แผนบริหารการสอนประจำบทที่ 9
ชีวเคมีในอาหารหมัก

หัวข้อเนื้อหา

1. ชีวเคมีของอาหารหมัก
2. ผลิตภัณฑ์นมหมัก
3. น้ำส้มสายชูหมัก
4. ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองหมัก
5. ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มแอลกอฮอล์
6. สรุป

วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

เมื่อผู้เรียนศึกษาบทเรียนนี้แล้วสามารถ

1. อธิบายกลไกการหมักทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจนได้
2. เข้าใจหลักการหมักด้วยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์
3. นำความรู้มาจัดการเรียนการสอนเพื่อแปรรูปผลิตภัณฑ์ด้วยกระบวนการหมักได้

วิธีสอนและกิจกรรมการเรียนการสอน

1. วิธีสอน

1.1 วิธีสอนแบบบรรยายให้ความรู้ทางชีวเคมีของกระบวนการหมัก การใช้จุลินทรีย์เพื่อการหมักต่าง ๆ ขั้นตอนการหมักนม ซีอิ๊ว น้ำส้มสายชู และผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มแอลกอฮฮล์

1.2 อภิปรายสรุปประเด็นสำคัญที่เกี่ยวกับชีวเคมีของการหมัก ประโยชน์ของผลิตภัณฑ์หมัก

2. กิจกรรมการเรียนการสอน

2.1 แสดงตัวอย่าง การประยุกต์ใช้ความรู้ทางชีวเคมีในชีวิตประจำวันและยกตัวอย่างงานวิจัยพร้อมทั้งนักชีวเคมีที่มีชื่อเสียงของไทย

2.2 การปฏิบัติการหมักผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ การหมักโยเกิร์ต น้ำส้มสายชู และการหมักแอลกอฮอล์

2.3 ออกแบบแผนการจัดการเรียนรู้เรื่องอาหารหมักท้องถิ่นสำหรับผู้เรียนระดับชั้นต่าง ๆ

สื่อการเรียนการสอน

1. เครื่องคอมพิวเตอร์และอินเทอร์เน็ต
2. เพาเวอร์พอยต์พรีเซนเตชัน เรื่องชีวเคมีในอาหารหมัก
3. สำเนาเอกสารคำสอนรายวิชาชีวเคมีประยุกต์
4. ห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์การปฏิบัติการหมักทางชีวภาพ

การวัดผลและการประเมินผล

1. สังเกตการตอบคำถามในชั้นเรียน
2. สังเกตจากการอภิปรายโต้ตอบ ซักถาม และการแสดงความคิดเห็น
3. สังเกตพฤติกรรมความกระตือรือร้นในการร่วมกิจกรรม
4. ประเมินคุณภาพของงานที่มอบหมาย

บทที่ 9
ชีวเคมีในอาหารหมัก

กระบวนการหมักอาหารถือเป็นวิถีชีวิตและวัฒนธรรมของมนุษย์ในทั่วทุกภูมิภาคของโลก มนุษย์ในยุคโบราณอาจได้วิธีการหมักอาหารมาจากความบังเอิญและความยากลำบากในการแสวงหาอาหารที่บีบบังคับให้รับประทานอาหารที่หมักโดยธรรมชาติ ในขณะที่ปัจจุบันเรามุ่งเน้นการหมักอาหารเพื่อกลิ่นรส เนื้อสัมผัส คุณค่าทางอาหาร และประโยชน์ต่อสุขภาพ การหมักอาหารโดยวิถีพื้นบ้านจะใช้จุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่ปะปนอยู่ในวัตถุดิบแต่อาจผ่านการคัดเลือกตามธรรมชาติ โดยการกำหนดส่วนผสมของวัตถุดิบและการสร้างสภาพแวดล้อมการหมักด้วยภูมิปัญญาท้องถิ่นที่สืบต่อกันมา ในขณะที่อาหารหมักที่มีการผลิตแบบอุตสาหกรรมจะมีการควบคุมกระบวนการผลิตทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ เช่น การควบคุมอุณหภูมิ ระยะเวลาการหมัก ปริมาณสารอาหาร การควบคุมความเป็นกรดด่าง และจำเป็นจะต้องใช้จุลินทรีย์ที่ทราบสายพันธุ์และปริมาณชัดเจน เพื่อให้คุณภาพของอาหารหมักที่ออกจำหน่ายมีความคงที่และปลอดภัย

ปฏิกิริยาชีวเคมีของการหมัก

อาหารหมักเป็นวิธีการถนอมอาหารที่มีอายุเก่าแก่หลายหมื่นปี โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเก็บรักษาอาหารไว้รับประทานให้ได้นาน ซึ่งเกิดจากการที่จุลินทรีย์หรือเอนไซม์ในอาหารทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการหมัก เกิดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น ย่อยง่าย รสชาติดี และมีความปลอดภัยมากขึ้น จุลินทรีย์ชนิดหลักที่เกี่ยวข้องกับการหมักมี 3 ชนิดคือ แบคทีเรีย ยีสต์และรา ซึ่งแตกต่างกันตามชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก และผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ต้องการ (วิธู ชูศรี, 2558 : 1-8 และ อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2558 : 6-8)

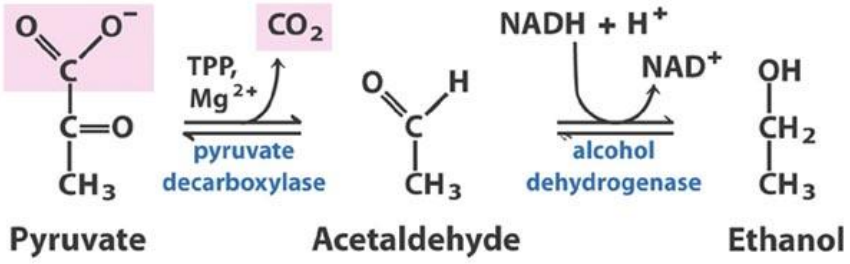
1. การหมัก

การหมัก (fermentation) มาจากภาษาละตินคือ *fervere* หมายถึง "เดือด" เป็นกระบวนทางชีวเคมีภายในเซลล์ เพื่อสร้างพลังงานจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ด้วยเอนไซม์ โดยมีสารอินทรีย์เป็นทั้งตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่งต่างจากการหายใจแบบใช้ออกซิเจนที่ใช้ออกซิเจนที่เป็นสารอนินทรีย์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย แต่เดิมคำว่าการหมักใช้อธิบายลักษณะที่เกิดจากการทำงานของยีสต์ในน้ำผลไม้ เนื่องจากยีสต์ย่อยสลายน้ำตาลในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนจึงเกิดฟองแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ผุดขึ้นมาเหมือนน้ำเดือด คำว่าการหมักเริ่มใช้ครั้งแรกเมื่อราวปลายคริสต์ศตวรรษที่ 14 แต่เริ่มใช้ในความหมายปัจจุบันเมื่อราวคริสต์ศตวรรษที่ 16 โดยผลิตภัณฑ์อาหารหมักหมายถึงกลุ่มของอาหารที่

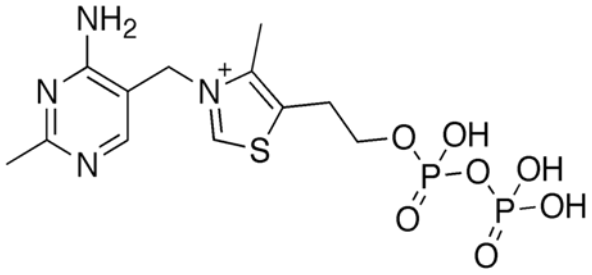
มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีและกายภาพของอาหารนั้นด้วยกิจกรรมของจุลินทรีย์ในอาหาร ส่วนใหญ่เป็นการผลิตกรด แอลกอฮอล์ และสารให้กลิ่นรส หรือทำให้เกิดสภาวะที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค หรือจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ โดยกรดไพรูวิก (pyruvic acid) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของน้ำตาลกลูโคสผ่านวิถีไกลโคลิซิส (glycolysis) จะทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก และมีการแบ่งการหมักออกเป็น 2 ประเภท ตามลักษณะของปฏิกิริยาทางชีวเคมี คือ กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ และกระบวนการหมักกรดแลคติก (Prescott *et al*., 2004 : 7-9 and Stanbury *et al*., 2016 : 1-2)

1.1 การหมักแอลกอฮอล์

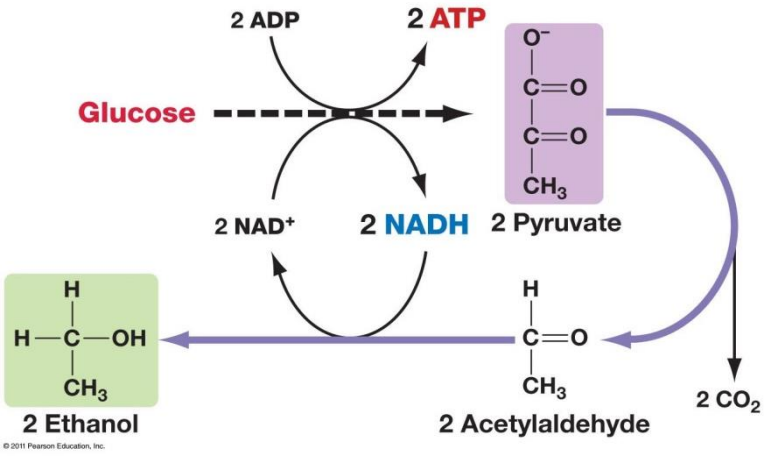
กระบวนการหมักแอลกอฮอล์เป็นหนึ่งในเส้นทางที่กรดไพรูวิกที่มาจากวิถีไกลโคไลซิสจะถูกเมแทบอลไลต์ต่อ ปฏิกิริยาแรกในการเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นเอทานอลเริ่มต้นจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ลดจำนวนคาร์บอนของสารตั้งต้นโดยกำจัดออกไปในรูปก๊าซคาร์บอนด์ไดออกไซด์ ปฏิกิริยานี้เร่งโดยเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส (pyruvate decarboxylase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) (ภาพประกอบ 9.1) ทั้งนี้เอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสจะต้องใช้ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) และไทอามีนไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate; TPP) เป็นโคแฟกเตอร์ คาร์บอนอะตอมที่อยู่ระหว่าง N และ S ในวงแหวนไทแอโซล (thaizole) ของ TPP นั้นมีความไวต่อปฏิกิริยามาก (ภาพประกอบ 9.2) ซึ่งสามารถเกิดเป็นคาร์บอนประจุบหรือเรียกว่าคาร์แบนไอออน (carbanion) ได้ง่าย คาร์แบนไอออนนี้สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอนิล (CHO) ของไพรูเวตและปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนด์ไดออกไซด์ออกมา ทิ้งโมเลกุลส่วนที่เหลือซึ่งมีคาร์บอน 2 อะตอมให้เชื่อมโยงกับ TPP ด้วยพันธะโคเวเลนต์ จากนั้นจะมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนภายในโมเลกุลสารมัธยันตร์นี้ และปลดปล่อยส่วนของโมเลกุลที่มีคาร์บอน 2 อะตอมออกจาก TPP ในรูปแบบของแอซีทัลดีไฮด์ บางครั้งเรียกส่วนที่มีคาร์บอน 2 อะตอม ที่จับอยู่กับ TPP นี้ว่าแอซิทัลดีไฮด์ที่ถูกกระตุ้น (activated aldehyde) (คณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2554 : 510-512) ก๊าซคาร์บอนด์ไดออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นในปฏิกิริยาข้างต้นนี้ เป็นสาเหตุทำให้เกิดฟองในเบียร์และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์บางชนิด แอซิทัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นจะถูกรีดิวซ์โดย NADH ที่มาจากวิถีไกลโคไลซิสได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทานอลและ NAD^+ (Boulton and Quain, 2006 : 72-81) ปฏิกิริยาแสดงดังภาพประกอบ 9.3



ภาพประกอบ 9.1 ไพรูเวตถูกเปลี่ยนไปเป็นแอซิทัลดีไฮด์ โดยเอมไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส
ที่มา : Engle (2010)



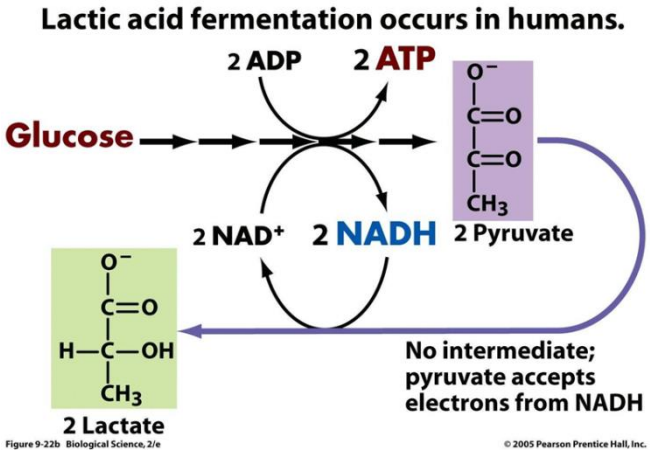
ภาพประกอบ 9.2 ไทอามีนไพโรฟอสเฟต (TPP) ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ในรูปที่พร้อมทำงาน
ที่มา : Pescarmona (2014)



