ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

เรื่อง การตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนชิ้นอ้อยเพื่อใช้ในกระบวนการหมักไวน์

(Immobilization of Yeast cells on Sugar cane for Wine Fermentation Process)

โดย

นาย วีระพงค์ ทาบึงกาฬ รหัส 41044456

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... ๘ / เม.ย. / ๔๕ **อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ**

(ปทมพันธ์ ปันศิโลม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18 396

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

เรื่อง การตรึงรูปเซลยีสต์บนชิ้นอ้อยเพื่อใช้ในกระบวนการหมักไวน์

(Immobilization of Yeast cells on Sugar cane for Wine Fermentation Process)

T096707

โดย

นายวีระพงค์ ทาบึงกาฬ รหัสประจำตัว 41044456

เสนอ

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)
2544

ปฟ.
2846 ก
2544

สาขาวิชา.....
เลขทะเบียน.....96707
วันลงทะเบียน.....4 มิ.ย. 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาย วีระพงศ์ ทาบึงกาฬ. 2545. เรื่อง การตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนชิ้นอ้อยเพื่อใช้ในกระบวนการหมักไวน์ (Immobilization of Yeast cells on Sugar cane for Wine Fermentation Process)
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร.
สถาบันเทคโนโลยพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม,25 หน้า

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนชิ้นอ้อยขนาด 1x1x0.5 เซนติเมตร สำหรับใช้ในกระบวนการหมักไวน์ พบว่า การเตรียมเซลล์ยีสต์ตรึงรูปด้วยวิธีการให้อากาศตลอดเวลาโดยการเขย่าชิ้นอ้อยในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ยีสต์อยู่ จะได้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่ให้ประสิทธิภาพในการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์สูงกว่าเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่เตรียมโดยวิธีที่ไม่เขย่าในช่วงระยะเวลาการหมัก 4 วันแรกของกระบวนการหมักไวน์ อย่างไรก็ตามที่ระยะเวลาการหมักหลังจาก 5 วัน อัตราการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์จะไม่แตกต่างกันสำหรับเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่เตรียมได้จากทั้งสองวิธี และจากการทดลองใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่เตรียมโดยวิธีเขย่าในปริมาณ 5 และ 10 % ของน้ำองุ่น พบว่าที่ปริมาณของเซลล์ยีสต์ตรึงรูป 10 %จะให้อัตราการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ในไวน์สูงกว่าที่ระดับ 5 % นอกจากนี้ การใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปดังกล่าวซ้ำในการหมักไวน์ครั้งที่ 2 พบว่าประสิทธิภาพของการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ในไวน์จะลดลงเล็กน้อย

วีระพงศ์ ทาบึงกาฬ		16/03/45
ลายมือชื่อนักศึกษา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	วัน/เดือน/ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร. ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม เป็นอย่างสูง ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาผู้คอยให้คำปรึกษาและแนะแนวทางต่างๆอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการทำปัญหาพิเศษ ตลอดจนการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของรายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้ และขอขอบพระคุณ ดร. บุญเทียม พันธุ์เพ็ง และอาจารย์นิตยา พิระภัทรุ่งสุริยา ซึ่งเป็นอาจารย์คณะกรรมการที่ปรึกษาที่คอยให้คำแนะนำในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ด้วย

วีระพงศ์ ทาบึงกาฬ

16 มีนาคม 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วารสารปริทรรศน์	2
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง	8
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี	8
3.2 วิธีการทดลอง	9
3.2.1 วิธีเตรียมเซลล์ยีสต์สำหรับตรึงรูป	9
3.2.2 วิธีตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนชิ้นอ้อย	10
3.2.3 การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนชิ้นอ้อย	11
3.2.4 การศึกษาประสิทธิภาพการหมักไวน์เมื่อใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย	11
บทที่ 4 ผลการทดลอง	13
4.1 ผลการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย	13
4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการหมักไวน์เมื่อใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย	15
4.2.1 การหมักไวน์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยปริมาณต่างกัน	15
4.2.2 การหมักไวน์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยซ้ำ 2 ครั้ง	18
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	21
เอกสารอ้างอิง	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 23
การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ 23
การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Lane and Eyon 23
การวิเคราะห์ความเป็นกรด 24
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 3.1	ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ยีสต์สำหรับใช้ตรึงรูป	10
รูปที่ 3.2	ขั้นตอนการตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนชิ้นอ้อย	11
รูปที่ 3.3	ขั้นตอนการหมักไวน์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย	12
รูปที่ 4.1	แสดงปริมาณแอลกอฮอล์ของอาหาร MY broth ที่ได้จากการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่เตรียมด้วยวิธีต่างกัน	14
รูปที่ 4.2	แสดงปริมาณแอลกอฮอล์ของไวน์ที่ได้จากการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่เตรียมด้วยวิธีต่างกัน	15
รูปที่ 4.3	แสดงปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไวน์ที่หมักได้โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยปริมาณต่างกัน	17
รูปที่ 4.4	แสดงปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไวน์ที่หมักได้โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่ใช้ซ้ำ 2 ครั้ง	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

การตรึงรูปเซลล์หรือเอนไซม์นับเป็นเทคนิคที่กำลังได้รับความสนใจและมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องในกระบวนการหมักเพื่อผลิตผลิตผลทางด้านการหมัก เช่น การหมักแอลกอฮอล์และน้ำส้มสายชูด้วยการใช้เซลล์ตรึงรูป เนื่องจากการใช้เซลล์ตรึงรูปในการหมักนั้นมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้เซลล์อิสระซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิม คือ สามารถนำเซลล์กลับมาใช้หมักได้อีกหลายครั้ง โดยที่เซลล์ยังคงมีประสิทธิภาพและเสถียรภาพใกล้เคียงกับเซลล์เริ่มต้น ทำให้ระยะเวลาของการหมักลดลง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณและคุณภาพสูงขึ้น ดังจะเห็นได้จากการนำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปมาใช้ในการผลิตไวน์ ซึ่งพบว่าไวน์ที่ได้นั้นมีความใสและกลิ่นที่ดีขึ้น เนื่องจากช่วยลดความขุ่นที่เกิดจากตะกอนของยีสต์เอง และลดกลิ่นของยีสต์ที่มีในไวน์ ซึ่งจัดเป็นกลิ่นที่ไม่ดีของไวน์ (พิเชษฐ์ และอัญชลี,2535)

จากข้อได้เปรียบของการใช้เซลล์ตรึงรูปในการหมักเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระที่มีอยู่หลายประการ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับการตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนพาหะของแข็งรูปแบบใหม่ๆ เพื่อใช้ในกระบวนการหมัก ซึ่งในการทดลองที่จะศึกษานี้ เกี่ยวข้องกับการตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนชิ้นอ้อยเพื่อหมักไวน์ เนื่องจากอ้อยเป็นวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีอยู่มากในประเทศไทย แต่การนำไปใช้ประโยชน์ยังมีจำกัด จึงน่าที่จะนำมาใช้สำหรับตรึงรูปเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักไวน์เป็นอย่างยิ่ง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนชิ้นอ้อย
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการหมักไวน์โดยการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทรรศน์

การตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์

การตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ หมายถึง การทำให้เซลล์อยู่ในบริเวณที่จำกัด หรืออยู่ที่ใดที่หนึ่งในระหว่างกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ซึ่งเมื่อกระบวนการผลิตสิ้นสุดลง สามารถแยกเซลล์ตรึงรูปออกจากผลิตภัณฑ์ และสามารถนำกลับมาใช้ได้อีก (Kilara and Shahani, 1985)

การตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์โดยทั่วไปแบ่งออกได้ 3 วิธีใหญ่ๆ คือ

1. การเชื่อมไขว้ (crosslinking method)

เป็นวิธีการตรึงรูปเซลล์โดยปราศจากสารพาหะที่เป็นของแข็ง ทำได้โดยการใช้สารเชื่อมไขว้ (crosslinking agent) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการเชื่อมต่อกันระหว่างโมเลกุลของเซลล์ วิธีนี้จะทำให้เซลล์เกิดการเชื่อมไขว้ทั้ง 3 ทิศทางและมีการจับตัวกันเป็นก้อน การตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ด้วยการเชื่อมไขว้ยังแบ่งออกได้เป็น 3 วิธีดังนี้

1.1 การใช้สารที่มีหมู่ฟังก์ชันนัลตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป เช่น กลูตารอลดีไฮน์ (glutaraldehyde) , โทลูอีน (tolulent) และ ไดไอโซไซยาเนต (diisocyanate) เป็นต้น ทำปฏิกิริยากับเซลล์ ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาที่หมู่อะมิโนอิสระหรือหมู่คาร์บอกซิลอิสระ บนผนังเซลล์ที่เชื่อมโยงกันด้วยสารเชื่อมไขว้

1.2 การเติมสารพอลีอิเลกโทรไลท์ เช่น การตรึงเซลล์ *Nitrosomonas curopaea*_ทำโดยผสมเซลล์เข้ากับสารละลายของ trimethyiammonium glycol chitosan iodide ที่มากเกินพอ หลังจากนั้นเติม potassium polyvinylalcohol sulfate เซลล์จะถูกล้อมรอบไว้ภายในเจล ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนจำพวกพอลีอิออน (polyion complex)

การตรึงรูปโดยวิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถใช้สารเชื่อมไขว้เพียงชนิดเดียวในการตรึงรูป และการยึดเกาะของเซลล์มีความแข็งแรง

2. การเชื่อมกับสารพาหะ (carrier binding method)

เป็นวิธีการตรึงรูปเซลล์โดยให้เซลล์ยึดเกาะกับสารพาหะที่เป็นของแข็ง (solid support) ปัจจัยที่สำคัญของการตรึงรูปวิธีนี้ คือ การเลือกชนิดของสารพาหะและปริมาณของเซลล์จุลินทรีย์ที่จะเชื่อมกับสารพาหะ ทำได้ 2 วิธีคือ

2.1 การดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) เป็นการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ไว้ที่ผิวของสารพาหะที่เป็นของแข็ง โดยใช้แรงดึงดูดที่ค่อนข้างอ่อน ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน (hydrogen-bond) หรือ แรงวัลเดอร์วาลส์ (Van der Waals interaction)โดยธรรมชาติจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชอบเจริญบนผิวของของแข็ง เช่น เม็ดทราย, ดินชื้น, เนื้อเยื่อพืช, วิลไล (villi) ของลำไส้ ,แร่ธาตุ และหลอดพอลีไวนีลคลอไรด์ เป็นต้น ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์บนพาหะของแข็ง จะเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างท่อยึดเกาะบนผิวของพาหะได้เมื่ออยู่ในภาวะที่เหมาะสม การยึดเกาะดังกล่าวเป็นลักษณะของการตรึงรูปเซลล์ด้วยการดูดซับทางกายภาพตามธรรมชาติ ส่วนแรงยึดระหว่างเซลล์กับสารพาหะจะมีมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ สารพาหะและเซลล์ นอกจากเกิดการจับกันด้วยแรงกระทำดังกล่าวข้างต้นแล้วยังอาจเกิดจากพันธะไอโอโนจินิก (ionogenic bond) เมื่อมีไอออนอื่นช่วย เช่น Ca^{2+} ,Fe^{2+}, Fe^{3+}, Al^{3+} เป็นต้น หรือสะพานไฮไดร์ (hydride brige) แรงเหล่านี้ขึ้นอยู่กับหมู่ต่างๆที่อยู่บนผิวของผนังเซลล์ ได้แก่ เปปไตด์ (peptide), เฮกโซซามีน (hexosamines) และกรดอะมิโนไพมิลิก (diaminopimelic acid) สารพาหะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปเซลล์ด้วยการดูดซับทางกายภาพ จะต้องเป็นสารที่เซลล์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และทำให้มีการแปรสภาพธรรมชาติน้อยที่สุด สารพาหะที่นิยมใช้ได้แก่ เรซินแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange resin) ,เซลลูโลสและอนุพันธ์เลคทิน (lectin), โพลีไฮ-ดรอกไซด์ของโลหะ เป็นต้น

การตรึงรูปเซลล์ด้วยการดูดซับทางกายภาพนี้ เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายและรวดเร็ว แต่จะได้ผลไม่ดีนัก ทั้งนี้เนื่องจากในกระบวนการตรึงรูปนั้นต้องมีการปรับพีเอช และประจุของผิวผนังเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงตามอายุของเซลล์และสภาพแวดล้อม

2.2 การตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding) วิธีนี้เซลล์จะถูกตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์กับสารพาหะ โดยการใช้สารพาหะที่มีหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยาหรือโดยการเติมสารที่สามารถยึดเซลล์กับสารพาหะเข้าด้วยกัน

สารพาหะที่มีหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยา ได้แก่ ไซยาโนเจนโบรไมด์-เซลลูโลส (CNBr-cellulose) และกลูตารอลดีไฮน์-เจลาติน (glutaraldehyde-gelatin) เป็นต้น ส่วนสารที่สามารถยึดเซลล์และสารพาหะเข้าด้วยกันด้วยพันธะโควาเลนต์ ได้แก่ อะมิโน-ไซเลนไดไอโซไซยาเนต, คาร์โบไดอิม-ไมด์ และกลูตารอลดีไฮด์ เป็นต้น แต่สารเหล่านี้มักจะทำให้เซลล์ตาย การตรึงรูปโดยวิธีนี้ค่อนข้างยากกว่าการดูดซับทางกายภาพ ปฏิกิริยาการเกิดพันธะโควาเลนต์ค่อนข้างซับซ้อนและมีความรุนแรง ดังนั้นในบางครั้งการเกิดพันธะโควาเลนต์จะกระทบกระเทือนต่อโครงสร้างของเซลล์ทำให้เซลล์เปลี่ยนความจำเพาะต่อซับสเตรท แต่อย่างไรก็ตาม แรงเกาะกันระหว่างเซลล์กับสารพาหะค่อนข้างแข็งแรงจึงทำให้เซลล์หลุดออกจากสารพาหะได้ยาก

3. การดักจับ หรือการล้อมรอบ (entrapping method)

เป็นวิธีการตรึงรูปเซลล์โดยการดักจับเซลล์ไว้ด้วยของแข็ง, เส้นใยหรือการล้อมรอบด้วยแคปซูลขนาดเล็กที่มีลักษณะเป็นเจล ซึ่งอาจจะเป็นสารอินทรีย์ที่พบในธรรมชาติหรือได้จากการสังเคราะห์ เช่น collagen , gelatin หรือalginate เป็นต้น ปัญหาที่สำคัญของการตรึงรูปเซลล์ด้วยวิธี-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดักจับหรือห่อหุ้ม คือ ความจำกัดในการแพร่กระจายของสารอาหาร โดยปกติเซลล์ตรึงรูปจะได้รับสารอาหารน้อยกว่าเซลล์อิสระ ทั้งนี้ เพราะเมื่อเซลล์ถูกจับไว้ด้วยสารพาหะ จะทำให้สารอาหารซึมผ่านสารพาหะก่อนที่เซลล์จะได้รับสารอาหาร อย่างไรก็ตาม การตรึงรูปด้วยวิธีนี้เซลล์จุลินทร์ยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้ เนื่องจากสภาวะที่ใช้ตรึงรูปไม่รุนแรง และยังป้องกันการหลุดออกของเซลล์ได้ดีกว่าวิธีอื่น

ข้อดีของการใช้เซลล์ตรึงรูปสำหรับกระบวนการหมัก

การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ตรึงรูปในกระบวนการหมักมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้เซลล์จุลินทรีย์อิสระ ดังนี้

1. เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปมีความคงทน ต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมได้ดี เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ หรือความเป็นกรดด่าง
2. เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปสามารถมีชีวิตได้นานขึ้น
3. สามารถนำเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง
4. สามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้เร็วกว่าการใช้เซลล์อิสระ ทั้งนี้เพราะเซลล์ตรึงรูปจะมีความหนาแน่นของเซลล์ต่อปริมาตรของสารละลายอาหารมากกว่าเซลล์อิสระ

ข้อเสียของการใช้เซลล์ตรึงรูปสำหรับกระบวนการหมัก

1. เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปมักจะไม่มีการเจริญเติบโตซึ่งจะทำให้สูญเสียความสามารถในการทำงานไป จึงจำเป็นต้องให้อาหารแก่เซลล์ตรึงรูปตลอดเวลา ทั้งนี้เพื่อให้เซลล์มีชีวิตอยู่ได้และมีประสิทธิภาพในการทำงาน
2. เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปจะมีปัญหาในการแพร่กระจายและการขนส่งของสารละลายอาหารและสารผลิตภัณฑ์ผ่านพาหะที่ใช้ตรึง
3. สารละลายอาหารและสารผลิตภัณฑ์อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นได้

ไวน์ (Wine)

ไวน์หรือเหล้าองุ่น เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่อาศัยบทบาทของยีสต์ในการหมักน้ำองุ่นให้เกิดแอลกอฮอล์

โดยทั่วไปการแบ่งชนิดของไวน์ (อรวินทร์ และสมสุข , 2538) จะนิยมแบ่งตามวิธีการผลิตและลักษณะอันเป็นเอกลักษณ์เฉพาะได้เป็น 4 ประเภทคือ

1. เทเบิลไวน์ (table wine) เป็นไวน์ที่ได้จากการหมักน้ำองุ่นตามธรรมชาติโดยไม่มีการผสมสารใดๆลงไป อาจเรียกว่า ไวน์ที่ไม่มีฟองหรือไวน์ธรรมชาติ (natural wine) มีปริมาณแอลกอฮอล์ 9-14 %v/v ไวน์ประเภทนี้ยังแบ่งออกได้ 3 ชนิดคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1 ไวน์แดง (red wine) เป็นไวน์ที่มีสีแดงตั้งแต่สีแดงอ่อนๆ เช่นสีส้มจนถึงสีทับทิมหรือสีม่วงเข้ม มีรสฝาด และมีความหวานน้อยกว่าไวน์ชนิดอื่น แต่มีความเข้มข้นและกลิ่นมากกว่า

1.2 ไวน์ขาว (white wine) เป็นไวน์ที่มีตั้งแต่สีเหลืองซีดเกือบใสเหมือนน้ำ จนถึงสีขาวปนเขียว และสีเหลืองระดับต่างๆกัน จนถึงสีเหลืองทองและน้ำตาลอ่อน มีรสชาติอ่อนและกลิ่นน้อยกว่าไวน์แดง มีทั้งชนิดที่หวานน้อยมากหรือไม่หวาน (very dry) หวานน้อยหรือหวานปานกลาง (medium) และหวานมาก (very sweet)

1.3 ไวน์สีชมพูหรือโรเซ่ไวน์ (rose wine) เป็นไวน์ที่มีสีชมพูตั้งแต่สีชมพูซีดจนถึงสีแดงปนส้ม มีลักษณะและรสชาติคล้ายไวน์ขาว

2. สปาร์กกลิงไวน์ (sparkling wine) เป็นไวน์ที่มีฟองและแก๊สผสมอยู่ มีรสซ่า เมื่อเปิดขวดจะมีเสียงดังจากแก๊สที่บรรจุอยู่ดันออกมาและมีฟองมาก โดยทั่วไป สปาร์กกลิงไวน์จะได้จากการนำเทเบิลไวน์ซึ่งอาจจะเป็นไวน์แดงหรือไวน์ขาว หรือโรเซ่ไวน์มาหมักซ้ำอีกครั้ง (refermentation) หรือหมักเป็นครั้งที่ 2 โดยการเติมน้ำตาลและยีสต์เพื่อให้เกิดการหมักต่อไปอีก ได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แล้วเก็บแก๊สนี้ไว้ในขวด ไวน์ชนิดนี้คนส่วนใหญ่เรียกว่า แชมเปญ (champagne)

3. ฟอร์ติไฟด์ไวน์ (fortified wine) เป็นไวน์ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงกว่าเทเบิลไวน์และสปาร์กกลิงไวน์ คือมีแอลกอฮอล์ตั้งแต่ 15-24 % แต่ส่วนใหญ่จะมีแอลกอฮอล์ประมาณ 18-19 % การที่ไวน์ประเภทนี้มีแอลกอฮอล์สูงเนื่องจากมีการเติมบรั่นดี (brandy) ที่ได้จากการต้มกลั่นไวน์ลงไปในขณะหมักไวน์ จึงทำให้ไวน์นั้นมีปริมาณแอลกอฮอล์สูงกว่าธรรมดา ปริมาณน้ำตาลในไวน์บางส่วนไม่สามารถเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ จึงทำให้ได้ไวน์ที่มีรสหวาน ไวน์ประเภทนี้เป็นที่นิยมและรู้จักกันดี คือ เชอร์รี (sherry), พอร์ต (port), มาเดียรา (madeira), มาร์ซาลา (marsala) และ มาลากา (malaga) ไวน์ประเภทนี้ส่วนใหญ่จะเสริฟเป็นแก้วตามสั่ง

4. อะโรมาไทซ์ไวน์ (aromatized wine) เป็นไวน์ที่มีกลิ่นหอมกว่าไวน์ประเภทอื่นๆ เนื่องจากมีการเติมบรั่นดีลงในไวน์ระหว่างการหมักเช่นเดียวกับ ฟอร์ติไฟด์ไวน์ แต่มีการเติมสมุนไพรชนิดต่างๆเพื่อให้เกิดกลิ่นหอม บางชนิดยังมีสรรพคุณทางยาด้วย แบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ อะเพอริทิฟไวน์ (aperritive wine) และ ดีสเซิร์ตไวน์ (dessert wine)

การใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปในกระบวนการหมักไวน์

ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการตรึงรูปเซลล์ยีสต์มาประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักไวน์ เนื่องจากการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้เซลล์ยีสต์อิสระหลายประการดังนี้ (Cantarelli, 1989)

1. เซลล์ยีสต์ตรึงรูปมีความต้านทานต่อปัจจัยที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ เช่น ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์, โลหะหนัก, สารประกอบฟีนอล, ความเป็นกรด และอุณหภูมิที่สูง ทำให้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปมีชีวิตรอดได้ดีกว่าเซลล์ยีสต์อิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปต่ำ เนื่องจากถูกกำหนดให้อยู่ในขอบเขตที่จำกัด ทำให้เซลล์สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีผลทำให้ระยะเวลาของการหมักสั้นลง

