# บทที่ 2
# เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 น้ำหมักหรือน้ำหมักชีวภาพ

น้ำหมักหรือน้ำหมักชีวภาพมีบทบาทในการเป็นทางเลือกสำหรับการส่งเสริมสุขภาพหลายด้าน น้ำหมักชีวภาพโดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือน้ำหมักชีวภาพที่ใช้สำหรับพืชและสัตว์ และน้ำหมักชีวภาพเพื่อการบริโภค ทั้งสองประเภทมีความแตกต่างคือ ประการแรกเป็นความความแตกต่างในเรื่องวัตถุดิบและกระบวนการผลิต เช่น น้ำหมักชีวภาพที่ใช้สำหรับพืชและสัตว์ มักใช้วัตถุดิบที่มาจากขยะ, สิ่งเหลือใช้ทั้งจากพืชและสัตว์ หรือบางสูตรอาจใช้พืช ผัก และผลไม้ ตามวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ โดยกระบวนการผลิตจะทำอย่างง่ายเพื่อใช้ในภาคเกษตร ส่วนน้ำหมักชีวภาพเพื่อการบริโภค จะต้องคัดเลือกวัตถุดิบ เช่น พืช ผัก และผลไม้ โดยวัตถุดิบแต่ละชนิดจะมีกระบวนการคัดเลือกตามคุณสมบัติเพื่อการบริโภคทั้งด้านโภชนาการ และสรรพคุณของพืชนั้นๆ ที่สำคัญคือกระบวนการผลิตน้ำหมักชีวภาพเพื่อการบริโภคจะต้องคำนึงถึงความปลอดภัยเป็นสำคัญ มีการควบคุมความปลอดภัยตั้งแต่ขั้นตอนเริ่มต้นจนขั้นตอนสุดท้ายของการผลิตโดยไม่ให้มีสิ่งปนเปื้อนที่เป็นอันตรายทั้งจากวัตถุดิบหรือที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก และต้องผลิตให้ได้ตามมาตรฐานน้ำหมักสำหรับการบริโภค (ชัยวัฒน์, 2553)

น้ำหมักชีวภาพเพื่อการบริโภคที่ดีต้องมีคุณสมบัติ คือ เมื่อมีการหมักจะต้องมีการควบคุมคุณภาพให้ได้น้ำหมักที่ดีคือ ไม่พบสิ่งปลอมปน เอทานอลต้องไม่เกินร้อยละ 15 เมทานอลต้องไม่เกิน 420 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะต้องเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.2089-2544) และมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน การควบคุมอีกเรื่องที่สำคัญซึ่งเกิดขึ้นในการหมัก คือ กรด ซึ่งโดยทั่วไปกรดที่เกิดในกระบวนการหมักถือเป็นการถนอมอาหารไปในตัว ความเป็นกรดของน้ำหมักเพื่อการบริโภคต้องมีค่าความเป็นกรดด่าง หรือค่าพีเอช (pH) ต่ำกว่า 4.3 จึงจะควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ (เจริญ, 2549)

ประโยชน์ของน้ำหมักชีวภาพเพื่อการบริโภคคือได้จากคุณค่าสารสำคัญตามชนิดของพืชผักผลไม้ที่นำมาใช้หมัก เพราะการหมักเป็นการแปรรูปที่เป็นการสกัดสารสำคัญในพืชผักผลไม้ ซึ่งในประเทศไทยเรามีพืชวัตถุดิบมากมายที่นำมาใช้ เช่น ลูกยอ มะขามป้อม ผลไม้ชนิดต่าง ๆ ตามฤดูกาล (ชัยวัฒน์, 2553)

ดังนั้น น้ำหมักชีวภาพที่ดีก็ต้องมีสารสำคัญของพืชผักผลไม้ในระดับที่เหมาะสม ซึ่งในการหมักจะมีสารสำคัญออกมา สารสำคัญนี้แหละที่จะเป็นส่วนหนึ่งในการเสริม ดังนั้นในวัตถุดิบที่เราหมักจะใช้เวลาแตกต่างกันที่จะสกัดสารสำคัญออกมา สำหรับน้ำหมักจะมีรสเปรี้ยวเพราะเกิดจากจุลินทรีย์กลุ่มที่สร้างกรดอยู่ในกระบวนการหมัก ส่วนภาชนะบรรจุ แสง อุณหภูมิ และอากาศ ก็เป็นปัจจัยที่ทำให้คุณสมบัติของน้ำหมักไม่คงตัว ดังนั้นการควบคุมคุณภาพของน้ำหมักเพื่อการบริโภคจึงมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องเหล่านี้ด้วย (ไชยวัฒน์, 2553)

## 2.2 ข้าวก่ำกล้องงอก

### 2.2.1 ข้าว

ข้าว (*Oryza Sativa.* L.) เป็นกลุ่มพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งที่เป็นอาหารหลักของคนกว่าครึ่งโลก เมล็ดข้าวประกอบด้วยส่วนเปลือกที่ห่อหุ้มอยู่ภายนอก ถัดเข้าไปจะเป็นชั้นรำที่เป็นเยื่อบางๆ ห่อหุ้มเมล็ดข้าวขาวและจมูกข้าวไว้ ตัวเมล็ดข้าวขาวที่เราบริโภคกัน ประกอบขึ้นจากโมเลกุลของแป้งที่อัดกันแน่นเป็นอนุภาคเล็กๆนับล้านล้านอนุภาค และส่วนของจมูกข้าวจะอยู่ปลายเมล็ด เป็นส่วนของต้นอ่อนที่จะเจริญงอกงามเป็นต้นข้าวต่อไป ในจมูกข้าวหรือคัพภะของข้าวนี้ เป็นแหล่งของเอนไซม์ วิตามิน และเกลือแร่ที่เกี่ยวข้องกับการงอกของเมล็ด (Saif *et al.*, 2004)

1) การจำแนกชนิดของข้าวตามลักษณะส่วนประกอบทางเคมี

1.1 ข้าวเหนียว (Glutinous rice หรือ Waxy rice หรือ Sticky rice) เมล็ดข้าวสารจะมีลักษณะขุ่น มีอะไมโลสเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 0.2 และมีอะไมโลเพคตินเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งทำให้ข้าวเมื่อหุงสุกจะนุ่มจับตัวติดเหนียวเป็นก้อนได้และมีลักษณะใส

1.2 ข้าวเจ้า (Non-glutinous rice) เมล็ดข้าวสารจะมีสีขาวใส มีปริมาณอะไมโลสเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 20-34 ที่เหลือเป็นอะไมโลเพคติน ซึ่งมีผลให้ข้าวสารที่นำไปหุงเป็นข้าวสุกจะมีสีขาวขุ่น มีลักษณะร่วนไม่เกาะติดกัน อัตราส่วนของส่วนประกอบทางเคมีทั้งสองชนิดนี้ เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ข้าวมีคุณสมบัติการหุงต้มที่ต่างกัน คือ ข้าวที่มีอะไมโลสสูง จะดูดน้ำและขยายปริมาตรในระหว่างการหุงต้มได้มากกว่าข้าวอะไมโลสต่ำ ทำให้ข้าวสุกและร่วน ส่วนข้าวที่มีอะไมโลสต่ำ จะดูดน้ำและขยายตัวได้น้อยกว่าข้าวที่มี อะไมโลสสูง ข้าวจะเหนียวและนุ่มกว่า

2) องค์ประกอบของเมล็ดข้าว

เมล็ดข้าว (rice fruit, rice grain, rice seed) เป็นผลชนิด caryopsis เนื่องจากส่วนที่เป็นเมล็ดเดี่ยว (single seed) ติดแน่นอยู่กับผนังของรังไข่หรือเยื่อหุ้มผล (pericarp) เมล็ดข้าวประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่ๆ (อรอนงค์, 2547) คือ

2.1 ส่วนที่ห่อหุ้ม เรียกว่าแกลบ (hull หรือ husk) ประกอบด้วย เปลือกใหญ่ (lemma) เปลือกเล็ก (palea) หาง (awn) ขั้วเมล็ด (rachilla) และกลีบรองเมล็ด (sterile lemmas)

2.2 ข้าวกล้อง หรือเมล็ดข้าวที่เอาเปลือกออกแล้ว (caryopsis หรือ brown rice) แต่จะมีเยื่อหุ้มผล (pericarp)ที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ เช่น cellulose จึงต้องทำการแยกส่วนนี้ออกเสมอ ที่เยื่อหุ้มผลจะมีสารอาหารประเภทวิตามิน แร่ธาตุอยู่มาก ซึ่งโดยทั่วไปเยื่อหุ้มผลประกอบไปด้วยเส้นใย (crude fiber) ร้อยละ 31-50 เถ้า (ash) ร้อยละ 13-29 คาร์โบไฮเดรทร้อยละ 24-39 โปรตีนร้อยละ 3 และไขมันร้อยละ 1 คาร์โบไฮเดรทส่วนใหญ่เป็น cellulose และ hemicellulose เป็นส่วนน้อย สำหรับส่วนที่เป็น hemicellulose ข้าวกล้องหรือเนื้อเมล็ดจะเป็นคาร์โบไฮเดรต คือมีเนื้อแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ในเมล็ดข้าวยังมีน้ำ โปรตีน ไขมันและวิตามินอยู่ด้วย

**2.2.2 ข้าวก่ำ**

ข้าวก่ำหรือข้าวเหนียวดำ เป็นข้าวพื้นบ้านของไทย ลักษณะเด่นคือ มีสีม่วงดำทั้งลำต้นและเมล็ด ส่วนใหญ่มักนำมาบริโภคในรูปขนมหรือของหวาน โดยมีความเชื่อว่ามีคุณสมบัติทางยา จากภูมิปัญญาของชาวล้านนาใช้ประโยชน์จากข้าวก่ำในหลายๆ ด้าน เช่น การทำนาข้าวสมัยก่อนจะปลูกข้าวก่ำไว้ที่หัวไร่ (ตรงช่องปลายน้ำเข้านา) เพราะเชื่อว่าจะช่วยป้องกันโรคและแมลงที่จะมารบกวนต้นข้าวในนาได้ ส่วนคุณสมบัติทางยาได้ใช้เพื่อป้องกันการตกเลือดในสตรีหลังคลอด นำมาใช้รักษาอาการท้องร่วง โรคผิวหนังได้อีกด้วย ในปัจจุบันประเทศญี่ปุ่นได้มีการสกัดเอาสารสำคัญในน้ำมันรำข้าวคือ แกมมา-โอรีซานอล ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และนำมาผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพ เครื่องสำอางในการรักษาสุขภาพชะลอความแก่แล้วนำกลับมาจำหน่ายในราคาที่สูงให้กับคนไทย (ดำเนินและคณะ, 2543) ในปีพุทธศักราช 2539 ดร. ดำเนิน กาละดี หัวหน้าหน่วยวิจัยข้าวก่ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้รับอนุมัติจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ให้จัดตั้งเป็นหน่วยวิจัยข้าวก่ำ ภายใต้การดูแลของสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เพื่อรวบรวมและอนุรักษ์พันธุกรรมข้าวก่ำพื้นเมืองของไทย โดยปฏิบัติงานด้านการรวบรวมและวิจัยในเชิงวิทยาศาสตร์ คณะผู้วิจัยได้รวบรวมพันธุ์ข้าวก่ำพื้นเมืองจากแหล่งปลูกข้าวต่างๆ ทั่วประเทศ จำนวน 42 พันธุ์ จากการดำเนินงานปรับปรุงพันธุ์ในอดีตจนถึงปัจจุบัน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ให้การยอมรับและขึ้นทะเบียนตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518 คือ ข้าวก่ำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด และพันธุ์ก่ำอมก๋อย ซึ่งพบว่าข้าวก่ำสายพันธุ์ที่พัฒนาขึ้นประกอบด้วยแกมมา-โอรีซานอลสูงกว่าข้าวขาวถึง 2–3 เท่า และยังพบสารแอนโทไซยานินสูงกว่าข้าวก่ำสายพันธุ์ปกติ 8–16 เท่า คุณค่าทางโภชนาการของข้าวก่ำยังประกอบไปด้วยไขมันร้อยละ 4.6 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 25.5 เส้นใยอาหารร้อยละ 16.6 วิตามินเอ วิตามินบีหนึ่ง วิตามินบีสอง แคลเซียม และธาตุเหล็ก อยู่ในปริมาณ 0.38, 36.67, 17.1, 3.25 และ 15.33 มิลลิกรัมต่อข้าวก่ำ 100 กรัม ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่ามีโปรตีนและวิตามินที่มีประโยชน์ต่อร่างกายในระดับสูงกว่าข้าวทั่วไป งานวิจัยยังพบอีกว่าเมื่อแกมมา-โอรีซานอลได้ทำงานร่วมกับแอนโทไซยานินจะมีสมบัติที่โดดเด่น ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารชะลอความแก่ เพิ่มภูมิคุ้มกัน ลดระดับคอเลสเตอรอล ป้องกันการเกิดมะเร็ง โรคอ้วน ความดัน โรคหัวใจ และความจำเสื่อม จึงเหมาะแก่