ภาพประกอบ 9.3 ปฏิกิริยารวมของกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ในยีสต์
ที่มา : Engle (2010)

1.2 การหมักกรดแลคติก

การหมักกรดแลคติกเกิดในเซลล์กล้ามเนื้อของสัตว์ชั้นสูงในขณะที่มีการออกกำลังกายอย่างรุนแรงจนการหายใจนำออกซิเจนไปสู่เซลล์กล้ามเนื้อไม่เพียงพอ กรดแลคติกที่เกิดขึ้นส่งผลให้กล้ามเนื้อของมนุษย์ทำให้เกิดการล้าและปวดเมื่อยของกล้ามเนื้อ ร่างกายมีวิธีกำจัดกรดแลคติกโดยส่งไปตามกระแสเลือดแล้วเปลี่ยนกลับให้เป็นกลูโคสด้วยกระบวนการกลูโคนีโอจิเนซิส (gluconeogenesis) ในตับ (คณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2554 : 508) นอกจากนี้ยังพบการหมักกรดแลคติกในแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* ที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ซึ่งใช้ประโยชน์ในการหมักนมเปรี้ยวและโยเกิร์ต ปฏิกิริยาเกิดขึ้นโดยไพรูเวตจะถูกรีดิวซ์ด้วย NADH โดยอาศัยเอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) ในผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติก (Mozzi *et al*., 2015 : 3-6) ปฏิกิริยาแสดงดังภาพประกอบ 9.4



ภาพประกอบ 9.4 การสังเคราะห์กรดแลคติกโดยเอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนส
ที่มา : Engle (2010)

2. สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในการหมัก

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์เป็นตัวแปรสำคัญในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตภัณฑ์การหมักที่มีคุณภาพตรงตามที่ต้องการ การใช้วัตถุดิบและจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันจะให้ผลิตภัณฑ์มีรูปแบบที่หลากหลายต่าง ๆ กันไป นอกจากนี้ยังปัจจัยประกอบอื่น เช่น อาหารของจุลินทรีย์ และสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม สายจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก มีดังนี้ (Prescott *et al*., 2004 : 29-31 ; Mozzi *et al*., 2015 : 9-14 and Ojha *et al*., 2016 : 1-5)

2.1 แบคทีเรียในสกุลบาซิลัส (*Bacillus spp.*) สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส (protease) เพื่อย่อยโปรตีน และทำให้เกิดกลิ่นรสต่าง ๆ ในผลิตภัณฑ์หมัก เช่น *Bacillus subtilis* สำหรับใช้ในการหมักถั่วนัตโตะ (natto)

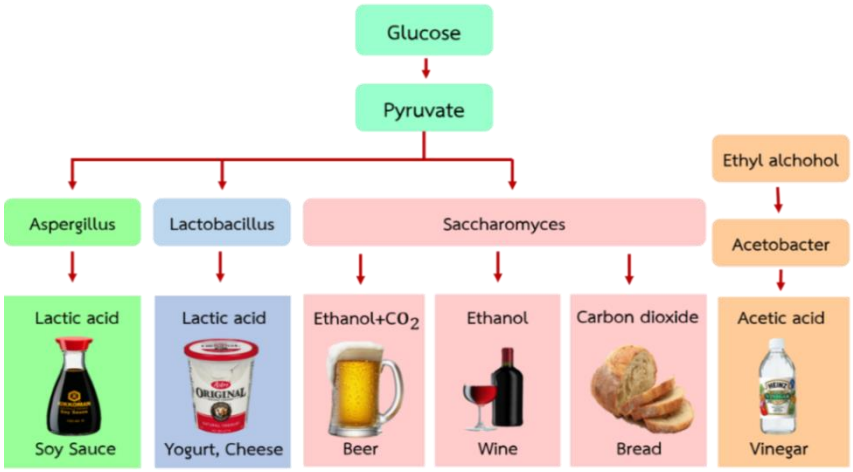
2.2 แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus spp*. ซึ่งต้องการน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่ม homo-fermentative โดยจะหมักน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกเพียงชนิดเดียว และกลุ่ม hetero-fermentative ที่สามารถผลิตกรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กลีเซอรอล แอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในการผลิตภัณฑ์ผัก เนื้อและนมหมัก

2.3 แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก (acetic acid bacteria) ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Acetobacter spp*. ทำหน้าที่แปรสภาพหรือเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก จึงมีความสำคัญในการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก

2.4 เชื้อรา เช่น อุตสาหกรรมผลิตกรดอินทรีย์ อุตสาหกรรมผลิตอาหาร ตัวอย่างของราที่ใช้ในการหมัก ได้แก่ *Actinomucor spp*. หรือ *Mucor spp*. ใช้ในการหมักเต้าหู้ยี้ *Monascus spp*. ใช้ในการผลิตข้าวแดงหรืออังคัก (Ang - kak) คือให้เชื้อราเจริญและสร้างสีแดงบนข้าวสุก และ *Rhizopus spp*. ใช้ในการผลิตข้าวหมากโดยใช้ราเปลี่ยนข้าวเหนียวสุกให้เป็นน้ำตาล

2.5 ยีสต์ ได้แก่ ยีสต์สกุล *Saccharomyces spp*. และ *Candida spp*. มีคุณสมบัติในการหมักน้ำตาล โดยจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae*

ในปัจจัยด้านสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์จะต้องมีหรือต้องเตรียมให้มีสารอินทรีย์ที่จะเป็นเป้าหมายหรือซับสเตรต (substrate) ของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเพื่อเปลี่ยนเป็นสารที่ต้องการ นอกจากนี้จะต้องมีสารอาหารหลักที่จุลินทรีย์ใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับดำเนินกิจกรรมการหมักของเซลล์ ได้แก่ สารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน สารอาหารอื่น ๆ ซึ่งมีความจำเป็นต่อกิจกรรมการหมักของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสภาวะแวดล้อมการหมักที่สำคัญ ได้แก่ อากาศ ความชื้น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และสารยับยั้งการเจริญ ซึ่งจะต้องควบคุมให้เหมาะสมจุลินทรีย์แต่ละชนิด (จารุวรรณ มณีศรี, 2551 : 40-45 ; วิธู ชูศรี, 2558 : 13-35 และ อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2558 : 94-103)



ภาพประกอบ 9.5 ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ได้จากกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ
ที่มา : ภาพโดย วรวัฒน์ พรหมเด่น (2560)

ผลิตภัณฑ์นมหมัก

ผลิตภัณฑ์นมหมัก (cultured dairy product) ถือได้ว่าเป็นอาหารหมักที่เก่าแก่ที่สุดที่มีมานานนับพันปี นมดิบที่นำมาหมักจะได้มาจากวัวหรือแพะที่เลี้ยงไว้แล้วนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการหมัก โดยแบคทีเรียแลคติก ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะคล้ายโยเกิร์ตในปัจจุบัน นมนั้นถือได้ว่าเป็นอาหารที่อุดมสมบูรณ์เป็นแหล่งของสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก องค์ประกอบของน้ำนมแสดงดังตาราง 9.1 มีค่ากิจกรรมของน้ำ (water activity; A_W) มากกว่า 0.95 และมีค่า pH ประมาณ 6.6–6.7 (จารุวรรณ มณีศรี, 2551 : 52-53 และ นิธิยา รัตนาปนนท์, 2557 : 17-24)

ตาราง 9.1 องค์ประกอบต่าง ๆ ในน้ำนมดิบ

องค์ประกอบในน้ำนม	ร้อยละ
น้ำ	87.3
แล็กโทส	4.80
ไขมัน	3.70
เคซีน	2.80
โปรตีนเวย์	0.60
เถ้า	0.70

ที่มา : ดัดแปลงจาก Mistry (2001 : 416)

1. จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์นมหมัก

หัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น (starter culture) เป็นปัจจัยสำคัญของกระบวนการผลิตนมหมัก ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายจีนัส ดังนี้ (บุษกร อุตรภิชาติ, 2550 : 26 และ ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และ สุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, 2560 : 275)

1.1 *Streptococcus* sp. เป็นแบคทีเรียแลคติกแกรมบวก รูปกลม มักมีการจัดเรียงตัวกันเป็นสาย ในจีนัสนี้ส่วนใหญ่จะนิยมใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นในการผลิตเนยแข็งและผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดอื่น ๆ เช่น *S. lactis* ssp. *lactis* *S. lactis* ssp. *cremoris* และ *S. thermophilus*

1.2 *Leuconostoc* sp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น คือ *L. mesenteroides* ssp. *cremoris* และ *L. mesenteroides* ssp. *dextranicum* ซึ่งมักนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตเนยแข็ง

1.3 *Lactobacillu* ssp. เป็นแบคทีเรียแลคติกแกรมบวก รูปท่อน ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามประเภทของการหมัก คือ homofermentative และ heterofermentative โดยกลุ่ม homofermentative ที่ใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น ได้แก่ *L. Delbrueckii* ssp. *lactis, L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus, L. acidophilus* และ *L. helveticus* ส่วนกลุ่มที่เป็น heterofermentative ได้แก่ *L. casei* ssp. *Casei* และ *L. plantarum*

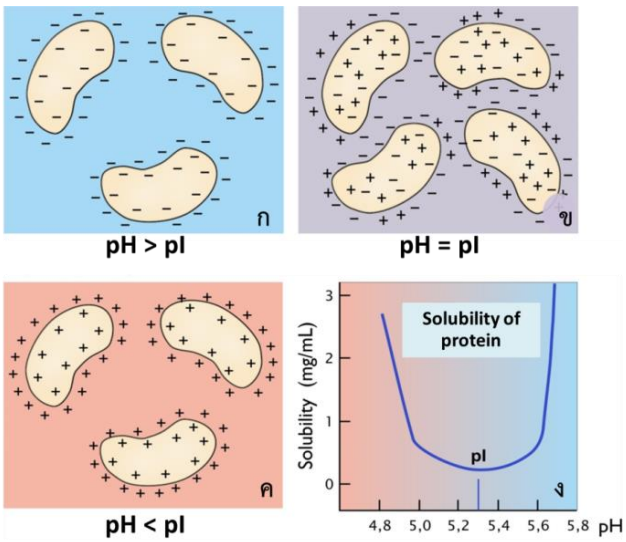
1.4 *Bifidobacterium* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน มักจะต่อกันเป็นกิ่งก้าน จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่มไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobe) อยู่ใน family actinomycetaceae แบคทีเรียถูกค้นพบครั้งแรกโดย Henry Tissier ในปี ค.ศ.1990 โดยแยกได้จากอุจจาระของเด็กทารก ปัจจุบันแบคทีเรียจีนัสนี้ถูกจัดให้เป็นโพรไบโอติกหรือแบคทีเรียสุขภาพ ซึ่งผู้ผลิตมักจะนำไปเติมในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น โยเกิร์ต หรือ นมผงสำหรับเด็กทารก เป็นต้น

สายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกจะมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์นมหมักนั้นมีคุณลักษณะและสมบัติที่แตกต่างกันไป ชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมักนม ดังแสดงดังตาราง 9.2 หน้าที่โดยทั่วไปของแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการหมักนม คือแบคทีเรียแลกติกจะหมักน้ำตาลแล็กโทสให้กลายเป็นกรดแลกติก ทำให้ pH ของน้ำนมมีค่าลดลงจนถึงจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point; pI) ส่งผลให้โปรตีนเคซีนซึ่งเป็นโปรตีนหลักในนมเกิดการตกตะกอน อันเกิดจากประจุของกรดอะมิโนที่ประกอบกับเป็นโปรตีนเคซีนมีประจุสุทธิรวมกันเป็นศูนย์ ดังแสดงในภาพประกอบ 9.6 (บุษกร อุตรภิชาติ, 2550 : 27 ; จารุวรรณ มณีศรี, 2551 : 54 และ วิธู ชูศรี, 2558 : 73-75)

