้อง แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส อาจจะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ (Yasuko *et al.*, 2004) จึงมีการใช้น้ำตาลได้ดีกว่า เนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลเพื่อเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ (นิรนาม, 2553)

การย่อยข้าวโดยเชื้อรา *Amylomyces* sp. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากภาพ 4.2 มีลักษณะเส้นใยสีขาวชอนไชทั่วข้าว และน้ำต้อยมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 33 องศาบริกซ์

ภาพที่ 4.2 การย่อยข้าวเหนียวด้วยเชื้อรา *Amylomyces* sp. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



ปริมาณของที่ละลายได้ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณของที่ละลายได้ที่ 22 องศาเซลเซียส

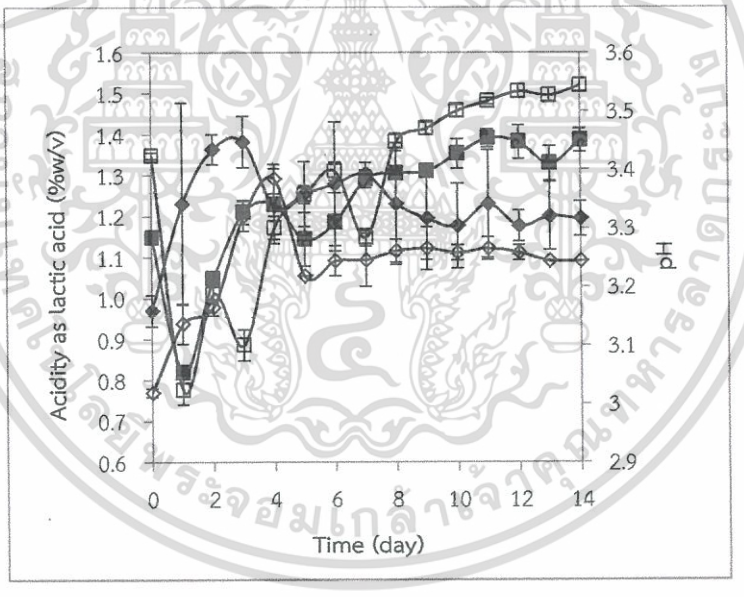
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 22 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 4.3 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้และน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างการหมักไวน์โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ปริมาณกรดแลคติก และค่าพีเอช

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก ดังแสดงในภาพที่ 4.4 พบว่าปริมาณกรดของการหมักไวน์ข้าวทั้งสองสภาวะตั้งแต่วันที่ 0 (ผ่าส่า+เติมยีสต์) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยการหมักที่อุณหภูมิห้อง (28.27±0.59 องศาเซลเซียส) พบว่าค่าปริมาณกรดเพิ่มขึ้นสูงสุดในการหมักวันที่ 3 เท่ากับ 1.38±0.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นลดลงเหลือ 1.19±0.04 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในวันที่ 14 การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสปริมาณกรดเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 1.29±0.04 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นลดลงเหลือ 1.09 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในวันที่ 14 ซึ่งสอดคล้องกับค่าพีเอสที่ลดลงในวันที่ 0 ถึงวันที่ 1 และจากนั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 3.01±0.01 ไปเป็น 3.45±0.02 ของอุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส จาก 3.02±0.01 ไปเป็น 3.54±0.01 ในวันที่ 14 จะเห็นว่าการหมักที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ส่งผลให้ปริมาณกรดแลคติกที่ต่างกัน โดยการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องมีปริมาณกรดแลคติกมากกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เนื่องจากราสร้างกรดอินทรีย์บางชนิดที่ทำให้เกิดรสเปรี้ยวในสาโท เช่น กลุ่ม Lactobacillus มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยทั่วไป 30-40 องศาเซลเซียส (ไร่กล้อมแกล้ม, 2553)



ปริมาณกรดในรูปของกรกแลคติกที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณกรดในรูปของกรดแลคติกที่ 22 องศาเซลเซียส

ค่าพีเอชที่อุณหภูมิห้อง ค่าพีเอชที่ 22 องศาเซลเซียส

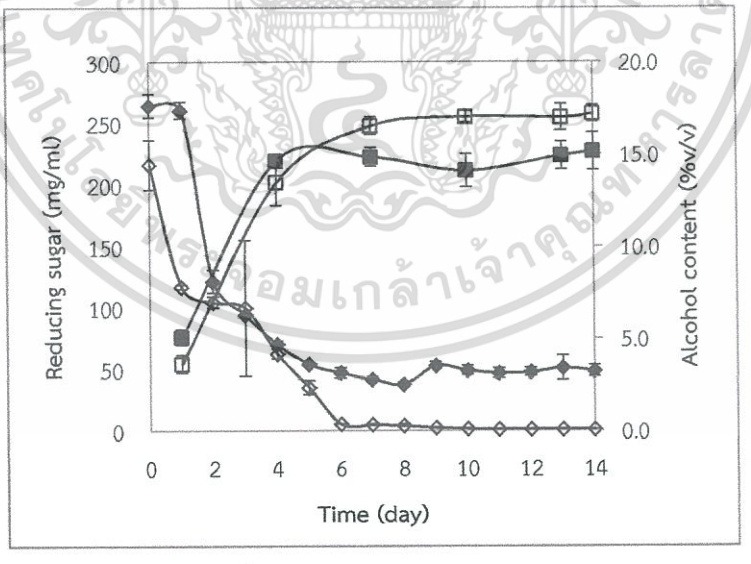
ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติคและค่าพีเอชในระหว่างการหมักไวน์โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้วมมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 ปริมาณแอลกอฮอล์ และน้ำตาลรีดิวซ์

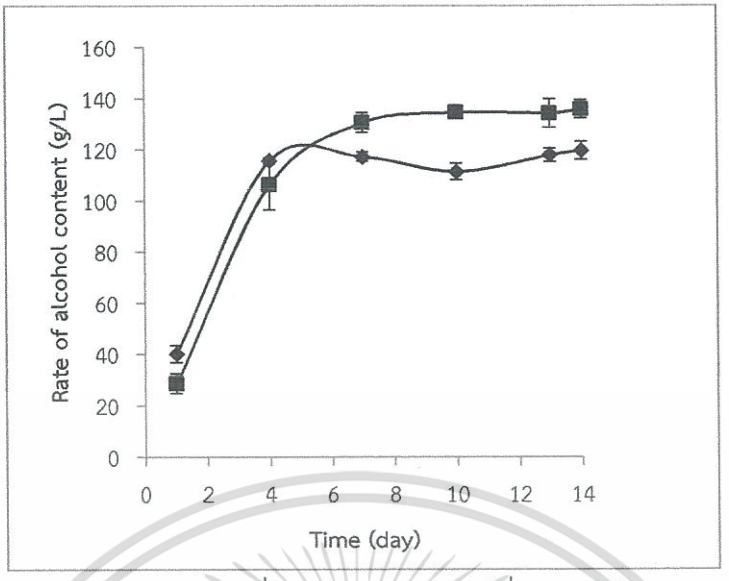
น้ำตาลถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์ ในการทดลองนี้วัดปริมาณแอลกอฮอล์โดยวิธีไดโครเมท จากภาพที่ 4.4 การทดลองการหมักไวน์ข้าวทั้ง 2 สภาวะ พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์มีแนวโน้มสูงขึ้นและสูงสุดในการหมักวันที่ 14 จากไวน์ข้าวที่หมักอุณหภูมิห้อง มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด 15.16±1.01 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ส่วนการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด 17.20±1.05 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จากภาพที่ 4.5 ในช่วงแรกของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องเชื้อมีการใช้น้ำตาลได้เร็วกว่า แต่การหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส มีปริมาณน้ำตาลสุดท้ายที่เหลือน้อยกว่าการกมักที่อุณหภูมิห้อง จึงส่งผลให้การหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียสมีปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูง เนื่องจากยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลฟรุคโตส ให้เป็นแอลกอฮอล์ และมีผลพลอยได้เป็นก๊าซ โดยตามทฤษฎี จะได้แอลกอฮอล์ประมาณ 50 % จากปริมาณน้ำตาลที่ใช้ แต่ในทางปฏิบัติมักไม่ถึง เพราะจะเกิดผลพลอยได้เป็นสารให้กลิ่นรสอีกหลายชนิด (นิรนาม, 2554)

จากภาพ 4.6 แสดงอัตราการเกิดแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักไวน์ พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ของการหมักไวน์ข้าวทั้ง 2 สภาวะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยการหมักไวน์ข้าวในวันที่ 14 อุณหภูมิห้องมีปริมาณแอลกอฮอล์ 119.63±3.55 กรัมต่อลิตร และ 22 องศาเซลเซียสมีค่าเท่ากับ 135.73±3.56 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเมื่อสิ้นสุดการหมัก เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำจะได้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่าการหมักภายใต้อุณหภูมิสูง (Parrou, 1997)



ภาพที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักไวน์โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



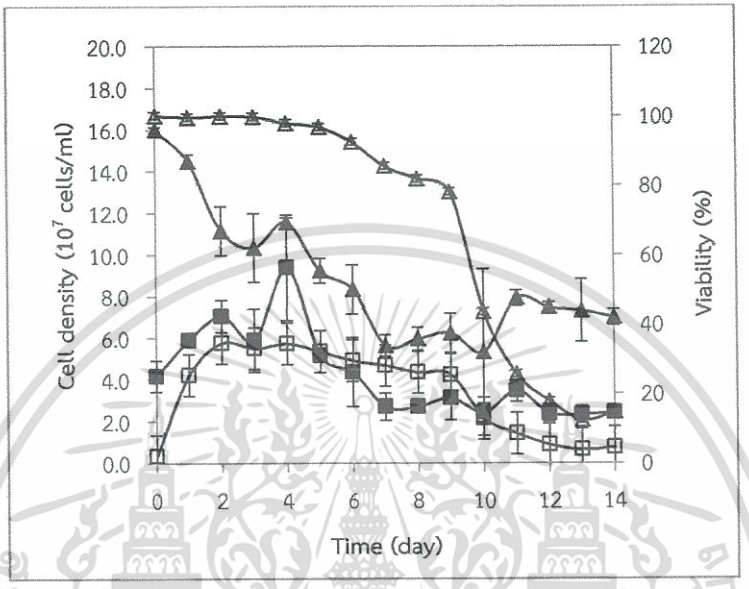
ภาพที่ 4.6 ปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักไวน์โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว

ในการศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai ในระหว่างการหมักไวน์ข้าว ในสภาวะอุณหภูมิห้อง และ 22 องศาเซลเซียส ความร้อนมีผลต่อการเจริญของยีสต์ และสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง แต่อุณหภูมิที่สูงมากเกินไปจะทำให้การเจริญของยีสต์และอัตราการผลิตเอทานอลต่ำกว่าที่อุณหภูมิการหมักปกติ โดยทั่วไปจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 18-20 องศาเซลเซียส (ปิยะรัชช์, 2551) ซึ่งการทดลองนี้พบว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มีแนวโน้มลดลงจากในวันที่ 0 (ผ่าส่า+เติมยีสต์) สูงสุดคือ 95.95±0.72 เปอร์เซ็นต์เหลือ 41.90±2.31 เปอร์เซ็นต์ในการหมักวันที่14 และการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส ในวันที่ 0 (ผ่าส่า+เติมยีสต์) มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์สูงสุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ลดลงเหลือเพียง 14.54±2.67 เปอร์เซ็นต์ จากภาพที่ 4.7 จะเห็นว่าการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส ในการหมักวันที่ 0 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องแต่วันที่ 11 จนถึงวันที่ 14 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องเนื่องจากยีสต์อยู่ในสภาพเครียดที่มีน้ำตาลน้อย และมีปริมาณแอลกอฮอล์ที่มากกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง โดยปริมาณแอลกอฮอล์สุดท้ายการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องเท่ากับ 15.16±1.01 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสเท่ากับ 17.20±1.05 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เนื่องจากจำนวนเซลล์การรอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตบ่งบอกถึงการเจริญ และความแข็งแรงของเซลล์ยีสต์ โดยในระหว่างการหมักเกิดสภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเครียดจากหลายสาเหตุ เช่นในวันที่ 0 มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้สูงประมาณ 24 องศาบริกซ์ ส่งผลให้ยีสต์อยู่ในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกสูง หลังจากนั้นระหว่างการหมักมีพลังงานความร้อนเกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลจากยีสต์ใช้น้ำตาลในการหมักไวน์ และเกิดสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ เช่น ความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้น น้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งอาหารของยีสต์ลดน้อยลง (ลูกจันทร์, 2551)



จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตที่อุณหภูมิห้อง จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตที่ 22 องศาเซลเซียส

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่อุณหภูมิห้อง เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 22 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของไวน์ข้าวเมื่อสิ้นสุดการหมักของทั้งสองอุณหภูมิ จากการทดลองพบว่าไวน์ข้าวที่มาจากการหมักที่ 22 องศาเซลเซียสแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อกระบวนการหมักไวน์ข้าว โดยสังเกตได้จากเมื่อสิ้นสุดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าต่ำกว่าไวน์ข้าวที่หมักอุณหภูมิห้อง (ตามตารางที่ 4.1) ส่งผลให้การสร้างปริมาณแอลกอฮอล์มีค่าสูงกว่า คือ 17.20±0.45 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อีกทั้งเมื่อสิ้นสุดการหมักแล้วยังพบว่าปริมาณกากข้าวของไวน์ข้าวที่หมักที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสมีน้อยกว่าไวน์ข้าวที่หมักอุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลผลิตไวน์ข้าวเมื่อสิ้นสุดการหมัก (14 วัน) โดยใช้อุณหภูมิการหมักที่ต่างกัน

องค์ประกอบทางเคมี	อุณหภูมิห้อง	22 องศาเซลเซียส
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์)	12.5±0.46	8.6±0.35
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	48.71±4.66	1.11±0.06
ค่าพีเอช	3.45±0.02	3.54±0.01
ปริมาณกรดทั้งในรูปกรดแลคติก (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	1.19±0.04	1.09±0.00
ปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	15.16±1.01	17.20±0.45
ปริมาตรน้ำไวน์ข้าวที่ได้ (มิลลิลิตร)	3,390±55.67	2,783.33±47.26
ปริมาณกากข้าวที่เหลือ (มิลลิลิตร)	175.33±14.52	73.79±1.36

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงในตารางมาจากค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.8 แสดงลักษณะการไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องวันที่ 1 (A) วันที่ 14 (B) และ 22 องศาเซลเซียส ในวันที่ 1 (C) วันที่ 14 (D) จะเห็นว่าการหมักไวน์ข้าววันที่ 1 ที่อุณหภูมิห้องมีการลอยตัวขึ้นลงของข้าวได้ดีกว่าการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียสในการหมักวันเดียวกัน เนื่องจากเกิดก๊าซเป็นผลการหมักของยีสต์ได้เร็วจากอุณหภูมิที่สูงกว่า และการหมักไวน์ข้าวในวันที่ 14 ที่ 22 องศาเซลเซียสมีข้าวบางส่วนลอยและมีบางส่วนตกตะกอนเมื่อเทียบกับไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องข้าวตกตะกอนทั้งหมด

ภาพที่ 4.8 การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องในวันที่ 1 (A) การหมักวันที่ 14 (B) และการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส ในวันที่ 1 (C) การหมักวันที่ 14 (D)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของการศึกษาอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์

ผลของอุณหภูมิเป็นสภาวะแวดล้อมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ ได้แก่ กระบวนการเผาผลาญสารอาหาร การขนส่งสารอาหาร และกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ รวมไปถึงการสะสมสารอาหารที่เป็นแหล่งให้พลังงานสำรอง และป้องกันเซลล์จากสภาพความเครียดต่างๆ เช่น Heat shock แรงดันออสโมติก เป็นต้น ซึ่งเป็นอันตรายกับเซลล์ (Irina, 2008; Junmei *et al.*, 2012) จึงทำให้เซลล์เกิดการสะสมของไกลโคเจน ทรีฮาโลส กลีเซอรอล และเออโกสเตอรอลในการศึกษานี้นั้นเป็นการเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกันในการผลิตไวน์ข้าว คือ อุณหภูมิห้อง และ 22 องศาเซลเซียส

4.3.1 ไกลโคเจน

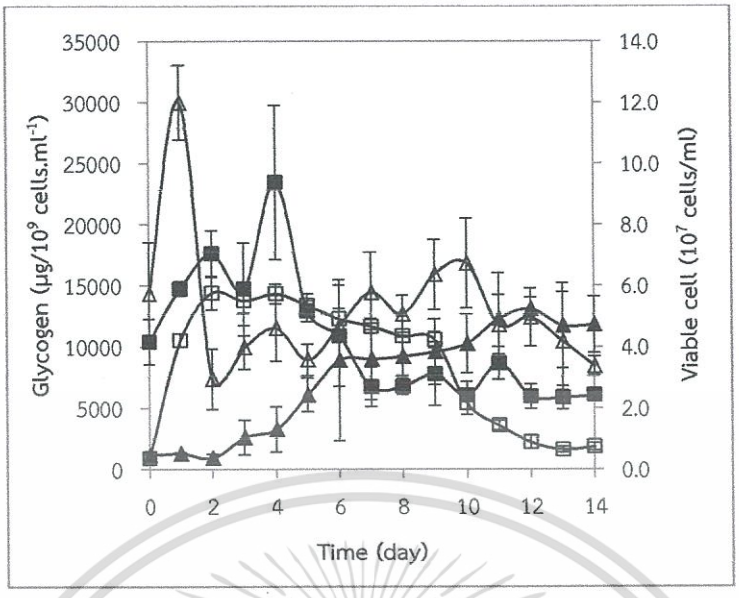
การสะสมไกลโคเจนภายในเซลล์ยีสต์นั้นเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับสภาวะความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงสารอาหารใหม่ ซึ่งเซลล์ยีสต์ยังไม่สามารถปรับสภาพในการนำสารอาหารใหม่นั้นมาใช้สำหรับกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ได้ จึงเป็นผลให้เซลล์ยีสต์มีการสลายสารอาหารสำรองภายในเซลล์ คือ ไกลโคเจน เพื่อให้เซลล์นั้นสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ได้ต่อไป (Boulton และQuain , 2001; Irina, 2008) จากภาพที่ 4.9 พบว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง และ 22 องศาเซลเซียส วันที่ 0 มีปริมาณไกลโคเจนที่สะสมภายในเซลล์อยู่ 1,138.84±200.41 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 14,319.01±4207.70 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าการสะสมไกลโคเจนที่อุณหภูมิห้องมีปริมาณน้อยกว่าการหมักไวน์ที่ 22 องศาเซลเซียส นอกจากนี้การเจริญของเซลล์ยีสต์ทั้งสองอุณหภูมินั้นมีการปรับตัวได้สังเกตจากการที่มีการรอดชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นจากการหมักวันที่ 0 ซึ่งจาก การรายงานว่า ไกลโคเจนถูกนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเผาผลาญของเซลล์ในช่วงของการปรับตัว (lag phase) เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในแหล่งอาหารใหม่ (Irina, 2008; Soisuda, 2011) จากการทดลองไม่พบว่าปริมาณไกลโคเจนนั้นลดลงในช่วงแรก (log phase) ตามทฤษฎี สาเหตุอาจเป็นเพราะการเก็บผลการทดลองนั้นไม่ได้มีการเก็บความถี่ทุกชั่วโมงเพียงแต่เป็นการเก็บผลทุกๆ 24 ชั่วโมงเท่านั้น

อย่างไรก็ตามผลอุณหภูมิที่แตกต่างกันจึงทำให้ปริมาณไกลโคเจนมีความแตกต่างกัน โดยการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส ยีสต์มีการสะสมปริมาณไกลโคเจนมากกว่าการหมักที่อุณหภูมิห้อง สังเกตได้จากการหมักในวันที่ 1 นั้นปริมาณไกลโคเจนที่มาจากเซลล์ยีสต์หมักที่อุณหภูมิห้องมีค่าเท่ากับ 1,263.92 ±89.57 ไมโครกรัมต่อ 10^9เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนปริมาณไกลโคลเจนที่ 22 องศาเซลเซียสมีค่าเท่ากับ 29,992.89±3051.47 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ไกลโคเจนจะย่อยสลายได้เร็วกว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ เพราะสภาวะที่อุณหภูมิสูงทำให้เซลล์ยีสต์อยู่ในภาวะเครียดจากอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น ยีสต์จำเป็นต้องสลายไกลโคเจนเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมนั้น (Perez *et al.*, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์ไกลโคเจนภายในเซลล์ยีสต์ และเป็นสารอาหารที่ให้พลังงานแก่เซลล์ เพื่อใช้ในกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์ จากภาพ 4.8 พบว่าไวน์ข้าวที่มาจากการหมักทั้งสองอุณหภูมินั้น เมื่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลง ทำให้ปริมาณไกลโคเจนสูงขึ้น โดยที่ไวน์ข้าวที่หมักอุณหภูมิห้อง มีการสะสมปริมาณไกลโคเจนเพิ่มขึ้นในการหมักวันที่ 2 ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะลดลงก่อนแล้วในการหมักวันที่ 2 เมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 14 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสอยู่ 48.71±4.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีการสะสมปริมาณไกลโคเจน 11,804.40±2289.81 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนในการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียสนั้นมีการสะสมปริมาณไกลโคเจนได้เร็วกว่า คือสะสมในการหมักวันที่ 1 ซึ่งเป็นวันเดียวกันกับการลดลงปริมาณน้ำตาลกลูโคส เป็นการสะสมไกลโคเจนหลังจากที่สารอาหาร(น้ำตาล)ลดลง ซึ่งเป็นการสะสมปริมาณไกลโคเจนได้สูงสุดอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับการสะสมปริมาณไกลโคเจนในวันอื่นๆ เมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 14 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสอยู่ 1.11±0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีการสะสมปริมาณไกลโคเจน 8,418.97±765.01 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่นั้นส่งผลต่อการสะสมไกลโคเจนภายในเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการหมักที่อุณหภูมิต่ำเป็นสภาวะที่มีการนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ได้ดีกว่า ดังแสดงในภาพที่ 4.10 เนื่องจากยีสต์สายพันธุ์ *S. cereviae* var. kyokai เป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ของประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีความสามารถในเจริญที่อุณหภูมิต่ำ (Yasuko *et al.*, 2004) เป็นสาเหตุให้ยีสต์สามารถนำน้ำตาลที่เป็นแหล่งอาหารภายนอกไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี ส่งผลให้น้ำตาลนั้นถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์และสารอาหารเพื่อการอยู่รอดของเซลล์ จึงทำให้ปริมาณการสะสมไกลโคเจนที่ 22 องศาเซลเซียสมากกว่าการหมักที่อุณหภูมิห้อง และยีสต์สามารถปรับตัวนำน้ำตาลที่เป็นแหล่งอาหารภายนอกที่มีจำกัดมาเปลี่ยนเป็นแหล่งพลังงานสำรองในรูปของไกลโคเจนที่สะสมไว้ภายในเซลล์ (Boulton และQuain , 2001) อีกทั้งมีรายงานว่าการสะสมไกลโคเจนภายในเซลล์ยีสต์นั้นจะเกิดขึ้น เมื่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมด หรือหลังจากที่น้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดทันที (Margaret *et al*, 1993) แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าการสะสมไกลโคเจนเกิดขึ้นในขณะที่สารอาหาร คือ น้ำตาลกลูโคสยังคงไม่ได้หมดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