3. การตรึงรูปทำให้สามารถใช้เซลล์ยีสต์ที่มีความเข้มข้นสูงเมื่อเทียบกับปริมาณสารตั้งต้น ทำให้มีอัตราการผลิตสูงกว่าการใช้เซลล์ยีสต์อิสระ โดยไม่ก่อให้เกิดปัญหาเนื่องจากการสลายตัวของเซลล์ยีสต์ รวมทั้งการแยกเซลล์ยีสต์ออกเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักทำได้ง่าย

4. การใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปสามารถปรับปรุงกระบวนการผลิตให้ง่ายขึ้น เนื่องจากไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมสตาร์ตเตอร์และสามารถนำเซลล์ตรึงรูปกลับมาใช้ได้หลายครั้ง

5. การใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปไม่ทำให้เกิดการกระจายตัวของเซลล์ยีสต์ในน้ำหมัก จึงสามารถลดความขุ่นของไวน์ได้

6. สามารถนำเซลล์ตรึงรูปไปใช้งานในลักษณะกระบวนการหมักไวน์แบบต่อเนื่องได้อย่างมีประสิทธิภาพ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้เซลยีสต์ตรึงรูปในกระบวนการหมักไวน์

ปี 1989 Ogbanna และคณะ ได้ศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงรูปเซลล์ยีสต์สำหรับใช้ในกระบวนการหมักไวน์โดยวิธีดักจับในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงรูปดังกล่าวได้แก่ จำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการตรึงรูป ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ ซึ่งจะมีผลต่อความแข็งแรงของเม็ดเจลที่ได้ โดยสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเซลล์ยีสต์ตรึงรูปโดยวิธีดักจับในแคลเซียมอัลจิเนต คือ ใช้จำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มต้น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2.0 % บ่มเม็ดเจลในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เป็นเวลาอย่างน้อย 22 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังนี้ยังพบว่า เซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่ได้มีเสถียรภาพสูง กล่าวคือ สามารถนำไปใช้หมักไวน์จากน้ำองุ่นได้ถึง 9 ครั้งภายในระยะเวลา 1 เดือน โดยที่เม็ดเจลแตกสลายน้อยมากและปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักยังคงมีระดับสูง

ปี 1993 ประพันธ์ และ วราวุฒิ ได้ศึกษาเกี่ยวกับการหมักไวน์แบบครั้งคราวและแบบต่อเนื่องโดยใช้ยีสต์ตรึงรูป พบว่า การใช้ยีสต์ตรึงรูปโดยวิธีดักจับในแคลเซียมอัลจิเนตในการหมักไวน์แบบครั้งคราวเปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์อิสระนั้น ปริมาณของแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นและปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงในน้ำองุ่น จะมีการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายคลึงกันตลอดระยะเวลาการหมัก 7 วัน และจากการใช้ยีสต์ตรึงรูปหมักไวน์แบบครั้งคราวซ้ำ 5 ครั้ง ปรากฏว่ายีสต์ตรึงรูปยังคงมีประสิทธิภาพการหมักได้ดี อย่างไรก็ตามการใช้งานซ้ำหลายครั้งจะมีผลทำให้เซลลยีสต์รั่วออกมาจากเม็ดเจลมากขึ้น เมื่อทดลองหมักไวน์แบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพยีสต์ตรึงรูปแบบแพคเบดขนาด 654 ลบ.ซม. โดยควบคุม dilution rate ของน้ำองุ่นในช่วง 0.015-0.030 ต่อชั่วโมง พบว่า ไวน์ที่ได้มีปริมาณแอลกอฮอล์ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก 80ชั่วโมง ปริมาณ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอลกอฮอล์โดยเฉลี่ยเท่ากับ 10.0 % โดยปริมาตร ไวน์ที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์อิสระ ยีสต์ตรึงรูปที่หมักแบบครั้งคราว และยีสต์ตรึงรูปที่หมักแบบต่อเนื่องจะมี ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และความเป็นกรดทั้งหมดใกล้เคียงกัน แต่ไวน์ที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์อิสระจะมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและฟีนอลทั้งหมดสูงกว่าไวน์ ที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ตรึงรูปทั้งที่หมักแบบครั้งคราวและแบบต่อเนื่อง

ปี 2001 Y.Kourkoutas และคณะ ได้ทดลองผลิตไวน์ที่อุณหภูมิต่ำโดยใช้ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นแอบเปิล ซึ่งใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* strain AXAZ-1 ศึกษาการตรึงรูปด้วยกล้องจุลทรรศอิเลกตรอน และติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักไวน์แบบครั้งคราว พบว่า ยีสต์ตรึงรูปยังคงมีเสถียรภาพและแอคติวิตีที่ดีอยู่ ซึ่งต้องทำการหมักที่อุณหภูมิต่ำ (1-12 องศาเซลเซียส) โดยเฉพาะที่ 6 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาในการหมักไวน์เพียง 8 วัน ซึ่งน้อยกว่าการหมักแบบธรรมชาติที่ต้องใช้เวลานาน การหมักไวน์โดยใช้ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นแอบเปิลนี้จะได้ไวน์ที่มีกลิ่นและรสชาติที่ดีขึ้นมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

องุ่นเขียว
น้ำตาลทราย
อ้อยดำ

สารเคมี

แอมโมเนียมซัลเฟต
กรดซิตริก
โพแทสเซี่ยมเมตาไบซัลไฟต์
โซเดียมคาร์บอเนต
เด็กโตส
ยีสต์แอคแทรค
มอลท์แอคแทรค
เปบโตน
แมกนีเซี่ยมซัลเฟต
โพแทสเซี่ยมไฮโดรเจนฟอสเฟต
โซเดียมไฮดรอกไซด์
ฟีนอล์ฟทาลีน
เมทิลีนบลู
คอบเปอร์ซัลเฟต
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต
น้ำตาลกลูโคส
3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิคเอซิด

อุปกรณ์และเครื่องมือ

ขวดรูปชมพู่
เครื่องเขย่า
เครื่องฆ่าเชื้อความดัน
เครื่องวัดพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตะเกียงแอลกอฮอล์

ลวดเขี่ยเชื้อ

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

refractometer

ebulliometer

เครื่องหมุนเหวี่ยง

เครื่องแก้วในการวิเคราะห์

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

MY broth และ MY agar

<u>เชื้อจุลินทรีย์</u>

เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae var burgundy*

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 <u>วิธีเตรียมเซลล์ยีสต์สำหรับตรึงรูป</u>

3.2.1.1 เขี่ยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* var *bugundy* จากอาหารวุ้นในหลอดทดลองลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar เพื่อแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวด้วยวิธีการ steak plate บ่มเลี้ยงเชื้อ 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

3.2.1.2 เขี่ยเชื้อยีสต์ที่เป็นโคโลนีเดี่ยวแล้วลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar ในหลอดทดลองใหม่ บ่มเลี้ยงเชื้อ 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

3.2.1.3 เขี่ยเชื้อที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง (slant agar) 2 ลูปลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อ MY broth ปริมาตร 300 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตรแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.2.1.4 แยกเซลล์ยีสต์ที่เพิ่มปริมาณขึ้น โดยนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน10 นาที จะได้เซลล์เปียกของยีสต์สำหรับใช้ตรึงรูปในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่3.1 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ยีสต์สำหรับใช้ตรึงรูป

3.2.2 วิธีการตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนชิ้นอ้อย

3.2.2.1 หั่นอ้อยเป็นรูปสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาด 1×1×0.5 เซนติเมตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

