การย่อยข้าวเหนียวโดยใช้เอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิตไวน์ข้าว

HYDROLYSIS OF GLUTINOUS RICE BY ENZYMATIC METHOD FOR RICE WINE PRODUCTION

ชฎาพร ชะราชรัมย์

พศุตม์ สำเร็จประสงค์

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

คณะอุตสาหกรรมอาหาร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2563

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การย่อยข้าวเหนียวโดยใช้เอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิตไวน์ข้าว

HYDROLYSIS OF GLUTINOUS RICE BY ENZYMATIC METHOD FOR RICE WINE PRODUCTION

จัดทำโดย

ชฎาพร ชะราชรัมย์ รหัสนักศึกษา 59080069

พศุตม์ สำเร็จประสงค์ รหัสนักศึกษา 59080096

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

W. Sriphachanart

.....

.....13...../.....ก.ค../....2563..

(ดร. วิรามศรี ศรีพจนารถ)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ การย่อยข้าวเหนียวโดยใช้เอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิตไวน์ข้าว
ชื่อนักศึกษา ชฎาพร ชะราชรัมย์ รหัสนักศึกษา 59080069
พศุตม์ สำเร็จประสงค์ รหัสนักศึกษา 59080096
หลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ. 2563
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. วิรามศรี ศรีพจนารถ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการนำเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสมาประยุกต์ใช้กับการย่อยข้าวเหนียวในการนำไปใช้ผลิตไวน์ข้าว โดยศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์และสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยข้าวเหนียว ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสมีกิจกรรมเอนไซม์ 11800 และ 600 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสภาวะที่เหมาะสมในการนำไปย่อยข้าวเหนียวคือ ใช้เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส 5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส pH 6.9 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้กลูโคอะไมเลส 5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 6.9 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้น้ำตาลรีดิวซ์ 18 องศาบริกซ์ หลังจากนั้นนำข้าวเหนียวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองแล้วไปหมักไวน์ข้าวโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai ในระยะเวลาการหมัก 14 วัน เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ และค่าแอลกอฮอล์ของไวน์ข้าวพบว่า มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้เหลือ 11 องศาบริกซ์ และได้ แอลกอฮอล์ 5.15 % (v/v)

คำสำคัญ : แอลฟ่าอะไมเลส กลูโคอะไมเลส ข้าวเหนียว ไวน์ข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Hydrolysis of glutinous rice by enzymatic method for rice wine production
Student name	Chadaporn Charadrum Student ID 59080069
	Pasut Sumrejprasong Student ID 59080096
Program	Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology
Year	2020
Advisor	Dr. Wiramsri Sriphochanart

ABSTRACT

The objective of this research was to hydrolyze glutinous rice for rice wine production by using alpha-amylase and glucoamylase. The enzyme activities and optimum conditions for glutinous rice digestion were determined. The results showed that enzyme activities of alpha-amylase and glucoamylase were 11800 and 600 unit/mL, respectively. The optimum condition for glutinous rice hydrolysis was 5 unit/mL of alpha-amylase at 90 °C, pH 6.9 for 1 hour. Glucoamylase at 5 unit/mL was then added at 60 °C, pH 6.9 for 2 hours. The reducing sugar content at 18 °Brix was obtained. The hydrolyzed glutinous rice was then fermented by using *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai. Rice wine production carried out for 14 days at 30 °C. The amount of soluble solids and alcohol of rice wine were 11 °Brix and alcohol 5.15% (v/v), respectively.

Keywords : Alpha-amylase; Glucoamylase; Glutinous rice; Rice wine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำเล่มปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและการตรวจสอบในการแก้ปัญหาพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์จาก ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในการทำปัญหาพิเศษ ตลอดจนให้ความรู้และดูแลในการดำเนินงานรวมถึงจัดหาเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี จึงกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ เพื่อนๆ และนักวิทยาศาสตร์ที่คณะอุตสาหกรรมอาหารทุกท่านที่ช่วยเหลือสนับสนุนทั้งด้านกำลังใจและกำลังทรัพย์ตลอดมา นอกจากนี้ยังมีผู้ที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลืออีกหลายท่าน ซึ่งผู้ไม่สามารถกล่าวนามในที่นี้ได้หมด จึงขอขอบคุณทุกท่านเหล่านั้นไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

คณะผู้ทำวิจัยหวังอย่างยิ่งว่างานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจในเรื่องการย่อยข้าวเหนียวโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเพื่อใช้ในการผลิตไวน์ข้าวไม่มากก็น้อย หากงานวิจัยนี้มีข้อพกพร่องต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นนั้นผู้วิจัยขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ชฎาพร ชะรามรัมย์
พศุตม์ สำเร็จประสงค์
8 มิถุนายน 2563

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ I
ABSTRACT II
กิตติกรรมประกาศ III
สารบัญ IV
สารบัญตาราง VI
สารบัญภาพ VII
บทที่ 1 2
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 2
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา 3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 4
2.1 ไวน์ข้าว 4
2.2 กระบวนการผลิตไวน์ข้าว 4
2.3 ข้าวเหนียว 5
2.4 Saccharification 6
บทที่ 3 10
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี 10
3.2 อุปกรณ์ 11
3.3. ขั้นตอนและวิธีการทดลอง 11
บทที่ 4 15
4.1 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ 15
4.2 ผลของการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยข้าวเหนียวด้วยเอนไซม์ 17
4.3 ผลการผลิตไวน์ข้าว 19
บทที่ 5 21
5.1 สรุปผล 21
5.2 ข้อเสนอแนะ 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม 22
ภาคผนวก 24
ภาคผนวก ก 25
ภาคผนวก ข 26
ประวัติผู้เขียน 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ข้อดีของการย่อยด้วยเอนไซม์และการย่อยด้วยจุลินทรีย์.....9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 โครงสร้างของอะไมโลส 6
2.2 โครงสร้างของอะไมโลเพกติน.....6
2.3 โครงสร้างเอนไซม์อะไมเลส.....7
2.4 โครงสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส.....8
2.5 ตำแหน่งการตัดพันธะของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส.....9
4.1 การย่อย soluble starch โดยเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส pH 6.9 เป็นเวลา 9 นาที.....15
4.2 การย่อย soluble starch โดยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 6.9 เป็นเวลา 9 นาที.....16
4.3 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลมอลโทสที่เกิดขึ้น.....17
4.4 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น.....18
4.5 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (องศาบริกซ์) และค่าแอลกอฮอล์ (%v/v) ของไวน์ข้าว.....19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ไวน์ข้าว (Rice wine) เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ไม่ผ่านการกลั่น เป็นสุราแช่ มีรสออกหวาน ผลิตโดยใช้ข้าวเหนียวนึ่ง นำมาล้างเมือกข้าวออกให้หมด ปล่อยให้แห้งจากนั้นคลุกเคล้าด้วยหัวเชื้อแห้งที่เรียกว่าลูกแป้ง ซึ่งหัวเชื้อมีส่วนผสมของเชื้อราและยีสต์ โดยเชื้อราทำหน้าที่ผลิตอะไมเลสมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า saccharification ส่วนยีสต์ในลูกแป้งทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งให้เป็น เอทิลแอลกอฮอล์

แป้งประกอบด้วยสองส่วนประกอบหลักของโมเลกุลขนาดใหญ่ ได้แก่ อะไมโลสและอะไมโลเพคติน อะไมโลสเป็น linear polymer ที่ประกอบด้วยกลูโคส α- (1,4) พันธะไกลโคซิดิค โซ่ยาวประมาณ 1,000 ชิ้นและสามารถละลายน้ำได้ อะไมโลเพคตินเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีการแตกแขนงมาก ประกอบด้วยโซ่ linear α - (1,4) - และ α - (1,6) – พันธะไกลโคซิดิค ที่จุดแตกกิ่ง และไม่ละลายน้ำ