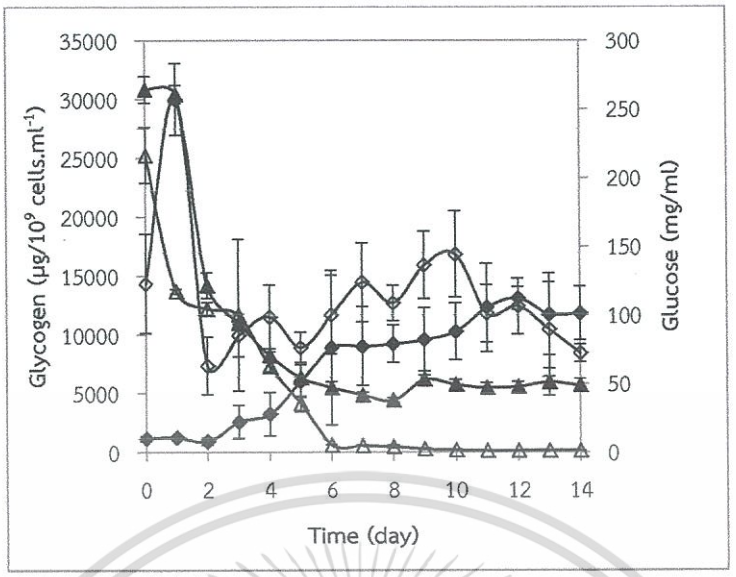


ปริมาณไกลโคเจนที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณไกลโคเจนที่ 22 องศาเซลเซียส

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่อุณหภูมิห้อง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ 22 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไกลโคเจนและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าว โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



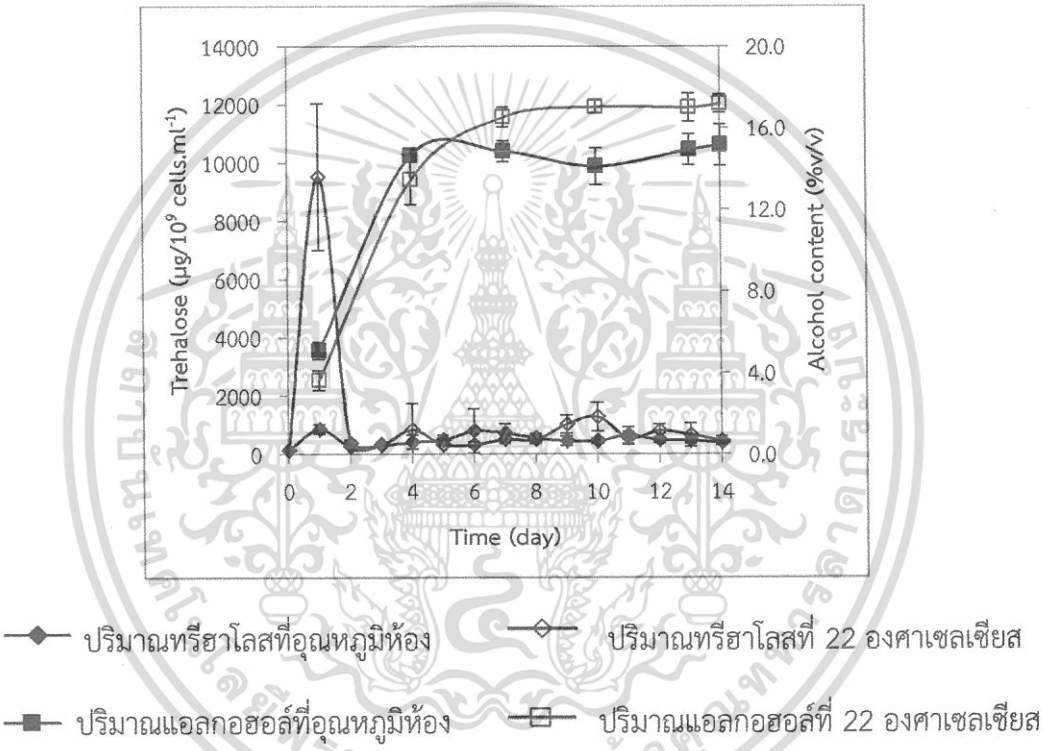
ภาพที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไกลโคลเจนและน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยโดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

4.3.2 ทรีฮาโลส

ทรีฮาโลสจัดเป็นน้ำตาลไดแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นระหว่างหน่วยย่อยอัลฟากลูโคส พบมากในเซลล์ยีสต์ระยะพักตัว (Stationary phase) และภายใต้สภาวะกดดันจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ นอกจากนี้ทรีฮาโลสจัดว่าเป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ยีสต์เช่นเดียวกันกับไกลโคเจนซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำรองให้แก่เซลล์ (Irina, 2008; Maria, 2003) จากภาพที่ 4.11 พบว่าการหมักวันที่ 1 ของทั้งสองอุณหภูมินั้นมีปริมาณทรีฮาโลสสะสมอยู่มากที่สุดเมื่อเทียบกับการหมักในวันอื่นๆ ซึ่งมีปริมาณทรีฮาโลสอยู่ 856.45± 155.55 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง และ 9,512.14± 2522.41 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส และในการหมักวันต่อไปจนถึงวันสุดท้ายของการหมักทั้งสองอุณหภูมินั้นก็มีการสะสมทรีฮาโลสได้ค่อนข้างน้อย ในขณะที่ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น โดยการหมักวันที่ 0 เป็น 5.08±0.43 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง และ 3.62±0.48 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส ซึ่งจากทฤษฎีแล้วการสะสมปริมาณทรีฮาโลสต้องเพิ่มขึ้น เนื่องจากทรีฮาโลสเป็นสารที่สามารถรักษาความเสถียรภาพของผนังเซลล์ และช่วยรักษาหรือซ่อมแซมการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนจากปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้น(Dahabada, 1999; Junmei *et al.*, 2009) และสามารถป้องกันพิษของแอลกอฮอล์ เช่น เอทานอล ได้อีกด้วย (Maria, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามมีรายงานในการศึกษาการสะสมปริมาณทรีฮาโลส และไกลโคเจนในระหว่างการหมักไวน์โดยอาศัยยีสต์ *S. cereviae* ซึ่งรายงานว่าปริมาณทรีฮาโลสจะลดลงในการหมักวันที่ 1 เนื่องจากถูกใช้เป็นแหล่งอาหารสำรองเช่นเดียวการสลายไกลโคเจนเพื่อใช้ในการปรับตัว และจะเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก (Maria, 2003) แต่จาการทดลองครั้งนี้พบว่าปริมาณทรีฮาโลสทั้งสองอุณหภูมิไม่ได้ลดลงในการหมักวันที่ 1 แต่กลับเพิ่มขึ้น และลดลงหลังจากการหมักวันที่ 1 ในระหว่างการหมักก็ไม่มีการสะสมทรีฮาโลสเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นหลังการหมักเพียง 1 วัน ในขณะที่ระหว่างการหมักไม่มีการสะสมทรีฮาโลสเพิ่มขึ้น เพราะฉะนั้นยีสต์อาจใช้สารสะสมอื่น เช่น เออร์โกเตอรอล เพื่อให้เซลล์มีความสามารถในการทนต่อแอลกอฮอล์ (Junmei *et al.*, 2009)



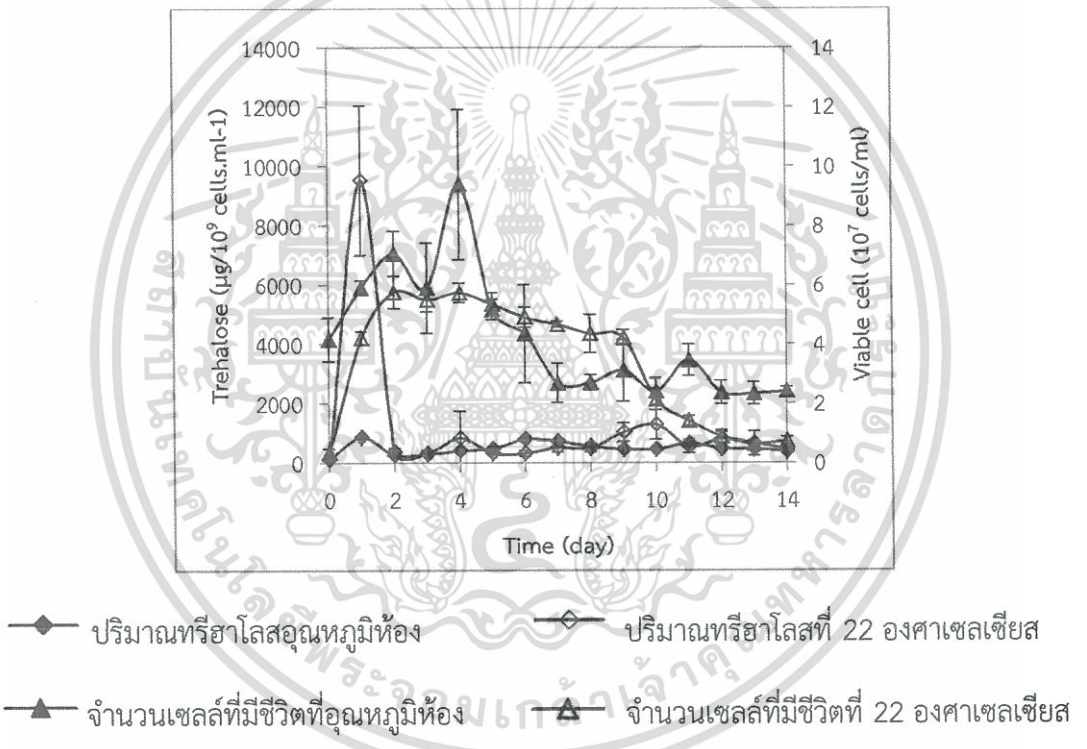
ภาพที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณทรีฮาโลสและปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

จากภาพที่ 4.12 พบว่าปริมาณทรีฮาโลสนั้นลดลงทั้งสองอุณหภูมิหลังการหมักวันที่ 1 ในขณะเดียวกันนั้นจำนวนเซลล์รอดชีวิตของการหมักไวน์ที่อุณหภูมิห้องเพิ่มขึ้นสูงสุดในการหมักวันที่ 4 และปรับตัวลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์รอดชีวิตของการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียสที่จำนวนเซลล์รอดชีวิตนั้นมีแนวโน้มคงที่ในการหมักวันที่ 2 ถึงวันที่ 4 และปรับตัวลดลงรวดเร็วหลังการหมักวันที่ 9 เป็นต้นไป ซึ่งผลของการหมักไวน์ที่ 22 องศาเซลเซียสนั้นทำให้ปริมาณทรีฮาโลสสูงมากกว่าการหมักที่อุณหภูมิห้องในการหมักวันที่ 1 ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่ออุณหภูมิในการหมักแตกต่างกันเป็นผลทำให้ปริมาณการเกิดแอลกอฮอล์ต่างกัน โดยการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส ยีสต์มีความสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