ผู้บริโภคทุกเพศ ทุกวัย โดยเฉพาะในผู้สูงอายุ รวมทั้งผู้ที่มักได้รับการปนเปื้อนจากอาหารทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง และคนที่งานที่ต้องเผชิญกับปัญหาความเครียด จึงเหมาะที่จะบริโภคข้าวก่ำเพื่อเป็นอาหารเสริมสุขภาพ

**2.2.3 ข้าวกล้องงอก**

ข้าวกล้อง (Brown rice) คือ เมล็ดข้าวที่กะเทาะออกเฉพาะเปลือกแต่ยังไม่ได้ขัดขาว (ข้าวซ้อมมือ) เมล็ดข้าวยังมีจมูกข้าว (คัพภะ) อยู่บริเวณโคนเมล็ดด้านเปลือกใหญ่ (ด้านท้องเมล็ด) และมีเยื่อรำติดอยู่ ซึ่งเป็นส่วนที่มีคุณค่าทางอาหารและมีประโยชน์ต่อร่างกาย ในส่วนคัพภะประกอบด้วยโปรตีน วิตามิน ไขมัน แร่ธาตุ และกรดอะมิโนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย ข้าวกล้องจะมีสีเดียวกับเยื่อหุ้มผลและเยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) ซึ่งเป็นส่วนที่มีเส้นใยอาหารสูง (dietary fiber) โดยทั่วไปข้าวกล้องจะมีโปรตีนอยู่ประมาณร้อยละ 7-12 (ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์) และถ้าขัดสีข้าวกล้องจนมีสีขาว จะทำให้โปรตีนสูญหายไปประมาณร้อยละ 30

ข้าวกล้องงอก (germinated brown rice) ถือเป็นนวัตกรรมหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากข้าวกล้องงอกเป็นการนำข้าวกล้องมาผ่านกระบวนการงอก ซึ่งโดยปกติแล้วในตัวข้าวกล้องเองประกอบด้วยสารอาหารหลายชนิด เช่น ใยอาหาร กรดไฟติก (phytic acid) วิตามินซี วิตามินอี และกรดแกมมา-อะมิโนบิวทิริก (gamma- aminobutyric acid, GABA) ซึ่งมีบทบาทในการช่วยป้องกันโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง เบาหวาน และช่วยในการควบคุมน้ำหนักตัว เป็นต้น เมื่อนำข้าวกล้องมาแช่น้ำ ในระหว่างกระบวนการงอกของข้าว สารอาหารในข้าวกล้องจะเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมาก โดยสารอาหารหลักที่เพิ่มขึ้นในข้าวกล้องงอก คือ เส้นใยอาหาร อินโนซิตอล กรดเฟอร์รูลิก กรดแกมมา- อะมิโนบิวทิริก โทโคไตรอีนอล แกมมา-โอรีซานอล แคลเซียม โพแทสเซียม และสังกะสี โดยมีปริมาณของ GABA เพิ่มขึ้น 10 เท่า เส้นใยอาหาร ไนอาซิน ไลซีน และวิตามินอีเพิ่มขึ้น 4 เท่า ส่วนวิตามินบี 1 และบี 6 เพิ่มขึ้น 3 เท่า (Kayahara and Tsukahara, 2000) ซึ่งนอกจากจะได้ประโยชน์จากการที่มีปริมาณสารอาหารที่สูงขึ้นแล้ว ยังทำให้ข้าวกล้องงอกที่หุงสุกมีเนื้อสัมผัสที่อ่อนนุ่ม รับประทานได้ง่ายกว่าข้าวกล้องธรรมดาอีกด้วย จึงง่ายแก่การหุงรับประทานได้โดยไม่ต้องผสมกับข้าวขาวตามความนิยมของผู้บริโภค

ข้าวเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีการเจริญเติบโตจะมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี การเปลี่ยนแปลงจะเริ่มขึ้นเมื่อน้ำได้แทรกเข้าไปในเมล็ดข้าว โดยจะกระตุ้นให้เอนไซม์ภายในเมล็ดข้าวเกิดการทำงาน เมื่อเมล็ดข้าวเริ่มงอก (malting) สารอาหารที่ถูกเก็บไว้ในเมล็ดข้าวก็จะถูกย่อยสลายไปตามกระบวนการทางชีวเคมีจนเกิดเป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลเล็กลง (oligosaccharide) และน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) นอกจากนั้นโปรตีนภายในเมล็ดข้าวก็จะถูกย่อยให้เกิดเป็นกรดอะมิโน และเปปไทด์ รวมทั้งยังพบการการสะสมสารเคมีสำคัญต่างๆ เช่น แกมมา-โอรีซานอล (gamma -oryzanol) โทโคฟี

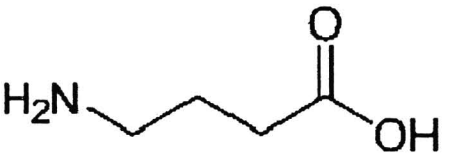
รอล (tocopherol) โทโคไตรอีนอล (tocotrienol) และโดยเฉพาะกรดแกมมา-อะมิโนบิวทิริก (gamma-aminobutyric acid) (Ito and Ishikawa, 2004)

**2.2.4 สารออกฤทธิ์ที่สำคัญในข้าวก่ำกล้อง**

1) กรดแกมมา- อะมิโนบิวทิริก (Gamma- aminobutyric acid, GABA)

GABA คือ อนุพันธ์ของกรดอะมิโนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein amino acid) (Kinnersley and Turano, 2000; Zhang *et al.*, 2006) มีทั้งประจุบวกและลบในโมเลกุล (Zwitterionic) สมบัติทางกายภาพของ GABA ได้แก่ มีจุดหลอมเหลว 203 องศาเซลเซียส ความสามารถในการละลายน้ำเท่ากับ $1.3 \times 10^6$ มิลลิกรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ค่าคงที่การแตกตัว (pKa dissociation constant) เท่ากับ 4.03 และ 10.56 (Shelp *et al.*, 1999) ถูกผลิตขึ้นโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซิเลส (GAD;EC 4.1.1.15) เปลี่ยนกรดกลูตามิก (Glu) ไปเป็น GABA (Shelp *et al.*, 1999; Zhang, 2006) เป็นกรดอะมิโนที่สำคัญในสิ่งมีชีวิตพวกโพรคาริโอต สำหรับ GABA ในมนุษย์แสดงพฤติกรรมเป็นจุดประสานประสาทแบบยับยั้ง (inhibitory synapses) ช่วยให้สมองเกิดการผ่อนคลายและนอนหลับสบาย ส่วน GABA ในสัตว์มีความเกี่ยวข้องในระบบประสาทและกล้ามเนื้อ (neuromuscular system) ซึ่งทำให้สัตว์สามารถรอดพ้นความเครียดจากสภาวะแวดล้อมได้และ GABA ในพืชมีผลต่อกลไกในการตอบสนองทางเคมีเพื่อบรรเทาความเครียด (Kinnersley and Turano, 2000) โดยทั่วไปปริมาณ GABA ในพืชมีอยู่ในระดับต่ำ 0.03-2.00 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ปริมาณจะเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสิ่งกระตุ้น เช่น ภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (hypoxia) ทำให้ความเข้มข้นของ GABA ในข้าวงอกเพิ่มขึ้นถึง 8 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสด (Shelp *et al.*, 1999) นอกจากนั้นอาหารเสริม GABA ยังถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการลดความดันโลหิต (Robers *et al.*, 1993; Abe *et al.*, 1995; Aoki *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2003; Hayakawa *et al.*, 2004) ช่วยรักษาโรคนอนไม่หลับ (sleeplessness disorder) โรคซึมเศร้า (depression disorder) โรคเครียด (autonomic disorder) (Okada *et al.*, 2000) และอาการติดสุราเรื้อรัง (chronic alcohol-related symptoms) (Oh *et al.*, 2003) ดังนั้นจึงได้มีการนำ GABA มาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดเพื่อให้มีผลป้องกันโรคดังกล่าว เช่น ยอดชาเสริม GABA โดยการบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นการบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจน 1 ชั่วโมง และบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนอีกครั้งเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เป็นต้น(Sawai *et al.*, 2001)

อีกบทบาทหนึ่งของ GABA ที่น่าสนใจคือ ช่วยในการลดการสะสมของไขมันภายในร่างกาย โดย GABA กระตุ้นให้มีการหลั่งฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตออกมา (human growth hormone, HGH) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเผาผลาญไขมันเพื่อให้พลังงานและสร้างกล้ามเนื้อ ร่างกายจะสร้างฮอร์โมนชนิดนี้ลดลงเมื่ออายุมากขึ้น ทำให้แก่ มีไขมันสะสมตามเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วยเหตุนี้อาหารเสริมหลายชนิดทั้งที่เป็นสูตรสำหรับผู้สูงวัย และสูตรสำหรับนักกีฬา จึงเติม GABA ลงไปด้วย เพื่อให้ผู้บริโภคสามารถควบคุมน้ำหนัก มีสุขภาพที่ดี สามารถพักผ่อนและนอนหลับได้เต็มที่ (Kayahara และ Tsukahara, 2000)

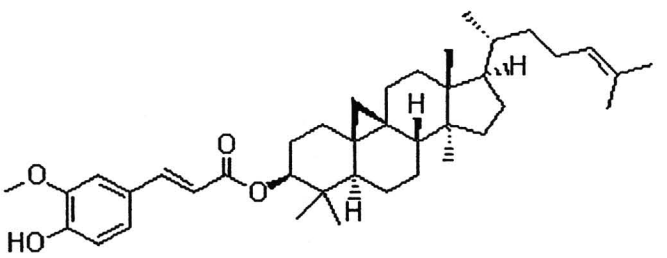



**รูป 2.1** สูตรโครงสร้างของกรดแกมมา-แอมิโนบิวทิริก

ที่มา: Shelp, Bown and Mclean (1999)

2) แกมมา-โอรีซานอล (Gamma -oryzanol)

