

จลนพลศาสตร์การหมักของไวน์กระเจี๊ยบและการยับยั้งแอลฟา-อะไมเลส Roselle Wine's Fermentation Kinetics and Alpha-Amylase Inhibition

มินตรา ศิริบำรุง¹ สุทธิดา นามเกตุ² ชิตชนก ทับทิม³ จินดา จันดาเรือง⁴ ทิตยา ศรีภักดี⁵ ณัฐวี ภูมิสุข^{6*}

E-mail: nattawee_p@snru.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ใช้การจำลองจลนพลศาสตร์แบบไม่เชิงเส้นเพื่อตรวจสอบจลนพลศาสตร์การหมักของไวน์กระเจี๊ยบที่หมักด้วยระดับความหวานเริ่มต้นต่างๆ คือ 18, 22 และ 26 บริกซ์ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาเปรียบเทียบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส ตลอดจนลักษณะทางเคมีและกายภาพของไวน์กระเจี๊ยบ ผลการคำนวณทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของยีสต์ การบริโภคน้ำตาล และการผลิตแอลกอฮอล์สอดคล้องกับสมการ Logistic และ Luedeking-Piret ในไวน์เริ่มต้นที่ระดับความหวาน 26 บริกซ์ มีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_m) และความเข้มข้นสูงสุดของยีสต์ (X_m) สูงที่สุด ซึ่งแสดงว่าการเติบโตของยีสต์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น อย่างไรก็ตาม ที่สภาวะการหมัก 18 บริกซ์ ในระยะเวลาการหมัก 30 วัน มีอัตราการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์สูงสุด และมีประสิทธิภาพการหมักที่ 36.39% ผลึกน้ำตาลที่ไวน์กระเจี๊ยบที่ได้มีความสว่างเพิ่มขึ้น (L^*) และโทนสีแดงอมเหลือง ($+a^*$ และ $+b^*$) สารสกัดหยาบของไวน์กระเจี๊ยบที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้นที่ 18 บริกซ์ และหมักนาน 30 วัน มีฤทธิ์ยับยั้งแอลฟา-อะไมเลส สูงสุด โดยมีความสามารถในการยับยั้ง $17.61 \pm 0.06\%$ ที่ความเข้มข้น 200 mg/mL ของสารสกัดหยาบ อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากไวน์กระเจี๊ยบมีศักยภาพในการยับยั้งแอลฟา-อะไมเลสต่ำกว่าอะคาร์โบสมาก ดังนั้นจึงอาจไม่เหมาะสมสำหรับบริโภคเพื่อรักษาโรคเบาหวาน

คำสำคัญ: จลนพลศาสตร์การหมัก ไวน์กระเจี๊ยบ แอลฟา-อะไมเลส โรคเบาหวาน

Abstract

This study used non-linear kinetic simulation to examine the fermentation kinetics of roselle wines fermented with various beginning sweetness levels: 18, 22, and 26 brix. A comparison of the alpha-amylase enzyme's inhibitory action as well as the chemical and physical characteristics of roselle wine production were also investigated. The kinetic outcomes of yeast growth, sugar consumption, and alcohol production agreed with the Logistic and Luedeking-Piret equations. The maximum specific growth rate (μ_m) and greatest yeast concentration (X_m) were both found in the must starting at 26 brix, denoting that yeast growth is dependent on the initial sugar concentration. However, at 18 brix fermentation conditions, the highest sugar-to-alcohol conversion was obtained, with a fermentation efficiency of 36.39%. The primary roselle wines are produced after a 30-day fermentation period. The roselle wine was found to have increased brightness (L^*) and a reddish-yellow tone ($+a^*$ and $+b^*$). The crude extract of roselle wine starting at 18 brix and fermented for 30 days had the highest alpha-amylase inhibitory activity, with an %inhibition of 17.61 ± 0.06 at a concentration of 200 mg/mL of crude extract. Nevertheless, roselle wine extract had a much lower alpha-amylase inhibitory potential than acarbose. As a result, it might not be acceptable for consumption as a diabetes treatment.

Keywords: fermentation kinetics, roselle wine, alpha-amylase, diabetes

ความเป็นมาของปัญหา

กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) เป็นที่นิยมปลูกมาในบริเวณอำเภอเต่างอย จังหวัดสกลนคร คนในชุมชนนิยมนำกลีบเลี้ยงของดอกมาแปรรูปเป็นเครื่องดื่ม เช่น ชา น้ำกระเจี๊ยบ หรือไวน์กระเจี๊ยบ ซึ่งผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีความแพร่หลายและเป็นที่นิยมในชุมชน กระเจี๊ยบยังมีสรรพคุณช่วยลดไขมันในเส้นเลือด ลดความดันโลหิต กระเจี๊ยบมีสารประกอบฟีนอลิก แอนโทไซยานิน และวิตามินซี ทำให้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้สารสกัดจากกระเจี๊ยบยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.* และ *Salmonella sp.* ได้อีกด้วย [1] สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีความสามารถในการ

¹⁻³ นักศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรครุศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

⁴⁻⁶ อาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส (α -glucosidase) และแอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) [2] ซึ่งการยับยั้งแอลฟา-อะไมเลส และแอลฟา-กลูโคซิเดส มักจะเป็นการรักษาโรคเบาหวานในลำดับแรกเพื่อจัดการภาวะน้ำตาลในกระแสเลือดสูง แอลฟา-อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่บริเวณผนังลำไส้เล็กจะทำหน้าที่สลายออลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว การรักษาเบาหวานด้วยตัวยับยั้งแอลฟา-อะไมเลส จึงส่งผลให้การดูดซึมกลูโคสในลำไส้จากทางเดินอาหารเกิดขึ้นได้ช้าลง

ไวน์กระเจียบ ซึ่งถือว่าเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตาม การผลิตในระดับชุมชนอาศัยการทำต่อๆ กันมาอย่างไม่มีแบบแผน ไม่มีข้อมูลการศึกษากระบวนการการผลิตหรือการหมักไวน์กระเจียบทางวิทยาศาสตร์มารองรับ การศึกษากระบวนการผลิตไวน์กระเจียบในส่วนของการหมักจึงเป็นหัวข้อที่มีความน่าสนใจ และผลจากการศึกษายังสามารถนำไปตอบโจทย์ของชุมชนถึงกระบวนการผลิตไวน์กระเจียบอย่างมีประสิทธิภาพ การหมักไวน์กระเจียบที่สภาวะแตกต่างกันส่งผลต่อกระบวนการเกิดแอลกอฮอล์ และองค์ประกอบทางฟลูเคมิ ในสารสกัดกระเจียบแดงที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกสูง มี delphinidin-3-O-sambubioside, cyanidin 3-O-sambubioside และ 3-O-caffeoylquinic acid เป็นองค์ประกอบหลักและสามารถยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดสและแอลฟา-อะไมเลสได้ดี แต่เมื่อผ่านกระบวนการหมักพบว่า 3-O-caffeoylquinic acid เปลี่ยนเป็น caffeic acid ส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ลดลง ซึ่งอุณหภูมิในการหมักมีส่วนทำให้ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ลดลงเช่นกัน โดยการหมักที่อุณหภูมิสูงทำให้สารสำคัญเกิดการสลายตัว หรือเปลี่ยนเป็นสารประกอบอื่น ส่งผลให้ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองลดลงอีก [3] นอกจากนี้ในกระบวนการหมักไวน์ผลไม้ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อปริมาณกรดอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นระหว่างกระบวนการหมักเช่นกัน Otegbayo B.O. และคณะ ได้ศึกษาระยะเวลาในการหมักไวน์บิทรู พบว่าเมื่อจำนวนวันหมักเพิ่มขึ้น กรดอินทรีย์และสารประกอบฟีนอลิกจะเพิ่มขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งส่งผลต่อรสสัมผัสและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไวน์สุดท้ายโดยตรง [4] นอกจากนี้ Wang D. และคณะ ได้ศึกษาชนิดของน้ำตาล (กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส) ที่มีผลต่อกระบวนการหมักไวน์แอปเปิ้ลผ่านการศึกษาจลนพลศาสตร์การหมัก พบว่าชนิดของน้ำตาลเริ่มต้นมีผลต่อกระบวนการหมัก จากการศึกษาด้วยแบบจำลองนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการหมักไวน์แอปเปิ้ลให้ได้ประสิทธิภาพการหมักสูงต่อไปได้ [5]

จากที่กล่าวมาข้างต้นพบว่ากระเจียบมีสารสำคัญหลายชนิดที่มีสรรพคุณในด้านการแพทย์และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากระบวนการหมักไวน์กระเจียบที่กำหนดระดับน้ำตาลเริ่มต้นที่แตกต่างกันโดยใช้ยีสต์ *S. Cerevisiae* ทางการค้าในการหมัก ใช้การจำลองจลนพลศาสตร์การหมักเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์ การใช้น้ำตาลและการเกิดแอลกอฮอล์ระหว่างกระบวนการหมัก ศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และความสามารถในการยับยั้งแอลฟา-อะไมเลสของไวน์กระเจียบ ซึ่งความรู้ที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้จะเป็นองค์ความรู้ในการผลิตไวน์กระเจียบในชุมชน เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ไวน์กระเจียบที่มีคุณภาพและมีประสิทธิภาพการผลิตสูงสุด นอกจากนี้ข้อมูลในการยับยั้งแอลฟา-อะไมเลสยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกบริโภคเครื่องดื่มสำหรับผู้ที่เป็นโรคเบาหวานได้อีกด้วย

วัสดุและวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

ตัวอย่างกระเจียบแดงแห้ง จากพื้นที่ อำเภอดงหลวง จังหวัดสกลนคร, 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด 98% (3,5-Dinitrosalicylic acid; $C_7H_4N_2O_7$) ชนิด AR grade ยี่ห้อ LOBA, เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (Alpha-Amylase from *Bacillus* sp. Type II-A, lyophilized powder) ยี่ห้อ Sigma, สารมาตรฐานกลูโคส (D(+)- Glucose Monohydrate) ชนิด AR grade ยี่ห้อ QREC, โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH) ชนิด AR grade ยี่ห้อ QREC, สารมาตรฐานอะคาร์โบส (Acarbose) ยี่ห้อ Sigma และ ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin 71B) บริษัท Lalvin ประเทศแคนาดา

2. การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งกระเจียบแห้ง 280 กรัม ล้างทำความสะอาด ต้มในน้ำเดือดปริมาตร 14 L เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 70 °C ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง ตรวจสอบ pH ของน้ำกระเจียบและปรับ pH ด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต เพื่อให้อยู่ในช่วง pH 2.8-3.8 [6] วัดความหวานเริ่มต้นของน้ำกระเจียบและปรับระดับความหวานให้ได้ 18, 22 และ 26 บริกซ์ ตามลำดับ ด้วยน้ำตาลทรายขาว สำหรับการศึกษาจลนพลศาสตร์การหมักของไวน์กระเจียบ แบ่งตัวอย่างน้ำกระเจียบตัวอย่างละ 100 mL จากนั้นแบ่งตัวอย่าง 5 mL สำหรับยีสต์ *S. cerevisiae* (Lalvin 71B) ปริมาณ 0.04 g ทำการบ่มยีสต์เป็นเวลา 20 นาที ก่อนเติมยีสต์ข้างต้นลงในตัวอย่าง และหมักต่อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °C ติดตามการเจริญเติบโตของยีสต์ การลดลงของน้ำตาล และการเกิดแอลกอฮอล์เป็นระยะเวลา 14 วัน สำหรับการหมักจนได้ผลิตภัณฑ์ไวน์กระเจียบสุดท้ายเพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีตลอดจนความสามารถในการยับยั้งแอลฟา-อะไมเลส จะหมักในระยะเวลา 30 วัน

3. ศึกษาจลนพลศาสตร์การหมักของไวน์กระเจียบ

3.1 จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของยีสต์

ตรวจสอบจำนวนยีสต์โดยใช้วิธีการหาน้ำหนักแห้ง (Dry weight method) คัดแปลงจาก ชูติมา แก้วกระจาย [7] การหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำหลอดทดลองไปอบที่ อุณหภูมิ 180 °เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ร่อนอุณหภูมิลงถึงอุณหภูมิห้อง จึงนำหลอดทดลองไปชั่งน้ำหนัก จากนั้นใส่ตัวอย่างไวน์ 5 mL ที่ผ่านการหมัก 14 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนที่ใส่ออกส่วนตะกอนล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ ก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาน้ำหนักเซลล์ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) จากนั้นศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของยีสต์โดยใช้สมการ Logistic กราฟอัตราการเจริญของยีสต์ที่เกิดจากกระบวนการหมักจะมีลักษณะเป็น “S-pattern” ซึ่งจะสอดคล้องกับสมการ Logistic ซึ่งสะท้อนผลการยับยั้งในหน่วยความเข้มข้นของเซลล์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ดังสมการที่ 1

$$X(t) = \frac{X_0 e^{\mu_m t}}{1.0 - (X_0/X_m)(1.0 - e^{\mu_m t})} \quad \text{สมการที่ 1}$$

เมื่อ $X(t)$ คือ จำนวนยีสต์ที่เวลาใดๆ

X_0 คือ จำนวนยีสต์เริ่มต้น

t คือ เวลา

μ_m คือ อัตราการเติบโตจำเพาะของยีสต์สูงสุด

X_m คือ ความเข้มข้นของยีสต์สูงสุดตามลำดับ

3.2 จลนพลศาสตร์การเกิดแอลกอฮอล์

หาปริมาณแอลกอฮอล์โดยวัดความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC 945.06 [8] ศึกษาจลนพลศาสตร์การเกิดแอลกอฮอล์โดยใช้สมการของ Luedeking-Piret ซึ่งถูกสร้างขึ้นโดย Luedeking และ Piret [9] เพื่อจำลองการเกิดของกรดแลคติก และถูกนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการเกิดแอลกอฮอล์จากกระบวนการหมักอย่างแพร่หลาย ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์และการเติบโตของเซลล์ยีสต์แสดงให้เห็นว่าการเกิดแอลกอฮอล์ในกระบวนการหมักมีความล่าช้ากว่าการเจริญของยีสต์ ดังนั้นสมการการเกิดแอลกอฮอล์จะประกอบด้วยพารามิเตอร์ย่อยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของยีสต์ ดังสมการที่ 2

$$P(t) = P_0 + \alpha \cdot X_0 \left(\frac{e^{\mu_m t}}{1.0 (X_0/X_m)(1.0 - e^{\mu_m t})} - 1.0 \right) + \beta \cdot \frac{X_m}{\mu_m} \ln \left(1 - \frac{X_0}{X_m} (1.0 - e^{\mu_m t}) \right) \quad \text{สมการที่ 2}$$

เมื่อ P_0 คือ ปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้น

$P(t)$ คือ ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เวลาใดๆ

β คือ สัมประสิทธิ์แสดงความจำเพาะของยีสต์

α คือ สัมประสิทธิ์ปริมาณสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของยีสต์ต่อเวลา

3.3 จลนพลศาสตร์ของการลดลงของน้ำตาล

ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่โดยใช้วิธีไดไนโตรซาลิไซเลต (Dinitrosalicylate) นำตัวอย่างไวน์กระเจียบที่กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 เจือจางสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 25, 50 และ 125 เท่า ตามลำดับ ปิเปตสารละลายที่เจือจางแล้วใส่หลอดทดลอง จำนวน 0.5 mL ตามด้วยสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic ปริมาตร 0.5 mL นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำเย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 5 mL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคส ปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้ถูกนำไปศึกษาจลนพลศาสตร์ของการลดลงของน้ำตาลโดยใช้สมการดัดแปลงของ Luedeking-Piret ดังสมการที่ 3 [9]

$$S(t) = S_0 - \gamma \cdot X_0 \cdot \left(\frac{e^{\mu_m t}}{1.0 (X_0/X_m)(1.0 - e^{\mu_m t})} - 1.0 \right) + \eta \cdot \frac{X_m}{\mu_m} \ln \left(1 - \frac{X_0}{X_m} (1.0 - e^{\mu_m t}) \right) \quad \text{สมการที่ 3}$$

เมื่อ S_0 คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น

$S(t)$ คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เวลาใดๆ

γ_{XS} คือ สัมประสิทธิ์ปริมาณสัมพันธ์สำหรับการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นชีวมวล

$Y_{p/s}$ คือ สัมประสิทธิ์ปริมาณสัมพันธ์สำหรับการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นแอลกอฮอล์
 m_s คือ ค่าสัมประสิทธิ์การคงอยู่สำหรับการเมทาโบลิซึมของยีสต์
 η, γ คือ ค่าคงที่ เมื่อ $\gamma = \frac{1}{Y_{x/s}} + \alpha \frac{1}{Y_{p/s}}$ และ $\eta = m_s + \frac{\theta}{Y_{p/s}}$

4. ศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไวน์กระเจี๊ยบ

ศึกษาสมบัติทางเคมีของตัวอย่างไวน์กระเจี๊ยบตลอดกระบวนการหมักโดย วัดความเป็นกรด-เบส (pH) และวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด (Total acid) ในรูปของกรดมาลิกโดยไทเทรตกับ 0.1 N NaOH โดยใช้โบรโมไทมอลบลูเป็นอินดิเคเตอร์ คำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดจากสมการที่ 4

$$\text{Total acid (\%)} = \frac{V_1 \times N \times 67 \times 100}{1000 \times V_2} \quad \text{สมการที่ 4}$$

เมื่อ V_1 คือ ปริมาตร NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต
 N คือ ความเข้มข้นของ NaOH
 V_2 คือ ปริมาตรของสารตัวอย่าง
 67 คือ น้ำหนักสมมูลของกรดมาลิก

ศึกษาประสิทธิภาพการผลิต (Product efficiency) จากการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด (TRS) ไปเป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์ ดังสมการที่ 5 [10]

$$\text{Product efficiency (\%)} = \frac{ABV}{(TRS_i - TRS_f) \times SA} \times 100 \quad \text{สมการที่ 5}$$

เมื่อ ABV คือ ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น
 TRS_i คือ ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (ก่อนการหมัก)
 TRS_f คือ ปริมาณน้ำตาลสุดท้าย (หลังการหมัก)
 SA คือ ความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ หาได้จากความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างการใช้น้ำตาลและแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก

การวิเคราะห์สีสุดท้ายของผลิตภัณฑ์ไวน์กระเจี๊ยบที่ผ่านกระบวนการหมักครบ 30 วัน ตามระบบ CIELAB ดัดแปลงจากวิธีของ Ayala และคณะ [11] โดยกรองตัวอย่างไวน์ทั้งหมดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 ก่อนการวิเคราะห์โดยไม่เจือจาง วัดสีด้วยเครื่องวัดสี (Colorimeter) โดยใช้น้ำกระเจี๊ยบเริ่มต้นเป็นตัวเปรียบเทียบ รายงานผลในระบบ CIELAB ซึ่งประกอบด้วยพารามิเตอร์ (L^* , a^* , b^* , dE^*) ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ [12]

5. ศึกษาความสามารถในการยับยั้งแอลฟา-อะไมเลส

การศึกษากายยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ดัดแปลงจากวิธีของ Bernfeld [13] โดยเตรียมสารสกัดหยาบไวน์กระเจี๊ยบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 mg/mL ปริมาตร 200 μ L บ่มกับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเข้มข้น 0.01 u/ μ L ที่ละลายใน 0.02 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ที่มี 0.01 M โซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 250 μ L บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำตาลละลายแป้ง (Starch) 2% ที่ละลายใน 0.02 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ที่มี 0.01 M โซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 250 μ L บ่มต่ออีก 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ความยาวคลื่น 540 nm คำนวณร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) ดังสมการที่ 6 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งกับยาอะคาร์โบส (acarbose)

$$\% \alpha\text{-amylase inhibition} = \frac{(A-B)/A}{A} \times 100 \quad \text{สมการที่ 6}$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ
B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

6. การคำนวณ

ตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยด้วย One-Way ANOVA โดยใช้ Tukey test ($p = 0.05$) ประมวลผลข้อมูลโดยใช้โปรแกรม OriginPro, Version 2019b

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. ศึกษาजनพลศาสตร์การหมักของไวน์กระเจียบ

จากการศึกษากระบวนการหมักไวน์กระเจียบ ด้วยยีสต์ *S. Cerevisiae* โดยเตรียมไวน์เริ่มต้นให้ความหวานเริ่มต้นเท่ากับ 18, 22 และ 26 บริกซ์ ตามลำดับ ทำการติดตามกระบวนการหมักเป็นเวลา 14 วัน เพื่อศึกษาजनพลศาสตร์ของการหมักไวน์ จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลสามารถจำลองजनพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของยีสต์ जनพลศาสตร์การเกิดแอลกอฮอล์ และजनพลศาสตร์ของการลดลงของน้ำตาลได้ดังภาพที่ 1 และพารามิเตอร์ที่ได้จากการจำลองजनพลศาสตร์ข้างต้นแสดงดังตารางที่ 1 จากผลการศึกษาजनพลศาสตร์การหมักโดยใช้สมการ Logistic และ Luedeking-Piret ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9 สำหรับทุกการจำลอง แสดงว่าสมการजनพลศาสตร์มีความสอดคล้องกับผลการทดลอง และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhang, G. [9] ที่ศึกษาजनพลศาสตร์ระหว่างการหมักของน้ำมะพร้าวแก่ แสดงให้เห็นกระบวนการในระหว่างการหมักที่คล้ายคลึงกัน

1.1 जनพลศาสตร์การเจริญเติบโตของยีสต์

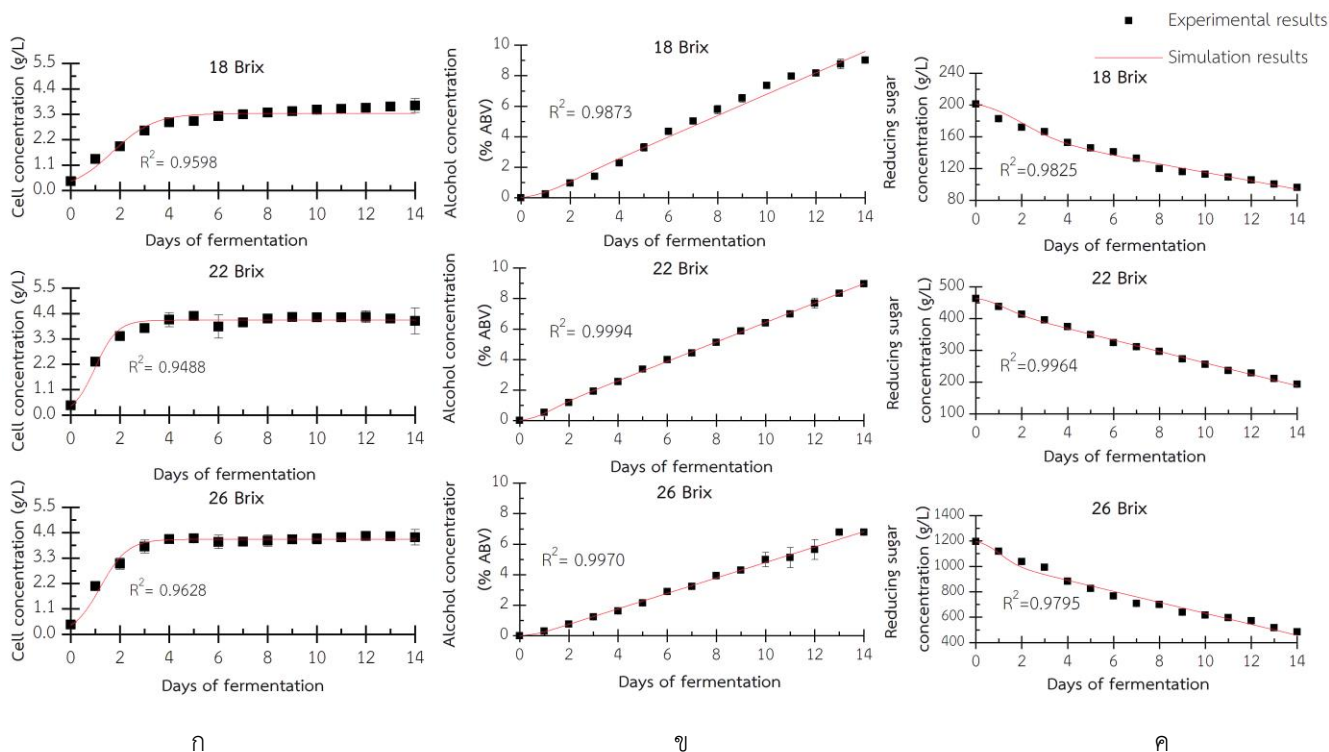
จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาजनพลศาสตร์การเจริญเติบโตของยีสต์ พบว่า μ_m (อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดของยีสต์) ของไวน์กระเจียบที่หมักที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้น 26 บริกซ์ มีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดของยีสต์สูงที่สุด (μ_m เท่ากับ 2.23) รองลงมาคือ 22 บริกซ์ และ 18 บริกซ์ ตามลำดับ โดยที่ X_m (ความเข้มข้นของสารชีวโมเลกุลสูงสุด) มีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับ μ_m แสดงให้เห็นว่ายีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดภายใต้สภาวะการหมักที่มีน้ำตาลสูง เนื่องจากน้ำตาลเป็นสารอาหารหลักในการเจริญเติบโตของยีสต์ เมื่ออัตราการเจริญของยีสต์สูงจึงทำให้จำนวนของยีสต์ในระบบสูงขึ้นด้วย จากภาพที่ 1 (ก) ยีสต์จะมีช่วงระยะการเจริญที่เห็นได้ชัด ซึ่งระยะการเจริญของยีสต์จะมีอยู่ 3 ระยะ โดยระยะแรกจะอยู่ในช่วงวันที่ 1 ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์กำลังปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่เพื่อเริ่มการเจริญ ระยะนี้จะใช้เวลาค่อนข้างสั้น เรียกระยะนี้ว่า ระยะเริ่มต้น (lag phase) ระยะที่ 2 คือระยะเจริญ (log phase) ซึ่งจะอยู่ประมาณช่วงวันที่ 2 ถึงวันที่ 6 ระยะนี้ยีสต์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ก็จะเพิ่มมากขึ้น และเซลล์ยีสต์จะเริ่มจับกลุ่มกัน แอลกอฮอล์ก็จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น และในช่วงหลังจะพบว่ากราฟค่อนข้างมีความคงที่ อาจเนื่องมาจากสารอาหารเริ่มหมดลงการเจริญหรือการแบ่งเซลล์จะลดน้อยลงจึงทำให้จำนวนเซลล์ค่อนข้างคงที่ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ก็จะลดน้อยลงจนเซลล์ยีสต์เริ่มมีการตายเกิดขึ้น ตะกอนเซลล์จะมีมากขึ้น เรียกระยะนี้ว่า ระยะตาย (death phase)

1.2 जनพลศาสตร์การเกิดแอลกอฮอล์

เมื่อพิจารณาजनพลศาสตร์การเกิดของแอลกอฮอล์ในกระบวนการหมักจากพารามิเตอร์ α และ β ซึ่งเป็นสัมประสิทธิ์ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นกับการเจริญเติบโตของยีสต์ (X_0 , X_m และ μ_m) ดังสมการที่ 2 ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 1 พบว่า ไวน์กระเจียบที่เริ่มหมักที่ 18 และ 22 บริกซ์ มีค่า α มากกว่า β ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.61 และ 1.80 และ β เท่ากับ 1.58 และ 1.26 ตามลำดับ แสดงว่าประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์ค่อนข้างมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของยีสต์ ในขณะที่ไวน์กระเจียบที่เริ่มหมักที่ 26 บริกซ์ พบว่าค่า α และ β มีค่าน้อย ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.68 และ 0.94 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์ค่อนข้างไม่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของยีสต์เมื่อหมักไวน์กระเจียบที่ความหวานเริ่มต้น 26 บริกซ์ อาจเนื่องมาจากผลของความเข้มข้นมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา และจะมีช่วงของการเข้าสู่สมดุล ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลมีความเข้มข้นมาก ยีสต์จะมีการเจริญเติบโตค่อนข้างเร็วส่งผลให้การเข้าสู่สมดุลเกิดเร็วขึ้น ดังนั้นแอลกอฮอล์อาจเปลี่ยนไปเป็นเมตาบอไลต์ตัวอื่น เมื่อเข้าสู่สมดุลที่เร็วเกินไป

1.3 जनพลศาสตร์ของการลดลงของน้ำตาล

จากการศึกษาजनพลศาสตร์การลดลงของน้ำตาล พบว่าสัมประสิทธิ์ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของยีสต์กับความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นผลิตภัณฑ์ (γ และ η) สำหรับไวน์กระเจียบที่หมักด้วยระดับน้ำตาลเริ่มต้นแตกต่างกัน ค่า γ ของไวน์กระเจียบเริ่มต้นที่ 26 บริกซ์ เท่ากับ 47.87 ซึ่งมีค่าสูงที่สุด ในขณะที่ไวน์กระเจียบที่เริ่มหมักที่ความหวาน 18 และ 22 บริกซ์ ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก (γ เท่ากับ 14.41 และ 12.20 ตามลำดับ) ซึ่งอาจเกิดจากผลของความเข้มข้นมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา สรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลสูง ยีสต์ยังเจริญเติบโตได้ดี น้ำตาลยังถูกใช้ได้มาก อย่างไรก็ตามไม่ได้หมายความว่าสามารถเกิดแอลกอฮอล์ได้ดี เนื่องจากน้ำตาลอาจถูกเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ หรือเมตาบอไลต์ตัวอื่น เช่น อัลดีไฮด์ คีโตน กรดอินทรีย์ได้เช่นกัน และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นและปริมาณน้ำตาลที่ลดลงดังตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าตลอดกระบวนการหมักไวน์กระเจียบที่เริ่มหมักที่ 18, 22 และ 26 บริกซ์ น้ำตาลรีดิวซ์ถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ที่ 0.61, 0.25 และ 0.60 ตามลำดับ ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าน้ำตาลที่ใช้ไปไม่ได้ถูกเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ทั้งหมด และยังปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นสูงกลับเกิดแอลกอฮอล์ได้น้อยลง ซึ่งน้ำตาลที่ใช้ไปถูกเปลี่ยนเป็นเมตาบอไลต์ชนิดใดนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันต่อไป



ภาพที่ 1 กราฟแสดงแบบจำลองจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของยีสต์ (ก) การเกิดแอลกอฮอล์ (ข) และการลดลงของน้ำตาล (ค) ของตัวอย่างไวน์กระเจียบที่หมักที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้น 18, 22 และ 26 บริกซ์

ตารางที่ 1 พารามิเตอร์ที่ได้จากการจำลองจลนพลศาสตร์การหมักของไวน์กระเจียบที่หมักที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้น 18, 22 และ 26 บริกซ์

จลนพลศาสตร์พารามิเตอร์		ระดับน้ำตาลเริ่มต้น (บริกซ์)		
		18	22	26
การเจริญเติบโตของยีสต์	X_0	0.40	0.40	0.40
	X_m	3.44	3.99	4.13
	μ_m	1.07	1.93	2.23
การเกิดแอลกอฮอล์	P_0	0	0	0
	α	3.61	1.80	0.68
	β	1.58	1.26	0.94
การลดลงของน้ำตาล	S_0	201.24	463.32	1195.49
	γ	14.41	12.20	47.87
	η	1.54	4.54	10.47

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นและปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปในกระบวนการหมักไวน์กระเจียบในระยะเวลา 14 วัน

ผลวิเคราะห์	ระดับน้ำตาลเริ่มต้น (บริกซ์)		
	18	22	26
ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด (g/L)	71.14	70.77	53.49
ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป (g/L)	104.97	270.79	712.05
ความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์	0.61	0.25	0.06
สัมประสิทธิ์แสดงความสัมพันธ์ (R)	0.9879	0.9986	0.9895
ประสิทธิภาพการผลิต (%)	36.39	5.99	0.38

2. สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไวน์กระเจี๊ยบ

จากการตรวจสอบความเป็นกรด-เบส ของตัวอย่างไวน์กระเจี๊ยบพบว่ามีค่า pH ลดลงจากเริ่มต้น ซึ่งมีค่า pH อยู่ระหว่าง 3.01-3.09 ซึ่งค่า pH ลดลงจากเริ่มต้นเล็กน้อย (เริ่มต้น pH 3.47) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 0.29 - 0.32 เมื่อคำนวณประสิทธิภาพการผลิตดังสมการที่ 5 โดยใช้ข้อมูลจากตารางที่ 2 ประกอบการคำนวณพบว่า ไวน์กระเจี๊ยบที่หมักด้วยระดับน้ำตาลเริ่มต้น 18, 22 และ 26 บริกซ์ในระยะเวลา 30 วัน มีประสิทธิภาพการผลิต 36.39% 5.99% และ 0.38% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลสูง ประสิทธิภาพการผลิตลดลง สอดคล้องกับปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นน้อยในขณะที่ใช้น้ำตาลไปมาก ดังนั้นจากการศึกษากระบวนการหมักไวน์กระเจี๊ยบด้วยยีสต์ *S. Cerevisiae* เชิงพานิชย์ข้างต้น กระบวนการหมักจะเกิดได้ดีและมีประสิทธิภาพสูงสุดที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้น 18 บริกซ์ ผลการวัดสีของไวน์กระเจี๊ยบรายงานตามระบบ CIELAB แสดงดังตารางที่ 3 พบว่าไวน์กระเจี๊ยบมีค่า L^* เพิ่มขึ้น (เมื่อ $L^* = 0$ สีที่ได้จะมีมืดเป็นสีดำ, $L^* = 100$ สีที่ได้จะสว่างเป็นสีขาว), a^* (a เป็น + วัดภูมิสีออกแดง, a เป็น - วัดภูมิสีออกเขียว), b^* (b เป็น + วัดภูมิสีออกเหลือง, b เป็น - วัดภูมิสีออกน้ำเงิน) และ ΔE (ค่าความแตกต่างของสีทั้งหมด) โดยไวน์กระเจี๊ยบที่หมักที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้น 18 บริกซ์ มีค่า L^* สูงที่สุด ($L^* = 37.81$) ในขณะที่ไวน์กระเจี๊ยบที่หมักที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้น 26 บริกซ์ มีค่า a^* และ b^* มากที่สุด เท่ากับ 37.79 และ 39.93 ตามลำดับ ดังนั้นไวน์กระเจี๊ยบที่หมักที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้น 18 บริกซ์ มีสีค่อนข้างสว่าง และไวน์กระเจี๊ยบที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้น 26 บริกซ์มีสีของไวน์อยู่ในโทนสีแดงอมเหลืองมากที่สุด ซึ่งสีของไวน์อาจส่งผลต่อความพึงพอใจของผู้บริโภค ดังนั้นกระบวนการหมักไวน์จึงจำเป็นต้องศึกษาและให้ความสำคัญเนื่องจากส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไวน์ทั้งทางเคมีและกายภาพโดยตรง

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ค่าสีของไวน์กระเจี๊ยบที่หมักในระยะเวลา 30 วัน รายงานผลตามระบบ CIELAB

สารทดสอบ	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
น้ำกระเจี๊ยบเริ่มต้น	5.09±0.05 ^a	22.70±0.11 ^a	6.75±0.09 ^a	-
ไวน์กระเจี๊ยบ 18 บริกซ์	37.81±0.02 ^d	28.17±0.02 ^a	32.09±0.04 ^b	41.67±0.04 ^a
ไวน์กระเจี๊ยบ 22 บริกซ์	35.69±0.09 ^c	30.85±0.05 ^{ab}	32.22±0.19 ^b	40.56±0.09 ^a
ไวน์กระเจี๊ยบ 26 บริกซ์	31.20±0.02 ^b	37.20±0.02 ^b	33.89±0.04 ^b	40.35±0.02 ^a

หมายเหตุ : อักษร a, b, c, d คือ สัญลักษณ์แสดงความแตกต่างของข้อมูลในคอลัมน์เดียวกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3. ความสามารถในการยับยั้งแอลฟา-อะไมเลส

ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของแอลฟา-อะไมเลสของสารสกัดหยาบกระเจี๊ยบและสารสกัดหยาบจากไวน์กระเจี๊ยบที่หมักที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้นแตกต่างกันในระยะเวลา 30 วัน แสดงดังตารางที่ 4 จากผลการวิจัยนี้พบว่าสารสกัดหยาบของน้ำกระเจี๊ยบจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสูงกว่าสารสกัดหยาบของไวน์กระเจี๊ยบ อาจเนื่องจากสารออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของแอลฟา-อะไมเลส สลายตัวหรือเสียสภาพไประหว่างกระบวนการหมัก สอดคล้องกับงานของ Ifie, I. และคณะ [3] ที่พบว่า 3-O-caffeoylquinic acid ถูกเปลี่ยนเป็น caffeic acid ระหว่างกระบวนการหมักทำให้ความสามารถในการยับยั้งแอลฟา-อะไมเลสลดลง อย่างไรก็ตามฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากสารสกัดหยาบของน้ำกระเจี๊ยบและไวน์กระเจี๊ยบมีประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำกว่าสารมาตรฐานอะคาร์โบส จึงสามารถสรุปได้ว่าไวน์กระเจี๊ยบอาจไม่เหมาะเป็นเครื่องดื่มเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือดสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน

ตารางที่ 4 ความสามารถในการยับยั้งแอลฟา-อะไมเลส (%Inhibition) ของสารสกัดหยาบ

สารสกัดหยาบ*	%Inhibition
น้ำกระเจี๊ยบ	32.11
ไวน์กระเจี๊ยบ 18 บริกซ์	17.61
ไวน์กระเจี๊ยบ 22 บริกซ์	12.35
ไวน์กระเจี๊ยบ 26 บริกซ์	6.85

* ความเข้มข้นสารสกัดหยาบกระเจี๊ยบ 200 mg/mL

สรุปผลการทดลอง

การศึกษากระบวนการหมักไวน์กระเจี๊ยบที่กำหนดปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่างกันคือ 18, 22 และ 26 บริกซ์ด้วยยีสต์ *S. Cerevisiae* Lalvin 71B ที่อุณหภูมิ 25 °C พบว่า จลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของยีสต์สอดคล้องกับสมการ Logistic และ จลนพลศาสตร์การเกิดแอลกอฮอล์และการลดลงของน้ำตาลสอดคล้องกับสมการ Luedeking-Piret การหมักที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้นสูง ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดี แต่อย่างไรก็ตามอัตราการผลิตแอลกอฮอล์กลับน้อยกว่าที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้นต่ำกว่า เนื่องจากน้ำตาล อาจถูกเปลี่ยนไปเป็นเมตาบอไลต์ตัวอื่น โดยไวน์กระเจี๊ยบที่หมักที่น้ำตาลเริ่มต้น 18 บริกซ์ มีประสิทธิภาพการหมักสูงสุด (61%) สารสกัดไวน์กระเจี๊ยบยับยั้งการทำงานของแอลฟา-อะไมเลสได้น้อยมากเมื่อเทียบกับอะคาร์โบส ดังนั้นการบริโภคไวน์กระเจี๊ยบจึงอาจไม่สามารถช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากกระเจี๊ยบมีสารสำคัญหลายชนิดที่มีสรรพคุณในด้านการแพทย์และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ถึงแม้ไวน์กระเจี๊ยบจะไม่สามารถช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน แต่อาจสามารถยับยั้งเอนไซม์ก่อโรคชนิดอื่นได้อีก จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อเป็นแนวทางให้ผู้บริโภคผลิตภัณฑ์ไวน์กระเจี๊ยบสามารถตัดสินใจเลือกบริโภคให้เหมาะสมกับสุขภาพของตนเองต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- [1] Chanudom, L. ., Ongsara, N. ., & Jindawong, C. . (2022). Scavenging capacity and antibacterial activity of roselle aqueous extract and wine production. **Suan Sunandha Science and Technology Journal**, 4(2), 17–22.
- [2] Ademiluyi, A. O., & Oboh, G. (2013). Aqueous extracts of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) varieties inhibit α -amylase and α -glucosidase activities in vitro. **Journal of medicinal food**, 16(1), 88-93.
- [3] Ifie, I., Marshall, L. J., Ho, P., & Williamson, G. (2016). *Hibiscus sabdariffa* (Roselle) extracts and wine: Phytochemical profile, physicochemical properties, and carbohydrase inhibition. **Journal of agricultural and food chemistry**, 64(24), 4921-4931.
- [4] Otegbayo, B.O., Akwa, I.M., & Tanimola, A.R. (2563). Physico-chemical properties of beetroot (*Beta vulgaris* L.) wine produced at varying fermentation days. **Scientific African**, 8, e00420. <<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00420>>
- [5] Wang, D., Xu, Y., & Zhao, G. (2004). Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of The Institute of Brewing**. 110(4), 340-346.
- [6] Linskens, H.F. & Jackson, J.F. (1988). **Wine Analysis**. Springer-Verlag, Berlin.
- [7] ชุตติมา แก้วกระจ่าย และพัชรีย์ สีนันทนา. (2015). การตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยขานอ้อยเพื่อการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิง. **Burapha Science Journal**, 20(2), 96-111.
- [8] Fernandes, E. N., & Reis, B. F. (2004). Automatic flow procedure for the determination of ethanol in wine exploiting multicommutation and enzymatic reaction with detection by chemiluminescence. **Journal of AOAC International**, 87(4), 920-926.
- [9] Zhang, G., Li, X., Chen, W., Chen, P., Jin, X., Chen, W., & Chen, H. (2018). Organic acid content, antioxidant capacity, and fermentation kinetics of matured coconut (*Cocos nucifera*) water fermented by *Saccharomyces cerevisiae* D254. **International Journal of Food Engineering**, 14(3), 1-13.
- [10] Alvarenga, R. M., Carrara, A. G., Silva, C. M., & Oliveira, E. S. (2011). Potential application of *Saccharomyces cerevisiae* strains for the fermentation of banana pulp. **African Journal of Biotechnology**, 10(18), 3608-3615.
- [11] Ayala, F., Echávarri, J.F., & Negueruela, A.I. (1997). A new simplified method for measuring the color of wines: I. Red and Rosé wines. **Am. J. Enol. Viticulture**, 48(3), 357-363.
- [12] Han, F. L., Zhang, W. N., Pan, O. H., Zheng, C. R., Chen, H. Y., & Duan, C. Q. (2008). Principal component regression analysis of the relation between CIELAB color and monomeric anthocyanins in young cabernet sauvignon wines. **Molecules**, 13(11), 2859-2870. <<https://doi.org/10.3390/molecules13112859>>
- [13] Bernfeld, P. (1955). Amylases, alpha and beta. **Methods in enzymology**. 1, 149-158.