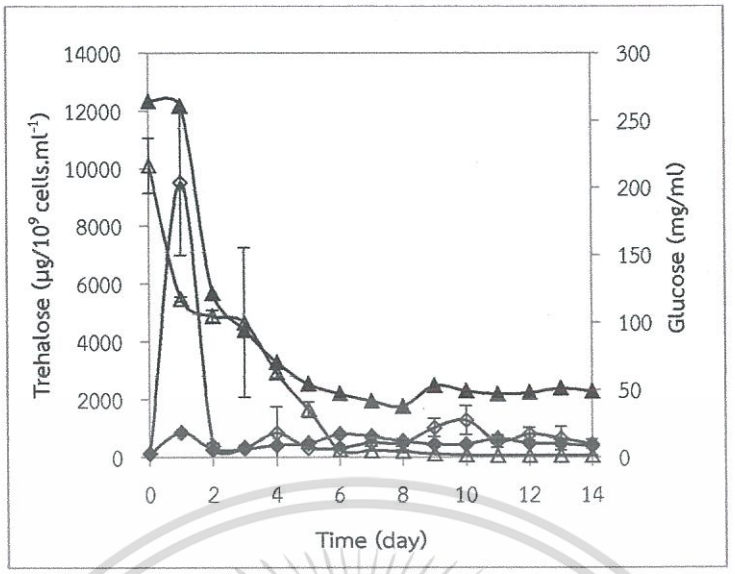
ในตอบสนองต่อปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นได้ดี ด้วยการสะสมปริมาณทรีฮาโลสได้มากกว่าถึงแม้ว่าปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจะต่ำกว่าการหมักที่อุณหภูมิห้องเล็กน้อย และจากการทดลองครั้งพบว่าในการหมักวันที่ 1 ปริมาณทรีฮาโลสที่ 22 องศาเซลเซียสมีการสะสมมากกว่าการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีรายงานว่าทรีฮาโลสช่วยป้องกันเซลล์ให้อยู่รอดจากสภาพความเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิสูง ความเป็นพิษของแอลกอฮอล์ เป็นต้น ซึ่งปกป้องเซลล์โดยรักษาโครงสร้างเมมเบรนให้เสถียรภาพ Irina (2008) อีกทั้งยังเป็นแหล่งพลังงานสำรองเช่นเดียวกันกับไกลโคเจนเพื่อใช้ในการปรับตัวในสารอาหารใหม่ (Maria *et al.*, 2003)

ส่วนในภาพที่ 4.12 จะเห็นได้ว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงปริมาณทรีฮาโลสก็ไม่ได้มีการสะสมเพิ่มขึ้นจากการหมักวันที่ 1 ในทั้งสองอุณหภูมิ



ภาพที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณทรีฮาโลส และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



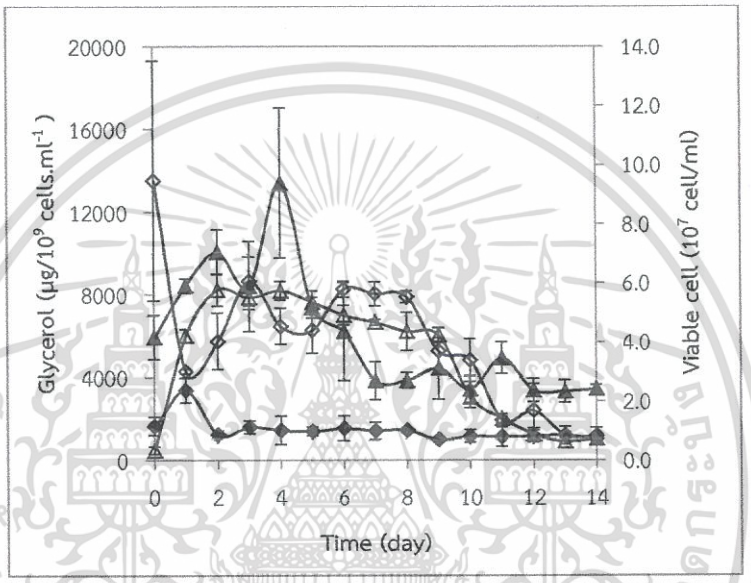
ภาพที่ 4.13 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ปริมาณทรีฮาโลสภายในเซลล์ยีสต์ *S. cereviae* var. kyokai ของการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส

4.3.3 กลีเซอรอล

การเกิดกลีเซอรอลนั้นส่วนใหญ่จะเกิดในระยะเริ่มต้นของกระบวนการหมัก ซึ่งการสร้างกลีเซอรอลจะมากน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ และปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์เริ่มต้น (ไพบูลย์, 2549) จากภาพที่ 4.14 พบว่าการสะสมปริมาณกลีเซอรอลในเซลล์ยีสต์ที่การหมักที่อุณหภูมิแตกต่างกัน โดยการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง การสะสมกลีเซอรอลเกิดขึ้นในวันที่ 1 ของการหมัก 3,374.62±590.21 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส การสะสมกลีเซอรอลเริ่มเกิดขึ้นในวันที่ 2-3 ของการหมัก มีค่าสูงสุด 8,638.84±1194.08 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และการสะสมนี้มีการปรับขึ้นและลงตลอดกระบวนการหมัก โดยการสะสมกลีเซอรอลปรับขึ้นในการหมักวันที่ 3 6 และ7 เป็น 8,638.84±1194.08 , 8,247.12±396.74 และ8,027.94±588.39 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิห้อง การสะสมกลีเซอรอลปรับขึ้นในการหมักวันที่ 3 และ 6 เป็น 1,577.05±312.34 และ 1,529.43±599.44 ไมโครกรัมต่อ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และผลของกลีเซอรอลต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ทั้งสองอุณหภูมินั้นมีการปรับตัวได้ดีในตั้งแต่การหมักวันที่ 1 เนื่องจากมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตเพิ่มขึ้นหลังจากวันที่ 0 ที่อุณหภูมิห้อง มีการเจริญเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก ส่วนที่ 22 องศาเซลเซียสนั้น มีการเจริญเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก และคงที่จนถึงวันที่ 5 จะเห็นได้ว่าผลกลีเซลรอลทั้งสองภาวะนั้นมีการสะสมแตกต่างกัน โดยที่ 22 องศาเซลเซียสมีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สะสมได้มากกว่า จากผลการทดลองครั้งนี้สังเกตได้ว่าการหมักทั้งสองอุณหภูมิสะสมกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลยังไม่ได้ลดลง และในทางกลับกันเมื่อปริมาณน้ำตาลภายนอกลดลงการสะสมกลีเซอรอลก็จะลดลงเช่นกัน เนื่องจากในช่วงเริ่มต้นการหมักยีสต์จะเผชิญกับสารอาหารใหม่ที่เพิ่มขึ้น คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลภายนอกเซลล์ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดแรงดันออสโมติกระหว่างสารภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน จึงทำให้ยีสต์มีการสะสมกลีเซอรอลเพื่อต้านทานแรงดันออสโมติกที่เกิดขึ้น โดยแรงดันออสโมติกนี้จะเป็นสื่อสัญญาณให้เกิดกระบวนการ HOG pathway (High osmolarity glycerol) ทำให้เกิดการปรับสภาพแรงดันภายในเซลล์ (Soisuda, 2011; Hassan *et al.,* 2004)



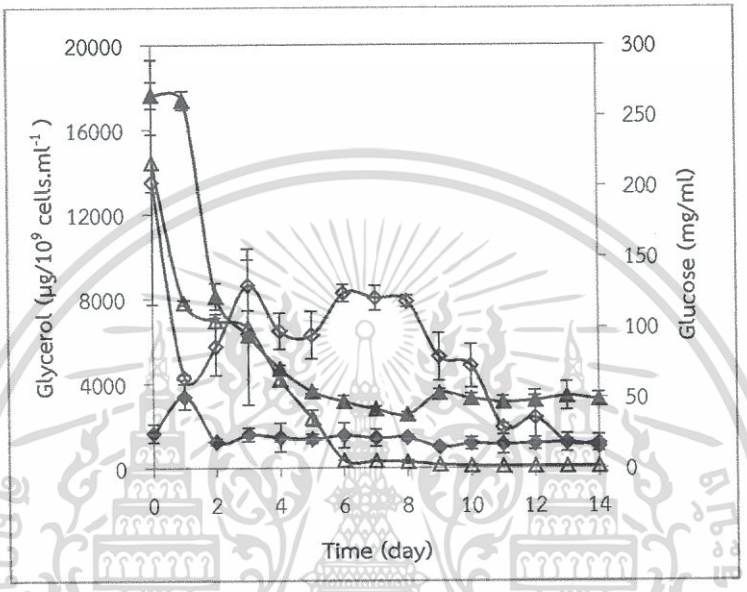
ภาพที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลีเซอรอล และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าในการหมักวันที่ 1 ที่ 22 องศาเซลเซียส การสะสมกลีเซอรอลลดลงจากการหมักวันที่ 0 เป็นผลมาจากปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ภายนอกลดลง เพราะเซลล์ยีสต์นั้นมีการนำน้ำตาลไปใช้ ตามภาพที่ 4.15 เนื่องจากกลีเซอรอลเป็นสารที่สามารถช่วยป้องกันการเกิดแรงดันออสโมติกที่เกิดจากกลูโคสเป็นสารละลายที่มีแรงดันออสโมติกสูง ซึ่งทำให้เกิดสภาพเซลล์เหี่ยวได้ (วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์, ม.ป.ป; นิรนาม, 2554; Kattie et al., 1995) นอกจากนี้ยังพบว่าการสะสมกลีเซอรอลมีการปรับตัวขึ้นและลดลงในระหว่างกระบวนการการหมักนั้น มีรายงานว่ากลีเซอรอลมีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลรีดอกซ์ให้อัตราส่วนระหว่าง NADHต่อNAD มีความสมดุลกันและในสภาวะอุณหภูมิต่ำจะมีการสะสมของกลีเซอรอล เนื่องจากภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ยีสต์ตอบสนองต่อสภาพเครียดต่างๆได้ดี ซึ่งทำให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การกระตุ้นให้ผลิตกลีเซอรอลมากขึ้น (Gang *et al.*, 2012) แต่ในการทดลองการหมักที่อุณหภูมิห้องการสะสมกลีเซอรอลสูงสุดมีเพียงวันที่ 1 เท่านั้นเพราะปริมาณน้ำตาลภายนอกยังไม่ได้ลดลง

นอกจากนี้ยังพบว่าการะสะสมกลีเซอรอลส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักไวน์ข้าว สังเกตได้ว่าที่ 22 องศาเซลเซียสมีการสะสมกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นมากกว่าที่อุณหภูมิห้อง ในขณะปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น ตามภาพที่ 4.16