แกมมา-โอรีซานอล มีลักษณะเป็นผงสีขาวหรือสีขาวออกเหลือง ไม่มีกลิ่น สามารถละลายได้ในขี้ผึ้ง น้ำมัน และสารละลายคลอโรฟอร์ม เช่น อีเทอร์ เฮปเทน เป็นต้น แต่ไม่ละลายน้ำ (Scavariello and Arellano, 1998) เป็นสารประกอบที่พบมากในรำข้าว มีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ ลดคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ เพิ่มระดับของ high density lipoprotein (HDL) ในเลือด กระตุ้นการทำงานของต่อมใต้สมอง ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร ยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือด ลดน้ำตาลในเลือด และเพิ่มระดับของฮอร์โมนอินซูลินในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน นอกจากนั้นแล้ว แกมมา-โอรีซานอล ยังทำหน้าที่ในการต้านการหืนในรำข้าว ซึ่งแกมมา-โอรีซานอลมีคุณสมบัติในการต้านการหืนได้ดีกว่าวิตามินอีถึงสิบเท่า (พันทิพา และคณะ, 2549)



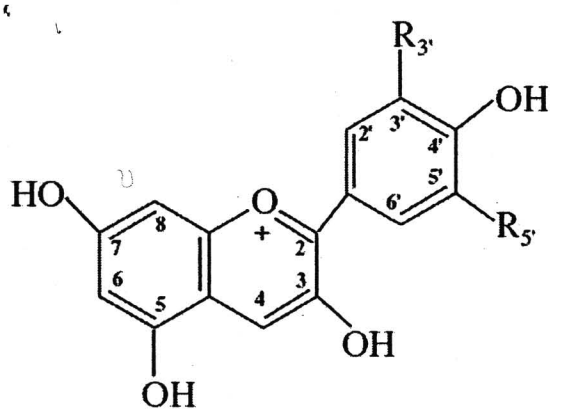

**รูป 2.2** สูตรโครงสร้างของแกมมา-โอรีซานอล

ที่มา: Lioy, Siebenmorgen and Beers (2000)

3) แอนโทไซยานิน (Anthocyanin)

แอนโทไซยานินเป็นสารที่มีสีในช่วงสีแดงถึงสีน้ำเงิน พบในผัก ผลไม้ และดอกไม้หลายชนิด เช่น ดอกอัญชัน ดอกกระเจี๊ยบแดง ผลองุ่น และผลสตรอเบอรี เป็นต้น แอนโทไซยานินเป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) มีโครงสร้างหลักซึ่งเป็นอนุพันธ์โพลีไฮดรอกซีของสารฟลาวิเลียม หรือ 2-phenylbenzopyrylium โมเลกุลประกอบด้วยแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin)

หรือเรียกว่า อะไกลโคน (aglycone) เชื่อมต่อกับน้ำตาลด้วยพันธะเบต้า-ไกลโคไซด์ (β-glycoside) (Markakis, 1982) ในธรรมชาติจะพบแอนโทไซยานิดินมากกว่า 15 ชนิดเรียกชื่อแตกต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล และหมู่เมทอกซิล (methoxyl, $OCH_3$) สารประกอบแอนโทไซยานิดินที่พบมาก และอยู่ในรูปของออกโซเนียมไอออน คือ ที่ออกซิเจนอะตอมมีประจุบวก ได้แก่ ไซยานิดิน (cyanidin) พีลาร์โกนิดิน (pelargonidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) และ พีโอนิดิน (peonidin) แอนโทไซยานิดินในผักและผลไม้ต่างๆ จะมีอัตราส่วนและปริมาณที่แตกต่างกันไปเนื่องจากแอนโทไซยานิดินมักจะอยู่ในรูปอิสระในเซลล์ของพืช ส่งผลต่อความคงตัวของสีเมื่อเกิดปฏิกิริยาต่างๆ (นิธิยา, 2545)




**รูป 2.3** สูตรโครงสร้างของแอนโทไซยานิน

ที่มา: Wilska-Jeszka (2007)

## 2.3 การย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์

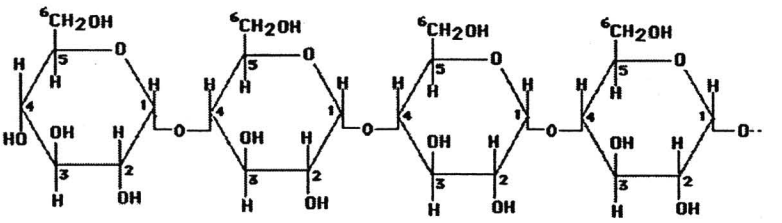
การย่อยสลายแป้งไปเป็นน้ำตาลที่สามารถหมักได้ (fermentable sugars) ตามด้วยการหมักด้วยยีสต์ ปกติยีสต์ไม่สามารถใช้แป้งได้โดยตรงในการหมักเพื่อให้เกิดแอลกอฮอล์ ดังนั้นแป้งต้องถูกย่อยให้เป็นน้ำตาล โดยการใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ แอลฟาแอมิเลส (alpha-amylase; α-amylase) และกลูโคแอมิเลส (glucoamylase) (Sheorain *et al.*, 2000)

### 2.2.1 ลักษณะโครงสร้างภายในโมเลกุลของแป้ง

แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบด้วย anhydroglucose unit เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ glucosidic linkage ประกอบด้วยโพลิเมอร์พื้นฐาน 2 ชนิด คือ อะไมโลส และอะไมโลเพคติน โดยโมเลกุลของอะไมโลสเป็นโพลิเมอร์เชิงเส้น ที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณไม่เกิน 6,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 กลูโคซิดิก ดังรูป 2.4 จำนวนหน่วยของกลูโคสจะเรียกว่า DP (degree of

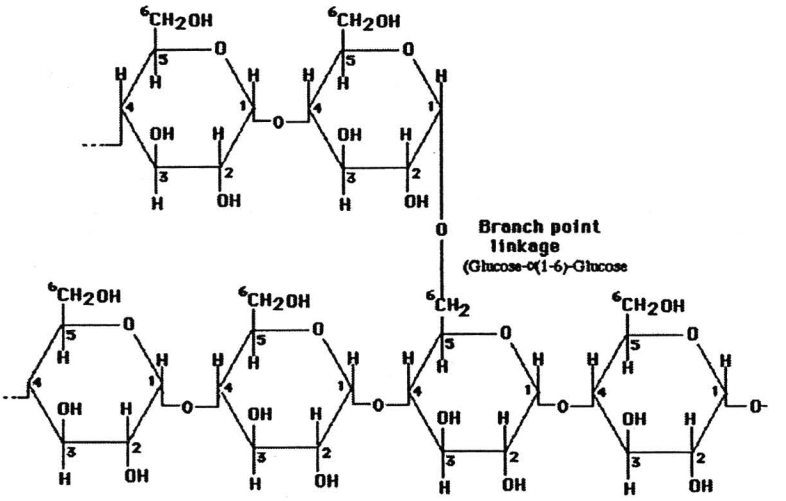
polymerization) ซึ่ง DP จะแปรผันตามแหล่งของอะไมโลส เช่น อะไมโลสจากแป้งมันฝรั่งหรือแป้งมันสำปะหลัง จะมี DP 1,000 – 6,000 ในขณะที่อะไมโลสจากแป้งข้าวโพดหรือแป้งสาลีจะมี DP 200 – 1,200 คุณสมบัติของอะไมโลสมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี ขณะต้มมีลักษณะขุ่น ความหนืดต่ำ เมื่ออุณหภูมิลดลงเกิดการคืนตัวได้มาก (Chaplin, 2001; Van der Maarel *et al.*, 2002)

ส่วนอะไมโลเพคตินเป็นโพลิเมอร์เชิงกิ่งที่ประกอบด้วยโพลิเมอร์เชิงเส้นของกลูโคส 10 – 60 หน่วยที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 กลูโคซิดิก และโพลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส 15 – 45 หน่วยที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1,6 กลูโคซิดิก ดังรูป 2.5 ในการจับกันเป็นกลุ่มของอะไมโลเพคตินเป็นทำให้เกิดเป็นเกลียวคู่ (Double helix) การเกิดเกลียวคู่ของอะไมโลเพคตินต้องใช้พันธะไฮโดรเจน และแรงแวนเดอร์-วาลส์ในการเชื่อมต่อกัน กิ่งของอะไมโลเพคตินภายในเมล็ดแป้งสามารถเกิดเป็นผลึกได้ ทั้งกิ่งที่อยู่ใกล้กันในกลุ่มเดียวกันหรือเกิดขึ้นระหว่างกลุ่มที่ใกล้เคียงกันทำให้มีคุณสมบัติ คือ ขณะต้มในน้ำจะใสและมีความหนืดสูง เมื่ออุณหภูมิลดลงจะเกิดการคืนตัวน้อย เพราะโมเลกุลระเกะระกะไม่เป็นระเบียบ จึงรวมตัวกันยาก (Chaplin, 2001; Van der Maarel *et al.*, 2002)



**รูป 2.4** โครงสร้างของอะไมโลส

**ที่มา**: Chaplin (2001)




รูป 2.5 โครงสร้างของอะไมโลเพคติน

ที่มา: Chaplin (2001)

**2.3.2 การย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล**

ในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีการทางเคมีโดยใช้กรดเจือจางและความร้อนกับวิธีการสลายแป้งโดยใช้เอนไซม์

1) การย่อยแป้งโดยวิธีการทางเคมี วิธีการนี้ใช้กรดเจือจางและความร้อนสูง ไม่เป็นที่นิยม เพราะผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยดังกล่าวจะไม่สะอาดและไม่บริสุทธิ์ หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางโมเลกุล เช่น ในการย่อยแป้งให้เป็นกลูโคส (เพื่อนำกลูโคสมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์) โดยความร้อนมักจะทำให้เกิดการรวมตัวใหม่ของกลูโคสเป็น dimer หรือ polymer ซึ่งทนความร้อนมากขึ้น ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวนี้จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (ศิริลักษณ์, 2544)

2) การสลายแป้งโดยใช้เอนไซม์ วิธีนี้เป็นวิธีที่ดีกว่าและนิยมใช้อุตสาหกรรม เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายโดยวิธีนี้มีความสะอาดและบริสุทธิ์และให้ผลิตผลที่สูงกว่ามาก นอกจากนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรง คือ ไม่ต้องการความร้อนและกรดด่างมากเท่ากับการใช้วิธีการทางเคมี กระบวนการสลายแป้งโดยเอนไซม์นี้เกิดได้ 2 ขั้นตอน คือ

2.1 การทำให้เหลว (Liquefaction) ซึ่งเป็นขั้นตอนการย่อยครั้งแรกโดยการใช้เอนไซม์แอลฟาแอมิเลสในการย่อยแป้งเพื่อจะผลิตน้ำตาลกลูโคสนั้น จะต้องมีขั้นตอนที่ทำน้ำแป้งสุกแล้วเป็นของเหลวที่มีความหนืดต่ำก่อนที่จะนำไปทำการผลิตต่อไป ซึ่งถือว่าเป็นการย่อยครั้งแรกของกระบวนการย่อยสลายแป้ง โดยจะทำการย่อยภายในโมเลกุลแป้ง (endo-acting enzyme) โดยเอนไซม์จะ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตัดพันธะ α-1,4 ระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสที่จับอยู่เท่านั้น ไม่สามารถตัดพันธะ α-1,6 ได้ ลักษณะการทำงานเป็นการสุ่มตัดภายใน เมื่อย่อยแล้วจะได้เป็นเดกซ์ทริน (dextrin) และโอลิโกแซค-คาร์ไรด์ (oligosaccharide) (Elfriede, 1998)