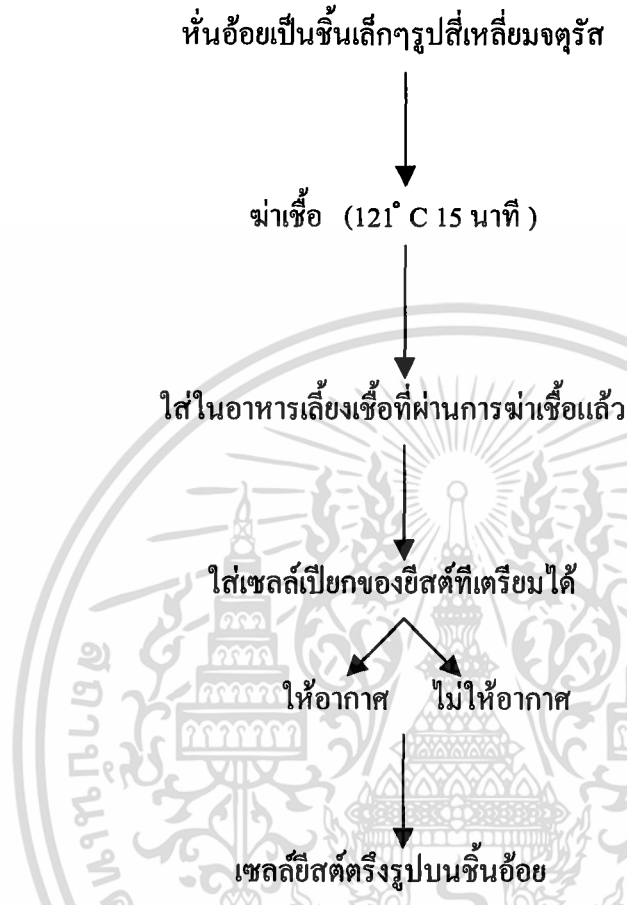
3.2.2.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 6 ขวด โดยอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ประกอบด้วย 12% glucose , 0.4% yeast extract , 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% KH_2PO_4 และ 0.5% $MgSO_4$ ในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้ได้ 5.6 แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Kourkoutas,Y. และคณะ,2001)

3.2.2.3 นำเซลล์เปียกของยีสต์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1 น้ำหนัก 1 กรัม เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.2.2.2 แล้วเติมชิ้นอ้อยที่เตรียมไว้แล้ว จำนวน 100 กรัม จากข้อ 3.2.2.1

3.2.2.4 ติดตามการเปลี่ยนแปลงโดยแบ่งเป็น 2 แบบ คือ แบบเขย่าชิ้นอ้อยในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อยีสต์ตลอดเวลาโดยใช้เครื่องเขย่า กับแบบไม่เขย่าโดยตั้งทิ้งไว้นิ่งๆ สภาวะละ3 ขวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.5 เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลือปริมาณของแข็งที่ละลายได้ประมาณ5 องศาบริกซ์ (ใช้ refractometer วัด) จึงถ่ายของเหลวออก แล้วล้างชิ้นอ้อยที่ตรึงรูปเซลล์ยีสต์ไว้แล้ว ก่อนที่จะใช้ในการหมักทุกครั้ง



รูปที่3.2 ขั้นตอนการตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนชิ้นอ้อย

3.2.3 การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนชิ้นอ้อย

3.2.3.1 นำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่เตรียมโดยการเขย่าให้อากาศตลอดเวลา และแบบที่ไม่เขย่า มาหมักในอาหาร MY broth 300 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร (ใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย 30 กรัม) ติดตามการเปลี่ยนแปลงของระดับแอลกอฮอล์ ด้วยเครื่อง ebulliometer ทุกๆ 10 ชั่วโมง) เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์

3.2.4 การศึกษาประสิทธิภาพการหมักไวน์เมื่อใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย

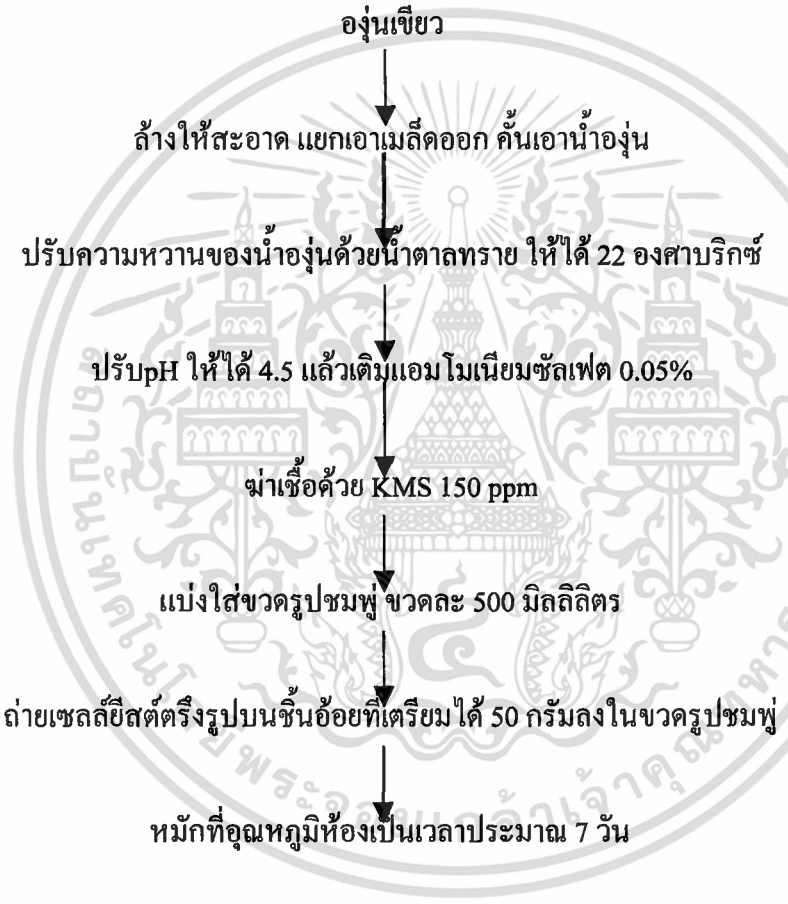
3.2.4.1 หมักไวน์ด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย โดยเลือกเอาสภาวะการตรึงรูปเซลล์ยีสต์ที่ให้ประสิทธิภาพการหมักที่ดีกว่า คือ มีอัตราการสร้างแอลกอฮอล์ที่สูงกว่า มาหมักไวน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามวิธีในแผนภูมิรูปที่ 3.3 พร้อมกับติดตามการหมักทุกๆวัน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ความเป็นกรดทั้งหมด พีเอช และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด

3.2.4.2 หมักไวน์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยในปริมาณ 5 และ 10 % ของน้ำองุ่นที่จะใช้หมัก ติดตามการเปลี่ยนแปลงทุกๆวัน และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมัก

3.2.4.3 หมักไวน์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยซ้ำ 2 ครั้ง ติดตามการเปลี่ยนแปลงทุกๆวัน และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในแต่ละครั้ง



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการหมักไวน์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