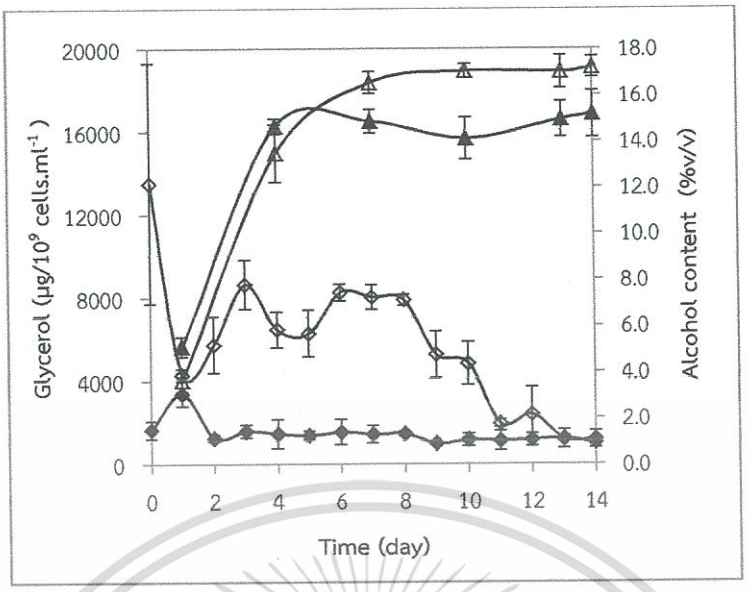


ปริมาณกลีเซอรอลที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณกลีเซอรอลที่ 22 องศาเซลเซียส

ปริมาณน้ำตาลน้ำรีดิวซ์ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณน้ำตาลน้ำรีดิวซ์ที่ 22 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลีเซอรอล และน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ปริมาณกลีเซอรอลที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณกลีเซอรอลที่ 22 องศาเซลเซียส

ปริมาณแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ 22 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 4.16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลีเซอรอล และปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

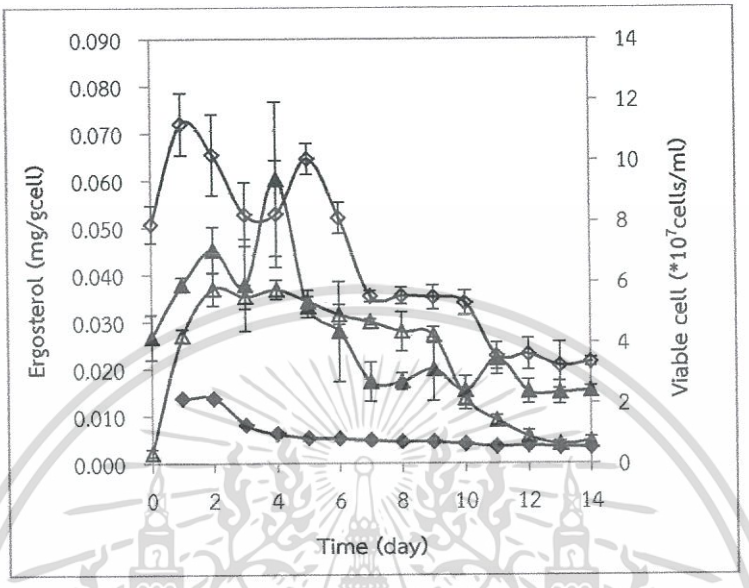
4.3.4 เออร์โกสเตอรอล

สารเออร์โกสเตอรอล ส่วนใหญ่มักพบได้ในสายพันธุ์ของยีสต์ *Sacharomyces cereviae* โดยสามารถสังเคราะห์ได้เมื่อเซลล์เจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีอากาศได้ถึง 2-15เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง (Maryke *et al.*, 1982) การทดลองนี้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณเออร์โกสเตอรอลที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์ระหว่างการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง และ 22 องศาเซลเซียส

จากภาพที่ 4.17 พบว่าในการหมักไวน์ข้าวทั้งสองอุณหภูมินั้น เกิดการสะสมสารเออร์โกสเตอรอลสูงสุดในช่วงเริ่มต้นการหมัก โดยที่การหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้องสะสมสารเออร์โกสเตอรอลได้สูงสุดในการหมักวันที่ 1 คือ 0.0138±0.0004 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ จากนั้นจึงลดลงไปเรื่อยๆจนถึงการหมักวันสุดท้าย ในขณะเดียวกันจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในช่วงแรกมีการเพิ่มขึ้น แต่สารเออร์โกสเตอรอลกลับลดลง ส่วนการหมักไวน์ที่ 22 องศาเซลเซียสนั้นมีการสะสมสารเออร์โกสเตอรอลได้มากกว่าและช่วงการสะสมกว้างกว่าการหมักที่อุณหภูมิห้อง จะเห็นได้ว่าการสะสมเริ่มจากการหมักวันที่ 1-5 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการสะสมมากที่สุดในวันที่ 5 หากเทียบกับการหมักในวันอื่นๆ ค่าสูงสุด คือ 0.0649±0.0092 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์จะสะสมสารดังกล่าวเพื่อให้เซลล์ทนต่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น (Juumei *et al*, 2009) เช่นเดียวกันจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในช่วงแรกมีการเพิ่มขึ้นและมีความคงที่ได้ยาวนานกว่าการหมักที่อุณหภูมิห้อง แต่สารเออร์โกสเตอรอลกลับลดลงเช่นกัน การที่สารสะสมเออร์โกสเต

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อรอลทั้งสองสภาวะเกิดขึ้นในช่วงเริ่มต้นการหมัก เนื่องจากก่อนเข้าสู่สภาวะการหมักนั้นจะมีปริมาณออกซิเจนที่เซลล์นั้นสามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์เออร์โกสเตอรอลได้ (Maryke *et al.*, 1982) จึงเป็นผลในช่วงเริ่มต้นการหมักมีปริมาณเออร์โกสเตอรอล



ปริมาณเออร์โกสเตอรอลที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณเออร์โกสเตอรอลที่ 22 องศาเซลเซียส

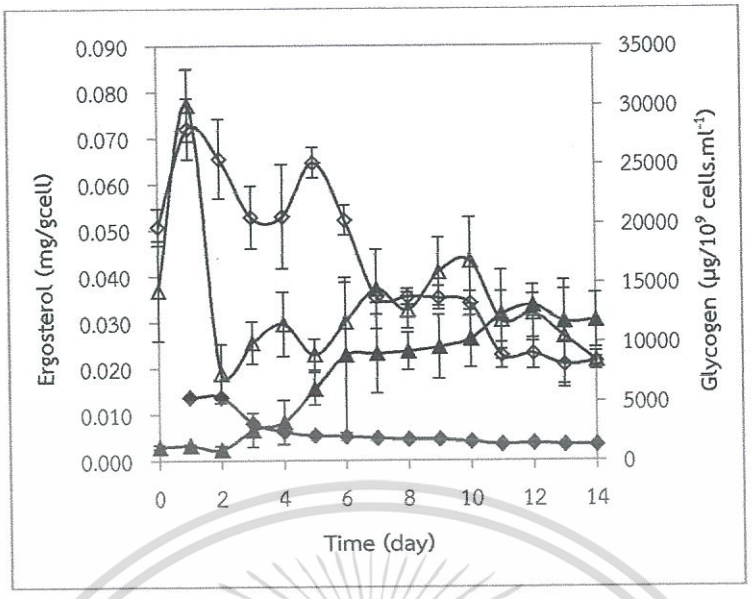
จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่อุณหภูมิห้อง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ 22 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเออร์โกสเตอรอล และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักไวน

ข้าวโดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

นอกจากนี้จากผลการทดลองพบว่าการสังเคราะห์สารเออร์โกสเตอรอลเกิดขึ้นควบคู่กับการสะสมปริมาณไกลโคเจน จากภาพที่ 4.18 จะเห็นได้ว่าการหมักไวน์ที่อุณหภูมิห้อง และ22 องศาเซลเซียสมีการสะสมของไกลโคเจน และการสังเคราะห์เออร์โกสเตอรอลควบคู่กันไป โดยที่การสังเคราะห์สารเออร์โกสเตอรอลเพิ่มขึ้น แต่การสะสมปริมาณไกลโคเจนยังคงไม่เกิดขึ้น ซึ่งในทางตรงข้ามเมื่อการหมักเกิดขึ้น การสะสมสารเออร์โกสเตอรอลลดลง ส่วนการสะสมปริมาณไกลโคเจนกลับเพิ่มขึ้น ตามทฤษฎี (Boulton และQuain , 2001) ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้พบว่าสารเออร์โกสเตรอลที่ 22 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้นและลดลงเป็นลักษณะคันบันได และมีปริมาณการสะสมในระหว่างการหมักสูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง เนื่องเซลล์มีการสะสมเออร์โกสเตอรอลเพิ่มขึ้นในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อต้านทานปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงขึ้น (Junmei *et al.*, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ปริมาณเออร์โกสเตอรอลที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณเออร์โกสเตอรอลที่ 22 องศาเซลเซียส

ปริมาณไกลโคเจนที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณไกลโคเจนที่ 22 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเออร์โกสเตอรอล และปริมาณไกลโคเจนในระหว่างการหมักไวน์ข้าว โดยใช้เชื้อ *S. cereviae* var. kyokai ที่ 22องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีของไวน์ข้าวที่ผลิตโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* var. kyokai โดยทำการศึกษา 2 สภาวะ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง และ 22 องศาเซลเซียส พบว่าการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีของไวน์ข้าวมีความแตกต่างกันระหว่างสองอุณหภูมิ โดยการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียสนั้น เซลล์ยีสต์มีความสามารถในการรอดชีวิตและปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมภายนอกในระหว่างกระบวนการหมักได้ดีกว่า อาทิเช่น ยีสต์สามารถนำน้ำตาลซึ่งเป็นสารอาหารเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีกว่า และปริมาณแอลกอฮอล์หลังสิ้นสุดกระบวนการหมักแล้วแล้วสูงกว่าการที่อุณหภูมิห้อง อีกทั้งปริมาณความเป็นกรดที่แสดงออกถึงรสชาติที่มีความเปรี้ยวต่ำกว่าการหมักที่อุณหภูมิห้องเช่นกัน

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงสารสะสมภายในเซลล์ยีสต์ พบว่าเซลล์ยีสต์นั้นมีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ต่างกันซึ่งส่งผลให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ โดยพบว่าการหมักไวน์ข้าวที่ 22 องศาเซลเซียส ยีสต์มีความสามารถในเจริญเติบได้ดีกว่าอุณหภูมิห้องซึ่งในระหว่างการหมักเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของยีสต์มีมากกว่า จากการสะสมสารทั้ง 4 ตัวเป็นการทำงานร่วมกัน (synergistic effect) เพื่อต้านสภาวะเครียดที่เซลล์ต้องเผชิญในระหว่างกระบวนการหมักส่งผลให้ยีสต์นั้นสามารถตอบสนองต่อสภาวะความเครียดจาก แรงดันออสโมติกจากความเข้มข้นของน้ำตาลสูง ความสามาต้านทานความเป็นพิษของแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักได้ดีกว่า เพื่อรักษาสภาพของเซลล์ให้สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ จากการหมักในช่วงแรกนั้นเซลล์ยีสต์ต้องเผชิญต่อการเปลี่ยนแปลงของสารอาหารใหม่ที่ความเข้มข้นน้ำตาลสูง จึงทำให้เซลล์จำเป็นต้องนำอาหารที่มีอยู่ภายในเซลล์อันได้แก่ ปริมาณไกลโคเจน ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำรองภายในเซลล์ เพื่อมาใช้ในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ก่อนที่จะนำสารสารอาหารใหม่นั้นมาใช้ และยังทำให้เซลล์ยีสต์มีการสะสมปริมาณกลีเซลรอลสูง เพื่อใช้ต้านแรงดันออสโมติกที่เกิดขึ้นระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลที่ต่างกันของสภาพแวดล้อมภายนอกและภายในเซลล์ อีกทั้งเมื่อกระบวนการหมักเกิดขึ้นทำให้เกิดปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นตามไปด้วย อีกทั้งการสะสมปริมาณกลีเซอรอลก็สามารถช่วยลดความเป็นพิษที่มาจากปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นนี้ได้ด้วย นอกจากนี้ทรีฮาโลสมีความสำคัญในการรักษาสภาพของโครงสร้างเซลล์ตรงบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ให้มีความคงทนต่อความเป็นพิษจากแอลกอฮอล์ได้เช่นกัน ส่วนสารเออร์โกสเตอรอล คือ สเตอรอลส่วนใหญ่ที่สามารถพบได้ในยีสต์ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งในโครงสร้างของเซลล์ จะช่วยในการรักษาโครงสร้างเซลล์ให้มีความยืดหยุ่นต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมจากความเครียดที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