2.2 การทำให้หวาน (Saccharification) เป็นการย่อยครั้งสุดท้าย โดยเอนไซม์จะย่อยทั้งพันธะ α-1,4 และ α-1,6 glucosidic ซึ่งอัตราเร็วในการย่อยนั้นเอนไซม์สามารถย่อยพันธะ α-1,4 ได้เร็วกว่าพันธะ α-1,6 นอกจากอัตราเร็วในการทำงานของเอนไซม์แล้ว ยังขึ้นกับขนาดและโครงสร้างของสารตั้งต้นเพื่อเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลกลูโคส การย่อยในขั้นนี้จะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้น ทำให้รสแป้งเกิดรสหวานเป็นน้ำเชื่อม ซึ่งในการย่อยเพื่อให้ได้น้ำเชื่อมสำหรับเป็นอาหารของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ ควรเป็นน้ำเชื่อมที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนใหญ่ จึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ประเภทย่อยจากข้างนอกเข้ามา (exo-acting enzyme) ก่อนที่จะถูกหมักโดยยีสต์เพื่อผลิตเป็นแอลกอฮอล์ (Elfriede, 1998)

เอนไซม์ที่นิยมใช้ในกระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล คือ เอนไซม์แอมิเลสเป็นเอนไซม์ที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางในทางการค้า เพราะเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในระดับอุตสาหกรรมหลายประเภท และเป็นที่ต้องการของตลาด แอมิเลสส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ถูกขับออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) สามารถพบได้ทั้งในพืช เมล็ดพืชที่กำลังงอก สัตว์ ส่วนในมนุษย์พบได้จากต่อมน้ำลาย และตับอ่อน รวมทั้งพบได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดและหลายสายพันธุ์ เช่น แบคทีเรีย *Achromobacter, Bacillus, Clostridium, Micrococcus* และเชื้อรา เช่น *Aspergillus, Rhizopus, Fusarium* เป็นต้น (กิ่งจันทร์, 2541) เอนไซม์แอมิเลส สามารถแบ่งตามชนิดของพันธะที่ถูกย่อยสลาย ได้ดังนี้

1) แอลฟาแอมิเลส (Alpha-amylase; α-amylase) มีชื่อตามระบบสากลว่า α(1,4)-glucan glucanohydrolase (E.C.3.2.1.1) เป็นเอนไซม์ชนิดย่อยภายในโดยการตัดพันธะ α-1,4-glucosidic linkage ภายในโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม แต่ไม่สามารถตัดพันธะα-1,6-glucosidic linkage ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเดกซ์ทริน (Dextrin) ที่เป็นลูกโซ่ของกลูโคสขนาดแตกต่างกัน เอนไซม์กลุ่มนี้สกัดจากจุลินทรีย์ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* หรือมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า *Bacillus subtilis* (*Baciilus subtilis var amyloliquefaciens*), *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus sterothermophilus* (Teaque and Brumm, 1992) เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์เหล่านี้จะทนความร้อนได้ดี ตั้งแต่อุณหภูมิประมาณ 70-105 องศาเซลเซียส ที่ความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 6 เหมาะสำหรับการย่อยในขั้นตอนการทำให้เหลว นอกจากนี้ยังมีแอลฟาแอมิเลสที่สกัดจากเชื้อรา *Aspergillus* หรือ *Rhizopus* ซึ่งสามารถทำงานที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.8 (ปกติใช้ความเป็นกรด-ด่างที่ 4-5) ซึ่งเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำเชื่อมในขั้นตอนของการทำให้หวาน (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2546) ตัวอย่างของเอนไซม์แอลฟาแอมิเลสที่จำหน่ายในเชิงการค้า เช่น Termamyl 120L และ Termamyl SC ที่ผลิตจากบริษัท Novozymes ประเทศเดนมาร์ค

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 30 พ.ย. 2554
เลขทะเบียน 242707
เลขเรียกหนังสือ

1.1 การย่อยอะไมโลส เอนไซม์สามารถย่อย α-1,4-glucoside linkage ในอะไมโลสทั้งจากด้านในและด้านนอกของโมเลกุลได้อย่างรวดเร็ว การสลายพันธะจะเกิดขึ้นแบบสุ่มมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์เป็นเดกซ์ทริน มีขนาดเล็กลงกว่าเดิมและขนาดแตกต่างกัน จึงเกิดสีกับสารละลายไอโอดีนเป็นสีม่วงแดง โดยที่เอนไซม์ยังคงโมเลกุลของเดกซ์ทรินต่อไปได้อย่างช้าๆ จนกลายเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดเล็กมากจนไม่เกิดสีกับสารละลายไอโอดีน และในที่สุดจะได้ผลิตภัณฑ์ เช่น มอลโตส และมอลโตไตรโอส (ศิริลักษณ์, 2544)

1.2 การย่อยอะไมโลเพคติน เอนไซม์สามารถย่อยโมเลกุลที่ตำแหน่ง α-1,4-glucosidic linkage ได้ แต่ไม่สามารถย่อย α-1,6-glucosidic linkage ของอะไมโลเพคติน สำหรับการย่อย α-1,4-glucosidic linkage ของอะไมโลเพคตินจะเกิดขึ้นแบบสุ่ม แล้วได้เดกซ์ทรินที่มีแขนง ทำให้มีขนาดโมเลกุลปานกลาง ทำปฏิกิริยากับไอโอดีนเป็นสีม่วงหรือสีม่วงแดง เอนไซม์จะยังคงมีความสามารถในการย่อยเดกซ์ทรินต่อไปอย่างช้าๆ จนในที่สุดกลายเป็นลิมิตเดกซ์ทริน (limit dextrin) (เดกซ์ทรินที่เหลือจากการย่อยโดยเอนไซม์แอลฟาแอมิเลส และไม่สามารถย่อยสลายโดยเอนไซม์เดิมได้อีกต่อไป) (ศิริลักษณ์, 2544)

1.3 การย่อยแป้งและแป้งเปียก โมเลกุลของแป้งซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลอะไมโลสและอะไมโลเพคตินจับยึดกันเป็นผลึกอยู่ในส่วนที่เรียกว่า crystalline regions และมีบางส่วนอยู่ในบริเวณที่เป็น noncrystalline regions เกิดเป็นโมเลกุลที่ซับซ้อนขนาดใหญ่มาก การสลายพันธะ glucosidic ภายในโมเลกุลแป้งเพียงจำนวนเล็กน้อยก็สามารถลดขนาดโมเลกุลลงได้หลายเท่า ดังนั้นความหนืดของแป้งเปียกจึงลดลงอย่างรวดเร็ว (ศิริลักษณ์, 2544)

2) เบตาแอมิเลส (Beta-amylase; β-amylase) มีชื่อตามระบบสากลว่า α(1,4)-glucan maltohydrolase (E.C3.2.1.2) เบตาแอมิเลส เป็นเอนไซม์ที่ทำงานภายนอกโมเลกุลของแป้ง (exo-enzyme) โดยค่อยๆ ตัดจากด้านนอกเข้ามาด้านใน เริ่มจากปลายของอะไมโลสหรืออะไมโลเพคติน (ปลายด้าน non-reducing end) เอนไซม์จะตัดพันธะ α-1,4 ของโมเลกุลกลูโคสเป็นคู่ๆ ผลที่ได้จากการย่อยคือน้ำตาลมอลโตส (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2546)

2.1 การย่อยอะไมโลส เอนไซม์สามารถย่อยโมเลกุลที่ตำแหน่ง α-1,4-glucosidic linkage ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสายด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์ (non-reducing end) เข้าสู่ภายในสายทีละ 2 หน่วยของกลูโคส ทำให้มอลโตสหลุดออกมาจากสายของอะไมโลส พร้อมๆ กับการเปลี่ยน configuration ของอะตอมคาร์บอนที่มีหมู่อัลดีไฮด์จาก α-1,4-glucosidic configuration เป็น β-glucosidic configuration ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายแป้งจึงกลายเป็นเบตามอลโตส (ศิริลักษณ์, 2544)

2.2 การย่อยอะไมโลเพคติน เอนไซม์จะย่อยสลายอะไมโลเพคตินลักษณะเดียวกับการย่อยอะไมโลส คือย่อยสลาย α-1,4-glucosidic linkage ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็น

ระเบียบจากปลายสายด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายไปทีละ 1 หน่วยของมอลโตส หรือทีละ 2 หน่วยของกลูโคส การสลายพันธะดำเนินจนกระทั่งถึงบริเวณแขนงของโมเลกุล α-1,6-glucosidic linkage ดังนั้นผลิภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายแป้ง เป็นลิมิตเดกซ์ทรินที่มีขนาดใหญ่ และมอลโตสที่มี configuration ต่างไปจากเดิม คือ β-configuration หรือเบตามอลโตส (ปราณี, 2543)

2.3 การย่อยแป้งและแป้งเปียก การสลายขนาดโมเลกุลและลดความหนืดของแป้งและแป้งเปียก โดยเอนไซม์นี้เกิดขึ้นได้น้อย เนื่องจากเบตาแอมิเลส ย่อยพันธะ α-1,4-glucosidic linkage อย่างจำเพาะตรงปลายสายของพอลิเมอร์เท่านั้น (ศิริลักษณ์, 2544)

3) กลูโคแอมิเลส (Glucoamylase) หรือ อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase) มีชื่อตามระบบสากลว่า α(1,4)-glucan glucohydrolase (E.C. 3.2.1.3) ซึ่งสกัดจากเชื้อรา *Aspergillus* หรือ *Rhizopus* สามารถทำงานที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสม 55 องศาเซลเซียส) ความเป็นกรด-ด่าง โดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 4-6 (ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม คือ 5.5) จำเป็นต้องใช้ความร้อนเพื่อหยุดกิจกรรมก่อนที่จะดำเนินกระบวนการผลิตต่อไป (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2546) ตัวอย่างของเอนไซม์กลูโคแอมิเลสที่จำหน่ายในเชิงการค้า เช่น SAN super 240L และ SAN super 360L ที่ผลิตจากบริษัท Novozymes ประเทศเดนมาร์ค สำหรับการทำงานของกลูโคแอมิเลส จะย่อยสลายพันธะที่จับกันของน้ำตาลกลูโคสทั้งพันธะ α-1,4 และพันธะกิ่ง α-1,6 จากปลายสายด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์ เช่นเดียวกับเบตาแอมิเลส แต่จะตัดจากปลายเข้าไปครั้งละ 1 หน่วยกลูโคส โดยการย่อยสลายพันธะกิ่ง α-1,6 จะเกิดขึ้นช้าๆ ดังนั้นเมื่อเอนไซม์กลูโคแอมิเลสย่อยแป้ง พบว่า สามารถเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ จนในที่สุดผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่มี configuration ต่างไปจากเดิม คือ β-configuration หรือ β-D-glucose กับลิมิตเดกซ์ทรินที่มีขนาดเล็ก (ปราณี, 2543)