ตาราง 9.2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตนมหมักชนิดต่าง ๆ

ผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดต่าง ๆ	**จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในกระบวนการผลิต**
Acidophilus milk (นมเปรี้ยว)	*Lactobacillus acidophilus*
Buttermilk (นมหมักที่ขึ้นในระหว่างการแยกเนย)	*Lactobacillus lactis* ssp. *cremoris* *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis, Leuconostoclactis* *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar.*diacetylactis* *Leuconostoc mesenteroides* ssp.*dextranicum*
Kefir (นมหมักที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ประมาณ 2% ทำจากนมแพะ ควาย หรือ วัว)	*Lactobacillus lactis* ssp. *cremoris* *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* *Lactobacillus helveticus, Lactobacillus kefir* *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* *Lactobacillus casei, Candida kefir* *Lactobacillus brevis, Acetobacter aceti* *Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc dextranicum* *Kluyveromyces marxianus* ssp. *marxianus* *Saccharomyces cerevisiae, Torulospora delbrueckii*
kumiss (ลักษณะคล้ายกับ kefir แต่เป็นนมม้า)	*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* *Lactobacillus kefir, Lactobacillus lactis* *Acetobacteraceti, Mycoderma* sp. *Saccharomyces cartilaginosus, Saccharomyces lactis*
yogurt (โยเกิร์ต)	*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* *Strptococcus salivariu* ssp. *Thermophiles*
sour cream (คล้ายกับ buttermilk แต่จะมีปริมาณของไขมันนมในครีม ตั้งแต่ 18-20%)	*Lactobacillus lactis* ssp. *Cremoris, Leuconostoclactis* *Lactococcuslactis* ssp. *lactis* *Leuconostocmesenteroides* ssp. *Dextranicum*

ที่มา : ดัดแปลงจาก Robert (2006 : 113)



ภาพประกอบ 9.6 แสดงคุณสมบัติประจุของโปรตีนที่ค่า pH ต่าง ๆ (ก) เมื่อค่า pH ของระบบสูงกว่าค่า pI โมเลกุลโปรตีนจะแสดงประจุลบ (ข) เมื่อค่า pH ของระบบเท่ากับค่า pI โมเลกุลโปรตีนจะแสดงประจุลบและประจุบวกเท่ากัน ทำให้ประจุสุทธิเป็นศูนย์ (ค) เมื่อค่า pH ของระบบต่ำกว่าค่า pI โมเลกุลโปรตีนจะแสดงประจุบวก (ง) ค่าความสามารถในการละลายของโปรตีน ที่ pH ต่าง ๆ ที่จุด pH = pI ประจุรวมสุทธิของโปรตีนจะมีค่าเป็นศูนย์ จึงเกิดการรวมตัวกัน (aggregate) แล้วตกตะกอน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Pearson Canada. Inc. (2013)

2. การหมักนมเปรี้ยว

นมเปรี้ยว หรือ โยเกิร์ต (yoghurt) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนมชนิดต่าง ๆ เช่น นมสด นมพร่องมันเนย หรือ นมถั่วเหลือง โดยการใช้แบคทีเรียแลคโตบาซิลัส เอซิโดซิส และสเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลลัส เป็นหลักใส่ลงไปหมักผลิตภัณฑ์นมต่าง ๆ แบคทีเรียเหล่านี้ช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตสในนมให้เป็นกรดแลคติก ทำให้มีภาวะกรดและมีรสเปรี้ยวโดยมีความเป็นกรด-เบสอยู่ระหว่าง 3.8-4.6 นมเปรี้ยว มี 2 ชนิด คือ ชนิดแรกเป็นนมเปรี้ยวที่มีลักษณะเป็นน้ำคล้ายเครื่องดื่ม อีกชนิดหนึ่งเป็นนมเปรี้ยวที่มีลักษณะเหลวข้นที่เรียกว่า โยเกิร์ต (จารุวรรณ มณีศรี, 2551 : 55-56)

โดยทั่วไปการผลิตโยเกิร์ตจะเริ่มจากการทำลายจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำนมด้วยความร้อนโดยการพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization) อาจทำได้ 2 วิธี คือ ใช้อุณหภูมิ 62.8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือใช้อุณหภูมิ 77 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ซึ่งสามารถทำลายจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในน้ำนม เช่น ยีสต์ ราและแบคทีเรียที่ไม่ทนร้อน แต่ไม่สามารถทำลายแบคทีเรียที่ทนความร้อนสูง และสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดได้ เมื่อให้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อจนครบระยะเวลาแล้วทำการ

ลดอุณหภูมิมาที่ 45 องศาเซลเซียสจากนั้นใส่หัวเชื้อหรือกล้าเชื้อ (starter culture) โดยใช้แบคทีเรียในกลุ่ม LAB 2 ชนิด คือ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus และ *Streptococcus thermophilus* จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 42 – 45 องศาเซลเซียส เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตเป็นเวลา 4-7 ชั่วโมง ในการผลิตโยเกิร์ตนั้นจะใช้เชื้อแบคทีเรียสองชนิดร่วมกันทำให้ผลิตโยเกิร์ตได้เร็วขึ้น มีกลิ่นและรสชาติดีกว่าใช้เชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว เนื่องจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้จะทำงานเสริมซึ่งกันและกัน (synergy) อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดและสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาเป็นหัวเชื้อจะมีผลต่อรสชาติและกลิ่น รวมทั้งเนื้อสัมผัส ของโยเกิร์ต ซึ่งจะแตกต่างกันในแต่ละยี่ห้อที่ผลิตออกมาขาย และอาจมีการเติมแบคทีเรียชนิดอื่นลงไปด้วย เช่น *Bifidobacterium* spp. (สุนัดดา โยมญาติ, 2557)

น้ำส้มสายชูหมัก

น้ำส้มสายชู (vinegar) เป็นของเหลวที่ได้จากกระบวนการหมักโดยมีองค์ประกอบหลักคือกรดอะซิติก (acetic acid) ประมาณ 4-8 เปอร์เซ็นต์ น้ำส้มสายชูหมักโดยธรรมชาติยังมีกรดชนิดอื่น ๆ ในปริมาณเล็กน้อย เช่นกรดทาร์ทาริก (tartaric acid) และกรดซิตริก (citric acid) มนุษย์รู้จักการผลิตและใช้น้ำส้มสายชูมาตั้งแต่สมัยโบราณ น้ำส้มสายชูเป็นองค์ประกอบสำคัญของอาหารยุโรป อาหารเอเชีย และตำรับอาหารอื่น ๆ และยังสามารถนำมาใช้ทำความสะอาดในครัวเรือนได้ (จารุวรรณ มณีศรี, 2551 : 68-69 และ วิธู ชูศรี, 2558 : 271-273)

1. หลักการของกระบวนการหมักน้ำส้มสายชู

การหมักน้ำส้มสายชูประกอบด้วย 2 กระบวนการต่อเนื่องกันคือกระบวนการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ (ethanolic fermentation) โดยใช้เชื้อยีสต์ในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) และตามด้วยกระบวนการออกซิเดชันของแอลกอฮอล์เพื่อให้ได้กรดอะซิติก (acetogenic fermentation) ด้วยเชื้อแบคทีเรียอะซิติก (acetic acid bacteria) ในสภาวะที่มีออกซิเจน (anaerobic condition) ดังนั้นในอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะซิติกจึงมุ่งเน้นไปที่เทคโนโลยีที่จะเพิ่มปริมาณออกซิเจนในกระบวนการหมักเพื่อให้แบคทีเรียอะซิติกผลิตกรดน้ำส้มได้ปริมาณมาก (Saichana *et al*., 2015 : 1260-1271 and Stanbury *et al*., 2016 : 243-244)

2. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักน้ำส้มสายชู

จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดอะซิติกจะเป็นแบคทีเรีย ซึ่งมีแบคทีเรีย 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือกลุ่มแบคทีเรียอะซิโตเจน (acetogen) ได้แก่แบคทีเรียในจีนัส *Clostridium Eubacterium Acetobacterium* และ *Peptostreptococcus* แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะผลิตกรดอะซิติกจากกระบวนการหมักโดยไม่ใช้ออกซิเจน โดยเริ่มจากการสังเคราะห์อะซิติลโคเอจากคาร์บอนไดออกไซด์

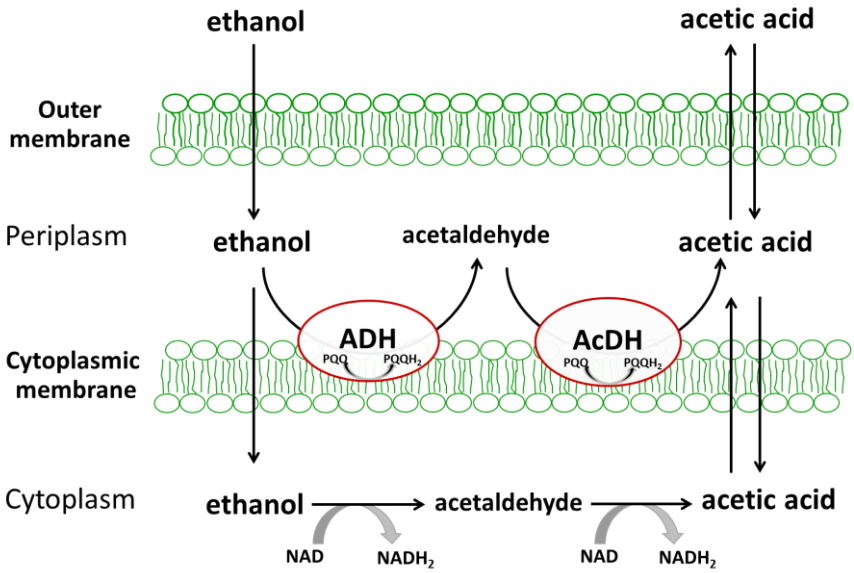
2 โมเลกุล และไฮโดรเจน 2 โมเลกุล และกลุ่มที่สองคือกลุ่มแบคทีเรียอะซิติก (acetic acid bacteria) ที่ผลิตกรดอะซิติกจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอทานอล จะใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน คาร์บอนจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกในสภาวะที่มีออกซิเจน เรียกวิถีนี้ว่าวิถีการออกซิเดชันของเอทานอล (ethanol oxidation pathway) แบคทีเรียในกลุ่มนี้มี 4 จีนัส คือ *Acetobacter, Gluconobacter, Gluconoacetobacter และ Acidomonas* และในปัจจุบันมีงานวิจัยพบว่ามีเพิ่มมาอีก 1 จีนัสคือ *Asaia* แต่ออกซิไดซ์เอทานอลได้ไม่ดีนัก (Saichana *et al*., 2015 : 1260-1271 and Stanbury *et al*., 2016 : 245-246)

3. เมแทบอลิซึมในกระบวนการหมักน้ำส้มสายชู

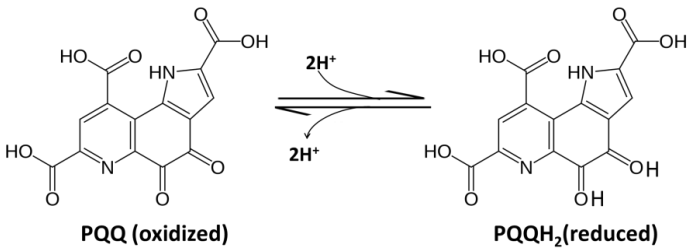
ในวิถีการออกซิเดชันของเอทานอลในแบคทีเรียอะซิติก โดยเฉพาะในแบคทีเรียชนิด *Acetobacteraceti* ที่ส่วนใหญ่จะนำมาใช้ในการผลิตกรดอะซิติกเป็นหลัก จะประกอบด้วยปฏิกิริยา 2 ขั้นตอนและเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ 2 ชนิด (ภาพประกอบ 9.7) ในปฏิกิริยาแรกเอทานอลจะถูกออกซิไดซ์ได้เป็นสารตัวกลาง (intermediate) คือ อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) โดยการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส (alcohol dehydrogenase; ADH) และปฏิกิริยาที่สองอะซีทัล-ดีไฮด์จะถูกออกซิไดซ์เป็นกรดอะซิติก โดยการทำงานของเอนไซม์อะซีทัลดีไฮด์ดีไฮโดรจิเนส (acetaldehyde dehydrogenase; AcDH) ทั้ง ADH และ AcDH เป็นเอนไซม์ที่อยู่ที่บนเยื่อหุ้มเซลล์ด้านใน (cytoplasmic membrane) ของเซลล์แบคทีเรีย และทั้งสองเอนไซม์นี้มีไพโรโลควิโนลีนควิ-โนน (pyrroloquionlinquinone ; PQQ) เป็น โคเอนไซม์โดยอยู่เป็นหมู่พรอสเทติก (prosthetic group) ของโมเลกุลเอนไซม์ (ภาพประกอบ 9.8) มีทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรกในระหว่างการเกิดออกซิเดชันและทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนไปสู่ไซโทโครม (cytochrome) ในห่วงโซ่การขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) (Robert, 2006 : 401-402 and Stanbury *et al*., 2016 : 245-246)