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งมี 2 ชนิด ได้แก่ อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ซึ่งอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคไซด์ภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลแป้ง และไกลโคเจน ที่ตำแหน่ง α- 1-4 แบบสุ่มทำให้โมเลกุลของแป้ง และไกลโคเจนถูกไฮโดรไลซ์ได้ น้ำตาล เช่น น้ำตาลมอลโทส และกลูโคส อย่างรวดเร็ว ส่วนกลูโคอะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคไซด์ภายนอกสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลแป้ง ซึ่งจะแยกพันธะของ α-1,4- ไกลโคซิดิค ออกจากปลาย nonreducing ของโซ่ไกลโคซิดิค

ประโยชน์ของการใช้เอนไซม์ในการย่อยแป้งนั้นดีกว่าการใช้จุลินทรีย์ เพราะเอนไซม์ช่วยเร่งการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล มีความเสถียรมากกว่า เก็บรักษาได้ง่าย ไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น และใช้เวลาในการย่อยแป้งน้อยกว่าการใช้จุลินทรีย์ ในอุตสาหกรรมอาหาร เอนไซม์อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมประเภทที่ใช้แป้งเป็นวัตถุดิบ โดยใช้เอนไซม์นี้ร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นเพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคส สำหรับอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยที่มีการใช้เอนไซม์ ได้แก่ อุตสาหกรรมการแปรรูปแป้งและผลิต syrups อุตสาหกรรมเบเกอรี่ และขนมปังกรอบ อุตสาหกรรมสารปรุงแต่งรสชาติอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มและนม และอุตสาหกรรมเครื่องดื่มและน้ำผลไม้

ดังนั้นจากคุณสมบัติและประโยชน์ของการใช้เอนไซม์ในการย่อยแป้ง งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการย่อยข้าวเหนียวโดยการใช้เอนไซม์เพื่อนำไปใช้ผลิตไวน์ข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะการย่อยข้าวเหนียวโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส

1.2.2 เพื่อศึกษาการผลิตไวน์ข้าวจากข้าวเหนียวที่ย่อยด้วยเอนไซม์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ช่วยลดเวลาในการผลิตไวน์ข้าว

1.3.2 เพิ่มผลผลิตในการย่อยข้าวเหนียวเป็นน้ำตาล

1.3.3 สามารถใช้วิธีการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส และ กลูโคอะไมเลสในการผลิตผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ได้ เช่น ผลิตไซรัป เพื่อนำไปใช้อุตสาหกรรมเบเกอรี่ อุตสาหกรรมสารปรุงแต่งรสชาติอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มและนม และอุตสาหกรรมเครื่องดื่มและน้ำผลไม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไวน์ข้าว

ไวน์ข้าวเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์หมักและกลั่นจากข้าว ไวน์ข้าวทำโดยการหมักแป้งข้าวที่ถูกย่อยเป็นน้ำตาล โดยจุลินทรีย์เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่เปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล ไวน์ข้าวมักจะมีปริมาณแอลกอฮอล์ 18-25% ไวน์ข้าวของไทยส่วนใหญ่ผลิตจากข้าวเหนียวซึ่งมีวิธีการทำต่อเนื่องจากข้าวหมาก โดยนำข้าวเหนียวมาแช่ค้างคืน นึ่งสุก ล้างข้าวเหนียวให้หมดยาง ผสมกับลูกแป้งที่มีทั้งเชื้อราและเชื้อยีสต์ เมื่อทำการหมัก เชื้อราจะเปลี่ยนแป้งในข้าวให้เป็นน้ำตาล จากนั้นเชื้อยีสต์ก็เปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ เมื่อได้เป็นข้าวหมาก เติมน้ำลงไป และหมักต่ออีก 5-14 วัน นำมากรอง จะได้น้ำขาว ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เก่าแก่ของไทย นอกจากนี้ จากการศึกษา ใช้ข้าวเจ้าในการผลิตไวน์ข้าว พบว่าข้าวเจ้าชนิดอะไมโลสต่ำ และข้าวเหนียว จะให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงกว่าข้าวอะไมโลสปานกลาง และสูง (Puechkaset, 2016)

2.2 กระบวนการผลิตไวน์ข้าว

การผลิตไวน์ข้าวเกิดจากการหมักของยีสต์ ยีสต์หรือเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมกับการผลิตไวน์มากที่สุด เนื่องจากยีสต์สามารถเจริญและหมักได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง คือช่วง pH ประมาณ 3.0-3.9 และต้องทนแอลกอฮอล์ที่จะเกิดขึ้นด้วย ยีสต์จะใช้น้ำตาลที่มีรสหวานในข้าวเป็นอาหาร เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้การหมักของยีสต์ในไวน์ก็จะได้ผลพลอยได้คือกรดอะซิติก (acetic acid) และกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) ซึ่งทำให้ไวน์มีค่า pH เป็นกรดและส่งผลให้ไวน์แต่ละชนิดมีรสชาติและกลิ่นหอมที่แตกต่างกัน ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุดเพราะนอกจากจะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์แล้ว ยังมีบทบาทสำคัญในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ของสาโทอีกด้วย (นริสา, 2550)

2.2.1 ในการหมักไวน์โดยการใช้ยีสต์นั้นมีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ เช่น

1. ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น เนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลเป็นอาหารในการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงควรมีปริมาณเพียงพอต่อการหมัก คือปริมาณ 21-22 องศาบริกซ์ หากมีปริมาณไม่เพียงพอก็อาจเติมน้ำตาลทรายเพิ่มเข้าไป แต่หากมีปริมาณน้ำตาลมากเกินไปก็สามารถเติมน้ำสะอาดเพื่อเจือจางลงได้ เพราะหากมีน้ำตาล มากเกินไปอาจยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ การหมักไวน์จะหมักไปจนเหลือปริมาณน้ำตาลที่ 2-0.4 องศาบริกซ์ ซึ่งเรียกได้ว่าเกิดการหมักอย่างสมบูรณ์

2. อุณหภูมิในการหมัก โดยอุณหภูมิที่ต่ำเกินไปจะทำให้เชื้อเจริญเติบโตช้า แต่หากมีอุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจทำให้เชื้อตายได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ความเป็นกรด-เบส ยีสต์เติบโตได้ใน pH ช่วงกว้าง pH ต่ำสุดที่ยีสต์สามารถเติบโตได้คือ 1.5 ส่วน pH สูงสุด 8.0-8.5 สำหรับ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของยีสต์แตกต่างกัน ส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่าง 4.0-4.5 ยีสต์ส่วนใหญ่จะเติบโตไม่ดีในสภาพที่เป็นด่าง นอกจาก pH มีผลต่อการเติบโตแล้วยังมีผลต่อการสร้างแอสโคสปอร์ของยีสต์อีกด้วย pH ในการสร้างสปอร์ของยีสต์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น *S. cerevisiae* pH สูงสุด 9.1-9.2 pH ต่ำสุด 2.4-2.6

2.3 ข้าวเหนียว

ข้าวเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตไวน์ข้าวมี 2 ชนิดคือ ข้าวเจ้า และข้าวเหนียวมีลักษณะเมล็ดเรียวยาว มีความสมบูรณ์ทางโชนาการสูง ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) อยู่ระหว่างร้อยละ 70 - 80 ซึ่งเป็นแป้งเกือบทั้งหมด โปรตีน (protein) เฉลี่ยร้อยละ 11 และไขมัน (lipid) ที่มีอยู่ร้อยละ 0-2 ในส่วนของจมูกข้าว นอกจากนั้นยังมีสารที่ทำหน้าที่แอนติออคซิแดนท์ (antioxidant) ซึ่งในข้าวเหนียว และข้าวเจ้าจะมีองค์ประกอบแตกต่างกันที่ประเภทของเนื้อแป้งในเมล็ด เมล็ดข้าวเจ้าประกอบด้วยแป้งอะไมโลสประมาณร้อยละ 15 ถึง 30 ส่วนเมล็ดข้าวเหนียวประกอบด้วยอะไมโลเพกตินเป็นส่วนใหญ่ และมีอะไมโลสเพียงเล็กน้อย ประมาณร้อยละ 5-7 หรือบางพันธุ์น้อยกว่าร้อยละ 1 (ศศิกานต์, 2553)

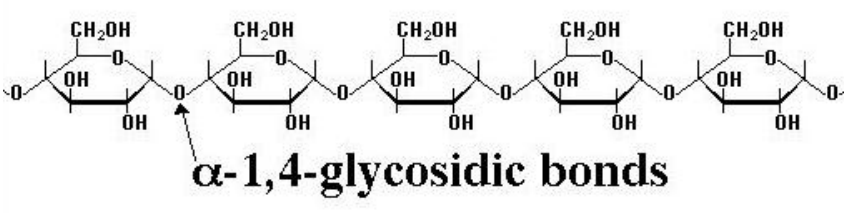
2.3.1 โครงสร้างและองค์ประกอบพื้นฐานของข้าวเหนียว

ข้าวเหนียวเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโฮโมพอลีแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ในโมเลกุลประกอบด้วยโมโนแซ็กคาไรด์เพียงชนิดเดียวคือ กลูโคส มีสูตรเคมีโดยทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เป็นพอลิเมอร์ของหน่วยกลูโคสเชื่อมต่อกับพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านตอนปลายของสายพอลิเมอร์ มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde group) มีคุณสมบัติรีดิวซ์ที่เรียกว่า reducing end group (Srirot และ Piyachomkwan, 2003) ข้าวเหนียวประกอบด้วยพอลิเมอร์หลักสองชนิดคือ อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพกติน (amylopectin)

2.3.1.1 อะไมโลส

เป็นพอลิเมอร์เชิงเส้น ประกอบด้วยโมเลกุลกลูโคสประมาณ 200-2,000 โมเลกุล เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 ไกลโคซิดิก ดังแสดงในภาพที่ 2.1 แป้งจากพืชต่างชนิดกันมีตำแหน่งการวางตัวของอะไมโลสภายในเม็ดแป้งที่ต่างกัน อะไมโลสบางส่วนแทรกอยู่ในกลุ่มของอะไมโลเพกติน บางส่วนกระจายอยู่ทั้งในส่วนอสัณฐาน (amorphous regions) ซึ่งเป็นส่วนที่โมเลกุลมีการจัดเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบและส่วนผลึก (crystalline regions) ที่โมเลกุล มีการจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ อะไมโลสที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะพบเป็นเกลียวคู่ (double helix) กับอะไมโลเพกตินในส่วนใจกลางเม็ดแป้ง ส่วนอะไมโลส โมเลกุลขนาดเล็กจะพบอยู่ตามขอบเม็ดแป้ง แป้งต่างชนิดกันมีปริมาณอะไมโลสไม่เท่ากัน แป้งส่วนใหญ่จะมีอะไมโลสประมาณร้อยละ 25 แป้งบางชนิดมีปริมาณอะไมโลสสูงถึงร้อยละ 70-75 (Oates, 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

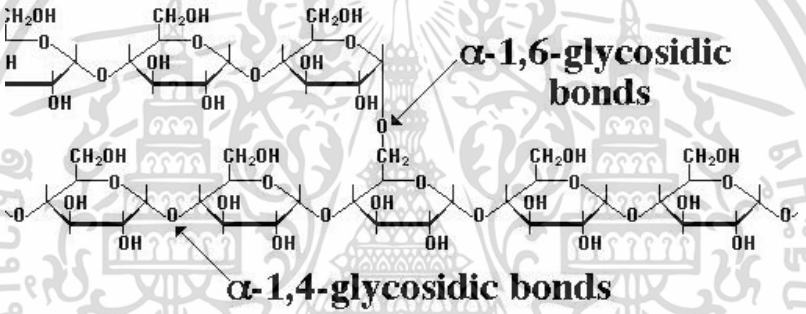


ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของอะไมโลส

ที่มา : Wils (2011)

2.3.1.2 อะไมโลเพกติน

เป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส ส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสจับกันด้วยพันธะ α-1,4 glycosidic และส่วนที่เป็นกิ่งสาขาของกลูโคสจับกันด้วยพันธะ α-1,6 glycosidic ดังแสดงในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของอะไมโลเพกติน

ที่มา : Wils (2011)

2.4 Saccharification

หมายถึง กระบวนการที่โอลิโกแซ็กคาไรด์และไดแซ็กคาไรด์ถูกย่อยเป็นน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงที่พันธะไกลโคไซด์ โดยกระบวนการ Saccharification สามารถใช้ได้ 2 วิธีคือ การย่อยด้วยจุลินทรีย์ และการย่อยด้วยเอนไซม์

2.4.1 การย่อยด้วยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ย่อยโมเลกุลของสตาร์ชให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) และ น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) เพื่อการหมักต่อไปให้เกิดแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ เพื่อผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

รา สามารถย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์กลุ่มอะไมเลส ประกอบด้วยแอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ย่อยโมเลกุลของแป้งให้เป็นน้ำตาลหลายโมเลกุล ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลคู่และโมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดี่ยว ราที่พบมีหลายสายพันธุ์ได้แก่ ราที่มีเส้นใยสีขาวฟู ราที่มีเส้นใยสีเทาดำ ราที่มีเส้นใยสีเทาเหลือง ราที่มีเส้นใยสีเหลืองเขียว

- เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ เช่น *Aspergillus oryzae, Amylomyces rouxii, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis* และ *Candida* sp. (อภิชญา, 2550)

2.4.2 การย่อยด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ที่มีความสำคัญมากในการหมักไวน์ข้าว คือ เอนไซม์อะไมเลส ซึ่งเป็น Extracellular enzyme มีความสามารถในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจากการสร้างของจุลินทรีย์ หลายชนิดเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยแป้ง สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดตามตำแหน่งการย่อยแป้ง

1. Endoamylase เป็นเอนไซม์ที่ย่อย (hydrolyze) แป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง **α**-1,4-glycosidic bond ถ้าการย่อยไม่สมบูรณ์จะมีกลูโคส, มอลโตส และเด็กสตรินเกิดขึ้น ถ้าการย่อยสมบูรณ์จะได้น้ำตาล มอลโตส และกลูโคสเท่านั้น เอนไซม์ประเภทนี้ ได้แก่ แอลฟ่าอะไมเลส พบได้ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์

2. Exoamylase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยแป้งจากปลายทางด้าน non - reducing เข้ามา ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคส (glucose unit) โดยย่อยที่ **α**-1,4-glycosidic bond และ **α**-1-6-glycosidic bond เอนไซม์ประเภทนี้ ได้แก่ แอลฟ่าอะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส (ศศิกานต์, 2553)

2.4.2.1 อะไมเลส

อะไมเลส (Amylase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolases และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลโดยไฮโดรไลซ์พันธะ **α**-1,4-glycosidic bond ในโมเลกุลของสตาร์ช (starch) ให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ทำให้ได้เป็นเดกซ์ทริน (dextrin) และน้ำตาล ไดแซ็กคาไรด์ เช่น มอลโทส (maltose) มอโนแซ็กคาไรด์ เช่น กลูโคส (glucose) แสดงดังภาพที่ 2.3 อะไมเลสส่วนใหญ่พบในน้ำลาย ตับอ่อน อะไมเลสที่พบในน้ำลายจะเรียกว่า ไทยาลิน (Ptyalin) ซึ่งสามารถพบได้ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Colon, 2012)

ภาพที่ 2.3 โครงสร้างเอนไซม์อะไมเลส

ที่มา : Colon (2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.1.1 ประโยชน์ของเอนไซม์อะไมเลสในอุตสาหกรรม

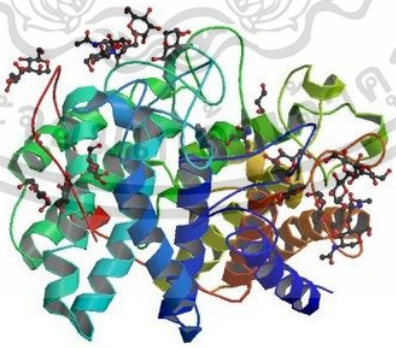
ในปัจจุบันเอนไซม์ได้เข้ามามีส่วนร่วมในวงการอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากช่วยลดต้นทุนในการผลิต และสารเคมีสังเคราะห์ที่มีราคาสูง เพราะสารเคมีเหล่านั้นเป็นอันตรายแก่ผู้บริโภค และยังทำลายสิ่งแวดล้อมในทางอ้อม อีกทั้งยังสามารถควบคุมวิธีการผลิตให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น (บุญพา, 2548) ในอุตสาหกรรมอาหารเอนไซม์อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมประเภทที่ใช้แป้งเป็นวัตถุดิบ โดยใช้เอนไซม์นี้ร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นเพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคส สำหรับอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยที่มีการใช้เอนไซม์ได้แก่ อุตสาหกรรมการแปรรูปแป้งและผลิต syrups อุตสาหกรรมเบเกอรี่ และขนมปังกรอบ (cracker) อุตสาหกรรมสารปรุงแต่งรสชาติอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มและนม (dairy) และอุตสาหกรรมเครื่องดื่มและน้ำผลไม้

2.4.2.2 กลูโคอะไมเลส

เป็นเอนไซม์ที่ใช้เพื่อเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสตาร์ท โดยตัดโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสออกจากโมเลกุลของสตาร์ช ที่ตำแหน่งปลาย non-reducing end ของพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) ทั้งที่ตำแหน่ง α-1-4 และ α-1-6 ซึ่งการทำงานจะตัดโมเลกุลกลูโคสที่ตำแหน่งปลายของอะไมเลสและอะไมโลเพคติน ผลผลิตที่ได้จะเป็นกลูโคสเพียงอย่างเดียว

2.4.2.2.1 ประโยชน์ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในอุตสาหกรรม

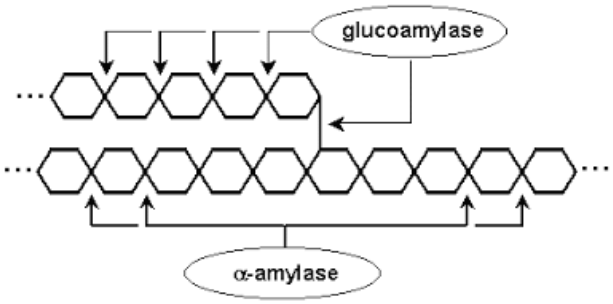
เอนไซม์นี้ใช้ประโยชน์เพื่อการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส glucoamylase มีความสำคัญในการผลิตเบียร์และสุราที่ทำจากน้ำตาลที่ได้จากแป้ง และใช้ในการทำขนมปังและย่อยสลายน้ำตาลที่ซับซ้อน เช่นแป้งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและยีสต์จะกินน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

ที่มา : Rakesh (2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.5 ตำแหน่งการตัดพันธะของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส

ที่มา : มานพ (2560)

2.4.2.3 เปรียบเทียบข้อดีของการย่อยด้วยเอนไซม์และการย่อยด้วยจุลินทรีย์

การเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์กับจุลินทรีย์ในการย่อยแป้ง แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ข้อดีของการย่อยด้วยเอนไซม์และการย่อยด้วยจุลินทรีย์

การเปรียบเทียบ	การย่อยด้วยเอนไซม์	การย่อยด้วยจุลินทรีย์
การปนเปื้อน	ไม่มี	อาจมีการปนเปื้อนของเชื้ออื่น เมื่อมีการปนเปื้อนของเชื้ออื่น อาจจะทำให้การเจริญของเชื้อที่ต้องการลดลง ส่งผลให้การสร้างเอ็นไซม์ลดลงตามไปด้วย
ความจำเพาะเจาะจง	มี	เชื้ออาจมีเอ็นไซม์มากกว่า 1 เอ็นไซม์
ระยะเวลาที่ใช้	น้อย ใช้เวลาไม่กี่ชั่วโมง	ใช้เวลามาก ใช้เวลาหลายวัน รวมทั้งต้องใช้เวลาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และต้องมีระยะเวลาการปรับตัวของเชื้อ
ความเสถียร	มีความเสถียรมากกว่า	อยู่ที่ความประสิทธิภาพของเชื้อ
การใช้น้ำตาล	เร่งการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล	เชื้อย่อยน้ำตาล และอาจนำไปใช้ในการเจริญ สร้างผลิตภัณฑ์ ทำให้ปริมาณน้ำตาลลดลง
การเก็บรักษา	เก็บรักษาง่าย	ต้องควบคุมสภาวะการเก็บ อาจต้องมีการต่อเชื้อก่อนนำไปใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

- ข้าวเหนียวเขี้ยวงู

3.1.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- Yeast extract, Scharlua, Spain
- Malt extract, Himedia, India
- Peptone, Himedia, India
- Dextrose, Pure Chem, Taiwan
- Potato Dextrose Agar (PDA), Himedia, India
- Sodium Hydroxide (NaOH), Malinckrodt, Sweden
- 3,5-Dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$), Acros, USA
- Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
- Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)
- Sodium chloride (NaCl)
- Potassium sodium tartrate ($C_4H_4KNaO_6$)
- Tartaric acid, China
- Soluble starch
- Maltose
- Distilled water

3.1.3 เชื้อจุลินทรีย์

- เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai

3.1.4. เอนไซม์

- แอลฟ่าอะไมเลส, KinowZyme, PTCI
- กลูโคอะไมเลส, KinowZyme, PTCI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์

- เครื่องชั่ง (Balance), MettlerToleo, Germany
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, Heraeus, Germany
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, Heraeus, Germany
- ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow), ABS 1200, BossTech, Thailand
- ไมโครเวฟ (Microwave), MR-30A, Electrolux, Japan
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath), Memmert, Germany
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave), Tommy, Japan
- ไมโครปิเปต (Micropipette) 200 และ 1000 ไมโครลิตร, Brand, Germany
- เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer), Scientific Industrirs, USA
- เครื่อง High speed Centrifuge: 3804R, Appendrop,Germany
- เครื่อง Spectrophotometer, Thermofisher sciencetific, USA
- จานเพาะเชื้อพลาสติก (Petri dish) ขนาด 15 มิลลิลิตร, Scidirect, Thailand
- หลอดทดลอง (Test tube), Pyrex, Germany
- ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ (Loop และ needle)
- บีกเกอร์ขนาด (Beaker) 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร, Pyrex, German
- กระบอกตวง (Cylnder) ขนาด 50, 100, 500 และ1000 มิลลิลิตร, Pyrex, Germany
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Burner)
- ปีเปต (Pipetts), Pyrex, Germany
- ขวดรูปชมพู่ (Erenmeyer flask), Pyrex, Germany
- ขวดแก้วขนาด 2 ลิตร, Pyrex, Germany

3.3. ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

3.3.1.1 เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส

1. ปิเปตสารละลายน้ำแป้งลงในหลอดทดลอง 20 หลอด หลอดละ 0.7 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที

2. ปิเปตเอมไซม์แอลฟ่าอะไมเลสที่เจือจางอัตราส่วน 1:10000 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองข้อที่ 1 และจับเวลาตามตาราง

3. เมื่อครบเวลาเติม DNS 1 มิลลิลิตรแล้วเขย่าให้เข้ากัน

4. นำหลอดในข้อที่ 3 ไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำเย็น

5. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองแล้วเขย่าให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

7. คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโทส

3.3.1.2 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

1. ปิเปตสารละลายน้ำแป้งลงในหลอดทดลอง 20 หลอด หลอดละ 0.7 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที

2. ปิเปตเอมไซม์กลูโคอะไมเลสที่เจือจางอัตราส่วน 1:1000 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองข้อที่ 1 และจับเวลาตามตาราง

3. เมื่อครบเวลาเติม DNS 1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

4. นำหลอดในข้อที่ 3 ไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำเย็น

5. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองแล้วเขย่าให้เข้ากัน

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

7. คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

3.3.2 หาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยข้าวเหนียวด้วยเอนไซม์

3.3.2.1 เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส

1. นำข้าวเหนียว 600 กรัม นำไปแช่น้ำ 1 ชั่วโมงแล้วนำไปนึ่งเป็นเวลา 20 นาที

2. แบ่งข้าวเหนียวใส่บีกเกอร์ บีกเกอร์ละ 100 กรัม

3. เติมเอมไซม์แอลฟ่าอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 ยูนิตปริมาตร 100 มิลลิตรลงในบีกเกอร์

4. นำไปบีกเกอร์ไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 120 นาที โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที

5. นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงโดยเครื่อง centrifuge ที่ 8000 rpm เป็นเวลา 20 นาที โดยคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

6. นำส่วนใสไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี DNS

7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

8. นำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟ และเลือกสภาวะที่เหมาะสม โดยเลือกจากความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด เพื่อนำไปใช้หาสภาวะของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อไป

3.3.2.2 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

1. นำข้าวเหนียว 600 กรัม นำไปแช่น้ำ 1 ชั่วโมงแล้วนำไปนึ่งเป็นเวลา 20 นาที

2. แบ่งข้าวเหนียวใส่บีกเกอร์ บีกเกอร์ละ 100 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เติมเอมไซม์แอลฟ่าอะไมเลสที่ความเข้มข้น 5 ยูนิตปริมาตร 100 มิลลิตรลงในบีกเกอร์

4. นำบีกเกอร์ไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที

5. จากนั้นลดอุณหภูมิให้เหลือ 60 องศาเซลเซียสแล้วเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้น 5 , 10 และ 20 ยูนิต ปริมาตร 100 มิลลิตรลงในบีกเกอร์

6.นำไปบ่มใน shaker ที่ควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

7. นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงโดยเครื่อง centrifuge ที่ 8000 rpm เป็นเวลา 20 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

8. นำส่วนใสไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี DNS

9. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

10. นำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟ และเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยข้าวเหนียว โดยเลือกจากความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด

3.3.3 การหมักแอลกอฮอล์

3.3.3.1 การย่อยข้าวด้วยเอนไซม์

นำข้าวเหนียว 800 กรัมมาล้างแล้วนำไปแช่น้ำประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปนึ่งให้สุก (100°C, 20 นาที) โดยนึ่งข้าวเหนียว 10 นาทีและกลับฝังอีก 10 นาที นำข้าวเหนียวที่สุกมาพักให้เย็นลงในถาดพลาสติกที่ลวกด้วยน้ำร้อนแล้ว จากนั้นนำข้าวเหนียวไปอุ่นให้ได้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียล แล้วเติมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส ที่ความเข้มข้น 5 ยูนิตปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วให้ความ ร้อนจน อุณหภูมิเพิ่มขึ้นจน ถึง 90 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 60 นาที แล้วลดอุณหภูมิข้าวเหนียวลงให้เหลือ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้น 5ยูนิต ในอัตราส่วน 1 : 1 และให้ความร้อน ในอุณหภูมิ คงที่ที่ 60 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 120 นาที เมื่อเอนไซม์ ย่อยข้าวเหนียวแล้วน้ำหวานของข้าวจะซึมออกมา (ดัดแปลงมาจาก Permanasari และคณะ, 2018)

3.3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

ใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai ความเข้มข้น 5% โดยเขี่ยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Kyokai ลงใน flask อาหารเหลว Yeast extract malt extract (YM) ปริมาณ 200 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อ นาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3.3 การเติมน้ำผ่าส่า

นำข้าวหมากที่ได้จากการย่อยข้าวเหนียวด้วยเอนไซม์มาเติมน้ำผ่าส่า 1600 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 18 องศาบริกซ์ และใส่เชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้ลงไปหมักที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่ง สิ้นสุดการหมัก โดยสังเกตจากปริมาณของแข็งที่ละลายได้จะคงที่ แล้วนำไวน์ข้าวไปกรองและนำไปฆ่าเชื้อโดยการพาสเจอไรซ์

3.3.3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้โดยใช้ Hand refractometer
2. วัดค่าแอลกอฮอล์ (%v/v) โดยใช้ Ebuliometer เทียบกับจุดเดือดน้ำบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

4.1.1 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส

นำเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสมาหากิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้ soluble starch เป็นสารตั้งต้น ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส, pH 6.9 เป็นเวลา 9 นาที และวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลมอลโทสที่เกิดขึ้นต่อหน่วยเวลา ได้ผลดังภาพที่ 4.1

ภาพที่ 4.1 การย่อย soluble starch โดยเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส pH 6.9 เป็นเวลา 9 นาที

จากภาพที่ 4.1 แสดงถึงความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโทสที่ได้จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส เทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโทส จากกราฟที่ได้พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโทสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากแป้งถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส จึงทำให้มีปริมาณน้ำตาลมอลโทสเพิ่มขึ้น จากนั้นนำไปคิดค่าความชันเพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส จากการทดลองได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส 11800 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยกำหนดให้ปริมาณเอนไซม์ 1 ยูนิต คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์แป้งในสภาวะที่กำหนดแล้วทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปของมอลโทส 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส pH 6.9

4.1.2 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

นำเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมาหากิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้ soluble starch เป็นสารตั้งต้น ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส, pH 6.9 เป็นเวลา 9 นาที และวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นต่อหน่วยเวลา ได้ผลดังภาพที่ 4.2

ภาพที่ 4.2 การย่อย soluble starch โดยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 6.9 เป็นเวลา 9 นาที

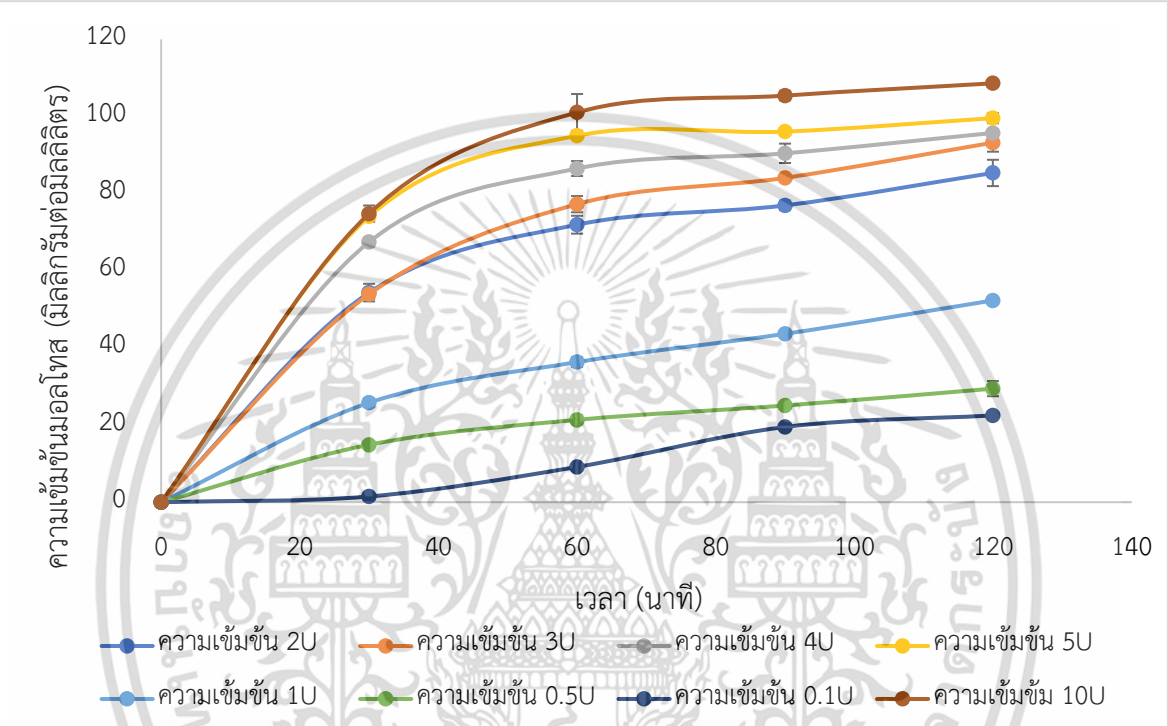
จากภาพที่ 4.2 แสดงถึงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส จากกราฟที่ได้พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากแป้งถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสทำให้มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น จากนั้นนำไปคิดค่าความชันเพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสอะไมเลส จากการทดลองได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 600 ยูนิตต่อมิลลิลิตร กำหนดให้ ปริมาณเอนไซม์ 1 ยูนิต คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์แป้งในสภาวะที่กำหนดข้างต้นแล้วทำให้เกิดน้ำตาล รีดิวซ์ในรูปของกลูโคส 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 6.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยข้าวเหนียวด้วยเอนไซม์

4.2.1 ผลของการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยข้าวเหนียวด้วยเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส

นำข้าวเหนียวมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 ยูนิตเป็นเวลา 120 นาที ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส pH 6.9 และนำไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น ได้ผลดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลมอลโทสที่เกิดขึ้น

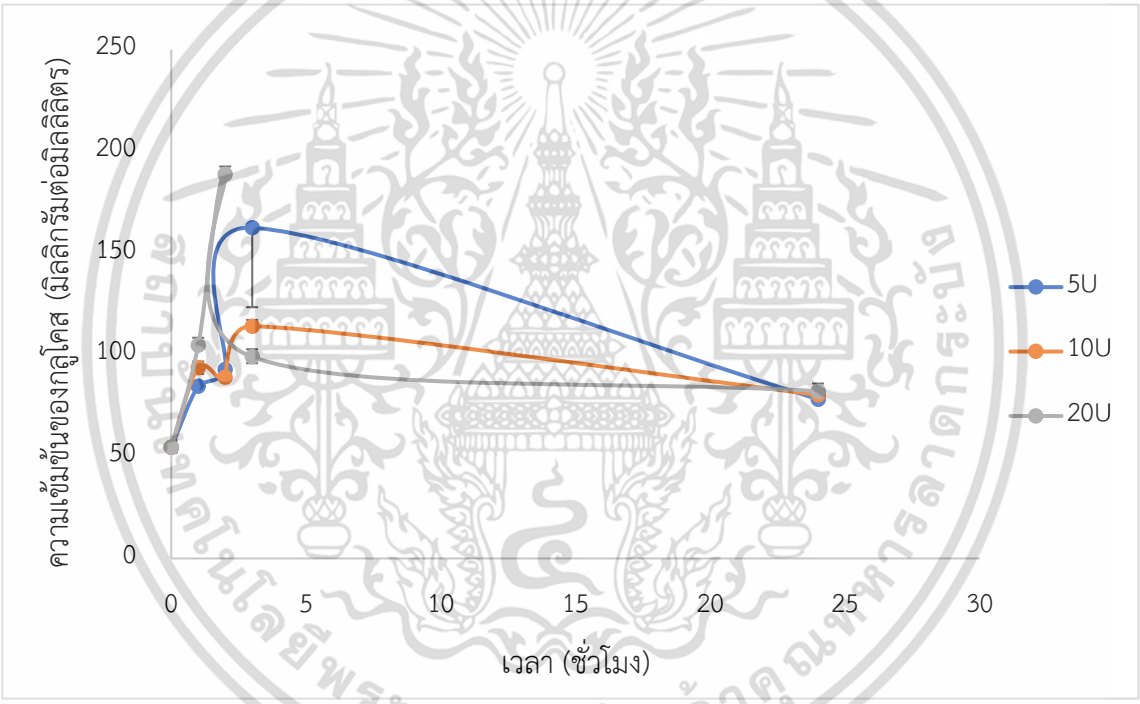
จากภาพที่ 4.3 แสดงถึงค่าความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโทสโดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 ยูนิต พบว่าในช่วง 30 นาทีแรก เมื่อใช้เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสที่ความเข้มข้นสูงในการย่อย จะได้น้ำตาลมอลโทสปริมาณสูงกว่าการใช้เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสที่ความเข้มข้นต่ำ เนื่องจากที่ความเข้มข้นของเอนไซม์สูงๆ จะมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้เร็วกว่า โดยความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโทสจะเริ่มคงที่ที่เวลา 60 นาที เนื่องจากปริมาณของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสมีค่ามากกว่าสารตั้งต้นที่ช่วง 30 นาที และเมื่อเวลาผ่านไปสารตั้งต้นถูกใช้จนหมดและได้ปริมาณผลิตภัณฑ์เหลือเท่านี้ โดยจากผลการทดลองนี้พบว่าเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสความเข้มข้น 5 ยูนิต ที่เวลา 60 นาที สามารถย่อยข้าวเหนียวได้ปริมาณน้ำตาลมอลโทส 95.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลมอลโทสมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ เกศรินทร์ (2014) ซึ่งใช้เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส 8.44 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสโดยใช้ระยะเวลา 60 นาทีย่อยข้าว พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลมอลโทส 67.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่าแอลฟ่าอะไมเลสที่ความเข้มข้น 5 ยูนิต สามารถไฮโดรไลซ์แป้งได้เร็วกว่าเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสที่ความเข้มข้นอื่น และสามารถไฮโดรไลซ์แป้งได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงเท่ากับ 95.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 60 นาที จึงเหมาะสมและคุ้มค่าที่สุดในการนำมาใช้ ไฮโดรไลซ์แป้งในข้าวเหนียว และเลือกใช้เวลาที่ 60 นาทีในการนำไปใช้ย่อยข้าวเหนียว

4.2.2 ผลของการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยข้าวเหนียวด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

นำข้าวเหนียวมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสความเข้มข้น 5 ยูนิตเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส pH 6.9 จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ยูนิตเป็นเวลา 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 6.9 และนำไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น ได้ผลดังภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น

จากภาพที่ 4.4 แสดงถึงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสโดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 5, 10 และ 20 ยูนิต พบว่าในช่วง 3 ชั่วโมงแรกความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมีแนวโน้มเพิ่ม ขึ้นในทุกความเข้มข้นของเอนไซม์ โดยที่ความเข้มข้น 20 ยูนิต มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมากที่ สุดและมีแนวโน้มลดลงโดยความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสจะเริ่มคงที่ที่เวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นช่วงที่เอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์แป้งสูงสุดแล้ว โดยจากผลการทดลองนี้พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้น 5 ยูนิต ที่เวลา 24 ชั่วโมงสามารถย่อยข้าวเหนียวได้ปริมาณน้ำตาลมอลโทส 78.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลมอลโทสน้อยกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ เกศรินทร์ (2014) ซึ่งใช้

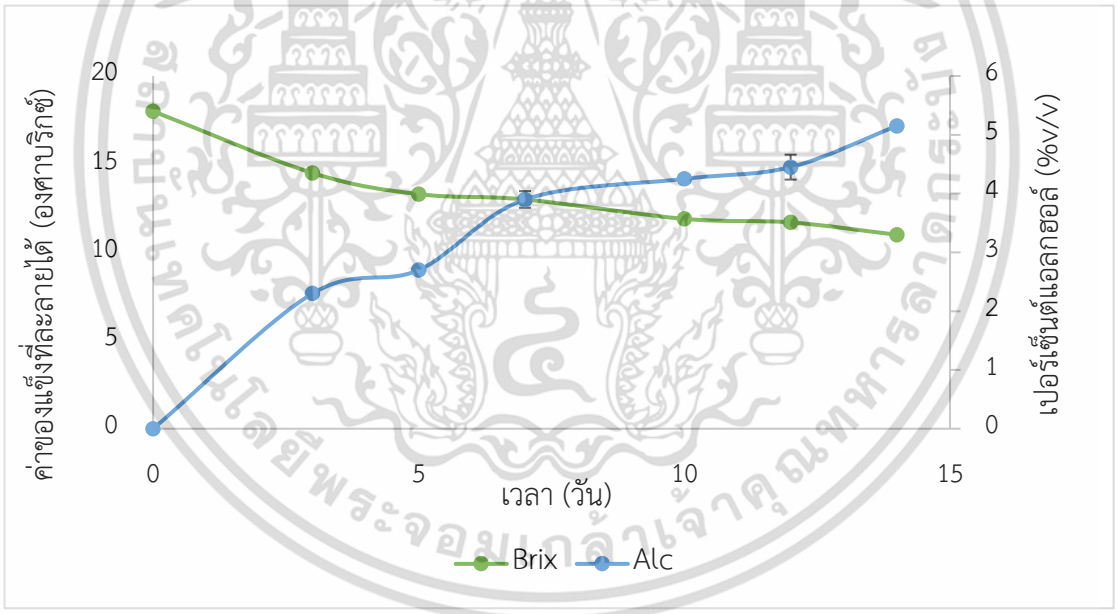
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้น 4.5 ยูนิตที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสโดยใช้ระยะเวลาในการย่อยข้าว 24 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลมอลโทส 86.23 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดลองหาความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ใช้ในการย่อยข้าวเหนียว พบว่า เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสความเข้มข้น 5 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส pH 6.9 เวลา 1 ชั่วโมง และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้น 5 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 6.9 เวลา 2 ชั่วโมง สามารถไฮโดรไลซ์แป้งได้มากกว่าเอนไซม์ที่ความเข้มข้นอื่น จึงเหมาะสมและคุ้มค่าที่สุดในการนำมาใช้ในการไฮโดรไลซ์แป้งในข้าวเหนียว

4.3 ผลการผลิตไวน์ข้าว

นำข้าวเหนียวมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสความเข้มข้น 5 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้น 5 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai เพื่อให้ได้ไวน์ข้าว และวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ และปริมาณแอลกอฮอล์ ได้ดังนี้



ภาพที่ 4.5 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ และค่าแอลกอฮอล์ (%v/v) ของไวน์ข้าว

จากภาพที่ 4.5 แสดงให้เห็นถึงปริมาณของแข็งที่ละลายได้และค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ของการหมักไวน์ข้าว โดยวันที่ 0 มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้เริ่มต้นที่ 18 องศาบริกซ์ และค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ 0% เนื่องจากยีสต์ยังไม่มีการใช้น้ำตาลในการสร้างแอลกอฮอล์ โดยในวันที่ 3 พบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ลดลงเหลือ 14.5 องศาบริกซ์ และมีค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นที่ 2.3% เนื่องจากยีสต์มีการใช้น้ำตาลในการสร้างแอลกอฮอล์ ในวันที่ 7 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ลดลงเหลือ 13 องศาบริกซ์ และมีค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเป็น 3.9 % และวันที่ 10 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 11.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาบริกซ์ โดยมีแนวโน้มเริ่มคงที่จนถึงวันที่ 14 มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้เหลือ 11 องศาบริกซ์ เนื่องจากยีสต์มีประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลในการสร้างแอลกอฮอล์ได้สูงที่สุดแล้ว และมีค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นที่ 5.15 % โดยผลการทดลองที่ได้แตกต่างกับงานวิจัยอื่น เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ วีระสิทธิ์ (2011) ซึ่งทำการหมักไวน์ข้าวด้วยลูกแป้งสาโทซึ่งมียีสต์และราเป็นส่วนประกอบโดยใช้ระยะเวลาในการหมัก 14 วัน ทำให้ได้เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ 16.75 %

โดยทั่วไปไวน์ข้าวจะมีแอลกอฮอล์ 12-15 % จากผลการทดลองไวน์ข้าวที่ได้มีแอลกอฮอล์น้อย เนื่องจาก การใช้ความร้อนสูงในการย่อยข้าวเหนียวด้วยเอนไซม์ อาจทำลายโครงสร้างแป้งในข้าวเหนียว ซึ่งอาจจะทำให้สารอาหารบางชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ถูกทำลายไปด้วย จึงทำให้ยีสต์มีปริมาณน้อย และโดยปกติไวน์ข้าวที่ใช้เชื้อราในการย่อยข้าวนั้น เชื้อราจะผลิตสารอาหารและวิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของยีสต์ และเมื่อพิจารณาอุณหภูมิในการหมักไวน์ข้าว จากการทดลองมีอุณหภูมิอยู่ที่ 36 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจจะเป็นอุณหภูมิที่สูงเกินไป จึงทำให้เชื้อยีสต์เจริญเติบโตน้อยและทำให้ผลิตแอลกอฮอล์ได้น้อย (Tsuyoshi, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

1. เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส มีกิจกรรมของเอนไซม์ 11800 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และกลูโคอะไมเลส มีกิจกรรมของเอนไซม์ 600 ยูนิตต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

2. สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยข้าวเหนียวด้วยเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส 5 ยูนิต โดยใช้เวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ

3. ไวน์ข้าวที่หมักด้วยข้าวเหนียวย่อยด้วยเอนไซม์ มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 11 องศาบริกซ์ และมีค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์เท่ากับ 5.15 % ในวันที่ 14 ของการหมัก

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ไวน์ข้าวที่ผลิตโดยใช้เอนไซม์แทนราในการย่อยข้าว จะทำให้ไวน์ที่ได้นั้นอาจจะขาดกลิ่นรสหอมๆ ที่ราบางชนิดสร้างขึ้น รวมทั้งไม่เกิดกรดที่ช่วยควบคุมการปนเปื้อนของแบคทีเรีย จึงอาจจะไม่เหมาะสมในการใช้เอนไซม์ในการย่อยข้าวเหนียวเพื่อผลิตไวน์ข้าว แต่อาจนำการย่อยด้วยเอนไซม์ไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อื่นๆ ได้ เช่น การผลิต syrups จากแป้ง เพื่อนำไปใช้ในการผลิตเบเกอรี่, ขนมปังกรอบ (cracker) และสารปรุงแต่งรสชาติอาหาร

5.2.2 ไวน์ที่ได้จากการหมักด้วยข้าวเหนียวทำให้ไวน์นั้นมีความขุ่น ซึ่งอาจส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค จึงควรมีการศึกษาขั้นตอนเพื่อปรับปรุงให้ไวน์ที่ลักษณะที่ใสขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

เกศรินทร์ ไกลถิ่น, นงพงา คุณจักร และ อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. 2557. การย่อยแป้งข้าวตกเกรดด้วยเอนไซม์อะไมเลสทางการค้า. วิทยาศาสตร์เกษตร. 45(2): 677-680

บุญพา วณิชชาพลอย. 2548. รูปการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส. [ออนไลน์] . เข้าถึงได้จาก : http://research.rdi.ku.ac.th/world/cache/17/BoonpaWANAll.pdf. 10 เมษายน 2563.

นริสา ตรีเนตร. 2550. ผลของยีสต์และราบางชนิดต่อสารให้กลิ่นในสาโท. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มานพ. 2560. รูปตำแหน่งการตัดพันธะของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://alpha-amylase.blogspot.com/2015/11/. 15 เมษายน 2563.

วีระสิทธิ์ กัลยากฤต. 2547. การคัดเลือกจุลินทรีย์จากลูกแป้งที่ผลิตเอนไซม์และแอลกอฮอล์เพื่ออุตสาหกรรมสาโท. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศศิกานต์ บ่อผล 2553. สปีชีส์ของยีสต์กับบทบาทในการผลิตสารให้กลิ่นในสาโท. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อภิชญา เตชะวสัญญู. 2550. การแยก จำแนก และลักษณะสมบัติของยีสต์และในลูกแป้งสุภาเพื่อการผลิตสาโท. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Bekatorou, A., Psarianos, C. and Koutinas, A.A. 2006. Production of Food Grade Yeasts Food Technology Biotechnology. 44: 407-415

Colon Institute. 2012. รูปโครงสร้างเอนไซม์อะไมเลส. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://colon-institute.org/supplements/amylase/. 11 เมษายน 2563.

Colon Institute. 2012. Amylase [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://colon-institute.org/supplements/amylase/. 11 เมษายน 2563.

Munoz, P., Bouza, E., Cuenca, M., Eiros, J.M., Perez, M.J., Rincon, C., Sánchez-Somolinos, M., Hortal, J. and Pelaez, T. 2005. Saccharomyces cerevisiae Fungemia. An Emerging Infectious Disease. 40: 1625-1634

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oates, C.G. 1996. Physical modification of starch. In advanced post academic course on tapioca starch technology. 19-23.

Puechkaset. 2016. สาโท [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://puechkaset.com/%e0%b8%aa%e0%b8%b2%e0%b9%82%e0%b8%97/. 11 เมษายน 2563.

Rakesh. 2009. รูปเอนไซม์กลูโคอะไมเลส [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://thai.alibaba.com/productdetail/glucoamylase-enzymes-112913907.html. 15 เมษายน 2563.

Srirot, K. and Piyachomkwan, K. 2003. Technology of starch. Cereal Chemistry. 65: 474-483.

Tsuyoshi, N., Fudou, R., Yamanaka, S., Kozaki, M., Tamang, N., Thapa, S. and Tamang, JP. 2005. Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim. A microbial starter for amylolytic fermentation. International Journal of Food Microbiology. 99: 135-146.

Wils, R. 2011. รูปโครงสร้างอะไมโลสและอะไมโลเพคติน. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://nutritionalbiochem. blogspot.com/2011/08/03-saving-calories-why-this-doesnt-work.html. 15 เมษายน 2563.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Malt medium (YM)

ประกอบด้วย

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 5.5 คนให้ส่วนผสมละลาย หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

ประกอบด้วย

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำมันฝรั่งที่ไม่ปอกเปลือกหั่นเป็นชิ้นขนาดเท่าลูกเต๋า จากนั้นนำไปต้มในน้ำกลั่น อัตราส่วนมัน ฝรั่ง 200 กรัมต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 15 นาที กรองแยกส่วนน้ำออกมา เติมน้ำ กลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เติมส่วนผสมต่างๆ ต้มจนละลาย หลังจากนั้นนำไป นึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

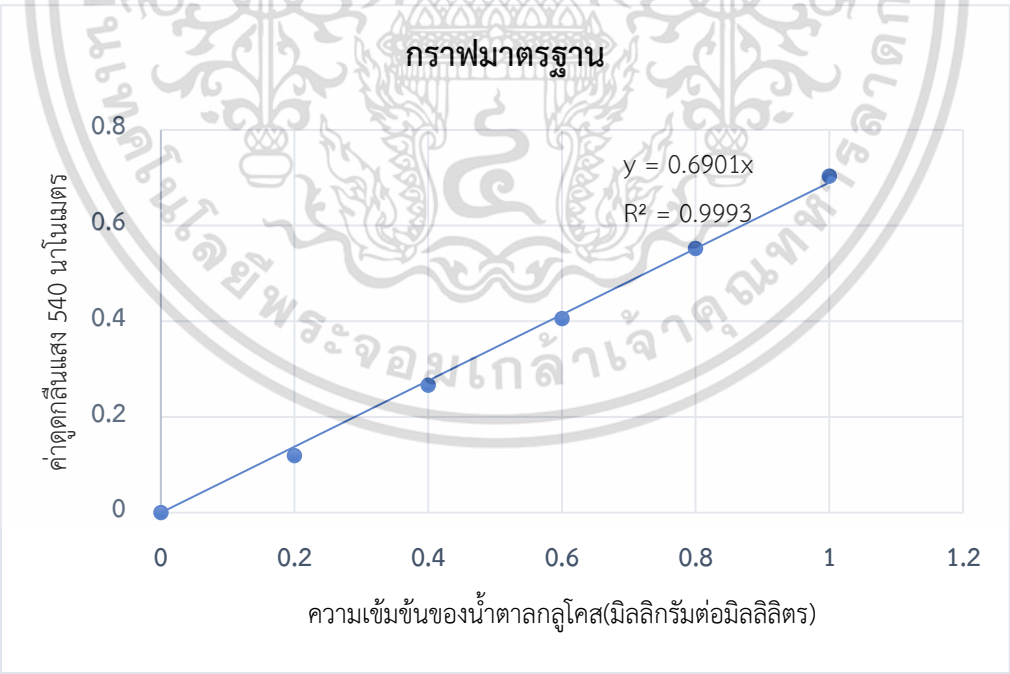
ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

วิธี DNS เป็นเทคนิคการวัดสีที่ประกอบด้วยปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่าง 3,5-dinitrosalicyclic acid และน้ำตาลรีดิวซ์มีอยู่ในตัวอย่าง โดยวิธีการนี้สามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีปริมาณอยู่ในช่วงระหว่าง 5 – 500 ไมโครกรัมของน้ำตาลกลูโคส

หลักการทางปฏิกิริยา (Miller, 1959)

น้ำตาลรีดิวซ์เหล่านี้มาจากกลุ่มคาร์บอนิลสามารถออกซิไดซ์ไปยังกลุ่มคาร์บอกซิลโดยตัวออกซิไดซ์อ่อน ๆ ในขณะที่ DNS (สีเหลือง) ลดลงเป็น 3-amino-5-nitrosalicylic acid (สีน้ำตาลแดง) ซึ่งสามารถวัดปริมาณได้โดย spectrophotometry ที่ความยาวคลื่นการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร โดยความเข้มของสีจะเป็นสัดส่วนเท่ากับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง



ภาพที่ ข-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-1 ตารางความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 nm
0.2	0.119
0.4	0.266
0.6	0.405
0.8	0.552
1	0.703

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวชฎาพร ชะราชรัมย์
วัน เดือน ปี เกิด	26 สิงหาคม 2540
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษา โรงเรียนพระมารดานิจจานุเคราะห์
	ปริญญาตรี คณะอุตสาหกรรมอาหาร
	สาขาวิชา เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อ-นามสกุล	นายพศุตม์ สำเร็จประสงค์
วัน เดือน ปี เกิด	14 พฤศจิกายน 2540
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษา โรงเรียนเทพศิรินทร์
	ปริญญาตรี คณะอุตสาหกรรมอาหาร
	สาขาวิชา เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้