**2.4 กระบวนการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์โดยใช้ยีสต์**

**2.4.1 ยีสต์** (Yeast)

บทบาทของยีสต์ต่ออุตสาหกรรมการหมักนั้นเป็นที่รู้จักกันมานาน โดยนำมาใช้ในการหมักไวน์ เบียร์ และผลิตภัณฑ์จำพวกขนมปังต่างๆ (คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร, 2546) โดยชนิดของยีสต์ที่ผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เรียกว่า baker's yeast ส่วนยีสต์ที่ผลิตแอลกอฮอล์ เรียกว่า brewer's yeast นอกจากนี้ยีสต์ที่ใช้เป็นอาหาร เรียกว่า food yeast เป็นต้น กัลยา (2547) ได้กล่าวไว้ว่าประโยชน์ของยีสต์ที่สำคัญที่สุดคือ การผลิตเอทิลแอลกอฮอล์จากวัตถุดิบพวกคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นกระบวนการประยุกต์ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ได้แก่ เบียร์ สุรา และไวน์ ทั้งในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่และอุตสาหกรรมในครัวเรือน และมีแนวโน้มว่าจะมีการนำเชื้อยีสต์บริสุทธิ์มาใช้กันมากขึ้นเรื่อยๆ

ยีสต์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการหมักอยู่ใน Class *Ascomycetes* โดย Genus ที่สำคัญคือ *Saccharomyces* ซึ่งหมักน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลอื่นๆได้แอลกอฮอล์ (คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร, 2546) ซึ่ง Genus *Saccharomyces* จะมีลักษณะรูปร่างกลม (spheroidal) รูปทรงแบนอย่างไข่ (ellipsoidal) ทรงกระบอก (cylindrical) หรือทรงยาว (elongate) สืบพันธุ์ด้วยการแตกหน่อแบบ multilateral budding อาจมีการสร้าง pseudomycelium แต่ไม่มีการสร้าง true mycelium (เป็นเส้นใยซึ่งมีลักษณะคล้ายเส้นใยของเชื้อราหรือเป็นเส้นใยที่ไม่ได้เกิดขึ้นมาจากการแตกหน่อ) สายพันธุ์ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ *Saccharomyces cerevisiae* ยีสต์สายพันธุ์นี้ถูกใช้เป็น bread yeast (ยีสต์ขนมปัง) และ brewer's yeast (ยีสต์ทำเบียร์) ตามปกติใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ ไวน์ กลีเซอรอล และแอลกอฮอล์ ยีสต์สายพันธุ์นี้ ยังแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามลักษณะการหมัก คือ

1) ทอปยีสต์ (Top yeast) เป็นเฟอร์เมนเทอร์ (fermenter) ที่เจริญได้ดีมาก และเจริญได้รวดเร็วที่ 20 องศาเซลเซียส เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์และปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาอย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์ลอยขึ้นไปอยู่บนผิวหน้าของน้ำหมัก จึงเรียกว่า ทอปยีสต์ พวกที่หมักแอลกอฮอล์ได้ดี สังเกตได้ง่ายๆ จากการเขย่าขวดหมักจะเห็นฟองเกิดขึ้นจำนวนมาก ส่วนพวกที่หมักไม่ดีมักจะขึ้นเป็นฝ้าอยู่ที่ผิวหน้าของอาหาร

2) บอตทอมยีสต์ (Bottom yeast) เป็นพวกที่กิจกรรมการหมักเกิดดี ที่อุณหภูมิต่ำ (10 ถึง 15 องศาเซลเซียส) ไม่มีการรวมกลุ่มของเซลล์และการเจริญเป็นไปอย่างช้าๆทำให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์น้อย เซลล์จึงค่อยๆ ตกตะกอนอยู่ที่ก้นภาชนะ จึงเรียกว่า บอตทอมยีสต์

คุณสมบัติสำคัญของสายพันธุ์ *Saccharomyces* ที่ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ คือ มีความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาล ทั้งนี้ไม่สามารถทำการเปรียบเทียบสายพันธุ์ *Saccharomyces* ในระหว่างกระบวนการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เพราะว่าสภาวะที่แตกต่างกัน แม้ว่าจะเป็นเครื่องดื่มชนิดเดียวกันก็ให้ผลที่แตกต่างกัน นอกจากจะอยู่ภายใต้สภาวะเดียวกันในการทดลองอย่างแท้จริง มีความทนทานต่อเอทานอล มีความสามารถในการสร้างสารประกอบกลิ่นรสที่ต้องการ เป็นสายพันธุ์ที่มีความคงตัวและปรับตัวได้ดี มีความสามารถในการผลิตฟองที่อ่อนนุ่ม ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ต้องการฟอง เช่น เบียร์ แต่ คุณสมบัติข้อนี้ไม่เป็นที่ต้องการในการผลิตสุรากลั่น รวมทั้งควรมีการพัฒนาสายพันธุ์ให้เหมาะสมกับการผลิตในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แต่ละชนิด (Frazier and Westhoff, 1988)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของยีสต์ในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ คือ

1) ผลของธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามินต่อการหมัก เมื่อพิจารณาถึงผลของธาตุอาหารแต่ละชนิดต่อการเจริญของยีสต์สามารถแยกออกเป็นพวกดังนี้ (Rose, 1977)

1.1 ไนโตรเจน ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็น โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้ ammonium ions เป็นแหล่ง

ไนโตรเจนได้ แต่ในยีสต์บางชนิดต้องการกรดอะมิโนที่เฉพาะเท่านั้น เพราะกรด อะมิโนดังกล่าวเป็นตัวควบคุมการทำงานของ glycolysis pathway อย่างไรก็ตามเซลล์ยีสต์เองก็ประกอบด้วย purine, pyrimidine และกรดอะมิโน ดังนั้นจึงอาจใช้ตัวยีสต์เองเป็นแหล่ง aminonitrogen เช่น ในการนำน้ำกากส่ากลับมาใช้ละลายกากน้ำตาล (ประมาณร้อยละ 10 – 30) เราเรียก กระบวนการนี้ว่า slopping back ซึ่งนอกจากจะได้ธาตุอาหารแล้ว ยังช่วยเพิ่ม buffering capacity และลดปริมาณน้ำที่ต้องใช้ รวมทั้งเป็นการกำจัดน้ำกากส่าทิ้งไปในตัวด้วยหรือโดยการนำเอาเซลล์ยีสต์ที่ถูกย่อยสลายแล้ว (lysed yeast cell) กลับมาใช้ใหม่ แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์ คือ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

1.2 ฟอสฟอรัส โดยมากใช้ในรูปเกลือฟอสเฟตในสัดส่วนประมาณ 0.6 mM/g.cell ฟอสเฟตมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์ไขมันและคาร์โบไฮเดรตและรักษาสภาพของผนังเซลล์ ดังนั้นฟอสเฟตจึงเป็น ionic factor ที่สำคัญต่อการหมัก

1.3 ซัลเฟอร์ ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 0.4 ของน้ำหนักแห้ง โดยอยู่ในรูปของเมไธโอนีน (methionine) แต่เนื่องจากเมไธโอนีนมีราคาแพงมาก ดังนั้นในอุตสาหกรรมจึงใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแทน

1.4 แร่ธาตุต่างๆ (Trace elements) แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตในการหมักยีสต์แบ่งเป็น 3 พวก ได้แก่

1.4.1 Macro elements ได้แก่ K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn และ Cl ยีสต์ต้องการ 0.1–1 mM และแร่ธาตุพวกนี้เข้าไปในเซลล์ยีสต์โดยอาศัย facilitated diffusion

1.4.2 Micro elements ได้แก่ Co, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni และ Va ยีสต์ต้องการในระดับ 0.1–100 μM

1.4.3 Inhibitors ได้แก่ Ag, As, Bd, Hg, Li, Ni, Os, Pd, Se และ Te ถ้ามีในระดับความเข้มข้นสูงกว่า 10–100 μM จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการหมักของยีสต์ ในบางครั้งถ้ามี macro elements และ micro elements ในปริมาณมากเกินไปจะมีผลไปยับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์ได้เช่นกัน

1.5 วิตามิน เป็นตัวควบคุมเมตาบอลิซึมของยีสต์ โดยจะควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพราะวิตามินเป็น co-enzymes หรือสารเริ่มต้น (precursors) ที่ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้เต็มที่ วิตามินที่ยีสต์ต้องการส่วนใหญ่เป็นไบโอตินและแพนธีโอนิคแอซิด นอกจากนี้ความต้องการวิตามินชนิดอื่นๆ เช่น ไธโอนิน ไพริดอกซิน ไนอาซิน โฟลิคแอซิด และ p-amino benzoic acid ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ บางสายพันธุ์ถ้ามีไธอามิน แต่ขาดไพริดอกซินจะทำให้การเจริญลดลง ในขณะที่บางสายพันธุ์จะเจริญได้ดีในสภาพซึ่งไม่มีไธอามินและไพริดอกซินเท่านั้น (ชรินทร์, 2546)

2) ผลของอุณหภูมิต่อการหมัก อุณหภูมินับว่ามีความสำคัญมากต่อการหมักแอลกอฮอล์ สำหรับยีสต์ที่ใช้กันอยู่ตามโรงงานทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30–35 องศาเซลเซียส และจะทนได้ไปถึง 37 องศาเซลเซียส ถ้าสูงขึ้นไปถึง 40 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่แล้วจะชะงักการเจริญแม้ว่าการหมักจะดำเนินไปได้ถ้ามีปริมาณยีสต์มากพอ ดังนั้นหลังการหมักไปแล้ว 1–10 ชั่วโมง ต้องควบคุมอุณหภูมิให้ไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส หลังจาก 10 ชั่วโมงไปแล้วควบคุมไม่ให้เกิน 37 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิในช่วง 10 ชั่วโมง สูงกว่า 37 องศาเซลเซียสแล้วอาจเกิดปัญหาแบคทีเรียเจริญขึ้นมามากเกินไป เป็นผลให้ยีสต์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ การควบคุมอุณหภูมิจึงจำเป็นและเป็นปัจจัยสำคัญต่อผลผลิตที่ได้ สำหรับการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์สูงร้อยละ 15–20 เพื่อให้ได้กลิ่นรสดีจะหมักไม่เกิน 15 องศาเซลเซียส การหมักที่อุณหภูมิสูงทำให้เกิดแอลกอฮอล์หนัก (fusel oil) มากขึ้น การลดอุณหภูมิของถังหมักจะต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น แต่ก็อาจจะคุ้มทุนได้ถ้าสามารถหมักแอลกอฮอล์ได้ในระดับร้อยละ 9–10 ภายใน 24–36 ชั่วโมง สาเหตุที่อุณหภูมิในระหว่างการหมักเพิ่มขึ้นเนื่องมาจากกิจกรรมของยีสต์ กล่าวคือในการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาลซูโครสจะเกิดความร้อน 149.5 แคลอรีต่อกรัมซูโครส หรือในกรณีน้ำตาลกลูโคสจะเกิดพลังงานความร้อนจากการหมัก 140.2 แคลอรีต่อกรัมกลูโคส ความร้อนที่เกิดขึ้นเป็นการคายพลังงานความร้อน (exothermic energy) จึงทำให้น้ำหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้น ปรกติอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักแอลกอฮอล์โดยยีสต์จะอยู่ในช่วง 30–35 องศาเซลเซียส แต่ในสภาวะที่มีแอลกอฮอล์ผลิตออกมาแล้วจะมีผลทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณเอทานอลเป็นสำคัญรวมถึงสายพันธุ์ของยีสต์ด้วย โดยมีผลดังนี้ (ชรินทร์, 2546)

2.1 กรณีที่มีเอทานอลร้อยละ 4.6 จะทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ลดลงจาก 38 องศาเซลเซียส ไปเป็น 32 องศาเซลเซียส

2.2 กรณีที่มีเอทานอลร้อยละ 3.8 การหมักจะหยุดอยู่ที่ 36 องศาเซลเซียส ถ้ามีเอทานอล สูงขึ้นเป็นร้อยละ 7.5, 8.3 และ 9.5 ทำให้ยีสต์หยุดหมักที่อุณหภูมิ 27, 18 และ 9 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