ชีวเคมีของกระบวนการหมักกรดอะซิติกจะต่างจากกระบวนการหมักกรดแลคติกและการหมักแอลกอฮอล์ เนื่องจากการหมักกรดอะซิติกจะเกิดในสภาวะที่มีออกซิเจนอย่างแท้ จริง และเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียอะซิติกจะเกิดที่เพอริพลาซึม (periplasm หรือ periplasmic space) ซึ่งเป็นช่องระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) กับเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (cytoplasmic membrane) โดยพลังงานหรือ ATP ที่เกิดขึ้นจะไม่ได้มาจากกระบวนการฟอสฟอรีเลชันระดับซับสเตรต (substrate-level phosphorylation) ซึ่งเป็นการสร้าง ATP จากซับสเตรตพลังงานสูง แต่จะได้จากกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอรีเลชัน (oxidative phosphorylation) ซึ่ง ATP ที่ได้จากกระบวนการนี้จะเกิดปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน ดังแสดงในภาพประกอบ 9.9 โดยที่ห่วงโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) จะมี NADH และ FADH ทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอนไปสู่ออกซิเจนที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย และการสังเคราะห์ ATP จะเกิดขึ้นโดยปฏิกิริยา

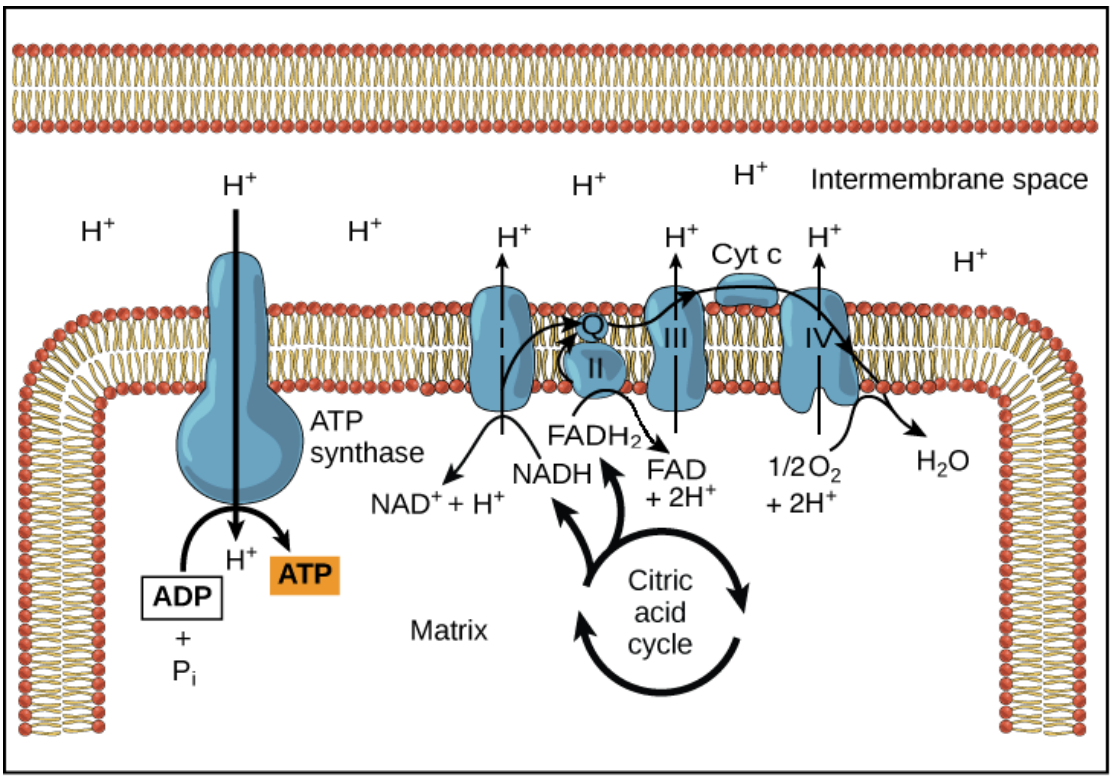
ระหว่าง ADP กับฟอสเฟต (Pi) ได้เป็น ATP (Robert, 2006 : 401-409 and Stanbury *et al*., 2016 : 248-249) มักพบว่ากระบวนการหมักกรดอะซิติกไม่ค่อยมีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ มากนัก เนื่องจากผลผลิตที่ได้จะมีทั้งเอทานอลและกรดอะซิติก อย่างไรก็ตามหากเกิดเอทานอลหรือกรดอะซิติกในปริมาณสูงก็จะเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรียอะซิติก รวมทั้งจุลินทรีย์อื่น ๆ ด้วย ดังนั้นสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการหมักกรดอะซิติกจึงต้องเป็นสายพันธุ์ที่ต้องทนต่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกได้ดี และสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีค่า pH ต่ำ (วิธู ชูศรี, 2558 : 274-279)



ภาพประกอบ 9.7 แสดงวิถีการเกิดออกซิเดชันของเอทานอลใน *Acetobacter aceti*
ที่มา : ดัดแปลงจาก Robert (2006 : 408)



ภาพประกอบ 9.8 PQQ เป็นหมู่พรอสเทติกในโมเลกุลเอนไซม์โดย ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์
ที่มา : ภาพโดย วรวัฒน์ พรหมเด่น (2560)



ภาพประกอบ 9.9 แสดงการสร้าง ATP จากกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน (oxidative phosphorylation) ที่ประกอบด้วยการปฏิกิริยาลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) และการสังเคราะห์ ATP

ที่มา : OpenStax College (n.d.)

ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองหมัก

อาหารจากธัญญพืชหมักเป็นภูมิปัญญาของคนในเอเชียตะวันออก (จีนและญี่ปุ่น) ที่แพร่หลายไปทั่วภูมิภาคเอเชีย นอกจากมีถั่วหลืองเป็นส่วนประกอบหลักแล้ว อาจมีข้าวเจ้าหรือข้าวสาลีเป็นส่วนผสมในการหมักด้วย เช่น ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว มิโซะ เป็นต้น ในกระบวนการหมักจำเป็นจะต้องมีหัวเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น (starter) ที่เรียกว่า โคจิ (koji) ซึ่งเป็นก้อนข้าวสุกที่คลุกเคล้ากับเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus aryzae* (บุษกร อุตรภิชาติ, 2550 : 315 และ พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.)

1. การผลิตซอสถั่วเหลือง

กระบวนการหมักซอสถั่วเหลือง มี 3 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นโคจิ (koji) ขั้นโมโรมิ (moromi) และขั้นตอนการการแยกกากและปรับปรุงคุณภาพ (จารุวรรณ มณีศรี, 2551 :132-135 ; วิธู ชูศรี, 2558 : 290-298 และ ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และ สุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, 2560 : 42-51)

1.1 ขั้นโคจิ

คำว่า โคจิ มาจากคำภาษาญี่ปุ่นที่มีความหมายว่า “ข้าวขึ้นรา” หรือ “moldy grain” ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการการหมักอาหารประเภทถั่วเหลือง เช่น เต้าเจี้ยวหรือมิโซะ ซีอิ้ว นอกจากนั้นยังใช้กับกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลในข้าว ธัญพืช และมันฝรั่งในการทำเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เหล้าสาเกหรือไวน์ข้าว เชื้อโคจิเป็นแหล่งของเอนไซม์จากเชื้อราที่จำเป็นต่อการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบซึ่งเป็นของแข็งที่มีองค์ประกอบซับซ้อนและไม่สามารถย่อยได้ เช่น อะไมเลส โปรตีนและเพปไทด์ ลิพิด เซลลูโลส เพคติน เป็นต้น ให้กลายเป็นของเหลวที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนและง่ายต่อการย่อยด้วยจุลินทรีย์อื่น ๆ ต่อไป (ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และ สุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, 2560 : 39-40)

การผลิตซอสถั่วเหลืองหรือโชยุ (shoyu) ของญี่ปุ่นแบบดั้งเดิมจะเริ่มจากการเตรียมวัตถุดิบและการเตรียมโคจิ ก่อนนำมาผสมกันเพื่อเริ่มกระบวนการหมัก (ภาพประกอบ 9.10) วัตถุดิบในการทำซอสถั่วเหลืองจะเป็นถั่วเหลืองแบบเต็มเมล็ดหรือกากถั่วเหลืองก็ได้ แต่จะนิยมใช้ถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว เพื่อให้ได้ผลผลิตมากขึ้นและลดระยะเวลาการหมักลงด้วย ขั้นตอนการเตรียมถั่วเหลืองจะเริ่มจากการล้าง คัดเลือกสิ่งปนเปื้อนออกและแช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน โดยต้องเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 2-3 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเน่าเสียจากจุลินทรีย์อื่น ๆ จากนั้นให้ความร้อนด้วยไอน้ำภายใต้ความดันและทำให้เย็นตัวลงอย่างรวดเร็ว ถ้ามีเมล็ดข้าวสาลีเป็นส่วนผสมด้วยจะต้องคั่วเมล็ดข้าวสาลีให้เหลืองหอมก่อนแล้วนำไปบดให้ละเอียด อัตราส่วนของถั่วเหลืองต่อข้าวสาลีจะอยู่ในช่วง 50:50 ถึง 67:33 ขึ้นอยู่กับความพอใจของผู้ผลิต ซึ่งข้าวสาลีคั่วที่ใส่ลงไปจะมีหน้าที่ช่วยเพิ่มกลิ่นรสและสีให้แก่ซอสถั่วเหลือง สามารถช่วยลดความชื้นในส่วนผสมทำให้ไม่เกิดการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนต่าง ๆ ที่ไม่ต้องการ ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อราในโคจิ และช่วยเพิ่มปริมาณของกรดกลูตามิกที่เป็นรสอร่อยตามธรรมชาติ (umami) หลังจากผสมถั่วเหลืองกับข้าวสาลีแล้วจึงเติมเชื้อบริสุทธิ์ของ *A. oryzae* หรือ *A. sojae* เพื่อให้เกิดเป็นหัวเชื้อโคจิสำหรับกระบวนการหมักซอสถั่วเหลือง ภาชนะที่ใช้สำหรับบ่มเชื้อจะเป็นถาดหรือถังก้นตื้นขนาดใหญ่ที่เจาะรูเพื่อให้มีอากาศและความชื้นไหลเวียนสะดวก ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อรา โดยต้องควบคุมอุณหภูมิในการบ่มให้ไม่เกิน 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากการเจริญของเชื้อราจะทำให้อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นได้ บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วิธู ชูศรี, 2558 : 290-298 และ ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และ สุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, 2560 : 48-51)

ถั่วเหลืองและข้าวสาลีจะถูกปกคลุมด้วยใยราสีขาว (hyphae) และบ่มต่ออีกเป็นเวลา 3 วัน เส้นใยของเชื้อราจะปกคลุมทั่วส่วนผสมและสร้างสปอร์สีเหลืองปนเขียวเรียกว่าโคจิ เมื่อเชื้อราเจริญเต็มที่จนเส้นใยปกคลุมวัตถุดิบจนหมด ก็จะได้โคจิที่พร้อมสำหรับกระบวนการหมักซอสถั่วเหลืองต่อไป (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.)