ข้าวเป็นวัตถุดิบใช้ในการผลิตไวน์ข้าว เมื่อผ่านกระบวนการหมักแล้วเกิดการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ส่งผลให้รบกวนการวิเคราะห์สารสะสมภายในเซลล์ยีสต์บางชนิดได้ ดังนั้นหากเป็นไปได้ควรมีการควบคุมการย่อยสลายของข้าว เพื่อลดการรบกวนการวิเคราะห์ให้ผลมีความคลาดเคลื่อนน้อยลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

นรินทร. 2543. การศึกษาไวน์ข้าวที่หมักจากลูกแป้งเหล้าและเชื้อบริสุทธิ์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://fic.nfi.or.th/research/research.php?id=353. 14 พฤศจิกายน 2558.

นิรนาม. 2552. NADH-NADPH. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.si.mahidol.ac.th/th/department/Biochemistry/webboard/dept_wbdetail.asp?wq_id=162

นิรนาม. 2554. การออสโมซิส (Osmosis). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:http://www.scimath.org/socialnetwork/groups/viewbulletin. 1 ธันวาคม 2558

นิรนาม. ม.ป.ป. ลิพิด(lipid). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.thoengwit.ac.th/freeweb/19443/Lipid.php. 10 ธันวาคม 2558.

นิรนาม. 2553. ขั้นตอนการหมัก. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.tpa.or.th/writer/read_this_book_topic.php?pageid=6&bookID=1619&read=true&count=true. 20 กรกฎาคม 2559

นิรนาม. 2558. สรีรวิทยาของยีสต์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://drkosol.yolasite.com/physiology.php. 5 ธันวาคม 2558.

ปิยะรัชช์ กุลเมธี. 2551. การผลิตไวน์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.agro.kmutnb.ac.th/e-learning/521302/5.php. 14 พฤศจิกายน 2558.

พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา. 2556. Generation time. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1543/generation-time. 9 ธันวาคม 2558.

พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา. 2556. Saccharomyces cerevisiae. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1509/saccharomyces-cerevisiae. 9 ธันวาคม 2558.

พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา. 2556. Glycerol. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1926/glycerol. 14 พฤศจิกายน 2558.

ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย. 2549. กระบวนการหมักไวน์ผลไม้. หน้า 68-69. ไวน์ผลไม้และสาโท. ขอนแก่น: คลังนานาวิทยา.

ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย. 2549. ปัจจัยที่จำเป็นในการผลิตไวน์ผลไม้และสาโท. หน้า 16-33. ไวน์ผลไม้และสาโท. ขอนแก่น: คลังนานาวิทยา.

ไร่กล้อมแกล้ม. 2552. ยีสต์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.kasetloongkim.com.14 พฤศจิกายน 2558.

ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์. 2551. คู่มือการอบรมโครงการฝึกอบรมเพื่อพัฒนาคุณภาพสุราชนิดผลไม้และสุราพื้นบ้านที่มีแรงแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรี และผลิตภัณฑ์จากผลผลิตทางการเกษตร. คณะอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์. ม.ป.ป. Membrane Structure and Function. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://web.sc.chula.ac.th. 1 ธันวาคม 2558.

วิษณุ จันทร์สง่า. 2556. สาโท.[ออนไลน์].เข้าถึงได้จาก:http://l3lackmann.blogspot.com/2013/05/blog-post.html.14 พฤศจิกายน 2558.

ศูนย์วิจัยข้าวเชียงราย. 2552. ข้าวเหนียวเขี้ยวงู. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://cri.brrd.in.th/web/index.php/2009-10-05-15-13-12/96-2013-08-28-05-26-08.14 พฤศจิกายน 2558.

สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา. 2557. การผลิตไวน์ข้าว. หน้า 36-38. อุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์. กรุงเทพ.สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว(BRRD). 2546. ผลิตภัณฑ์ไวน์ข้าว.[ออนไลน์].เข้าถึงได้จาก: http://www.arda.or.th/kasetinfo/rice/rice_product/rice-product1_7.html. 14 พฤศจิกายน 2558.

สุราไทย. 2556. ยีสต์และการหมักไวน์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:https://surathai.wordpress.com/2010/06/12/yeastwine/.14 พฤศจิกายน 2558.

ธีรวัลย์ ชาญฤทธิเสน. 2554. การทำไวน์ผลไม้. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://surathai.wordpress.com/2011/05/15/fruitwine/. 2 มิถุนายน 2559.

อรุณ ชาญชัยเชาร์วิวัฒน์. 2558. การสังเคราะห์ไกลโคเจนและทรีฮาโลส. หน้า 166-168. ยีสต์และเทคโนโลยีของยีสต์. ครั้งที่ 1. กรุงเทพ. ก้าวไทยแอดเวอร์ไทซิ่งแอนด์พริ้นติ้ง.

Anonymous. 2015. [Online]. Available: http://homedistiller.org/wash/ferment/temp. 13 December 2015.

AOAC. 1990. Official method of analysis. 15th Edn. Association of Official Agrilcultural ChemistsWashington,DC

Brew Science. 2013. Sterols in beer. [Online]. Available: http://sciencebrewer.com/tag/sterols-in-beer/. 9 December 2015.

Boulton, C. and Quain, D. 2001. Brewing Yeast and Fermentation. Blackwell Science, Oxford

Clark, M.H, Wade, F., Larry, A.L, Marjorie, L.L, David, E.B. 2013. Fermentation Temperature Modulates Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylinositol Levels in the Cell Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. [online]. Available: http://aem.asm.org/content/79/17/5345.full. 14 December 2015.

Dahabada Helena J.L., José L., José Roberto M.F., Mauro S.P. 1999. Effects of Trehalose and Ethanol on Yeast Cytosolic Pyrophosphatase. Z. Naturforsch. 186-190.

Gang, D. Jicheng, Z. Yiling, Y. Yu, Z. Weidong, H. 2012. Effect of Fermentation Temperature and Culture Medium on Glycerol and Ethanol during Wine Fermentation. [online].

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Available: http://www.ajevonline.org/content/63/1/132.full. 14 December 2015.

Hassan, D., Renate, K., Klaus, E. 2004. High Osmolarity Glycerol (HOG) Pathway-induced Phosphorylation and Activation of 6-Phosphofructo-2-kinase Are Essential for Glycerol Accumulation and Yeast Cell Proliferation under Hyperosmotic Stress. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

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

Irina, B. 2008. The importance of trehalose in brewing yeast survival. Innovative Romanian Food Biotechnology, SC Heineken

Johannes, P.D, W. Alexander, S. 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. FEMS. Microbiology Reviews. 32. 199-224.

Junmei, D.,Xiaowei, H.,Lemin, Z.,Na Zhao, Dongmei, Y.,Keqin, Z. 2009. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 85. 253-263.

Kattie, L., Jacobus A., W.Fourie S., Bernard A.P., Jose R., Johan M.T., and Stefan H. 1995. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. The EMBO Journal. 14. 1360-1371.

Maria, T.N., Gemma, B., Maria, J.T., Montserrat, P., Nicolas, R., Jose, M. G., Alberto, M. 2003. Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation, rehydration and low temperature fermentations. International Journal of Food Microbiology. 86. 153-161.

Margaret, W.W., Edward B., Gerald C.J., Richard A.S. 1993. Stationary phase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiological reviews. 383-401.

Maryke, S., Adrienne, F.K., Tomp, A. 1982. Ergosterol concentration of several different *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. South African Journal of Enology and Viticulture.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal.Chem. 31(3). 426-428.

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

Paul, V.A. 1987. Trehalose accumulates in Saccharomyces cerevisiae during exposure to agents that induce heat shock response. Elsevier Science Publishers B. V. Vol.225.

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาที่ได้รับความคุ้มครองตามกฎหมาย ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

259-263.

Pederson, C.S. 1979. Microbiology of Food Fermantations. 2nd ed. AVI Publishing, Westport, Connecticut

Prez-Torrado, R., Gimeno-Alcaniz, J.V, Matallana, E. 2002. Wine Yeast Strains Engineered for Glycogen Overproduction Display Enhanced Viability under Glucose Deprivation Conditions. [online]. Available: http://aem.asm.org/content/68/7/3339.short?related urls=yes&legid=aem;68/7/3339. 14 December 2015

Soisuda Pornpukdeewattana. 1977. Investigation of ethanol fermentation in industrial strains of Saccharomyvces cerevisiae. University of Nottingham.

Sunanta, W., Lamaimaat, Y. , Phunsri, S. 2008. Production of rice wine from pure culture of *Aspergillus oryzae* and\ *Saccharomyces cerevisiae*. Rice Department, Bangkok (Thailand). Bureau of Rice Research and Development

Thomas, D.S., Hossack, I.A., Rose, A.H., 1978. Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae. Arch. Microbiol. 117. 239-245.

Wikipedia. 2015. Amylomycesrouxii. [Online]. Available: https://id.wikipedia.org/wiki/Berkas:Amylomycesrouxii1.jpg. 9 December 2015.

Williams, M.B. and Reese, H.D., 1950. Colorimetric determination of ethyl alcohol, Analytical Chemistry. 22. 1556-1561.

X. He, W. Huai, C. Tie, Y. Liu, B. Zhang, 2000. Breeding of high ergosterol-producing yeast strains. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 25. 39-44.

Yasuko, M., Megumi, S., Takeyuki, K., Shogo, S., Tohu, F., Haruyuki, I., 2004. Increase in Spontaneous Locomotive Activity in Rats Fed Diets Containing Sake Lees or Sake Yeast. Food Science and Technology Research. 10. 300-302.

Yoshizawa, K. 1999. Saka: Production and flavor. Food Review International, 15 (1): 83-107.