2.3 rapid batch fermentation ที่ได้เอทานอลร้อยละ 9.5 จะทำให้ยีสต์มีอัตราในการรอดชีวิตอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิสูงกว่า 20–25 องศาเซลเซียส

2.4 กรณีของ sake yeast (highly ethanol tolerant) ที่ความเข้มข้นของเอทานอลระหว่างร้อยละ 10 และ 19 อัตราการผลิตเอทานอลจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงจะเห็นได้ว่าในระหว่างการหมักการควบคุมอุณหภูมิและปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมักจึงมีความสำคัญมาก

3) ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการหมัก ยีสต์และราเจริญได้ดีในสภาพที่เป็นกรดพอสมควร คือในระดับ 3.8–5.5 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 3.5 การเจริญจะลดลง ถ้าพีเอชต่ำถึง 3 หรือต่ำกว่านั้นก็จะไม่สามารถเจริญได้ ดังนั้นในการหมักจึงนิยมปรับให้มีพีเอชในช่วง 4–4.5 ทั้งนี้นอกจากยีสต์จะเจริญได้ดีที่ระดับพีเอชดังกล่าวแล้วยังช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ด้วย เพราะแบคทีเรียทั่วไปเจริญ

ได้ดีในสภาพที่พีเอชเป็นกลาง แต่ก็มีแบคทีเรียบางชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติคที่สามารถเจริญได้ดีในระดับพีเอชที่ยีสต์เจริญ และมักจะสร้างปัญหาเมื่อแบคทีเรียพวกนี้สร้างกรดขึ้นมามากเกินไปจนยีสต์ทนไม่ได้ ปรกติจะใช้กรดซัลฟิวริกแบบราคาถูกมาใช้ในการปรับพีเอช การปรับพีเอชจะช่วยลดระยะเวลาการต้มให้ความร้อนแก่ถังหมักเพื่อการฆ่าเชื้อ เพราะความร้อนที่อุณหภูมิเท่ากันจะฆ่าแบคทีเรียในอาหารที่มีสภาพเป็นกรดได้มากกว่าในสภาพที่เป็นกลาง โดยปรกติจะใช้อุณหภูมิ 65–70 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 นาทีก็เพียงพอ สำหรับการต้มฆ่าเชื้อในถังเตรียมกล้าเชื้อเมื่อปรับพีเอชลงมาแล้วให้เป็น 4–4.5 การติดตามวัดค่าพีเอชในช่วงการหมักนับว่าจำเป็น บ่อยครั้งปัญหาที่เกิดขึ้นเราสามารถคาดคะเนได้ว่าการหมักผิดปกติ โดยการสังเกตอุณหภูมิของถังหมักที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วควบคู่กับการที่ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วผิดปกติโดยปริมาณแอลกอฮอล์ไม่เพิ่มขึ้น เมื่อเกิดเหตุการณ์เช่นนั้นขึ้น บางโรงงานก็แก้ปัญหาโดยการสูบถ่ายไปในถังหมักอื่นที่หมักได้ดีมีแอลกอฮอล์สูงเกินกว่าร้อยละ 5 แล้วและเติมกล้าเชื้อยีสต์เพิ่มควบคู่กันไปก็พอช่วยแก้ปัญหาได้ (ชรินทร์, 2546)

4) ความเข้มข้นของน้ำตาล กรณีที่สารละลายมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกินขีดจำกัด คือประมาณร้อยละ 22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลาย จะเกิดการรบกวนการเจริญเติบโตของยีสต์ทำให้เติบโตได้ยาก การหมักจะเป็นไปอย่างเชื่องช้าและไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดกรดแลคติค กรดน้ำส้มและสารอินทรีย์ต่างๆ ขึ้นได้ ซึ่งส่วนมากจะเกิดในบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ โดยปกติแล้วกระบวนการหมักจะใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลไม่เกินร้อยละ 18 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลายเพื่อให้การเจริญเติบโตของยีสต์เป็นไปโดยปกติและได้เอทานอลในปริมาณสูงเหมาะแก่การนำไปกลั่นคือประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตร ถ้าน้ำตาลเป็นแบบโมเลกุลเล็กๆ เช่น glucose และ fructose แล้วการหมักจะเกิดได้เร็วกว่าพวกที่มีโมเลกุลใหญ่ๆ เช่น sucrose และ maltose ทั้งนี้เพราะว่ายีสต์สามารถนำน้ำตาลโมเลกุลเล็กไปใช้ได้ทันที

5) ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ ในกรณีที่ความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้นถึงขีดจำกัดอันหนึ่งคือ ประมาณร้อยละ 15 โดยปริมาตร (ขีดจำกัดนี้อาจสูงหรือต่ำกว่านี้ขึ้นกับชนิดของยีสต์ แต่เท่าที่พบจะสูงไม่เกินร้อยละ 18 โดยปริมาตร) ปริมาณของเอทานอลที่สูงขึ้นนี้จะขัดขวางหรือหยุดยั้งการทำงานของยีสต์ (end product inhibition) การหมักจะหยุดชะงัก แม้จะยังคงมีน้ำตาลเหลืออยู่ในน้ำส่าในปริมาณเท่าใดก็ตาม ซึ่งถือว่าเป็นข้อจำกัดสำหรับอุตสาหกรรมการหมัก เช่น ไวน์ เบียร์ เหล้า สาเก เป็นต้น ดังนั้นเครื่องดื่มที่ต้องการปริมาณแอลกอฮอล์สูงจึงต้องนำไปผ่านกระบวนการกลั่นภายหลังจากผ่านกระบวนการหมัก (ชรินทร์, 2546)

6) คาร์บอนไดออกไซด์และความดัน คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากปฏิกิริยาในการใช้น้ำตาลของยีสต์จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ด้วย ถ้าไม่มีการระบายคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากระบบความดันในถังหมักจะสูงขึ้น ซึ่งถ้าสูงขึ้นจนถึง 7.5 บรรยากาศ จะทำให้อัตราเร็วของการหมักลดลงจนกระทั่งความดันสูงถึง 8.0 บรรยากาศ อัตราเร็วของการหมักจะช้ามากหรือเกือบจะไม่เกิดเลย

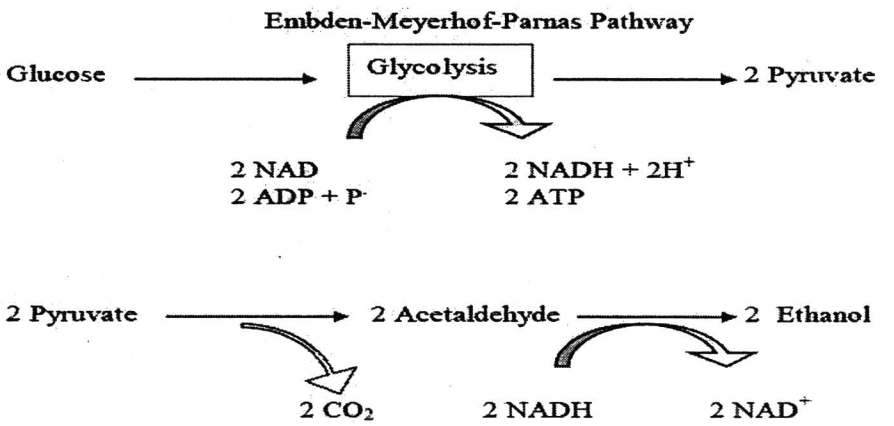
7) ออกซิเจน ออกซิเจนจะถูกใช้ในการเจริญเติบโตและการแตกหน่อหรือการแบ่งตัวในกระบวนการหายใจ เพื่อทำให้เกิดพลังงานในการดำรงชีพ ซึ่งการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของยีสต์ในที่มีออกซิเจนจะไม่ให้เอทานอลออกมาแต่จะมีเพียงคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเกิดขึ้น (โชคชัย และคณะ, 2546)

8) กรดน้ำส้มหรือกรดแอซิติค กรดน้ำส้มมีผลทำให้การเจริญเติบโตของยีสต์ชะงัก ความเข้มข้นที่มีผลต่อการเจริญ คือร้อยละ 0.1–0.5 ถ้ามี propionic acid และ butyric acid เกิดขึ้นด้วยก็จะมีผลเช่นเดียวกันกับกรดน้ำส้ม กรดน้ำส้มเกิดจากแบคทีเรียซึ่งเป็นพวกต้องการออกซิเจน (aerobacter) ซึ่งในบางครั้งกรดน้ำส้มจะทำให้เซลล์ของยีสต์แตกได้

9) สารช่วยการเติบโต (growth factor) นอกจากน้ำตาลแล้วยีสต์ยังต้องการสารประกอบอื่นเพื่อการเจริญเติบโตและการแตกหน่อเพิ่มจำนวน สารเหล่านี้ได้แก่ vitamin B-complex เช่น biotin thiamine riboflavin nicotinic acid และ panthothenic acid

**2.4.2 กระบวนการหมัก (fermentation)**

กระบวนการหมัก หมายถึง กระบวนการที่มีการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ ด้วยเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ให้เกิดเป็นแอลกอฮอล์ เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในสภาพที่ไม่มีอากาศ ซึ่งแอลกอฮอล์จะถูกสร้างขึ้นโดยผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas pathway โดยเริ่มจากกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวท 2 โมเลกุล และ ATP อีก 2 โมเลกุล จากนั้นไพรูเวทจะสูญเสียก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุลได้อะเซตาลดีไฮด์ (acetaldehyde) 2 โมเลกุล ด้วยเอนไซม์ไพรูเวทดีคาร์บอกซิเลส (pyruvate decarboxylase) จากนั้นอะเซตาลดีไฮด์จะถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ได้เป็นเอทานอล 2 โมเลกุล (รูป 2.6)




**รูป 2.6** กระบวนการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเอทานอลโดยผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas pathway

ที่มา: Elfriede (1998)

กระบวนการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลักๆ คือ

1) Saccharification เป็นกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยเอนไซม์แอมิเลสที่ผลิตโดยเชื้อรา หรือได้จากการเติมเอนไซม์ลงไป ทำการย่อยแป้งที่พันธะ α-1,4-glucocidic และเอนไซม์กลูโคแอมิเลสที่ผลิตโดยเชื้อรา หรือได้จากการเติมเอนไซม์ลงไปทำการย่อยแป้งโดยตัดพันธะ α-1,6-glucocidic ได้น้ำตาลกลูโคส

2) Alcoholic fermentation เป็นขบวนการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในถังหมัก จึงเรียงลำดับจาก saccharification ของแป้งเป็นน้ำตาลเฟอร์เมนต์ชนิดต่างๆ กลูโคส กรดแลคติก และกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ฯลฯ โดยเอนไซม์แอมิเลสจากราตามด้วยยีสต์ที่จะเปลี่ยนน้ำตาลเฟอร์เมนต์และกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์พร้อมๆ กับการผลิตกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น กรดซัคซินิค และกรดมาลิค นอกจากนี้ยังพบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดอื่นๆ เช่น โปรติเอสที่ย่อยสลายโปรตีนเป็นเปปไทด์ และกรดอะมิโน ไลเปสที่เปลี่ยนไขมันเป็นกรดไขมัน และกรีเซอรอล เกิดเป็นกลิ่นรสที่มีความซับซ้อน และยิ่งไปกว่านั้น สารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นยังสามารถทำปฏิกิริยากันเองแล้วได้สารอินทรีย์ชนิดใหม่ๆ ที่ช่วยเพิ่มความซับซ้อนของกลิ่นที่มีลักษณะเฉพาะตัว ได้แก่ กรดอะมิโนบางตัว เช่น ลิวซีนจะถูกยีสต์เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ประเภทไอโซแอลกอฮอล์ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปโดยอะซิทิลโคเอนไซม์เอเป็นไอโซเอมิล-อะซิเตท ซึ่งช่วยให้กลิ่นของสาโทดีขึ้น นอกจากนี้กรดลิวซินิคที่เปลี่ยนมาจากกรดอะมิโนลิวซีน ยังเป็นสารตั้งต้นของสารเอสเทอร์ชนิดเอทิลลิวซิเนต ที่เป็นสารให้กลิ่นเฉพาะของสาเก เป็นต้น (ยุพกนิษฐ์, 2543)