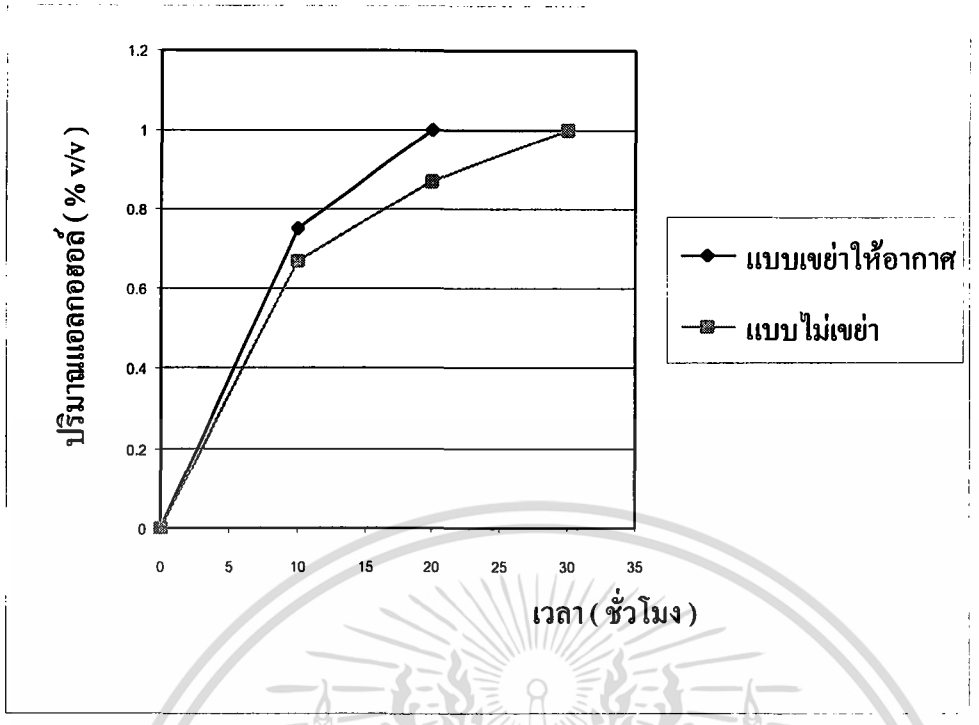
4.1 ผลการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย

จากการทดลองเตรียมเซลล์ยีสต์ตรึงรูปโดยวิธีเขย่าให้อากาศตลอดเวลา และวิธีไม่เขย่าโดยตั้งทิ้งไว้นิ่งๆ เมื่อนำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่เตรียมได้จากทั้งสองวิธีมาหมักในอาหาร MY broth และในน้ำอ้อยอุ่น เพื่อเลือกวิธีการเตรียมเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่มีประสิทธิภาพในการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์สูงสุด ได้ผลดังตารางที่ 4.1, 4.2 และ รูปที่4.1, 4.2

ตารางที่4.1 ปริมาณแอลกอฮอล์ของอาหาร MY broth ที่ได้จากการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่เตรียมด้วยวิธีต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณแอลกอฮอล์ (% v/v)	
	แบบเขย่าให้อากาศ	แบบไม่เขย่า
0	0	0
10	0.75	0.67
20	1.00	0.87
30	1.00	1.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

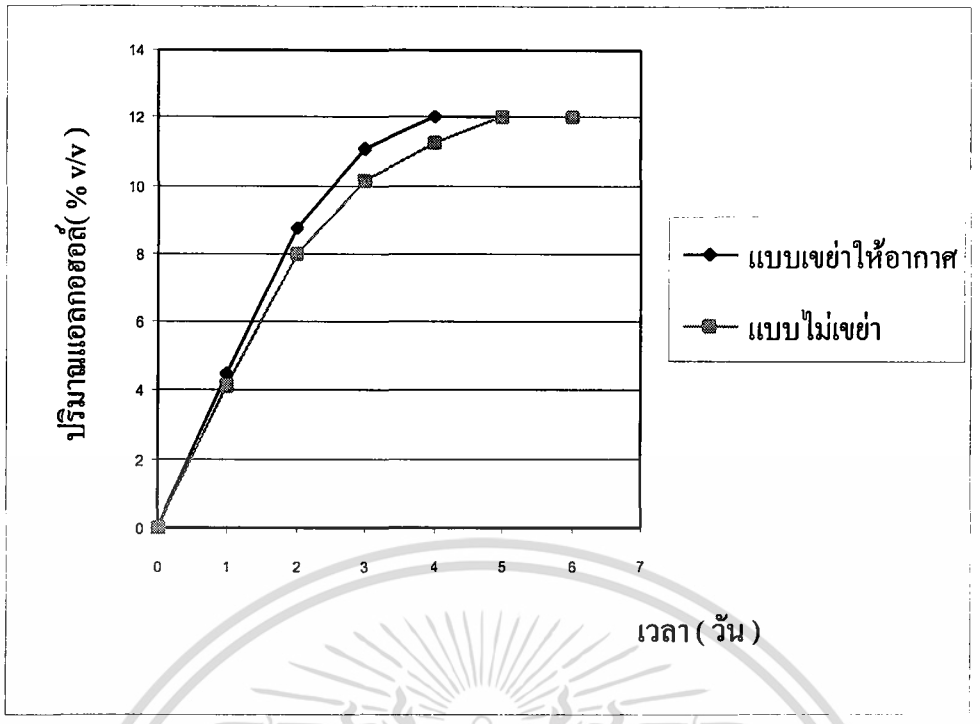


รูปที่ 4.1 กราฟแสดงปริมาณแอลกอฮอล์ของอาหาร MY broth ที่ได้จากการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่เตรียมด้วยวิธีต่างกัน

ตารางที่ 4.2 ปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไวน์ที่ได้จากการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่เตรียมด้วยวิธีต่างกัน

เวลา (วัน)	แบบเขย่าให้อากาศ		แบบไม่เขย่า	
	ปริมาณแอลกอฮอล์ (%v/v)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณแอลกอฮอล์ (%v/v)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
0	0	23.50	0	23.50
1	4.50	15.67	4.17	16.40
2	8.77	10.83	8.00	11.23
3	11.10	6.40	10.17	7.00
4	12.00	5.17	11.27	5.83
5	12.00	4.67	12.00	5.00
6	12.00	2.17	12.00	2.30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ปริมาณแอลกอฮอล์ของไวน์ที่ได้จากการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่เตรียมด้วยวิธีต่างกัน

จากตารางที่ 4.1, 4.2 และรูปที่ 4.1, 4.2 จะเห็นว่าปริมาณแอลกอฮอล์ของอาหาร MY broth ที่ได้จากการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่เตรียมได้ทั้งสองวิธี มีอัตราการเพิ่มใกล้เคียงกันมาก แต่ก็พอมีแนวโน้มว่า การเตรียมเซลล์ยีสต์ตรึงรูปโดยการเขย่าให้อากาศตลอดเวลาจะมีประสิทธิภาพในการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์สูงกว่า และเมื่อนำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยมาหมักในน้ำอ้อยงุ่น พบว่า ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้น และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง เมื่อหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่เตรียมโดยการเขย่าให้อากาศจะมีอัตราที่สูงกว่าแบบไม่เขย่า

4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการหมักไวน์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย

4.2.1 การหมักไวน์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยด้วยปริมาณที่ต่างกัน

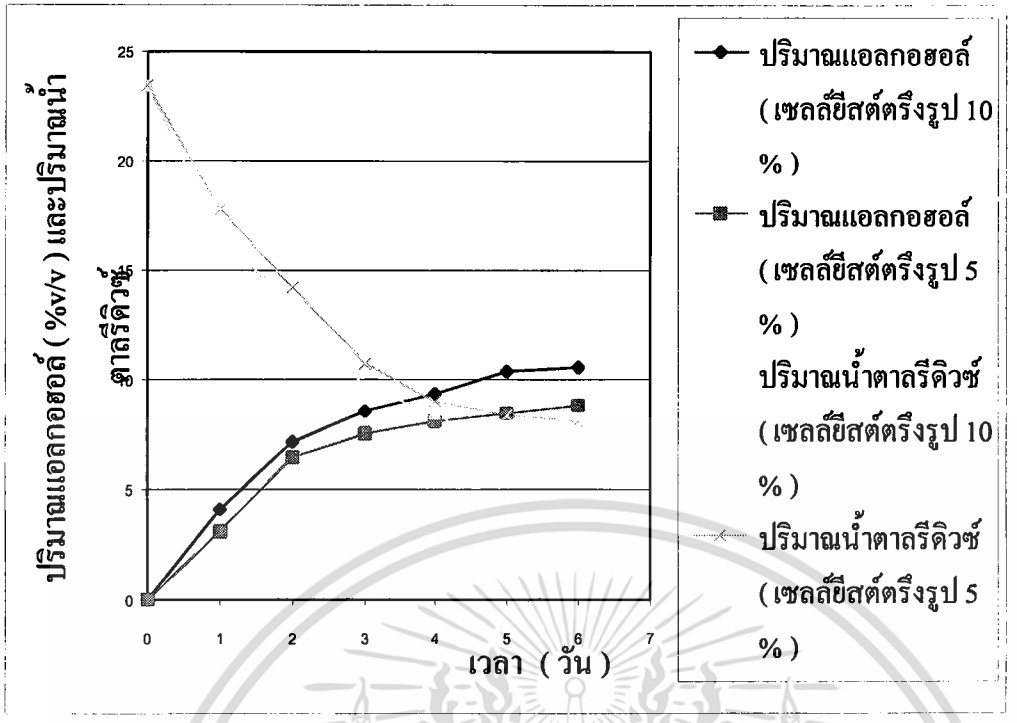
จากการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่เตรียมโดยวิธีที่เหมาะสมแล้วมาหมักไวน์โดยใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์ตรึงรูป 5 และ10 % ของน้ำอ้อยงุ่นที่ใช้หมัก ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 องค์ประกอบทางเคมีบางประการของไวน์ที่ได้จากการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยในปริมาณต่างกัน

เวลา (วัน)	เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย 5 %				เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย 10 %			
	ปริมาณแอลกอฮอล์ (% v/v)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้	ความเป็นกรด	ปริมาณแอลกอฮอล์ (% v/v)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้	ความเป็นกรด
0	0	23.50	22.00	0.35	0	23.50	22.00	0.35
1	4.10	16.47	16.33	0.36	3.07	17.83	17.00	0.31
2	7.16	13.17	12.00	0.36	6.43	14.15	13.67	0.37
3	8.58	9.67	6.00	0.37	7.53	10.73	7.00	0.37
4	9.38	8.47	5.00	0.39	8.07	9.00	6.00	0.39
5	10.33	6.55	4.00	0.39	8.47	8.40	6.00	0.39
6	10.52	6.00	4.00	0.43	8.81	8.07	5.00	0.42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไวน์ที่ได้จากการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยปริมาณต่างกัน

จากตารางที่4.3 และรูปที่ 4.3 จะเห็นว่าการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย ปริมาณ 10 % ของน้ำอ้อยที่ใช้หมัก จะมีอัตราการสร้างแอลกอฮอล์สูงกว่าตลอดช่วงระยะเวลาการหมัก และเมื่อสิ้นสุดการหมักแล้วจะมีระดับแอลกอฮอล์ที่สูงกว่า ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณของแข็งที่ละลายได้จะเหลือน้อยกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
96707

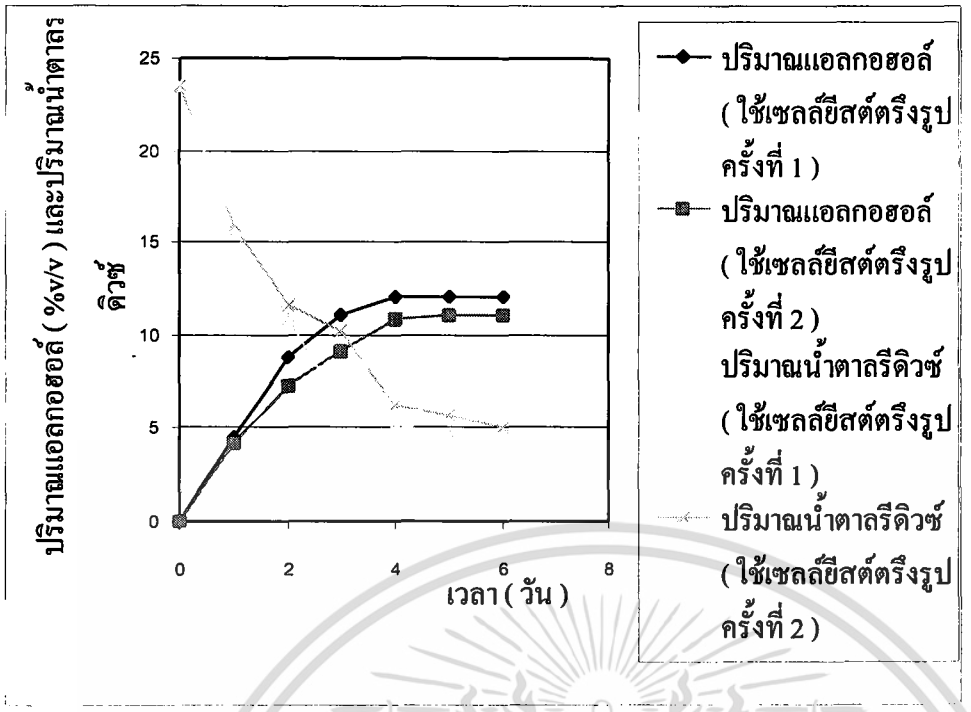
4.2.2 การหมักไวน์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยซ้ำ 2 ครั้ง

เมื่อหมักไวน์ด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยซ้ำ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบทางเคมีบางประการของไวน์ที่หมักได้จากการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่ใช้ซ้ำ 2 ครั้ง

เวลา (วัน)	การใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย ครั้งที่ 1				การใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย ครั้งที่ 2			
	ปริมาณแอลกอฮอล์ (% v/v)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้	ความเป็นกรด	ปริมาณแอลกอฮอล์ (% v/v)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้	ความเป็นกรด
0	0	23.50	22.00	0.35	0	23.50	22.00	0.35
1	4.50	15.67	13.00	0.39	4.22	15.83	13.00	0.51
2	8.77	10.83	8.00	0.39	7.26	11.57	9.00	0.51
3	11.10	6.40	6.00	0.42	9.17	10.15	6.00	0.51
4	12.00	5.17	5.00	0.43	10.80	6.17	5.00	0.55
5	12.00	4.67	4.00	0.47	11.00	5.66	5.00	0.55
6	12.00	2.16	4.00	0.47	11.00	5.00	5.00	0.55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไวน์ที่ได้จากการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่ใช้ซ้ำ 2 ครั้ง

จากตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4 จะเห็นว่าการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยครั้งที่ 2 จะมีอัตราการสร้างแอลกอฮอล์ต่ำกว่าการใช้ครั้งแรก และเมื่อสิ้นสุดการหมักแล้วจะมีปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำกว่าการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปครั้งแรก 1 % โดยปริมาตร และการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปครั้งที่ 2 นี้จะทำให้ไวน์มีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 องค์ประกอบทางเคมีของไวน์ที่ได้จากการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่เตรียมด้วยวิธีเขย่าให้อากาศตลอดเวลา

เวลา (วัน)	องค์ประกอบทางเคมี			
	ปริมาณแอลกอฮอล์ (% v/v)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้	ความเป็นกรด
0	0	23.50	22.00	0.31
1	4.50	15.67	13.00	0.39
2	8.77	10.83	8.00	0.39
3	11.10	6.40	6.00	0.43
4	12.00	5.17	5.00	0.43
5	12.00	4.67	4.00	0.47
6	12.00	2.17	4.00	0.47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18396

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 วิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย

เมื่อพิจารณาถึงอัตราการสร้างแอลกอฮอล์ทั้งในอาหาร MY broth และในน้ำอ้อยคั้นแล้ว พบว่า การเตรียมเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยโดยเขย่าให้อากาศตลอดเวลาจะมีประสิทธิภาพในการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ได้สูงกว่าแบบที่เตรียมโดยไม่เขย่า จะเห็นได้ชัดเจนเมื่อนำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปมาหมักในน้ำอ้อยคั้น โดยเฉพาะในช่วง 4 วันแรกของการหมัก แต่หลังจากวันที่ 5 ไปแล้วจะไม่แตกต่างกัน เนื่องจากการหมักได้สิ้นสุดลง กล่าวคือ จะสามารถหมักให้ได้แอลกอฮอล์ในระดับที่ต้องการโดยใช้ระยะเวลาสั้นกว่า ดังนั้นการเตรียมโดยการเขย่าให้อากาศจึงเหมาะสมกว่า

5.2 ประสิทธิภาพการหมักไวน์เมื่อใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อย

5.2.1 เมื่อหมักไวน์ด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่เตรียมโดยการเขย่าให้อากาศตลอดเวลา และการเตรียมโดยไม่เขย่า พบว่า อัตราการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ในกรณีที่ใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่เตรียมโดยวิธีแรกจะสูงกว่าวิธีที่สอง และพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณของแข็งที่ละลายได้จะลดลงในอัตราที่สูงกว่าด้วย ส่วนความเป็นกรดและพีเอชจะมีค่าใกล้เคียงกันมาก

5.2.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักไวน์เมื่อใช้ปริมาณของเซลยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยต่างกันที่ 5 และ 10% ของน้ำอ้อยที่ใช้หมัก พบว่า การใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยที่ 10% จะให้อัตราการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์สูงกว่าและได้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงกว่าการใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์ตรึงรูปเพียง 5%

5.2.3 เมื่อนำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยมาทำการหมักไวน์ซ้ำ 2 ครั้ง พบว่า ประสิทธิภาพการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์เมื่อใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยครั้งที่ 2 จะลดลง และเมื่อสิ้นสุดการหมักจะได้แอลกอฮอล์ต่ำกว่าการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยครั้งแรก 1 % v/v

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดลองเตรียมเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นอ้อยนั้น การควบคุมขนาดของชิ้นอ้อยที่ใช้เป็นพาหะให้เซลล์ยีสต์ยึดเกาะทำได้ค่อนข้างยากซึ่งจะมีผลต่อปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ยึดเกาะ จึงอาจมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

เอกสารอ้างอิง

ประดิษฐ์ ครุวัณณา. 2534. การพัฒนาไวน์. อาหาร. 21(2) : 136-137

ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม และ วราวุฒิ ครูส่ง .2536 .การหมักไวน์แบบครั้งคราวและแบบต่อเนื่องโดยใช้ยีสต์ตรึงรูป . วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง .1(1):40-46

ภาวิณี คณาสวัสดิ์. 2531. การตรึงเอนไซม์และเซล. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 249หน้า

Y.Kourkoutas , M.Komaitis, A.A.Koutinas, and M.Kanellaki. 2001.Wine production Using Yeast Immobilized on Apple Pieces at Low and Room Temperatures.J.Agric.Food Chem.49,1417-1425

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

1. การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ (A.OA.C 1980)

1.1 ล้างชุดเครื่องกลั่นแอลกอฮอล์ด้วยน้ำกลั่น

1.2 ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 50มิลลิลิตร ใส่ลงในเครื่องกลั่น หาจุดเดือดของน้ำกลั่น บันทึกอุณหภูมิ

1.3 นำจุดเดือดของน้ำกลั่นที่หาได้ไปตั้งค่าในแผ่นสเกลมาตรฐานที่ใช้สำหรับอ่านค่าแอลกอฮอล์

1.4 ล้างชุดเครื่องกลั่นแอลกอฮอล์ ด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด

1.5 ตวงตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำมาหาจุดเดือดจนได้อุณหภูมิคงที่ บันทึกอุณหภูมิ

1.6 หาค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ โดยเปรียบเทียบจุดเดือดของตัวอย่าง กับจุดเดือดของน้ำกลั่น ด้วยแผ่นสเกลมาตรฐาน

1.7 ก่อนใช้เครื่องทุกครั้ง ต้องคาลิเบตชุดกลั่นด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ก่อน

2. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Lane and Eyon (A.O.A.C,1980)

สารเคมี

ก. Fehling ' s A Solution

เตรียมโดยละลาย $Cuso_4 + 5H_2O$ 34.639 กรัมด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask

ข. Fehling ' s B Solution

เตรียมโดยละลาย Sodium potassium tartrate 173 กรัม และ NaOH 50 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask

ค. methylene blue 1 %

ง. Standard glucose 0.5 %

วิธีการ

1. การ Standardization

นำ Fehling ' s A Solution ผสมกับ Fehling 's B Solution ในปริมาตรที่เท่ากัน เรียกว่า Soxhlet 's reagent

ปิเปต Soxhlet ' s reagent 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติม glass bead ลงไป 2-3 เม็ดเพื่อลดการ bumping แล้วนำมาไทเทรตกับสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.5 % ในขณะเดือด เขย่าขวดรูปชมพู่ตลอดเวลา จนกระทั่งสีน้ำเงินของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Soxhlet' s reagent เริ่มจางลง ให้เติมสารละลาย methylene blue 1 % ลงไป 4 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ ไทเทรตต่อไปจนกระทั่งสีน้ำเงินหมดไปหรือเกิดตะกอนสีแดงอิฐ

2. การเตรียมตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ ถ้าตัวอย่างมีน้ำตาลรีดิวซ์สูงจะต้องนำมาทำให้เจือจาง จนมีน้ำตาลรีดิวซ์ไม่เกิน 0.5 % เมื่อเตรียมตัวอย่างได้แล้ว ให้ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี Soxhlet' s reagent 10 มิลลิลิตร นำไปไทเทรตด้วยวิธีเดียวกับข้อ 1 ปริมาตรของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ใช้จะนำมาคำนวณตามสูตร

$$\% \text{ น้ำตาลรีดิวซ์ (g/100ml)} = \frac{(A-B)(0.005)(100)}{V}$$

เมื่อ A คือ ปริมาตรของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.5 % ที่ใช้ในการไทเทรต กับ Soxhlet ' s reagent จากการ Standardization (ml)

B คือ ปริมาตรของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.5 % ที่ใช้ในการไทเทรตกับ ตัวอย่าง (ml)

V คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่นำมาไทเทรต

3. การหาความเป็นกรด

สารเคมี

NaOH 0.1 %

Phenolphthalene 1 %

วิธีการ

ปิเปตตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ไล่เอา CO_2ออกแล้ว 45 มิลลิลิตร แล้วหยด Phenolphthalene 1 % 3-5 หยด เป็นอินดิเคเตอร์แล้วไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N เมื่อถึงจุดยุติ จะมีสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ แล้วนำมาคำนวณหาค่าความเป็นกรดในรูปของกรดทาร์ทาริก โดยมีสูตรดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นกรด (g/100ml) = $\frac{(v)(N)(MW)(100)}{(1000)(U)}$

เมื่อ V คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน NaOH 0.1 N ที่ใช้ในการไทเทรตจนถึงจุดยุติ (ml)

N คือ Normality ของสารละลายมาตรฐาน NaOH

U คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่นำมาไทเทรต (ml)

MW คือ น้ำหนักโมเลกุลของกรดทาร์ทาริก = 75

4.สูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.MY broth

Yeast axtract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2.MY agar

Yeast axtract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้