Zheng-Xiang, W., Jian, Z., Huiying, F., Bernard, A.P., Glycerol production by microbial fermentation:A review. Biotechnology Advances. 19. 201–223.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารอาหาร

ก.1 Yeast Malt Agar Medium (YM Agar)

1.1 ส่วนประกอบ

Glucose	1.0 กรัม
Peptone	0.5 กรัม
Malt extract	0.3 กรัม
Yeast extract	0.3 กรัม
Agar	2 กรัม
น้ำกรอง	100 มิลลิลิตร

1.2 ขั้นตอนการเตรียม

ผสมองค์ประกอบทั้งหมด ต้มให้ละลาย เทลงในหลอดทดลองขนาด 16 × 15 มิลลิเมตร ปริมาณหลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดฝา เข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเอียงหลอดไว้จนแข็ง

ก.2 Yeast Malt Broth Medium (YM broth)

2.1 ส่วนประกอบ

Glucose	1.0 กรัม
Peptone	0.5 กรัม
Malt extract	0.3 กรัม
Yeast extract	0.3 กรัม
น้ำกรอง	100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ขั้นตอนการเตรียม

ผสมองค์ประกอบทั้งหมด ต้มให้ละลาย เทลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณขวดละ 100 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีและฟอยล์ และเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.3 Potato Dextrose Agar (PDA)

3.1 ส่วนประกอบ

Potato Dextrose Agar (PDA)

น้ำกรอง

3.2 ขั้นตอนการเตรียม

นำ Potato Dextrose Agar (PDA) ปริมาณ 3.9 กรัม ละลายในน้ำกรอง และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ปิเปตอาหารใส่หลอดทดลองขนาด 16 × 15 มิลลิเมตร ปริมาณหลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดฝา เข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเอียงหลอดไว้จนแข็ง

4. Potato Dextrose Broth (PDB)

4.1 ส่วนประกอบ

สารอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB)

น้ำกรอง

4.2 ขั้นตอนการเตรียม

นำ Potato Dextrose Broth (PDB) ปริมาณ 3.9 กรัม ละลายในน้ำกรอง และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ปิเปตอาหารใส่หลอดทดลองขนาด 16 × 15 มิลลิเมตร ปริมาณหลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดฝา เข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

ข.1 สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดแลกติก)

1.1 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล

เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วนำมาหาความเข้มข้น

การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยชั่งโพแทสเซียมพาทาเลต 0.3 กรัม ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคำนวณจากสูตร

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

1.2 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล

เตรียมโดยชั่งฟีนอฟธาลีน 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ข.2 สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

2.1 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)

เตรียมโดยชั่ง DNS ปริมาณ 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างลงไปทีละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 32 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากันบนฮอทเพลทจนสารละลายใส เติมโพแทสเซียมทาเทรตปริมาณ 600 กรัม ลงไปทีละน้อย ปรับปริมาตรเป็น 2,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

ข.3 สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์โดยวิธีไดโครเมทออกซิเดชั่น

3.1 สารละลายโปแทสเซียมไดโครเมท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมโดยชั่งโปแทสเซียมไดโครเมท ($K_2Cr_2O_7$) 33.77 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 325 มิลลิลิตร ลงไปทีละน้อย ทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3.2 สารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต

เตรียมโดยชั่งเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_2)_2\ 6H_2O$) ปริมาณ 135 กรัม ละลายในน้ำ 750 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร ลงไปทีละน้อย ทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.3 สารละลาย 1,10 ฟีแนนโทรลีนเฟอร์รัสซัลเฟต

เตรียมโดยชั่งเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4\ 7H_2O$) ปริมาณ 0.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมออโธฟีแนนโทรลีน 1.49 กรัม คนให้ละลาย และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ข.4 สารเคมีวิเคราะห์เซลล์ยีสต์

4.1 สารละลายเมทิลไวโอเลต ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์

เตรียมสารละลายโซเดียมซิเตรท ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งโซเดียมซิเตรม 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้ว ชั่งเมทิลไวโอเลต 0.01 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมซิเตรทที่เตรียมไว้ 100 มิลลิลิตร

ค.5 สารเคมีวิเคราะห์ไกลโคเจน

5.1 ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ pH 7.0

เตรียมสารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดย ชั่งไดโซเดียมฟอสเฟต 35.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายโมโนโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดย ชั่งไดโซเดียมฟอสเฟต 30 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดย นำสารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่เตรียมไว้แล้ว มา 80 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 400 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมสารละลายโมโนโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดย นำสารละลายโมโนโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่เตรียมไว้แล้ว มา 30 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 150 มิลลิลิตร

นำสารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และค่อยๆเติมสารละลายโมโนโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เพื่อปรับพีเอช ให้เป็น 7.00

5.2 โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 2.65 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

5.3 โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่ pH 7.0

ชั่งโซเดียมอะซิเตท 2.72 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 7.00 ด้วยกรดแอซีติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์โดยค่อยๆเติม

5.4 กรดแอซีติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์

เติมกรด 5.74 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

ข.6 สารเคมีวิเคราะห์ทรีฮาโลส

6.1 โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 2.65 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6.2 โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่ pH 7.0

ชั่งโซเดียมอะซิเตท 2.72 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 7.00 ด้วยกรดแอซีติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์โดยค่อยๆเติม

6.3 กรดแอซีติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์

เติมกรด 5.74 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

ข.7 สารเคมีวิเคราะห์กลีเซอรอล

7.1 โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 2.65 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

7.2 โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่ pH 7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่งโซเดียมอะซิเตท 2.72 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 7.00 ด้วยกรดแอซีติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์โดยค่อยๆเติม

7.3 กรดแอซีติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์

เติมกรด 5.74 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

ข.8 สารเคมีวิเคราะห์เออร์โกสเตอรอล

8.1 สารละลายแอลกอฮอล์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 50 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำมาผสมกับแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 2 ต่อ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์

ค.1 วิธีวิเคราะห์ปริมารของแข็งที่ละลายโดยใช้รีแฟรกโตมิเตอร์ (AOAC,2000)

1.1 เครื่องมือ/วัสดุ/อุปกรณ์

เครื่องรีแฟรกโตมิเตอร์

1.2 วิธีวิเคราะห์

1.2.1 เลือกรีแฟรกโตมิเตอร์ที่มีช่วงสเกลเหมาะสม

1.2.2 ใช้น้ำกลั่นล้างส่วนปริซึมของรีแฟรกโตมิเตอร์ให้สะอาด และเช็ดให้แห้ง

1.2.3 หยดน้ำกลั่นลงบนปริซึม ส่งอ่านค่า แล้วปรับค่าที่อ่านได้ให้เท่ากับ 0 จากนั้นเช็ดให้แห้ง

1.2.4 หยดสารละลายตัวอย่าง 1-2 หยด ลงบนปริซึม ส่องอ่านค่า

1.2.5 ใช้น้ำกลั่นล้างให้สะอาด และเช็ดให้แห้ง

ค.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดแลกติก) (AOAC, 1990)

2.1 เครื่องมือ/วัสดุ/อุปกรณ์

ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

ปิเปต ขนาด 5 มิลลิลิตร

บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร

บีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.2 สารเคมี

น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ (ต้มน้ำกลั่นให้เดือด 20 นาที)

สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล

สารละลายฟีนอฟธาลีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 วิธีวิเคราะห์

2.3.1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่

2.3.2 เติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 100 มิลลิลิตร

2.3.3 เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด

2.3.4 ไตเตรดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนคือจุดยุติ คำนวณหาปริมาณกรดในรูปกรดแลกติกต่อปริมาตรไวน์ 100 มิลลิลิตร

$$\text{ปริมาณกรดแลคติก} = \frac{\text{ปริมาตร NaOH} \times \text{ความเข้มข้น NaOH} \times 90 \times 100}{1000 \times \text{ปริมาตรตัวอย่าง}}$$

ค.3 วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

3.1 เครื่องมือ/วัสดุ/อุปกรณ์

หลอดทดลองขนาด 16 × 15 มิลลิเมตร

ลูกแก้ว

ปิเปต

Vortox

Hot plat

3.2 สารเคมี

3,5-dinitroslicylic acid

Sodium hydroxide

Sodium potassium tartrate

น้ำกลั่น

3.3 วิธีวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่าง 1 มิลลิเมตร (ถ้าตัวอย่างมีความเข้มข้นมากให้เจือจางโดยน้ำกลั่น) ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DNS 1 มิลลิเมตร

3.3.2 ปิดปากหลอดด้วยลูกแก้ว ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาการเกิดสีโดยแช่น้ำเย็นทันที

3.3.3 เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิเมตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

3.3.4 เตรียม blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

3.3.5 นำค่าที่ได้มาหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

3.4 การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

3.4.1 นำกลูโคสอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้อุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น

3.4.2 ชั่งกลูโคส 0.0901 กรัม ละลายในน้ำน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3.4.3 เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.00 และดูดมาใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.4.4 ปิดปากหลอดด้วยลูกแก้ว ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาการเกิดสีโดยแช่น้ำเย็นทันที

3.4.5 เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิเมตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคล 550 นาโนเมตร

ค.4 วิธีนับเซลล์ยีสต์โดยใช้ Haemacytometer

4.1 เครื่องมือ/วัสดุ/อุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์

Haemacytometer

ปิเปต

หลอดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกยาง

4.2 สารเคมี

น้ำเกลือความเข้มข้น 9 เปอร์เซ็นต์

สารละลายเมทิลไวโอเลต

4.3 วิธีวิเคราะห์

4.3.1 ปิเปตตัวอย่างใส่หลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร (ถ้าตัวอย่างมีความเข้มข้นมากเกินไป ให้เจือจางด้วยน้ำเกลือ 9 เปอร์เซ็นต์) ดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วใส่หลอดทดลอง 0.1 มิลลิลิตร เติม สารละลายเมทิลไวโอเลต 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4.3.2 รอ 5 นาที นับจำนวนเซลล์มีชีวิตและไม่มีชีวิตภายใน 15 นาที โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่ความละเอียด 40 เท่า

4.3.3 คำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ทั้งหมด และร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้สูตร

$$\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด (เซลล์/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ทั้งหมด} \times \text{อัตตราการเจือจาง} \times 10^6}{4}$$

$$\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี} \times \text{อัตตราการเจือจาง} \times 10^6}{4}$$

$$\text{ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}}$$

ค.5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์โดยวิธีไดโครเมทออกซิเดชัน (Williams, 1950)

5.1 เครื่องมือ/วัสดุ/อุปกรณ์

ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จุกยางปิดปากขวด

ชุดกลั่น

บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิเปตแบบวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร และ 25 มิลลิลิตร

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

5.2 สารเคมี

สารละลายโปแทสเซียมไดโครเมท

สารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต

สารละลาย 1,10 ฟีแนนโทรลีนเฟอร์รัสซัลเฟต

5.3 วิธีวิเคราะห์

5.3.1 เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และ ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดสำหรับกลั่น ต่อชุดกลั่น

5.3.2 ปิเปตสารละลายโปแทสเซียมไดโครเมท 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปวางไว้ที่ปลายส่วนควบแน่น โดยให้ปลายของส่วนควบแน่นจุ่มลงในสารละลายโปแทสเซียมไดโครเมท กลั่นด้วยความร้อนต่ำจนได้ distillate รวมกับสารละลายโปแทสเซียมไดโครเมท จนมีปริมาตรประมาณ 40-45 มิลลิลิตร จึงหยุดหลั่น

5.3.3 ฉีดล้างส่วนควบแน่นด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยให้ลงไปรวมอยู่ในขวดรูปชมพู่

5.3.4 นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 60-65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาที

5.3.5 นำมาไตเตรทกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียวใส เติมสารละลาย 1,10 ฟีแนนโทรลีนเฟอร์รัสซัลเฟต ลงไปประมาณ 10 หยด แล้วไตเตรทต่อจนกลายเป็นสีน้ำตาลแดงอิฐ จดปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นค่า V_A

5.3.6 ทำ Blank โดยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายโปแทสเซียมไดโครเมท 25 มิลลิลิตร ทำตาม ข้อ 5.3.2 – ข้อ 5.3.5 และจดปริมาตรสารละลายที่ใช้เป็น V_B

5.3.7 นำค่า V_A และ V_B ที่ได้คำนวณหาปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างโดยใช้สูตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.6 วิธีวัดความเป็นกรดด่างโดยใช้ pH meter (AOAC, 2000)

6.1 เครื่องมือ/วัสดุ/อุปกรณ์

เครื่องวัดพีเอช

บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น

6.2 สารเคมี

สารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ พีเอช 7 และ 4.01

สารละลายสำหรับแช่อิเลคโทรด

6.3 วิธีวิเคราะห์

6.3.1 เปิดเครื่องวัดพีเอชทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที เพื่อให้สัญญาณเสถียร

6.3.2 ปรับค่าพีเอชโดยใช้บัฟเฟอร์ 7 เป็นจุดที่ 1 และ ใช้บัฟเฟอร์ 4.01 เป็นจุดที่ 2

6.3.2 จุ่มอิเลคโทรคลงในน้ำตัวอย่างจนกว่าค่าพีเอชจะนิ่ง จดค่าจากเครื่อง

ค.7 วิธีวิเคราะห์ไกลโคเจน (Parrou และ Francois, 1997)

7.1 เครื่องมือ/วัสดุ/อุปกรณ์

เครื่องเซ็นตริฟิวก์

เครื่องผสมสารละลาย

เครื่องสเปคโตรมิเตอร์

ตู้แช่เย็น -20 องศาเซลเซียส

อ่างควบคุมอุณหภูมิ

ไมโครปิเปต

ไมโครปิเปตทิป

ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลอดทดลองขนาด 16 × 15 มิลลิเมตร

หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

หลอดเซ็นตริฟิวก์ ขนาด 15 มิลลิลิตร

7.2 สารเคมี

0.1 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟฟเฟอร์ ที่ pH 7.0

โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์

โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

กรดแอซีติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์

เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส

ชุดวิเคราะห์กลูโคส (Megazyme International Ireland ,2012)

น้ำกลั่น

7.3 วิธีวิเคราะห์

ขั้นตอนการย่อยแป้ง

7.3.1 เติม 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟฟเฟอร์ ที่ pH 7 ปริมาณ 4.9 มิลลิลิตร และเติม เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซ็นตริฟิวก์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีตัวอย่าง

7.3.2 เขย่าเบาๆให้เข้ากัน และนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส เวลาอย่างน้อย 3-5 ชั่วโมง

7.3.2 นำมาเข้าเครื่องเซ็นตริฟิวก์ ที่5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเทส่วนใสทิ้ง

7.3.3 เติมเติม 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟฟเฟอร์ ที่ pH 7 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร

7.3.4 ทำซ้ำข้อ 7.3.2 – ข้อ7.3.3 จำนวน 2 รอบ เพื่อล้างตะกอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการวิธีวิเคราะห์

7.3.5 เติม โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ปริมาณ 250 ไมโครลิตร

7.3.6 เขย่าให้เข้ากัน บ่ม ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง

7.3.7 นำไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 รอบ)

7.3.8 เติม โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาณ 600 ไมโครลิตร และ กรดแอซีติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 150 ไมโครลิตร

7.3.9 เขย่าให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร มาใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง

7.3.10 นำมาเข้าเครื่องเซ็นตริฟิวก์ ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที

7.3.11 ดูดส่วนใสมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงหลอดทดลองขนาด 16 × 15 มิลลิเมตร และเติม GOPOD Reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

7.3.12 บ่มที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที

7.3.13 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร นำค่าคำนวนตามสูตร

7.3.14 ทำแบลงค์ โดยเติมน้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงหลอดทดลองขนาด 16 × 15 มิลลิเมตร เติม GOPOD Reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และทำตามขั้นตอนข้อ 7.3.12- ข้อ 7.3.13

7.3.15 ทำสแตนดาร์ด โดยเติม กลูโคส 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงหลอดทดลองขนาด 16 × 15 มิลลิเมตร เติม GOPOD Reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และทำตามขั้นตอนข้อ 7.3.12- ข้อ 7.3.13

<u>สูตรการคำนวณ</u>

ปริมาณกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $(\Delta A_{sample} / \Delta A_{D\text{-glucose standard (100 µg)}}) \times 1000$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.8 วิธีวิเคราะห์ทรีฮาโลส (Parrou และ Francois, 1997)

8.1 เครื่องมือ/วัสดุ/อุปกรณ์

เครื่องเซ็นตริฟิวก์

เครื่องผสมสารละลาย

เครื่องสเปคโตรมิเตอร์

ตู้แช่เย็น -20 องศาเซลเซียส

อ่างควบคุมอุณหภูมิ

ไมโครปิเปต

ไมโครปิเปตทิป

ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร

หลอดทดลองขนาด 16 × 15 มิลลิเมตร

หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

หลอดเซ็นตริฟิวก์ ขนาด 15 มิลลิลิตร

8.2 สารเคมี

โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์

โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

กรดแอซีติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์

เอนไซม์ทรีฮาเลส

ชุดวิเคราะห์กลูโคส (Megazyme International Ireland ,2012)

น้ำกลั่น

8.3 วิธีวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.3.1 เติม โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ปริมาณ 250 ไมโครลิตร

8.3.2 เขย่าให้เข้ากัน บ่ม ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง

8.3.3 นำไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 รอบ)

8.3.4 เติม โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาณ 600 ไมโครลิตร และ กรดแอซีติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 150 ไมโครลิตร

8.3.5 เขย่าให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร มาใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง

8.3.6 นำมาเข้าเครื่องเซ็นตริฟิวก์ ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที

8.3.7 ดูดส่วนใสมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงหลอดทดลองขนาด 16 × 15 มิลลิเมตร และเติม GOPOD Reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

8.3.8 บ่มที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที

8.3.9 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร นำค่าคำนวณตามสูตร

8.3.10 ทำ blank โดยเติมน้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงหลอดทดลองขนาด 16 × 15 มิลลิเมตร เติม GOPOD Reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และทำตามขั้นตอนข้อ 7.3.8- ข้อ 7.3.9

8.3.11 ทำสแตนดาร์ด โดยเติม กลูโคส 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงหลอดทดลองขนาด 16 × 15 มิลลิเมตร เติม GOPOD Reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และทำตามขั้นตอนข้อ 7.3.8- ข้อ 7.3.9

<u>สูตรการคำนวน</u>

ปริมาณกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $(\Delta A_{sample} / \Delta A_{D\text{-}glucose\ standard\ (100\ \mu g)}) \times 1000$

ค.9 วิธีวิเคราะห์กลีเซอรอล (Hounsa และคณะ, 1998)

9.1 เครื่องมือ/วัสดุ/อุปกรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครปิเปต

ไมโครเวลเพลท

เครื่องสเปคโตรมิเตอร์

9.2 สารเคมี

น้ำกลั่น

ชุดวิเคราะห์กลีเซอรอล (Megazyme International Ireland ,2012)

9.3 วิธีวิเคราะห์

9.3.1 ปิเปตส่วนใสที่ได้จากการเบรกเซลล์แล้ว 0.01 มิลลิลตร น้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตร สารละลาย 2 (NADH/ATP/PEP buffer) 0.02 มิลลิลิตร และสารละลาย 3 (PK/L-LDH) 0.002 มิลลิลิตร ลงในไมโครเวลเพลท

9.3.2 นำมาผสมกันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (A1)

9.3.3 รอ 4 นาทีจึงนำมาเติม สารละลาย 4 (GK) 0.02 มิลลิลิตร

9.3.4 นำมาผสมกันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm (A2)

9.3.5 ทำสแตนดาร์ด โดยเติมสารละลายมาตรฐาน 0.01 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตร สารละลาย 2 (NADH/ATP/PEP buffer) 0.02 มิลลิลิตร และสารละลาย 3 (PK/L-LDH) 0.002 มิลลิลิตร ลงใน**ไมโครเวลเพลท** ทำตามขั้นตอน ข้อ9.3.2-ข้อ9.3.4

9.3.6 ทำแบลงค์ โดยเติม น้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตร สารละลาย 2 (NADH/ATP/PEP buffer) 0.02 มิลลิลิตร และสารละลาย 3 (PK/L-LDH) 0.002 มิลลิลิตร ลงในไมโครเวลเพลท ทำตามขั้นตอน ข้อ9.3.2-ข้อ9.3.4

<u>สูตรการคำนวน</u>

$$\text{ปริมาณกลีเซอรอล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\Delta A_{\text{ตัวอย่าง}}}{\Delta A_{\text{สารละลายมาตรฐาน}}} \times \text{ค่ามาตรฐาน} \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

ค.10 วิธีวิเคราะห์เออโกสเตอรอล (X HE และคณะ, 2000)

10.1 เครื่องมือ/วัสดุ/อุปกรณ์

เครื่องผสมสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องสเปคโตรมิเตอร์

เครื่องชั่งน้ำหนัก

ตู้อบ

อ่างควบคุมอุณหภูมิ

ไมโครปิเปต

ไมโครปิเปตทิป

ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร

หลอดทดลองขนาด 16 × 15 มิลลิเมตร

หลอดเซ็นตริฟิวก์ ขนาด 50 มิลลิลิตร

10.2 สารเคมี

สารละลายแอลกอฮอล์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

แอบโซลูทเอทานอล

เฮน-เฮปเทน

10.3 วิธีวิเคราะห์

10.3.1 นำตัวอย่างอบไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ข้ามคืน รอเย็นชั่งน้ำหนัก

10.3.2 เติมสารละลายแอลกอฮอล์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น

10.3.3 เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 3 ชั่วโมง

10.3.4 เติมเฮน-เฮปเทน 10 มิลลิลิตร เขย่านาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้แยกชั้น

10.3.5 ดูดส่วนใสชั้นบน 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 16 × 15 มิลลิเมตร และเติมแอบโซลูทเอทานอล 4.5 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น

10.3.6 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 281.5 นาโนเมตรและ 230 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>สูตรการคำนวน</u>

$$\text{ปริมาณเออร์โกสเตอรอล (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์)} = \left(\frac{\text{OD 281.5 nm}}{290} - \frac{\text{OD 230 nm}}{518}\right) \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	ปาริชาติ ศรีละโคตร
วัน เดือน ปี เกิด	28 กันยายน 2536
ประวัติการศึกษา	มัธยมปลายที่โรงเรียน นวมินทราชินูทิศสวนกุหลาบวิทยาลัยปทุมธานี ปัจจุบันศึกษาอยู่ที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ที่อยู่	51/16 หมู่ 2 ตำบลคูคต อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี 12130
ชื่อ-นามสกุล	ศิริวรรณ ใจมา
วัน เดือน ปี เกิด	11 สิงหาคม 2536
ประวัติการศึกษา	มัธยมปลายที่โรงเรียน มาเรียลัย ปัจจุบันศึกษาอยู่ที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ที่อยู่	139 ซอยร่มเกล้า 21 แขวนคลองสามประเวศ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้