กระบวนการหมักยังสามารถแบ่งตามความต้องการอากาศได้เป็น 2 ชนิด คือ การหมักที่ต้องการอากาศ (aerobic fermentation) เช่น การหมักกรดแอซีติก และกรดซิตริก และการหมักที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic fermentation) เช่น การหมักอะซิโตน เอทานอล และบิวทานอล เป็นต้น(สมใจ, 2537)

กระบวนการหมักให้เกิดแลกอฮอล์โดยยีสต์เกิดในสภาพไร้อากาศ โดยทั่วไปเป็นการหมักน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* sp. ซึ่งแอลกอฮอล์จะถูกสร้างขึ้นมาโดยอาศัย Embden-Meyerhof-Pasnas Pathway ยีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้ประมาณร้อยละ 51.1 และคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณร้อยละ 48.9 ในทางปฏิบัติน้ำตาลเพียงประมาณร้อยละ 95 ถูกเปลี่ยนแปลงเป็นแอลกอฮอล์ นอกจากนั้นยีสต์ใช้สำหรับการเจริญ และเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่นๆ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์อะเซตาลดีไฮด์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำตาลประมาณร้อยละ 1 ในการสร้างเซลล์ยีสต์เองด้วย (Margalit, 1996)

**2.4.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์**

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์แบ่งออกเป็น 3 ประเภทหลักๆ (นัยทัศน์, 2542) ได้แก่

1) วัตถุดิบที่ให้ความหวาน เช่น น้ำตาล น้ำอ้อย และกากน้ำตาล เป็นต้น ที่นิยมใช้กันมากคือกากน้ำตาล ซึ่งอาจได้มาจากอ้อยหรือจากหัวบีทก็ได้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดตามคุณภาพคือ

black strap กับ refiner and high test molasses ซึ่งมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 30-33 และ 78 ตามลำดับ

2) วัตถุดิบประเภทแป้ง ซึ่งมีแป้งเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานของยีสต์ได้ แต่ต้องผ่านการย่อยเป็นน้ำตาลเสียก่อน โดยอาจใช้กรดหรือเอนไซม์ก็ได้ ซึ่งในวัตถุดิบในกลุ่มนี้แบ่งออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ

2.1 ธัญพืช ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวไรย์ ข้าวฟ่าง และข้าว

2.2 ข้าวโพด มีแป้งเป็นองค์ประกอบร้อยละ 60- 68 ขั้นแรก ต้องทำข้าวโพดให้เกิด gelatinization เสียก่อน และอาจลดความหนืดลงได้โดยใช้ HCl หรือใช้ amylolytic enzyme ที่ได้จากรา หรือมอลต์ ถ้าหากใช้มอลต์เวิร์ต จะใช้ประมาณร้อยละ 10-15

2.3 ข้าวบาร์เล่ย์ มีแป้งอยู่ร้อยละ 55-65 ใช้เป็นวัตถุดิบในการทำน้ำหมักในรูปของธัญพืชก็ได้ หรือใช้ในรูปของมอลต์ซึ่งมี amylolytic activity ก็ได้ พบว่า มอลต์ในสภาพที่ผ่านความร้อนมาแล้วจะสูญเสียประสิทธิภาพในการย่อยแป้งไปประมาณร้อยละ 15 เมื่อเทียบกับมอลต์สด

2.4 พืชที่เก็บแป้งไว้ในหัวและราก ที่นำมาใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ ได้แก่ มันฝรั่ง และมันสำปะหลัง

2.4.1 มันฝรั่ง มีแป้งอยู่ประมาณร้อยละ 10-25โดยนึ่งมันฝรั่งในหม้อความดัน 2-3 atm นาน 15 นาที แล้วจึงเติมมอลต์ลงไปประมาณร้อยละ 2-3 ควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส

2.4.2 มันสำปะหลัง มีแป้งประมาณร้อยละ 25

3) วัตถุที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ เช่น ไม้ และ waste sulfite liquor น้ำตาลที่ได้จากการย่อยไม้มีอยู่ประมาณร้อยละ 65-88 ประกอบด้วย กลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส กาแลคโตส ไซโลส และอะราบิโนส สำหรับไม้เนื้ออ่อนสามารถย่อยได้น้ำตาลเฮกโซสมากและสามารถหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ได้เลย

**2.4.4 สารเคมีอื่นที่สำคัญซึ่งเกิดขึ้นในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์**

1) เอสเทอร์ (Ester) การหมักแอลกอฮอล์ประกอบด้วยสารระเหยหลายชนิด เช่น แอลกอฮอล์ กรดคาร์บอนิค เอสเทอร์ แอลดีไฮด์ และคีโตน เป็นต้น ซึ่งสารต่างๆ เหล่านี้โดยมากมาจากกิจกรรมของยีสต์ในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ แต่สารระเหยบางตัว เช่น เอทิลลิวซิเนต ที่เป็นสารที่ให้กลิ่นหอมในเฉพาะของสาเก มาจากกิจกรรมของราขณะย่อยแป้ง มีปัจจัยหลายอย่างที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์สารระเหยได้ของยีสต์ในขณะหมัก เช่น องค์ประกอบของข้าว สายพันธุ์เชื้อราและยีสต์ พบว่าสารเอสเทอร์และแอลกอฮอล์ที่โมเลกุลใหญ่ จะถูกผลิตขึ้นขณะที่ยีสต์อยู่ในระยะกำลังเจริญ และวิถีการสังเคราะห์เอสเทอร์โดยยีสต์ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ และกรดที่มีอยู่ในสารละลายด้วย (นัยทัศน์, 2542)

เอสเทอร์ เป็นสารหอมระเหย ที่มีความสำคัญในการให้กลิ่นรสแก่ผลิตภัณฑ์ เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง acyl CoA และ free alcohols โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) และแอลกอฮอล์อะซิติลทรานสเฟอเรส (alcohol acetyl transferase) ทำให้เกิดกลิ่นหอมขึ้น นอกจากนี้การเกิดเอสเทอร์ยังเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของกรดในการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ความเข้มข้นของ free acid ขึ้นอยู่กับขั้นตอนย่อยแป้งเป็นน้ำตาลของเชื้อรา ซึ่งจะเกิดการย่อยสลายกรดไขมันในข้าวได้เป็นกลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) (นัยทัศน์, 2542) ปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์ สามารถเกิดได้ 2 รูปแบบ ดังสมการ

แบบที่ 1 เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอทานอลกับกรดแอซีติก

$$R\text{-}OH + R\text{-}COOH \longrightarrow R\text{-}COO\text{-}R + H_2O$$

แบบที่ 2 เกิดจากปฏิกิริยา Alcoholysis ของสารประกอบ Acyl CoA

$$R\text{-}CO\sim SCoA + R\text{-}OH \longrightarrow R\text{-}COO\text{-}R + CoA\sim SH$$

2) แอลกอฮอล์ที่มีโมเลกุลใหญ่ (Higher alcohols) หรือแอลกอฮอล์ขั้นสูงมีที่มาจากกระบวนการสลายกลูโคสและกรดอะมิโน เกิดขึ้นในช่วงการเจริญเติบโตของยีสต์ ได้แก่ amylalcohol isobutyl alcohol และ 2-phenyl ethanol ชนิดและปริมาณขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์ และองค์ประกอบของสารอาหารเริ่มต้น (ชรินทร์, 2546)

3) แอลดีไฮด์ (Aldehyde) เป็นสารในกลุ่ม carbonyl เป็นสาระสำคัญที่มีบทบาทต่อกลิ่นรสของสาโท เกิดจากปฏิกิริยาการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นแอลดีไฮด์ ปริมาณแอลดีไฮด์ที่ถูกสร้างขึ้นมาขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์และสภาวะในการหมัก โดยทั่วไปแล้วปริมาณแอลดีไฮด์ควรมีค่าอยู่ในช่วง 60-190 มิลลิกรัมต่อลิตร (พัฒน์พงษ์, 2543)

4) เอทิลคาร์บาเมต (Ethyl carbamate) เป็นสารประกอบที่สร้างขึ้นในระหว่างการหมักด้วยยีสต์ สร้างจากยูเรียซึ่งเป็นสารตั้งต้น (precursor) ที่จะถูกเอนไซม์ยูเรียเอส (urease) เปลี่ยนเป็นสารนี้ (พัฒน์พงษ์, 2543)

5) ฟูเซลออยล์ (Fusel oil) เกิดจากกระบวนการสลายกรดอะมิโน ชนิด valine leucine isoleucine และ phenylalanine และเกิดขึ้นจากกระบวนการสร้างกรดอะมิโนชนิด threonine, glutamic acid, isoleucine และ valine ตัวอย่างของฟูเซลออยล์ ได้แก่ แอลกอฮอล์มวลโมเลกุลสูงๆ เช่น 1-propanol, 1-butanol, 2-butanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 3-pentanol และ 1-hexanol (พัฒน์พงษ์, 2543)

6) เมทิลแอลกอฮอล์ (Methyl alcohol) ในกระบวนการหมักสุราแช่ประเภทต่างๆ ได้แก่ สาโท ไวน์ และไวน์ผลไม้นั้น ยีสต์มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาล และคาร์โบไฮเดรตเป็นแอลกอฮอล์และสารอื่นๆ ได้ในชนิดและปริมาณต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับสภาวะในการหมัก ในบางสภาวะที่ไม่เหมาะสม

เช่น ในกระบวนการผลิตไวน์ผลไม้บางชนิดที่ใช้เอนไซม์เพคติเนส (pectinase) ในการเตรียมน้ำผลไม้ ก็ทำให้เกิดเมทิลแอลกอฮอล์ขึ้นได้ เป็นต้น (กิจชัย, 2535; สมิง, 2541; มลิวรรณ, 2544)