1.2 ขั้นโมโรมิ

ขั้นโมโรมิคือการนำโคจิที่ได้มาผสมกับน้ำเกลือแล้วคลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เรียกว่าการ mashing (ภาพประกอบ 9.10) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่เอนไซม์จากเชื้อราในโคจิจะเริ่มย่อยสลายโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมันและส่วนประกอบอื่น ๆ ในส่วนผสม และต่อมาจุลินทรีย์ต่าง ๆ จะเริ่มใช้สารประกอบที่เกิดจากปฏิกิริยาการย่อยเหล่านี้ โดยปกติแล้วขั้นตอนนี้จะใช้อัตราส่วนของของแข็ง (หรือโคจิ) ต่อน้ำเกลือเท่ากับ 1:1.5 แต่อัตราส่วนนี้สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามวิธีและความต้องการของผู้ผลิต โดยน้ำเกลือที่ใช้จะมีความเข้มข้น 20-25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปผสมกับโคจิแล้วจะทำให้มีความเข้มข้นของเกลือเป็น 16-19 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด ยกเว้นพวกที่ทนเกลือ (halotolerant) หรือพวกทนแรงดันออสโมซิส (osmotolerant) ส่วนผสมระหว่างโคจิและน้ำเกลือนี้ จะเรียกว่าโมโรมิและถังหมักที่ใช้ในการหมักซอสถั่วเหลืองสมัยก่อนจะใช้ถังไม้ ในปัจจุบันเปลี่ยนมาเป็นถังคอนกรีต ถังเหล็ก หรือถังสแตนเลสที่เคลือบเรซินป้องกันการกัดกร่อน ปกติจะใช้เวลาในการหมักนานเป็นปีที่อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส (แต่บางครั้งจะใช้อุณหภูมิต่ำที่ 20 องศาเซลเซียสในการหมักเนื่องจากต้องการให้เอนไซม์บางชนิดทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพดี) แต่สามารถเร่งกระบวนการหมักให้เสร็จสิ้นภายใน 3-4 เดือนได้ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิการหมักให้สูงขึ้น (สูงสุดได้ไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส) และในถังหมักต้องมีระบบการกวนและการให้อากาศเพื่อช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์และการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในส่วนผสม (วิธู ชูศรี, 2558 : 298-300 และ ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และ สุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, 2560 : 49-51)

เอนไซม์ต่าง ๆ ที่พบในโมโรมิเป็นเอนไซม์ที่มาจากเชื้อรา ได้แก่ โปรติเนส (proteinase) เพปติเดส (peptidase) เซลลูเลส (cellulase) และอะไมเลส (amylase) และในระหว่างขั้นตอนการ mashing เอนไซม์เหล่านี้จะย่อยโปรตีนและแป้งในถั่วเหลือง กลายเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลงซึ่งจะเป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์อื่น ๆ ต่อไป การโปรตีนในถั่วเหลืองให้ได้มากที่สุดจะส่งผลดีต่อคุณภาพของซอสถั่วเหลือง ในกรณีเอนไซม์อะไมเลสจะทำหน้าที่ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวเช่น กลูโคส มอลโตส ไซโลส กาแล็กโตส และอะราบิโนส ซึ่งเชื้อราจะนำไปใช้ในการเจริญต่อไป และน้ำตาลเหล่านี้จะมีความสำคัญต่อการสร้างสีและกลิ่นรสในซอสถั่วเหลืองเช่นกัน เนื่องจากเหล่านี้มีสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มเอมีนที่ได้จากกระบวนการหมักส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (non-enzymatic browning

reaction) ซึ่งเป็นสีของผลิตภัณฑ์ซอสถั่วเหลืองในที่สุด นอกจากนี้ในขั้นตอนการ mashing ยังมีเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส (pectinases) เฮมิเซลลูเลส (hemecellulases) และเอนไซม์ที่ย่อยสลายเนื้อเยื่อของพืช (tissue-degrading enzyme) ชนิดอื่น ๆ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีหน้าที่ย่อยสารต่าง ๆ จากเมล็ดถั่วเหลืองและข้าวสาลี จึงช่วยเพิ่มสารอาหาร ที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ต่าง ๆ และช่วยเพิ่มการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ด้วย (ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และ สุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, 2560 : 47-48)

หลังจากขั้นตอนการ mashing แล้ว กระบวนการหมักซอสถั่วเหลืองจะเริ่มขึ้นทันที ซึ่งจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่พบในกระบวนการหมักซอสถั่วเหลืองจะมีหลายชนิดดังแสดงในตาราง 9.3 ในช่วงแรกของการหมักเชื้อราซึ่งจะไวต่อปริมาณเกลือจะเริ่มตายอย่างรวดเร็ว รวมทั้งแบคทีเรีย *Micrococcus* และ *Bacillus* ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นสูง ก็จะตายลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นน้อยกกว่าจะเริ่มเจริญขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากแบคทีเรียแลคติกแล้ว ยังพบแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Bacillus mesentericus* ที่สามารถเกิดกระบวนการหมักได้ดี แต่ในกระบวนการหมักซอสถั่วเหลืองจะต้องไม่พบแบคทีเรียอะซิติกอย่างเด็ดขาด pH เริ่มต้นในการหมักจะอยู่ที่ 6.5-7.0 ซึ่งเหมาะแก่การเจริญของจุลินทรีย์ทุกชนิด แต่ในโมโรมิจะมีความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 16-19 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นตัวกำหนดชนิดของจุลินทรีย์ โดย *Micrococcus Bacillus* และ wild yeast จะไม่สามารถทนเกลือได้นาน เมื่อเวลาหมักผ่านไป 1-2 เดือน เชื้อเหล่านี้จะตายลง จากนั้นเชื้อที่สามารถทนเกลือ ทนแรงดันออสโมซิส และทนค่าแอคติวิตีของน้ำ (a_w) ที่ต่ำได้ จะเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นมาแทน ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus delbrueckii* และ *Tetragenococcus halophilus* (ชื่อเดิมคือ *Pediococcus halophilus*) จะเริ่มเจริญขึ้นมาก่อน ในการผลิตซอสถั่วเหลืองในปัจจุบันนิยมเติมเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* และ *Tetragenococcus halophilus* ลงไปในโมโรมิเลย เพื่อเริ่มต้นกระบวนการหมักมากกว่าจะรอใช้เชื้อธรรมชาติที่มาจากโมโรมิเอง และพวกยีสต์ที่ทนเกลือ คือ *Zygosaccharomyces rouxii* และ *Candida versatilis* ก็จะถูกเติมเข้าไปในโมโรมิด้วย และเมื่อ pH ลดต่ำลงกว่า 5.0 แบคทีเรียแลคติก *L. delbrueckii* และ *T. halophilus* จะถูกยับยั้งการเจริญ แต่ยีสต์ที่สามารถทนเกลือได้มากกว่าแบคทีเรียแลคติกจะยังคงเจริญอยู่ได้และทำหน้าที่หมักต่อไป และเมื่อค่า pH ลดต่ำลงจนถึง 4.0 ยีสต์ทั้งหมดก็จะหยุดการเจริญเช่นกัน เมื่อการหมักดำเนินมาถึงจุดที่แบคทีเรียแลคติกและยีสต์หยุดการเจริญ จะเป็นสัญญาณบอกว่ากระบวนการหมักได้สิ้นสุดอย่างสมบูรณ์แล้ว (วิธู ชูศรี, 2558 : 301-303 และ ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และ สุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, 2560 : 49-50)

ตาราง 9.3 จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีความสำคัญในกระบวนการหมักซอสถั่วเหลือง

รา	แบคทีเรีย	ยีสต์
Aspergillus oryzae	*Tetragenococcus halophilus (or Pediococcus halophilus)*	*Saccharomyces rouxii*
Aspergillus sojae	*Lactobacillus delbrueckii*	*Candida versatilis*
Mucor sp.	*Leuconostoc mesenteroides*	*Torulopsis versatilis*
Rhizopus sp.	*Bacillus subtilis* *Bacillus mesentericus*	*Hansenula sp.*

ที่มา : ดัดแปลงจาก Robert (2006 : 422) และ Hui *et al*. (2004 : 572)

ภาพประกอบ 9.10 ขั้นตอนโคจิ (บน) และ โมโรมิ (ล่าง)

ที่มา : Dewazakura Sake Brewery Co., Ltd. (2017)

2. การแยกกากและการทำบริสุทธิ์ซอสถั่วเหลือง

เมื่อการหมักสิ้นสุดลงและซอสถั่วเหลืองได้ที่แล้ว จะมาถึงขั้นตอนการแยกน้ำซอสออกจากกากโดยใช้แรงกดหรืออัดโดยใช้เครื่องกรองไฮโดรลิค (hydraulic filter presses) กดบีบหรือดันโมโรมิให้ผ่านแผ่นกรองที่เป็นผ้าหรือไนลอนหลาย ๆ ชั้น การกรองจะทำหลายครั้งแบบค่อยเป็นค่อยไป โดยเพิ่มแรงอัดไปเรื่อย ๆ จนถึง 100 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร กากที่เหลือจากการกรองจะนำไปทำอาหารสัตว์ได้ และการกรองจะยิ่งมีประสิทธิภาพดีและได้น้ำซอสออกมาในปริมาณมากถ้าโปรตีนในถั่วเหลืองถูกย่อยได้มากที่สุดและเอนไซม์เพคติเนส (pectinase) ทำงานได้ดีในขั้นตอนการ mashing นั่นหมายถึง จะทำให้มีกากน้อยลง พอถึงขั้นตอนการกรองจึงทำได้ง่ายและมีประสิทธิภาพดี (จารุวรรณ มณีศรี, 2551 : 134 และ วิธู ชูศรี, 2558 : 303)

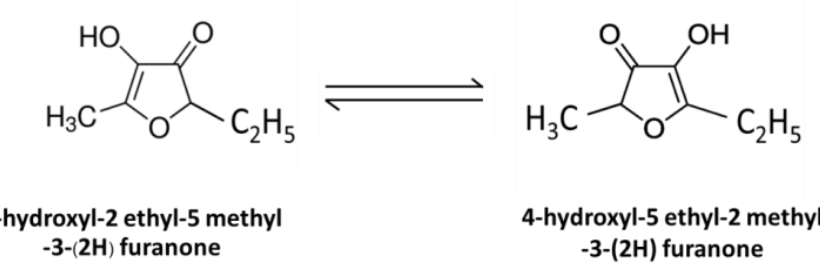
ส่วนในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ (refining) ซอสถั่วเหลืองจะเป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก โดยนำน้ำซอสที่ผ่านการกรองมาแล้ว มากำจัดของแข็งที่ยังหลงเหลืออยู่และกำจัดของเหลวบางอย่างที่ไม่ต้องการออก คือ ชั้นไขมันที่ปรากฏอยู่ด้านบนของน้ำซอสที่ผ่านการกรองแล้ว ส่วนชั้นกลางจะเป็นน้ำซอสถั่วเหลืองซึ่งต้องนำไปกรองอีกครั้งหนึ่ง แนะนำไปเติมส่วนประกอบที่ต้องมีในซอสถั่วเหลือง หรือเรียกว่า การปรับมาตรฐาน (standardized) ซอสถั่วเหลือง โดยปกติจะต้องมีการปรับปริมาณเกลือ ความเข้มของสารประกอบไนโตรเจน สี และกลิ่นรส ในซอสถั่วเหลืองให้ได้มาตรฐานที่กำหนด หลังขั้นตอนการบีบแยกกากและทำบริสุทธิ์แล้วจะได้น้ำซอสถั่วเหลืองที่พร้อมจะนำมาฆ่าเชื้อด้วยวิธีพาสเจอไรซ์แบบปกติ (อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส) หรือใช้การฆ่าเชื้อแบบแฟลชพาสเจอร์ไรส์ (flash pasteurization) ที่ใช้อุณหภูมิสูงกว่าการพาสเจอร์ไรส์ปกติ คือ ที่อุณหภูมิที่ 115 องศาเซลเซียส แต่ใช้เวลาสั้นเพียง 3-5 วินาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์และทำลายจุลินทรีย์ปนเปื้อน ทำให้สามารถเก็บรักษาซอสถั่วเหลืองได้นานขึ้น แม้ว่าความร้อนก็ทำให้กลิ่นรสสามารถระเหยไปได้บางส่วน แต่การพาสเจอไรส์ในซอสถั่วเหลืองเป็นขั้นตอนที่จำเป็น แล้วยังช่วยเพิ่มสีน้ำซอสจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (จารุวรรณ มณีศรี, 2551 : 134-135 และ วิธู ชูศรี, 2558 : 303)

เนื่องจากซอสถั่วเหลืองประกอบด้วยเกลือเข้มข้นถึง 16-19 เปอร์เซ็นต์ กลิ่นรสชนิดแรกที่จะพบคือความเค็ม (saltness) นอกจากนี้ยังตรวจพบสารให้กลิ่นรสที่ระเหยได้ (volatile flavor compound) ประมาณ 200 ชนิด ดังตัวอย่างในตาราง 9.4 แต่สารให้กลิ่นรสที่สำคัญในซอสถั่วเหลืองคือ สารในกลุ่มฟูราโนน (furanone) และสารประกอบฟีนอล เนื่องจากมีความเข้มข้นมากและเป็นกลิ่นรสให้รสชาติของซอสถั่วเหลือง สารฟูราโนนที่พบในซอสถั่วเหลือง คือ 4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3-(2H) furanone (HEMF) และ 4-hydroxy-5-methyl-3-(2H) furanone (HMF) (ภาพประกอบ 9.11) ซึ่งจะให้รสหวานและกลิ่นคล้ายของคั่วหรือย่าง (roasted flavor) สาร HEMF เป็นสารให้กลิ่นรสตัวหลักที่พบในซอสถั่วเหลืองในญี่ปุ่นแทบทุกชนิดที่มีข้าวสาลี

เป็นองค์ประกอบ สำหรับสารประกอบฟีนอลที่ให้กลิ่นรสในซอสถั่วเหลือง (มักพบในซอสถั่วเหลืองโชยุของญี่ปุ่น) คือ 4-ethylguaiacol (4-EG) และ 4-ethylphenol (4-EP) เป็นสารให้กลิ่นรสที่ให้รสชาติของซอสถั่วเหลืองและถูกสร้างในระหว่างการเกิดกระบวนการหมักซอสถั่วเหลืองที่มีส่วนผสมเป็นข้าวสาลีเช่นเดียวกับสาร HEMF นอกจากสารฟูราโนนและสารประกอบฟีนอลแล้ว ยังมีสารให้กลิ่นรสอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นในซอสถั่วเหลืองอีก คือ กรดอินทรีย์ อัลดีไฮด์ แอลกอฮอล์ และเอสเทอร์ เหล่านี้จะถูกผลิตมาจากแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ในขั้นตอน การ mashing และการบ่มโมโรมิ สารเหล่านี้มีส่วนช่วยในเรื่องของสีเหลืองถ่านปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ เนื่องจากเมื่อนำซอสถั่วเหลืองไปผ่านการพาสเจอร์ไรส์ ความร้อนจากการพาสเจอร์ไรส์จะเร่งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2557 : 321-329)

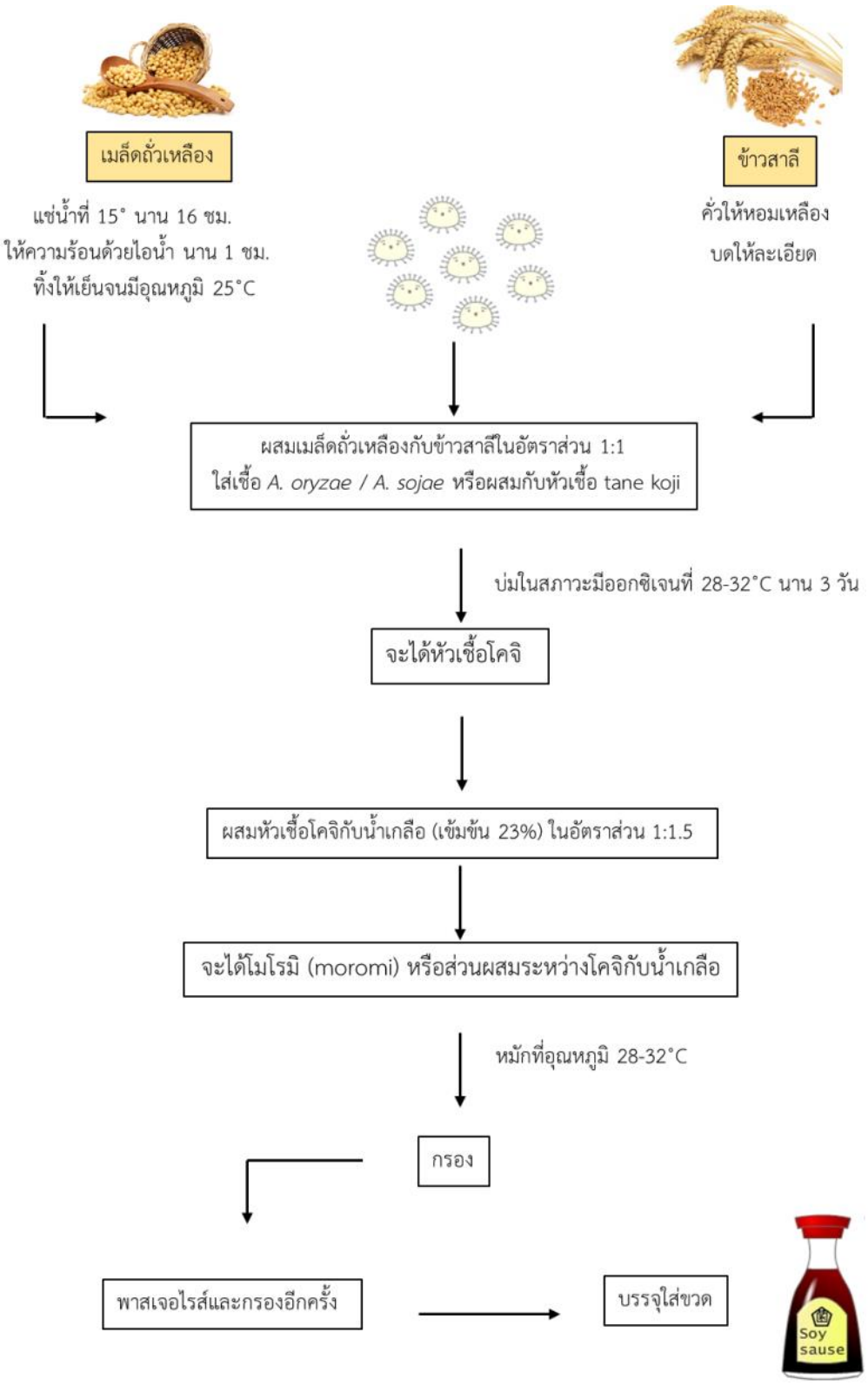
สารให้กลิ่นรสที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งในซอสถั่วเหลืองจะเป็นพวกกรดอะมิโนต่าง ๆ คือ กรดกลูตามิก (glutamic acid) และ 5’nucleotides inosine 5’-monophosphate (IMP) และ guanosine 5’-monophosphate (GMP) นอกจากจะให้รสพื้นฐานทั้ง 4 รสแล้ว คือ หวาน เปรี้ยว ขม และเค็ม แล้วเกลือของสารเหล่านี้คือโซเดียมกลูตาเมต (sodium glutamate) โซเดียมอินโนซิเนต (sodium inosinate) และโซเดียมกวานิลเลต (sodium gaunylate) เป็นสารให้กลิ่นรสเฉพาะอย่างหนึ่งที่เรียกกันว่ารสอูมามิ (umami) หรือรสอร่อย และส่วนมากอาหารในเอเชียจะมีส่วนผสมที่ทำให้เกิดรสรสอูมามิ (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2557 : 484-485)

การผลิตซอสถั่วเหลืองที่กล่าวมาข้างต้น เป็นกระบวนการผลิตแบบอาศัยกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ในการทำงาน แต่ยังมีการผลิตอีกแบบหนึ่งที่ไม่ใช้กระบวนการหมัก คือ เป็นการผลิตด้วยกระบวนการทางเคมีโดยใช้การย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองด้วยกรด (acid hydrolysis) ข้อดีของกระบวนการผลิตทางเคมีคือต้นทุนการผลิตจะถูกกว่า และใช้เวลาในการผลิตน้อยกว่าการใช้กระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ แต่ซอสถั่วเหลืองที่ได้จากกระบวนการทางเคมีจะขาดสารให้กลิ่นรสรสชาติของความเป็นซอสถั่วเหลืองจากกระบวนการหมัก จึงทำให้ขาดคุณสมบัติด้านกลิ่นรสและประสาทสัมผัสที่ดี (จารุวรรณ มณีศรี, 2551 : 137 และ วิธู ชูศรี, 2558 : 308)



ภาพประกอบ 9.11 โครงสร้างทางเคมีของสาร HEMF

ที่มา : ภาพโดย วรวัฒน์ พรหมเด่น (2560)



ภาพประกอบ 9.12 แสดงวิธีการผลิตซอสถั่วเหลืองหรือโชยุของญี่ปุ่น

ที่มา : ดัดแปลงจาก Robert (2006 : 424)

ตาราง 9.4 สารให้กลิ่นรสชนิดต่าง ๆ ในซอสถั่วเหลือง

ประเภท	**สารประกอบ**	**สารตั้งต้นในการสร้าง**
แอลกอฮอล์ (alcohols)	Isobutanol n-Butanol Isoamy alcohols Acetol Acetoin 2,3-Butanediol Furfuryl alcohols Methionol 2-Phenyl ethanol 4-Ethyl guaiacol	Valine Isoleucine Leucine Methionine Phenylalanine Ferrulic acid
กรด (acids)	Acetic acid Lactic acid Succinic acid	Pentose Hexose
ฟูราโนน (furanones)	HDMF HEMF HMF	Amino acid and reducing Sugars
ไพราซีน (pyrazines)	Methylpyrazine 2,6-dimethylpyrazine	Threonine
เอสเทอร์ (esters)	Ethyl lactate Diethyl succinate	Lactic acid Succinic acid Fatty acid Ethanol

ที่มา : ดัดแปลงจาก Hui *et al*. (2004 : 575)

ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มแอลกอฮอล์

เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (alcoholic beverage) เป็นเครื่องดื่มที่ประกอบด้วยเอทานอล ซึ่งได้จากกระบวนการหมักธัญพืช ผลไม้ หรือแหล่งน้ำตาลต่าง ๆ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีความสัมพันธ์กับสังคมวัฒนธรรมในเกือบทุกชนชาติ อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิต การจำหน่าย และการบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ จะมีการควบคุมด้วยกฎหมายอย่างเข้มงวด การบริโภคแอลกอฮอล์ในปริมาณน้อย ๆ จะทำให้รู้สึกสบาย คลายความวิตกกังวล แต่ในการบริโภคมากขึ้นจะทำให้เกิดอาการมึนเมา ขาดสติสัมปชัญญะ ความสามารถในการทำงานลดลง ในระยะยาวส่งผลเสียต่อสุขภาพ เช่น ตับแข็ง มะเร็งตับ พิษสุราเรื้อรัง อย่างไรก็ตามในที่นี้จะกล่าวถึงกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตเครื่องดื่ม เช่น เบียร์ ไวน์ และสาโท

1. เบียร์

เบียร์เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่นิยมดื่มกันมากที่สุดชนิดหนึ่งในบรรดาเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทั้งหลาย ประวัติศาสตร์ของเบียร์เริ่มขึ้นเมื่อประมาณ 3,500-3,100 ปี ก่อนคริสตศักราช จนกระทั่งในช่วงกลางปี ค.ศ.1800 ผลิตภัณฑ์เบียร์ถือเป็นหนึ่งในอาหารที่มีการผลิตกันในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่และมีการควบคุมการผลิตอย่างดี ส่วนประกอบหลักในการผลิตเบียร์จะประกอบด้วยมอลต์ (malt) จากข้าวบาร์เลย์ (barley) น้ำ ดอกฮ็อพส์ (hop) และยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์คือ *Saccharomyces cerevisiae* โดยมอลต์และยีสต์จะมีผลต่อลักษณะเฉพาะของเบียร์แต่ละชนิด ส่วนน้ำและดอกฮ็อพส์จะมีผลต่อคุณภาพของเบียร์ (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2558 : 253-257 ; ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และ สุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, 2560 : 224-225 และสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2560)

1.1 หลักการในการผลิตเบียร์

ขั้นตอนในการผลิตเบียร์เกี่ยวข้องกับกระบวนการทั้งทางกายภาพ ชีวภาพ และกระบวนการหมักด้วยยีสต์ แสดงดังภาพประกอบ 9.13 ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้ (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2558 : 253-258)

1.1.1 การเตรียมข้าวมอลต์

ขั้นการเตรียมข้าวมอลต์ (malting) จะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่มีหน้าที่เปลี่ยนแป้งในเมล็ดข้าวบาร์เลย์ ให้กลายเป็นมอลต์ โดยการนำข้าวบาร์เลย์มาแช่น้ำ (steep) ที่อุณหภูมิ 14-18 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เกิดการงอก (germinate) ที่อุณหภูมิ 16-20 องศาเซลเซียส นาน 4-6 วัน จากนั้นนำไปอบให้แห้ง (kinning) ที่อุณหภูมิ 50-115 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

1.1.2 การบดข้าว

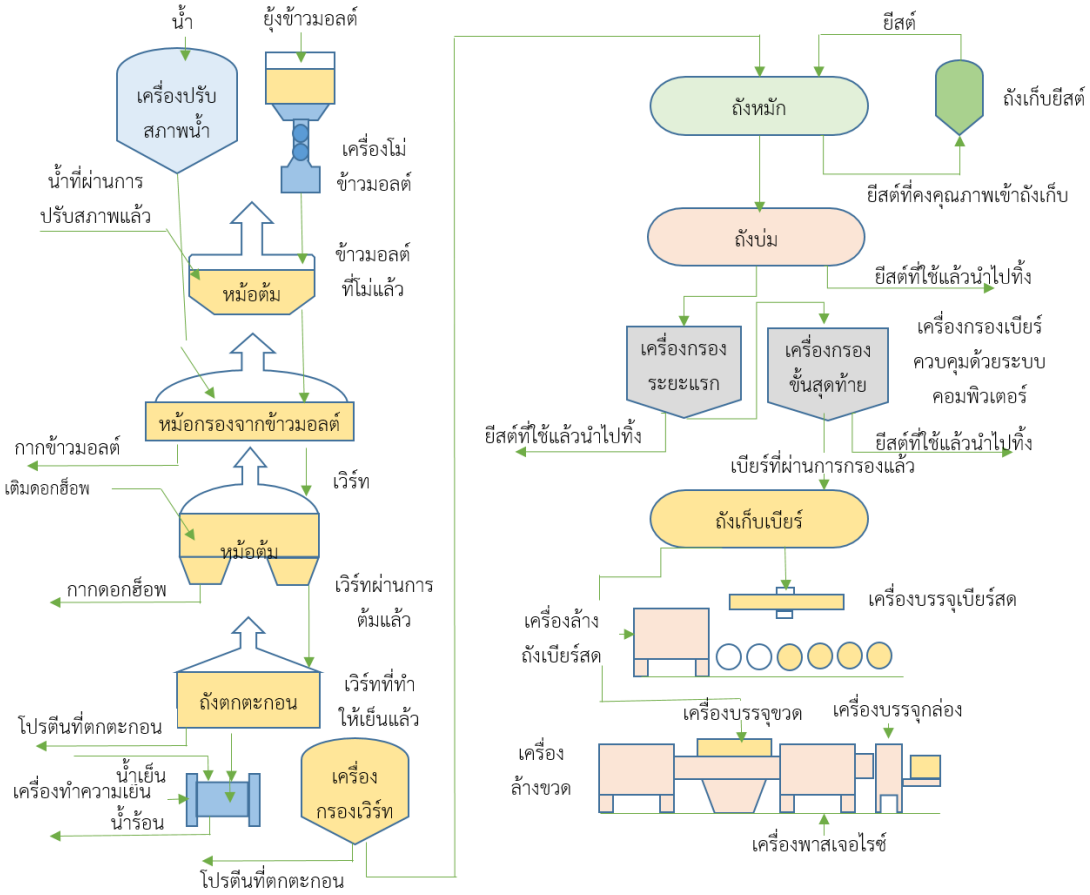
ขั้นตอนนี้นำมอลต์ไปผ่านกระบวนการสี (miling) และจากนั้นนำไปโม่หรือบด (mushing) ที่อุณหภูมิ 40-72 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที ถึง 2 ชั่วโมง เมื่อให้ความร้อนได้ระยะหนึ่งใส่ดอกฮ็อพส์ (ภาพประกอบ 9.14) ลงไป เมื่อเสร็จสิ้นการต้มจะได้ของเหลวที่มีสีน้ำตาลเข้มข้นที่เรียกว่าเวิร์ท (wort) แยกตะกอนออกแล้วเติมเชื้อยีสต์ลงไปในเวิร์ท

1.1.3 การหมัก

นำเวิร์ทไปผ่านกระบวนการหมักโดยการใส่เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยยีสต์จะใช้น้ำตาล กรดอะมิโน และสารอาหารต่าง ๆ ในเวิร์ทเพื่อการเจริญ ซึ่งในสภาวะไร้ออกซิเจนหรือมีออกซิเจนน้อยยีสต์จะใช้น้ำตาลในการเจริญและเปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ หลังจากนั้นจะนำเบียร์ไปบ่มในห้องที่มีการปรับอุณหภูมิให้ต่ำประมาณ 2-3 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3-48 เดือน แล้วแต่ชนิดของเบียร์ การหมักเบียร์จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนทำให้เบียร์ขุ่น จึงต้องนำเบียร์ไปผ่านกระบวนการหลังการหมัก (post-fermentation) อีกครั้งหลังการหมักเสร็จสิ้นแล้ว ทั้งนี้การจะเลือกใช้ยีสต์สายพันธุ์ใดขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของยีสต์แต่ละชนิดหรือชนิดของเบียร์และเอกลักษณ์ของเบียร์แต่ละยี่ห้อ ซึ่งโดยพื้นฐานแล้วจะแบ่งชนิดของยีสต์เป็นเอลยีสต์ (ale yeast) หรือเรียกว่า top-fermenting yeast คือยีสต์ที่เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักแล้วตัวเซลล์ของยีสต์จะลอยอยู่บนผิวหน้าของเบียร์ และลาเกอร์ยีสต์ (lager yeast) หรือเรียกว่า bottom-fermenting yeast คือยีสต์ที่เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักแล้วตัวเซลล์ของยีสต์จะจมอยู่ก้นภาชนะที่ใช้หมักเบียร์ (วิธู ชูศรี, 2558 : 213-214 และ อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2558 : 256-257)

1.1.4 การแปรรูปและบรรจุ

ขั้นตอนนี้เป็นการนำเบียร์ที่ได้จากการหมักมาผ่านการทำให้ใส (clarify) โดยการกรอง (filtration) เพื่อกำจัดตะกอนต่าง ๆ จากโปรตีนและเซลล์ยีสต์ที่เหลืออยู่ รวมทั้งเซลล์จุลินทรีย์อื่น ๆ ที่อาจทำให้เกิดการเสื่อมเสียของเบียร์ได้ ซึ่งมีผลต่อคุณภาพของเบียร์ จากนั้นบรรจุเบียร์ใส่ขวดแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีพาสเจอร์ไรส์เป็นเบียร์ที่พร้อมจำหน่ายได้



ภาพประกอบ 9.13 แสดงขั้นตอนการผลิตเบียร์

ที่มา : ดัดแปลงจาก สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (2560)

ภาพประกอบ 9.14 ดอกฮ็อพส์

ที่มา : Chen Design Associates Inc. (n.d.)

2. ไวน์

ไวน์เป็นเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ที่โดยส่วนมากได้มาจากการหมักองุ่น แต่ในปัจจุบันมีการนำผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่มีตามฤดูกาลในแต่ละท้องถิ่นมาผลิตเป็นไวน์ การผลิตไวน์ตามแบบฉบับดั้งเดิมใช้ทั้งองุ่นเขียวและองุ่นแดง ส่วนประกอบหลักของไวน์คือองุ่นสายพันธุ์ต่าง ๆ และยีสต์ โดยทั่วไปไวน์จะมีปริมาณของแอลกอฮอล์จะอยู่ระหว่าง 9-15 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นไวน์ยังประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสในปริมาณที่แตกต่างกันไป ตั้งแต่ ในดรายไวน์ที่หมักจนน้ำตาลกลายเป็นแอลกอฮอล์แล้วจะเหลือน้ำตาลเพียง 1-2 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ในไวน์หวานซึ่งกระบวนการหมักบ่มยังไม่สมบูรณจะยังคงมีน้ำตาลถึง 50-60 กรัมต่อลิตร กรดที่พบในไวน์ได้แก่กรดมาลิก กรดซิตริก กรดทาทาริก กรดน้ำส้ม กรดแลคติก กรดซัคซินิก รวมถึงรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีของไวน์คือแอนโทไซยานิน (anthocyanin) (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ และพรเทพ ถนนแก้ว, 2549 : 73-74)

2.1 หลักการและกระบวนการในการผลิตไวน์

กระบวนการผลิตไวน์มีหลักการละขั้นตอนในการผลิตไม่ยุ่งยากมากนัก โดยแต่ละขั้นตอนรายละเอียดดังนี้ (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ และพรเทพ ถนนแก้ว, 2549 :37-42 ; สมพงษ์ บัวแย้ม, 2559 : 7-12)

2.1.1 การเตรียมน้ำองุ่น

นำผลองุ่นมาบดด้วยเครื่องบดที่มีลักษณะเป็นลูกกลิ้งที่ประกอบไปด้วยลูกกลิ้งรูปทรงกระบอก 1 คู่ ทำจากสแตน ผลองุ่นที่ถูกบดแล้วจะประกอบไปด้วยน้ำองุ่น เมล็ด และเปลือก นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุและสารประกอบฟีนอล จะต้องมีการเติมสารประกอบซัลไฟต์ทันทีหลังจากคั้นน้ำองุ่นเสร็จ เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่าง ๆ และช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลในน้ำองุ่น หลังจากนั้นจึงทำการกรองแยกกาก และปั่นเหวี่ยงเอาตะกอนที่ยังเหลืออยู่ออกเพื่อให้น้ำองุ่นใสที่สุด

2.2.2 การหมัก

กระบวนการหมักไวน์จะเกิดขึ้นทันทีเมื่อใส่หัวเชื้อตั้งต้นพร้อมกับใส่สารประกอบซัลไฟต์ลงไป ซึ่งกระบวนการหมักไวน์แดงและไวน์ขาวนั้นจะมีความแตกต่าง คือ ในไวน์ขาวจะมีการใส่หัวเชื้อภายหลังการบีบคั้นน้ำองุ่นและการทำให้ใสแล้วและหมักที่อุณหภูมิ 7-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 7-8 วัน ในขณะที่ไวน์แดงจะใส่หัวเชื้อภายหลังการบดลูกองุ่นโดยยังคงมีเมล็ดและเปลือกอยู่ด้วย และหมักที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส ใช้เวลาถึง 5-6 สัปดาห์

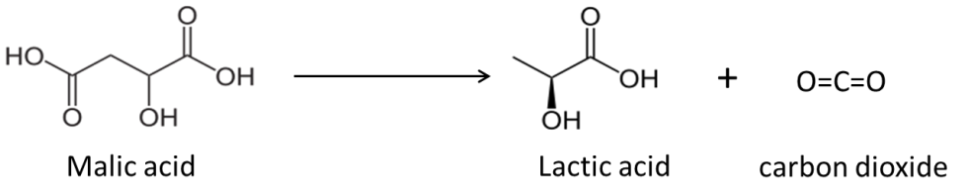
2.2.3 การปรับองค์ประกอบในไวน์และการทำให้ไวน์ใส

หลังจากกระบวนการหมักเสร็จสิ้นจะได้ไวน์ที่มีน้ำตาลเล็กน้อยหรือไม่มีเลย และมีปริมาณแอลกอฮอล์ประมาณ 12-14 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากความแตกต่างในเรื่องขององค์ประกอบและกรรมวิธีการผลิต จึงต้องมีการปรับองค์ประกอบในไวน์หลังกระบวนการหมัก

เสร็จสิ้นลง เช่น การปรับค่า pH ซึ่งมีผลต่อสีและกลิ่นรสของไวน์ ถ้าความเป็นกรดมากเกินไปจะต้องอาศัยกระบวนการหมักแบบมาโลแลคติก (mallolactic fermentation) (ภาพประกอบ 9.15) และถ้าต้องการปรับสีจะใช้วิธีการกรองซึ่งจะกรองเอารงควัตถุที่ไม่ต้องการออกไป และถ้าต้องการปรับกลิ่นรสในไวน์จะใช้วิธีการใส่เอนไซม์ที่กฎหมายอนุญาตให้ใช้ได้ ส่วนขั้นตอนการผสมหรือปรุงแต่งองค์ประกอบต่าง ๆ ในไวน์นี้จะช่วยเพิ่มคุณสมบัติด้านประสาทสัมผัส รวมทั้งช่วยเพิ่มความคงตัวด้านกลิ่นรส กลิ่นหอมและสีของไวน์ ส่วนขั้นตอนการทำให้ใส (clarification) จะทำทันทีภายหลังกระบวนการหมักที่ใช้เวลาประมาณ 3-6 สัปดาห์ โดยจะปล่อยให้เซลล์ยีสต์ แบคทีเรีย และตะกอนต่าง ๆ ค่อย ๆ ตกตะกอนนอนก้นลงมา จากนั้นจะดูดส่วนใสออกมา เรียกวิธีการนี้ว่า “racking” ถือได้ว่าเป็นการบ่ม (aging) ไปในตัว (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ และพรเทพ ถนนแก้ว, 2549 : 81-83 ; สมพงษ์ บัวแย้ม, 2559 : 16-17)

2.2.4 การบ่มไวน์

ไวน์ที่หมักเสร็จใหม่ ๆ จะมีรสแข็งกระด้างอยู่จึงจำเป็นต้องมีการบ่ม (aging) เพื่อให้ได้รสที่นุ่มละมุนละไม ไวน์ขาวและไวน์ชมพูจะถูกนำไปบ่มในถังสเตนเลสหรือท่อแก้วหรือถังไฟเบอร์กลาส ไวน์ทั้งสองชนิดนี้จะบ่มไม่นานนักเพราะต้องการได้กลิ่นของผลไม้ยังคงอยู่ ในขณะที่ไวน์แดงจำเป็นบ่มในถังไม้โอ๊ค (oak vat) เท่านั้น และต้องบ่มนาน 3-5 ปี แล้วนำไปบรรจุขวด และสามารถบ่มต่อในขวดเป็นเวลา 5-20 ปีก็ได้ สาเหตุที่ไวน์แดงต้องบ่มในถังไม้โอ๊คก็เพราะว่าจะได้รส ได้สี และกลิ่น รวมทั้งกรดฝาด ความนุ่ม เพิ่มทวีคูณตามจำนวนปีขึ้นไปด้วย (สมพงษ์ บัวแย้ม, 2559 : 17)



ภาพประกอบ 9.15 กระบวนการหมักแบบมาโลแลคติกเกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติก ที่สามารถใช้กรดมาลิกในน้ำองุ่นเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ที่มา : ภาพโดย วรวัฒน์ พรหมเด่น (2560)

3. สาโท

การผลิตสาโทหรือเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่คล้ายสาโท โดยมีการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ถือว่าเป็นภูมิปัญญาของชาวเอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และตะวันออกไกล ในประเทศไทยหัวเชื้อเริ่มต้นนี้เรียกว่าลูกแป้งซึ่งทำจากแป้งที่มีการผสมสมุนไพรหรือเครื่องเทศเพื่อใช้เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่หลากหลาย ลูกแป้งที่ดีจะต้องมีคุณลักษณะโดยทั่วไป คือ โปร่งเบา สีขาวนวล ไม่มีรอยแตกร้าว ก้อนแป้งเป็นรูพรุน เมื่อขยี้จะยุ่ยเป็นผงละเอียดไม่มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว มีรูปร่างและขนาดต่าง ๆ กัน โดยลูกแป้งจัดเป็นวัฒนธรรมที่สืบทอดกันมาช้านาน และเป็นเอกลักษณ์ การหมักสาโทจะใช้ข้าวเหนียวขาวหรือข้าวเหนียวดำที่นึ่งสุก นำมาคลุกกับลูกแป้ง หมักไว้ประมาณ 3-4 วัน กลิ่นข้าวที่หมักจะหอมเป็นกลิ่นคล้ายข้าวหมากและมีน้ำเยิ้มออกมาเรียกว่า “น้ำต้อย” เมื่อหมักต่อไปอีก 7 วัน สาโทจะเริ่มอยู่ตัวและมีน้ำเยิ้มมากพอที่จะดื่มได้ (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ และพรเทพ ถนนแก้ว, 2549 : 256-257 และ พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.)

3.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโท

โดยปกติทั่วไปสาโทจะผลิตจากข้าวเหนียว มีรายงานว่าการใช้ข้าวเจ้าในการผลิตจะได้ผลไม่ดีเท่าข้าวเหนียวโดยจะได้ปริมาณแอลกอฮอล์น้อยกว่า และสาโทจะมีลักษณะขุ่นตกตะกอนยากและอาจเปรี้ยวได้ การขัดสีข้าวมีผลต่อคุณภาพและการหมักสาโท หากใช้ข้าวที่ยังมีรำข้าวเหลืออยู่บ้างอาจช่วยให้การหมักดีขึ้นเนื่องจากมีสารอาหารให้จุลินทรีย์มากกว่าข้าวขัดขาว แต่จะทำให้สาโทมีกลิ่นหืนเนื่องจากไขมันที่อยู่ในรำข้าว (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.)

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตสาโท

จุลินทรีย์กลุ่มเชื้อราในกระบวนการผลิตสาโทจะทำหน้าที่เปลี่ยนแป้งที่เป็นองค์ประกอบในข้าวให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เรียกปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงนี้ว่าแซคคาริฟิเคชั่น (saccharification) เชื้อราจะสร้างเอนไซม์กลุ่มอะไมเลสซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) เบตาอะไมเลส (β-amylase) และกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) เพื่อย่อยสลายโครงสร้างของโมเลกุลแป้งให้เป็นน้ำตาล ราที่มีบทบาทสำคัญและสร้างเอนไซม์ในปริมาณมากได้แก่ราในกลุ่ม Zygomycetes ได้แก่ *Rhizopus sp. Mucor sp. และ Amylomyces sp.* และราในกลุ่ม *Deuteromycetes* ได้แก่ *Aspergillus sp*. โดยราในกลุ่ม Zygomycetes สามารถสร้างเอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงและสร้างกรดอินทรีย์บางชนิดที่ทำให้เกิดรสเปรี้ยวในสาโท เช่น กรดซิตริก กรดแลคติก และกรดฟูมาลิก (fumalic acid) แต่ราในกลุ่มนี้มีข้อด้อยคือการย่อยแป้งจะเกิดไม่สมบูรณ์ทำให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวน้อยกว่าราในกลุ่ม *Deuteromycetes* จากนั้นยีสต์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งโดยรา ให้กลายเป็นแอลกอฮอล์โดยผ่านกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ (alcoholic fermentation) ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดได้ดีในสภาวะที่ไร้อากาศ (anaerobic condition) ยีสต์ที่มี

บทบาทสำคัญในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ได้แก่ ยีสต์ในกลุ่ม Ascomycetes เช่น *Saccharomyces sp.* *Endomycopsis sp.* และ *Hensenula* สาเหตุที่ยีสต์กลุ่มนี้เหมาะสำหรับใช้ในการหมักสาโทเนื่องจากเจริญเติบโตได้เร็ว ทนต่อความเป็นกรด ทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาล และทนต่อแอลกอฮอล์ได้ดี (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ และพรเทพ ถนนแก้ว, 2549 : 263 และ ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และ สุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, 2560 : 196-201)

สรุป

กระบวนการหมักอาหารด้วยจุลินทรีย์ เป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางอาหารด้วยเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น เอนไซม์เซลลูโลสและโปรทีเอสจะย่อยโครงสร้างวัตถุดิบอาหารทำให้เนื้อสัมผัสอาหารอ่อนนุ่ม นอกจากนี้เอมไซม์โปรทีเอสสามารถย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน และเอนไซม์กลุ่มย่อยพอลิแซ็คคาไรด์จะให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุล ทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ในระหว่างการหมักจุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตสารบางอย่างซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค อย่างไรก็ตามข้อจำกัดในการผลิตอาหารหมักคือใช้ระยะเวลานาน และการผลิตอาหารหมักบางชนิดต้องอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิด ทำให้กระบวนการควบคุมการหมักเป็นไปได้ยาก จุลินทรีย์กลุ่มแลคติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่พบในอาหารหมักเกือบทุกชนิด จุลินทรีย์กลุ่มรองที่พบในอาหารหมักบางชนิดคือยีสต์และรา การศึกษาสมบัติและปัจจัยที่ส่งผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก รวมทั้งการวิจัยพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถลดระยะเวลาในการหมักโดยไม่สูญเสียกลิ่นรสอาหาร และมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพประกอบ มีสารอาหารโมเลกุลเล็กที่ง่ายต่อการดูดซึม มีประโยชน์ต่อสุขภาพ และมีรสชาติที่น่าพึงพอใจของผู้บริโภค

คำถามท้ายบท

1. เพราะเหตุใดสายพันธุ์จุลินทรีย์จึงจำเป็นต่ออุตสาหกรรมการผลิตซอสปรุงรส
2. จงอธิบายกระบวนการหมักน้ำส้มสายชู โดยระบุจุลินทรีย์และสารตัวกลางที่เกี่ยวข้อง
3. การผลิตเต้าเจี้ยวมีกระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์ประเภทใดบ้าง และมีขั้นตอนอย่างไร
4. นักศึกษาคิดว่าผักกาดดองน้ำซาวข้าวที่จำหน่ายในท้องตลาดจำเป็นจะต้องใช้จุลินทรีย์กลุ่มใด และน้ำซาวข้าวมีความสำคัญต่อการหมักอย่างไร
5. การผลิตเบียร์ใช้จุลินทรีย์ชนิดใด สายพันธุ์ใด
6. มอลต์และดอกฮอพมีความสำคัญอย่างไรในการผลิตเบียร์
7. โคจิและลูกแป้งมีความเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร และมีความสำคัญต่อกระบวนการหมักอย่างไร
8. ในการหมักแหนมจะใช้จุลินทรีย์ประเภทใด และจำเป็นต้องควบคุมสภาวะการหมักอย่างไร
9. น้ำผลไม้ที่จะใช้ในการหมักไวน์ควรมีคุณสมบัติอย่างไร
10. จงยกตัวอย่างอาหารหมักพื้นบ้านและระบุจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

เอกสารอ้างอิง

คณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (2554). **ชีวเคมี**. กรุงเทพฯ. เซนเกจ เลินนิ่ง.

จารุวรรณ มณีศรี. (2551). **เทคโนโลยีอาหารหมัก.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โฟร์เพซ

นิธิยา รัตนาปนนท์. (2557). **เคมีอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

บุษกร อุตรภิชาติ. (2550). **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 3. สงขลา: ภาควิชาชีววิทยา

ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และสุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์. (2560). **กระบวนการและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตอาหารหมัก.** สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พัฒนา เหล่าไพบูลย์ และพรเทพ ถนนแก้ว. (2549). **ไวน์ผลไม้และสาโท ผลิตด้วยความมั่นใจได้อย่างไร.** ขอนแก่น: คลังนานาวิทยา.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์.(ม.ป.ป.). **ซีอิ๊ว.** สืบค้น วันที่ 13 เมษายน 2560, จาก ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร (Food Network Solution) เว็บไซต์: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1435/fermented-soy-sauce

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. (ม.ป.ป.). **สาโท.** สืบค้นวันที่ 20 เมษายน 2560 จาก ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร (Food Network Solution). เว็บไซต์: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3091/สาโท

วิธู ชูศรี. (2558). **เทคโนโลยีของกระบวนการหมักอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.). (2560). **ว่าด้วยเรื่องของเบียร์.** สืบค้นวันที่ 10 กรกฎาคม 2560, จาก คลังความรู้สู่ความเป็นเลิศทางวิทยาศาสตร์ คณิตศาสตร์และเทคโนโลยี โดยสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.). เว็บไซต์ : http://www.scimath.org/lesson-science/item/7108-2017-06-04-06-33-01

สมพงษ์ บัวแย้ม. (2559). **การผลิตไวน์ผลไม้ เบียร์ผลไม้ และน้ำผลไม้ เพื่อสุขภาพ.** กรุงเทพฯ: วรวุฒิการพิมพ์.

สุนัดดา โยมญาติ . (2557). **โยเกิร์ต.** สืบค้น วันที่ 12 กรกฎาคม 2560, จาก สาขาชีววิทยา สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.). เว็บไซต์ : http://biology.ipst.ac.th/?p=987

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. (2558). **ยีสต์และเทคโนโลยีของยีสต์.** กรุงเทพฯ: ก้าวไทย แอดเวอร์ไทซิ่ง แอนด์พริ้นติ้ง.

Boulton, C., and Quain, D. (2006). **Brewing yeast and fermentation.** (2nd ed.). Wiley-Blackwell.

Chen Design Associates Inc. (n.d.). **Hop flower brewing house.** Retrieved June 12, 2017, from Chen Design Associates Inc. Available URL: http://www.chendesign.com/portfolio/hop-flower-brewing-house/

Dewazakura Sake Brewery Co.,Ltd. (2017). **Fermentation process.** Retrieved June 10, 2017, from Dewazakura Sake Brewery Co.,Ltd. Available URL: http://www.dewazakura.co.jp/en/dewazakura/sake-02.html

Engle, K. (2010). **Pyruvate decarboxylase**. Retrieved June 7, 2017, from Proteopedia. Available URL: http://proteopedia.org/wiki/index. php/Image: Pyruvate_decarb_1.jpg

Hui, Y.H., Meunier, G.L., Hansen, A.S., Josephsen, J., Nip, W.K., Peggy, S.S., and Toldra, F. (2004). **Handbook of food and beverage fermentation technology.** New York: Marcel Inc.,

Mistry, V.V. (2001). **Low fat cheese technology.** International Dairy Journal. 11(4–7), 413-422.

Mozzi, F., Raya, R.R., and Vignolo, G.M. (2015). **Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications.** (2nd ed.). Wiley-Blackwell.

Ojha, K.S., and Tiwari, B.K. (2016). **Novel food fermentation technologies.** Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG.

OpenStax College. (n.d.). **Oxidative Phosphorylation.** Retrieved June 21, 2017, OpenStax CNX® Rice University Houston, Texas. Available URL: https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@9.85:7oTVAgrZ@7/Oxidative-Phosphorylation

Pearson Canada. Inc. (n.d.). **Effect of pH on protein solubility and denaturation.** Retrieved June 8, 2017, from Stack Exchange . Available URL: https://biology.stackexchange.com/questions/51825/effect-of-ph-on-protein-solubilty-and-denaturation

Pescarmona, G. (2014). **Thiamine pyrophosphate (TPP).** Retrieved April 15, 2017, from flipper e nuvola. Available URL: http://flipper.diff.org/app/pathways/6096

Prescott, L.M., Harley, H.P., Klein, D.A. (2004). **Microbiology.** (6th ed). New York: McGraw-Hill.

Robert, W. H. (2006). **Microbiology and Technology of fermented foods.** Lowa: Blackwell Publishing Professional.

Saichana, N., Matsushita, K., Adachi, O., Frébort, I., and Frebortova, J. (2015). **Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications.** Biotechnol Adv. 1;33(6 Pt 2): 1260-1271.

Stanbury, P., Whitaker, A., and Hall, S. (2016). **Principles of fermentation technology.** (3rd ed). Butterworth-Heinemann.