**2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์**

พักตร์ประไพ (2546) ทำการศึกษาการผลิตกลูโคสไซรัปจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับโรงงานต้นแบบ กากมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีราคาถูก จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากมันสำปะหลังพบว่ามีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลักร้อยละ 77.98 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะใช้กากมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกลูโคสไซรัป ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกลูโคสไซรัปจากการย่อยกากมันสำ ปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาแอมิเลส (Thermamyl 120L) ในขั้นตอนการเกิดแซคคาริฟิเคชัน พบว่าในระดับห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มข้นกากมันสำ ปะหลัง 150 กรัมต่อลิตร ปริมาตรการย่อย 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้นเอนไซม์แอลฟาแอมิเลส 1000 หน่วย ความเป็นกรด-ด่าง 6.5–7.0 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคแอมิเลส (OptimaxTM7525) 600 หน่วย ที่ความเป็นกรด-ด่าง 4.3–4.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ให้เกิดการเปลี่ยนกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 69.80 ซึ่งเทียบเท่ากับประสิทธิภาพการย่อยร้อยละ 72.71 จากนั้นขยายการผลิตสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับโรงงานต้นแบบขนาด 50 ลิตร ที่ความเข้มข้นกากมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตร ปริมาตรการย่อย 35 ลิตร เอนไซม์แอลฟาแอมิเลส 100 หน่วยต่อปริมาตรการย่อย 100 มิลลิลิตร นาน 40 นาที ความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส แล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคแอมิเลส 150 หน่วยต่อปริมาตรการย่อย 100 มิลลิลิตร ที่ความเป็นกรด-ด่าง 4.3–4.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงด้วยใบกวนชนิด helical ribbon 100 รอบต่อนาที ให้ประสิทธิภาพการย่อยสูงถึงร้อยละ 106.35 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกลูโคสโดยการเติมกากมันสำปะหลังเพิ่มในขั้นตอนลิเคอแฟคชัน พบว่าการเติมกากมันสำปะหลังร้อยละ 50 ของกากมันสำปะหลังเริ่มต้น ให้ประสิทธิภาพการย่อยร้อยละ 89.90 เมื่อนำน้ำเชื่อมที่ได้ไปผลิตเอทานอลด้วย *Saccharomyces cerevisiae* เปรียบเทียบกับการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 6.05 และ 4.59 (โดยปริมาตร) ตามลำดับ และเมื่อนำน้ำเชื่อมที่ย่อยได้ไปผลิตกลูโคสไซรัปสามารถผลิตกลูโคสไซรัปได้ค่าสมมูล เดกโทรส (DE) เป็นร้อยละ 82

ชุลีพร (2548) ทำการศึกษาผลของเอนไซม์ พันธุ์ข้าวเหนียว และเชื้อยีสต์ต่อคุณภาพของสุรากลั่นชุมชนโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิด คือ Termamyl SC และ SAN super 360 L ย่อยข้าวเหนียว 3 พันธุ์ คือ กข6 กข10 และสันป่าตอง 1 แล้วหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ทางการค้า 4 สายพันธุ์ คือ Lalvin K1-V1116, Lalvin EC-1118, Enoferm BDX และ Fermivin PDM พบว่า ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เหมาะสมในการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสุรากลั่น โดย

เริ่มจากนำข้าวเหนียว ไปแช่กับน้ำในอัตราส่วน 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นาน 6 ชั่วโมง ต้มจนข้าวสุก แล้วเติมเอนไซม์ Termamyl SC ในปริมาณร้อยละ 0.04 ของน้ำหนักข้าวสาร และรักษาอุณหภูมิโดยการบรรจุในกล่องโฟม เมื่ออุณหภูมิลดลงเป็น 65 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์ SAN super 360 L ในปริมาณร้อยละ 0.10 ของน้ำหนักข้าวสาร ปล่อยให้ย่อยจนถึงอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เติมยีสต์ Fermivin PDM เพื่อหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ในสภาวะที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน เมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่า น้ำส่าที่ได้มีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 13.73 ± 0.12 โดยปริมาตร เมื่อนำไปกลั่นเป็นสุรากลั่นพบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำส่า ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้เมื่อเทียบกับปริมาณแป้ง และประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์เมื่อเทียบกับทางทฤษฎี เป็นร้อยละ 75.93 ± 0.28, 53.92 ± 0.65 และ 94.90 ±1.14 ตามลำดับ

มณชัย และคณะ (2550) ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซรัปจากข้าวหอมมะลิไทยด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซรัปจากข้าวหอมมะลิไทยโดยใช้วิธีการหมักข้าวด้วยเชื้อรา *Amylomyces* spp. CM 105 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื่อมข้าวคือการใช้อัตราส่วนระหว่างข้าวท่อนหอมมะลิและปลายข้าวหอมมะลิเท่ากับร้อยละ 80+ร้อยละ 20 ปริมาณโคจิข้าวเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 15 ปริมาณรำข้าวเท่ากับร้อยละ 3 อุณหภูมิในการบ่มคือ 30 องศาเซลเซียส และปริมาณน้ำกลั่นที่เติมลงในข้าวเท่ากับร้อยละ 2 การศึกษาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ที่เหมาะสมในการผลิตไซรัปข้าวได้ผันแปรปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ต่างกัน 3 ระดับ คือ 60 70 และ 80 องศาบริกซ์ โดยนำน้ำเชื่อมข้าวไปทำการระเหยแบบกระทะเปิด (Pan evaporation) และควบคุมอุณหภูมิในการระเหยเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่าไซรัปข้าวที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้เท่ากับ 70 องศาบริกซ์ มีคุณภาพโดยรวมดีที่สุด จากการวิเคราะห์คุณภาพพบว่ามีค่าความหนืดเท่ากับ 393.20 เซนติพอยซ์ ค่าความใสเท่ากับร้อยละ 2.41 และมีค่าสี L, a*, b* เท่ากับ 26.10 8.24 และ 15.10 ตามลำดับ มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 125.70 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 3.43 ปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 2.51 ส่วนคุณภาพทางจุลินทรีย์พบว่ามีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณเชื้อราและยีสต์น้อยกว่า 30 CFU/g

ศราวุธ (2550) ทำการศึกษาผลของเอนไซม์ ชนิดน้ำตาล และชนิดเครื่องกลั่นต่อคุณภาพของสุรากลั่นจากส้มสายน้ำผึ้ง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเอนไซม์ ชนิดน้ำตาล และชนิดเครื่องกลั่นต่อคุณภาพของสุรากลั่นจากส้มสายน้ำผึ้ง น้ำส่าส้มสายน้ำผึ้งผลิตได้จากการเตรียมน้ำหมักจากเนื้อส้มสายน้ำผึ้งบดที่มีการปรับปริมาณน้ำตาลเป็น 22 องศาบริกซ์ เติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) 200 ppm และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP) 300 ppm แล้วหมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า (Lalvin V1116) เป็นระยะเวลา 5 วัน หลังการกรองพบว่าได้ปริมาณน้ำส่าอยู่ในช่วงร้อยละ 56.66-57.61 (v/w) และปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ในช่วงร้อยละ 10.8-11.4 (v/w) ในการศึกษาการเติมเปลือกส้ม สามารถเติมเปลือกส้มร้อยละ 10-15 (w/w) ของน้ำหมัก ในน้ำหมัก/หรือผสมในน้ำส่าก่อนกลั่น สุราส้มสาย

น้ำผึ้งที่ได้มีกลิ่นหอมของเปลือกส้มใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยผู้ทดสอบชิมให้คะแนนความชอบอยู่ในเกณฑ์ปานกลาง การศึกษาการใช้เอนไซม์เซลลูเลส ในน้ำหมักส้มสายน้ำผึ้ง พบว่าถึงแม้ว่ามีการเติมลงไปในปริมาณสูงถึง 1500 ppm ก็ยังไม่คุ้มค่าต่อการผลิตเชิงการค้าในการที่จะเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด จากการศึกษาการใช้เอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 150 และ 200 ppm พบว่าช่วยเพิ่มปริมาณน้ำส้มคั้นได้ประมาณร้อยละ 20 แต่ไม่ได้ช่วยเพิ่มปริมาณน้ำส่าหลังหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกันไม่ได้ช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพในการหมัก ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นที่จะใช้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ในการศึกษาการเติมน้ำตาล 3 ชนิด คือ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง และกากน้ำตาล ลงในน้ำหมักส้มสายน้ำผึ้ง ได้น้ำหมักที่มีคุณภาพใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ในช่วงร้อยละ 10.1-10.9 (v/v)

ปิยะพร (2552) ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากการหมักข้าวเปลือกด้วยวิธีการบดหยาบ โดยมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนากระบวนการที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากการหมักข้าวเปลือก ซึ่งใช้ข้าวเปลือกด้อยคุณภาพเป็นวัตถุดิบหลักในการทดสอบ โดยทำเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่หมักได้จากข้าวเปลือก ซึ่งพันธุ์ข้าวเปลือกที่ใช้คือ สายพันธุ์ กข 6 โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 5 กรณี คือ 1. การเพาะข้าวเปลือกงอก 2. การอบแห้งข้าวเปลือก 3. การลดขนาดข้าวเปลือก 4. อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการหมักข้าวเปลือก และ 5. การใช้เอนไซม์แอลฟาแอมิเลส ย่อยสลายแป้งในเมล็ดข้าว เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาล จากนั้นหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ ด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ทางการค้า Fermivin PDM ผลการศึกษาพบว่า ข้าวเปลือกพันธุ์กข 6 ที่ผ่านการเพาะงอกเมล็ดข้าวเปลือก ผ่านการอบแห้งผ่านการลดขนาดด้วยวิธีการแบบบดหยาบ และการผสมเอนไซม์ในการย่อยแป้งในเมล็ดข้าวแล้วโดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 25 – 35 องศาเซลเซียส ซึ่งมีความเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากข้าวเปลือกได้ โดยเริ่มจากการนำข้าวเปลือกแช่น้ำเป็นเวลา องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง จากนั้นนำข้าวเปลือกบรรจุในกระสอบและหมักไว้นาน 24 - 36 ชั่วโมง เพื่อให้ข้าวเปลือกงอก แล้วจึงไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อหยุดกระบวนการงอกของข้าวเปลือก จากนั้นนำไปบดหยาบด้วยเครื่องบดข้าวเปลือก เติมน้ำร้อนในอัตราส่วนของน้ำต่อข้าวเปลือก 3 : 1 ส่วนในถังหมักแอลกอฮอล์ ผสมเอนไซม์แอลฟาแอมิเลสในปริมาณร้อยละ 0.04 ของน้ำหนักข้าวสาร หมักทิ้งไว้ จนกระทั่งอุณหภูมิภายในถังหมักลดลงเหลือ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเติมเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerivisiae* ทางการค้า Fermivin PDM ในปริมาณ 0.2 กรัมต่อปริมาตร ทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 - 10 วัน เมื่อสิ้นสุดการกระบวนการแล้วทำการทดสอบร้อยละแอลกอฮอล์ด้วยเครื่องอีบูลิโอมิเตอร์ (Ebulliometer) พบว่าได้ปริมาณแอลกอฮอล์เข้มข้นสูงสุดร้อยละ 7.4 โดยปริมาตร

Adeleke and Abiodun (2010) ทำการศึกษาคุณลักษณะทางเคมีฟิสิกส์ของเครื่องดื่มทางการค้าในท้องถิ่นของรัฐ Osun ประเทศไนจีเรีย โดยทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ความถ่วงจำเพาะ ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณเอทานอล และวิตามินซี พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของเครื่องดื่มทั้งหมดอยู่ในช่วง 4.2-6.3 ปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.8-11.7 ค่าความถ่วงจำเพาะพบสูงสุดใน fura da nunu (1.3180) และต่ำสุดใน ogogoro (0.9897) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.3-10.7 ส่วนปริมาณแอลกอฮอล์พบว่า Ogogoro (distilled palm wine) มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดร้อยละ 37.6 และวิตามินซีพบสูงสุดใน Adoyo เท่ากับ 32.0 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

Ocloo and Ayernor (2008) ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และชีวภาพในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ของไซรัปจากแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้ *Saccharomyces cereviseae* (baker's yeast) ทำการหมักที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน ผลการศึกษาพบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงตามความเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดทั้งหมดและแอลกอฮอล์ตลอดระยะเวลาการหมัก แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีของน้ำหมักจะมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมัก