บทคัดย่อ

การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไวน์มะเกี๋ยง เพื่อให้ได้เชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่มีความจำเพาะต่อมะเกี๋ยง ซึ่งมีส่วนสำคัญในการสร้างสารให้กลิ่นรสของไวน์ ดังนั้นจึงทำการแยกยีสต์จากผลมะเกี๋ยงสด พบยีสต์ ไอโซเลทที่ 3 ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพต่อการหมักแอลกอฮอล์ในขั้นตอนการผลิตไวน์มากที่สุด จากการศึกษาการเตรียมน้ำหมักมะเกี๋ยงโดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่ายีสต์สามารถเจริญในน้ำตาลกาแลคโทส กลูโคส แลคโทส มอลโทส และซูโครสได้ ในการศึกษาปริมาณไนโตรเจนและซัลเฟตที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ พบว่าน้ำหมักมะเกี๋ยงสูตรที่เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.02 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการหมักมากที่สุด และจากการศึกษาอัตราส่วนระหว่างเนื้อมะเกี๋ยงต่อปริมาณน้ำ ในอัตราส่วนต่างๆ พบว่ายีสต์สามารถเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นแอลกอฮอล์จนปริมาณของแข็งที่ละลายได้และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 6.5±2.05 องศาบริกซ์ และ 64.23±3.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้คือ 13.8±2.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผู้ทดสอบจำนวน 21 คน แบบ 20-Points Wine ประเมินตามคุณลักษณะ ความใส สี กลิ่น และรสชาติ พบว่าไวน์ที่ผลิตจากน้ำหมักมะเกี๋ยงอัตราส่วนเนื้อมะเกี๋ยงต่อน้ำ สูตร 1:1 และ 1:1.5 ได้คะแนนรวมสูงสุดคือ 18 คะแนน รองลงมาคือ สูตร 1:2 ได้คะแนนรวม 17 คะแนน สูตร 1:2.5 ได้คะแนนรวม 16 คะแนน สูตร 1:3 ได้คะแนนรวม 14 คะแนน และน้อยที่สุดคือสูตร 1:3.5 และ 1:4 ได้คะแนนรวม 11 คะแนน

Abstract

Wine yeasts were screened using the characteristics of formation of unique flavors and aromas from fresh Ma-Kiang (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*) for wine production. The isolate No. 3 showed high efficiency of ethanol production. This isolate could grow well in galactose, glucose, lactose, maltose and sucrose as a sole carbon source. The optimal condition for Ma-Kiang production needed the addition of 0.2 g/l di-ammomium hydrogen phosphate and 0.02 g/l magnesium sulfate for nitrogen source and mineral source. In such the condition, sugar was converted to ethanol from 6.5±2.0 $^{\circ}$Brix or reducing sugar at 64.23±3.29 g/l to 13.8±2.5% (v/v) of ethanol. For, the sensory evaluation using 21 testers with 20-Point wine scale technique for color, clarity, smell and flavor. The ratios of Ma-Kiang fruit and water at 1:1 and 1:1.5 showed highest score level at 18. The treatments with the ratio of 1:2, 1:2.5 and 1:3 gave the level of score of 17, 16 and 14, respectively. The lowest score of sensory evaluation was the treatments 11 with the ratio of 1:4.

บทที่ 1
บทนำ

ไวน์มะเกี๋ยงเป็นไวน์ผลไม้ที่จัดอยู่ ในกลุ่ม ไวน์ชมพู (rose or pink wine) เป็นไวน์ชนิด Table wine มีปริมาณแอลกอฮอล์ 9 ถึง 14 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นไวน์เพื่อสุขภาพได้ในอนาคต ปัจจุบันพบว่าการผลิต ไวน์มะเกี๋ยง ผลิตจากเชื้อยีสต์ในสปีชีส์ *Saccharomyces cerevisiae* สำเร็จรูปในลักษณะของยีสต์ผง (active dried yeast) หรือยีสต์สดที่หาซื้อได้ทั่วไปซึ่งมีความสะดวกต่อการนำมาใช้ แต่การใช้เชื้อยีสต์ที่ไม่ได้มาจากธรรมชาติของผลไม้ชนิดนั้นๆ จะทำให้ไวน์ขาดรสชาติและกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ของผลไม้ (Pretorius., 2000)

S. cerevisiae เป็นยีสต์หลักที่ใช้หมักน้ำองุ่น ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตเป็นยีสต์ผง จำหน่ายให้โรงงานผลิตไวน์เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น (หัวเชื้อ) ในการหมัก โดยมีจุดประสงค์ให้ผลิตไวน์ที่มีคุณภาพได้สม่ำเสมอ การหมักเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยไม่มีเชื้ออื่นปลอมปน งานวิจัยในปัจจุบันพบว่าถ้าเป็นการหมักตามธรรมชาติยีสต์สายพันธ์ *S. cerevisiae* ไม่ได้เป็นยีสต์หลักเพียงสายพันธุ์เดียว ที่พบในผลองุ่น แต่ยังพบยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ ในผลองุ่นด้วย ที่เรียกรวมๆ กันว่า ยีสต์ป่า (wild yeast) จากการศึกษาของ Goto และ Yokotsuka (1977) พบว่าปริมาณยีสต์ที่ตรวจพบในผลองุ่นที่คั้นสดนั้นแปรผันไปตามระยะเวลาการเก็บเกี่ยวองุ่น ไร่องุ่น และปีที่เก็บเกี่ยว ยีสต์ที่พบ เช่น *Kloeckera apiculata, Hansenula anomala, Candida* spp. เป็นต้น นอกจากจะใช้ยีสต์แต่ละสายพันธุ์ในขั้นตอนการหมักไวน์ ยีสต์ผลิตเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้น้ำตาลในน้ำองุ่นในการเจริญเติบโต แล้วยังมีผลต่อชนิดและปริมาณสารเคมีในไวน์ที่มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อกลิ่น รสชาติของไวน์ (Lambrechts and Pretorius., 2000) จากผลพลอยได้ของการหมัก จะได้สารให้กลิ่น รสชาติต่างๆ มากมาย เช่น กรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ และเอสเทอร์ต่างๆ เป็นต้น ยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวกับยีสต์อีกหลายด้านที่ยังไม่ได้ศึกษาอีกมาก เช่นคุณสมบัติของยีสต์ *S. cerevisiae* จากธรรมชาติ การเลือกใช้ยีสต์ให้เหมาะสมกับรูปแบบของไวน์ผลไม้ที่ต้องการผลิต การผลิตสารฆ่ายีสต์ชนิดอื่น (killer toxin) ความทนทานต่อแอลกอฮอล์ การศึกษาผลของสารอาหารในน้ำองุ่นที่มีต่อสรีรวิทยาของยีสต์ ได้แก่ การผลิตสารทางชีวเคมีต่าง ๆ การผลิตสารประกอบซัลเฟอร์ ซึ่งมีผลเสียต่อการหมักไวน์เป็นต้น

ดังนั้นผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะแยกเชื้อยีสต์จากผลมะเกี๋ยงให้ได้สายพันธุ์ที่มีความจำเพาะ และมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการผลิตไวน์มะเกี๋ยงให้มีคุณภาพใกล้เคียงกับสากลและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในด้านของตัวผลิตภัณฑ์ สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีและนำไปใช้ในระดับกลุ่มสหกรณ์ กลุ่มเกษตรกร ชุมชน อุตสาหกรรมหรือผู้ที่สนใจได้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาสมบัติบางประการและหาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์ที่แยกได้เพื่อใช้ในกระบวนการหมักไวน์
2. ศึกษาประสิทธิภาพการหมักของเชื้อยีสต์ที่แยกได้
3. ศึกษาการผลิตและการบ่มไวน์มะเกี๋ยง

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตไวน์และไวน์ผลไม้

การหมักไวน์และไวน์ผลไม้ ในปัจจุบันนิยมใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้ว ทั้งในระดับอุตสาหกรรมและเชิงพานิชย์มากมาย เช่นสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* (Anfang et al., 2009 ; Bely et al., 2008 ; Fleet. 2003) ซึ่งมีหลากหลายสายพันธุ์ด้วยกัน อาจอยู่ในรูปแบบของยีสต์สดหรือยีสต์ผง (active dried yeasts) และอาจใช้แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติคมาร่วมในการผลิตไวน์แดงหรือไวน์ผลไม้บางชนิดอีกด้วย

ยีสต์ที่เกี่ยวกับการหมัก (fermentative yeasts) หลายจีนัสที่พบในน้ำผลไม้ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไวน์ส่วนใหญ่ สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 8 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ขึ้นไป

Saccharomyces sp. เป็นยีสต์มีบทบาทมากที่สุดในการผลิตไวน์ (Fugelsang et al., 2007) ในสภาวะที่เหมาะสมบางสายพันธุ์สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงถึง 16 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในการหมักที่มีการเติมน้ำเชื่อมลงไปเป็นช่วงๆ ของการหมักอาจทำให้ยีสต์สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หรือมากกว่า (Querol et al., 1990) ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล ได้แก่ สารอาหาร ความเป็นกรด ด่าง (ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4 ถึง 4.5) อุณหภูมิ ความเข้มข้นของน้ำตาล ความเข้มข้นของเอทานอลและปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำหมัก เป็นต้น *Saccharomyces* sp. จัดอยู่ในกลุ่มยีสต์ที่เกี่ยวกับการหมัก ลักษณะสัณฐานวิทยาเซลล์มีรูปร่างทรงกลมจนถึงรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5x10 ไมโครเมตร ขนาดและรูปร่างขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

Zygosaccharomyces sp. เป็นยีสต์ที่เจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง ทนต่อซัลเฟอร์ไดออกไซด์มากกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดซอร์บิก (sorbic acid) มากกว่า 800 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดเบนโซอิก (benzoic acid) มากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารฆ่าเชื้อไดเมทิลไดคาร์บอเนท (dimethydicarbonate, DMDC) มากกว่า 500 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า *Z. bailii* สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่าง ต่ำกว่า 2 และแอลกอฮอล์สูงกว่า 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (Thomas et al., 1985)

Brettanomyces sp. ยีสต์สายพันธุ์นี้มีลักษณะคล้าย *S. cerevisiae* แต่มีขนาดเล็กกว่า *Brettanomyces* sp. เป็นปัญหาหลักของไวน์ที่กำลังบ่มในถังไม้ (barrel-aging wine) อย่างไรก็ตาม *Brettanomyces* sp. เป็นยีสต์ที่เกี่ยวกับการหมักโดยสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ถึง 10 ถึง 11 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (Fuglesang et al., 2007)

Kloecker sp. และ *Hanseniaspora* sp. ยีสต์กลุ่มนี้ถือว่าเป็นกลุ่มที่เจริญเด่นที่สุดในน้ำผลไม้ ยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์นี้พบมากในน้ำผลไม้ที่ยังไม่ได้เติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ หรือในช่วงที่เกิดการหมักตามธรรมชาติ เซลล์ของยีสต์เหล่านี้มีลักษณะคล้ายลูกมะนาว (apiculate or lemon-shaped) ยังพบว่า *K.*

apiculata สามารถเจริญได้ในที่ที่มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์สูงถึง 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (Heard et al., 1988) และทั้งสองสายพันธุ์ สามารถผลิตกรดอะซิติกและเอทธิลอะซิเตทได้สูงจนถึงในระดับที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่ใช้ในการหมัก ที่ทนความเป็นกรดได้ต่ำ เช่น *S. cerevisiae* ดังนั้นการที่มีการเจริญของยีสต์เหล่านี้จึงเป็นผลเสียต่อการหมักไวน์ สายพันธุ์ที่พบมากที่ถือว่าเป็นสายพันธุ์ฆาตกร (killer strains) คือ *K. uvarum*

คุณสมบัติของยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์และไวน์ผลไม้

สายพันธุ์ของยีสต์และสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อมีผลต่อสามารถในการเจริญและการให้ผลิตภัณฑ์ รวมถึงสามารถทนต่อปริมาณแอลกอฮอล์ได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติที่ดีของยีสต์ที่ใช้ในการผลิตไวน์และผลไม้ดังนี้

1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูง
2) ทนต่อปริมาณเอทานอลสูงได้
3) ทนความเป็นกรดสูง
4) ทนซัลเฟอร์ไดออกไซด์ได้
5) ทนความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นได้สูง
6) สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide) ต่ำ
7) สามารถตกตะกอนได้ง่าย
8) ไม่ทำให้เกิดฟองในระหว่างการหมัก
9) ไม่เกิดการกลายพันธุ์ได้ง่าย
10) เป็นยีสต์ที่เจริญแล้วสามารถสร้างสารที่ทำลายจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นได้

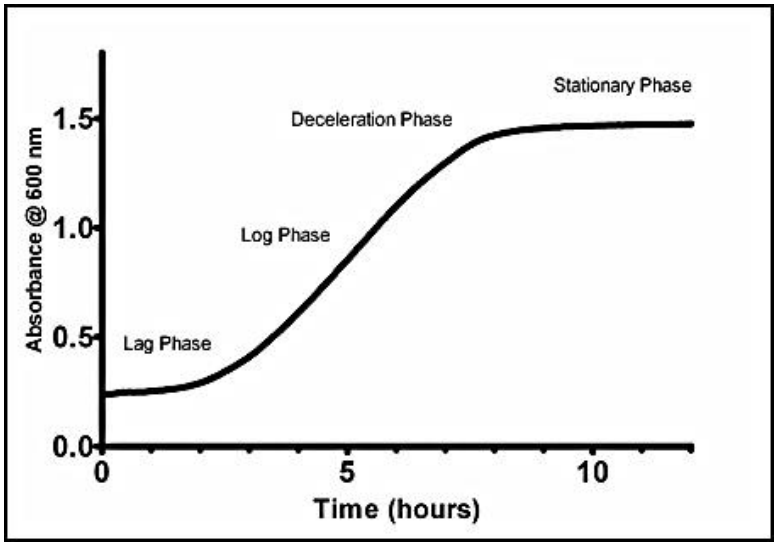
ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (wine yeasts) มีมากกว่า 300 ชนิด โดยยีสต์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการผลิตแอลกอฮอล์ที่แตกต่างกัน ให้กลิ่น รสชาติ ของไวน์และไวน์ผลไม้ที่มีเอกลักษณ์แตกต่างกัน (Sua´rez et al., 2005) นอกจากนี้คุณลักษณะที่ดีของไวน์และไวน์ผลไม้ ยังขึ้นอยู่กับสภาวะของอุณหภูมิของสถานที่ที่ใช้ผลิตไวน์ ดังเช่นประเทศทางยุโรปตะวันออกส่วนใหญ่ใช้ยีสต์สายพันธุ์ *S. vini* หรือ *S. ellipsoideus* ประเทศแคนาดานิยมใช้ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* ร่วมกับ *S. florentinus*, *S. steineri* และ *Torolopsis* sp. ในขณะที่ประเทศอิตาลีใช้ยีสต์สายพันธุ์ *S. rosei* (Romano et al., 2002) ที่รัฐแคริฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา เลือกใช้ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* var. *burgundy* และ *S. cerevisiae* var. *champagne* ส่วนการผลิตไวน์ที่มีปริมาณน้ำตาลต่ำหรือดรายไวน์ (dry wine) นิยมใช้ยีสต์สายพันธุ์ *S. oviformis* นอกจากยังพบยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces* ที่โดดเด่นในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ และที่ไม่ใช่ *Saccharomyces* เช่น *Kloeckera candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Hanseniaspora* และ *Metschnikowia* ที่เติบโตในขั้น

แรกของกระบวนการหมัก ในการผลิตเครื่องดื่มไซเดอร์แอปเปิ้ลแบบดั้งเดิมตามวิธีธรรมชาติในเมือง Asturias ประเทศสเปน เป็นต้น (Cabranes et al., 1997)

สำหรับการผลิตไวน์และไวน์ผลไม้ในประเทศไทยส่วนใหญ่นิยมใช้ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* เนื่องจากสามารถหมักได้ดีที่อุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตาม การเลือกสายพันธุ์ยีสต์เพื่อใช้ในการผลิตไวน์ผลไม้ยังขึ้นกับชนิดของผลไม้ด้วย เช่น การหมักไวน์มังคุด ควรใช้ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* var. *burgundy* ส่วนการผลิตไวน์มะพร้าว ควรใช้ยีสต์สายพันธุ์ *S. ellipsoideus* TISTR และไวน์กล้วยหอม ควรใช้ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* var. *champagne* เป็นต้น

ลักษณะการเจริญของยีสต์ (growth curve of yeast)

การผลิตไวน์และไวน์ผลไม้ให้มีคุณภาพสูง นอกจากการใช้วัตถุดิบที่ดีแล้ว การเลือกสายพันธุ์ยีสต์และการเตรียมกล้าเชื้อให้เหมาะสม เพื่อใช้ในกระบวนการหมัก เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากอีกอย่างหนึ่ง โดยก่อนเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ จำเป็นต้องคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมเพื่อให้ได้ยีสต์ที่แข็งแรงและมีจำนวนเพียงพอแก่ปริมาณน้ำผลไม้ที่ใช้ในการหมัก ซึ่งต้องอาศัยความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกราฟการเจริญเติบโต (growth curve) ของยีสต์ด้วย



ภาพ 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ยีสต์บนสเกลล็อก (log scale) กับเวลาบนสเกลปกติ

เมื่อนำกล้าเชื้อถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และตรวจวัดอัตราการเจริญเติบโตโดยวิธีนับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่เวลาต่างๆ เป็นระยะ จากนั้นเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ยีสต์บนสเกลล็อก (log scale) กับเวลาบนสเกลปกติจะได้กราฟการเจริญ ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 ระยะ คือ

1) ระยะปรับตัว (lag phase) เป็นระยะที่ยีสต์ปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่และเตรียมตัวให้พร้อมเพื่อจะเพิ่มจำนวนในระยะถัดไป ความยาวของระยะปรับตัวขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม อาหารที่ใช้เลี้ยง และอายุของกล้าเชื้อที่ใช้

2) ระยะล๊อกหรือระยะการเจริญสูงสุด (log phase or exponential phase) เป็นระยะที่ยีสต์แตกหน่อ แบ่งตัว และเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในอัตราที่คงที่ ระยะนี้จะมีอัตราการเจริญสูงสุด และเซลล์ยีสต์จะเป็นเซลล์ที่แข็งขันหรือว่องไว (active cells) สารอาหารจะถูกใช้อย่างมากและรวดเร็ว

3) ระยะคงที่ (stationary phase) เป็นระยะที่ยีสต์มีปริมาณสูงสุดและคงที่ อาจมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเล็กน้อย แต่อัตราการเพิ่มจำนวนของยีสต์เท่ากับอัตราการตาย ระยะนี้สารอาหารจะถูกใช้ไปเกือบหมด

4) ระยะตาย (death phase or decline phase) เป็นระยะที่ยีสต์ตายอย่างรวดเร็ว ทำให้จำนวนเซลล์ลดลงอย่างมาก เนื่องจากสารอาหารหมดเกิดการสะสมของเสียและสารพิษที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม

ประโยชน์ของการใช้ยีสต์สายพันธุ์ทำไวน์และไวน์ผลไม้

ในการผลิตไวน์และไวน์ผลไม้ นิยมใช้ยีสต์สายพันธุ์ทำไวน์หรือยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกแล้ว แทนการใช้ยีสต์สายพันธุ์ธรรมชาติ เนื่องจากมีข้อได้เปรียบดังนี้

1) มีการเริ่มต้นของการหมักช่วงแข็งขันหรือว่องไว (active fermentation) ได้เร็วกว่า คือ มีช่วงปรับตัว (lag phase) สั้นกว่า

2) สามารถใช้น้ำตาลในการหมักได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้ทำนายอัตราการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้

3) สามารถทนต่อปริมาณแอลกอฮอล์ได้สูงกว่า

นอกจากนี้แล้วยังมีคุณสมบัติอื่นๆ ของยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการผลิตไวน์และไวน์ผลไม้ ดังนี้

1) สามารถผลิตผลพลอยได้ (by-products) ที่ต้องการได้สูง เช่น เอสเทอร์ (ester) และผลิตผลพลอยได้ที่ไม่ต้องการได้ต่ำ เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เป็นต้น

2) สร้างกรดอะซิติก และอะซีตัลดีไฮด์ต่ำ

3) เกิดฟองน้อย และมีการหมักอย่างสมบูรณ์

4) เป็นยีสต์ที่เจริญที่ก้นภาชนะ (bottom yeast) เพราะทำให้ไวน์ใสได้ง่าย ทำให้แยกตะกอนได้ง่าย

5) มีความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการในการหมักไวน์ได้ เป็นต้น

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับยีสต์และยีสต์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไวน์และไวน์ผลไม้

ยีสต์ มีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับจีนัส สายพันธุ์ อายุของการเลี้ยง และชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงยีสต์ (Barnett et al., 1990) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่พบตามธรรมชาติส่วนใหญ่มีเซลล์เป็นรูปไข่หรือวงกลม การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ และยังพบว่าการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการบางครั้งอาจมีการเพิ่มจำนวน โดยมีวงจรแบบอาศัยเพศโดยเซลล์แม่จะสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) ที่จะเจริญและได้เซลล์ปกติ (vegetative cells)

1. ชีวเคมีของการเกิดกลีเซอรอล

นอกจากยีสต์จะเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแล้ว ยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้ทำไวน์และไวน์ผลไม้ ยังสามารถเปลี่ยนกลูโคสโดยวิถีการหมักกลีเซอรอลไพรูวิก (glyceropyruvic fermentation) ให้ได้กลีเซอรอลและไพรูเวท โดยการเกิดกลีเซอรอลนั้นส่วนใหญ่จะเกิดในระยะเริ่มต้นของกระบวนการหมัก ซึ่งการเกิดกลีเซอรอลจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์และปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์เริ่มต้น ที่มีอยู่ในน้ำผลไม้ก่อนหมัก เพราะซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับอะซีตัลดีไฮด์ ทำให้อะซีตัลดีไฮด์ไม่สามารถรีดิวซ์ต่อไปเป็นเอทานอล ซึ่งทำให้วิธีการผลิตเอทานอลหยุดลง (Remize et al., 1999)

ส่วนใหญ่กลูโคส 8 เปอร์เซ็นต์ จะถูกเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอล และอีก 92 เปอร์เซ็นต์ จะเปลี่ยนเป็นเอทานอล ส่วนไพรูเวทสามารถเปลี่ยนต่อไปเป็นสารอื่นๆ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ล้วนมีผลต่อกลิ่นและรสชาติของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

2. ชีวเคมีของการเกิดแอลกอฮอล์โมเลกุลสูง

ยีสต์สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นแอลกอฮอล์โมเลกุลสูง (higher alcohol) หรือ ฟูเซลออยล์ (fusel oils) โดยโมเลกุลของกรดอะมิโนจะเกิดปฏิกิริยาดึงเอาแอมโมเนียออกจากโมเลกุลของกรดอะมิโน (deamination) ได้เป็นกรดคีโท (α-ketonic acid) จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ดึงหมู่คาร์บอกซิล เอาคาร์บอนไดออกไซด์ออกได้เป็นแอลกอฮอล์ (decarboxylation) โดยปฏิกิริยาสุดท้ายจะมีการใช้ $NADH_2$ โดยเปลี่ยนเป็น NAD^+ (Fleet., 2003) จากกระบวนการดังกล่าวจะทำให้ได้ชนิดและปริมาณของแอลกอฮอล์โมเลกุลสูงแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของแอลกอฮอล์

3. การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางชีวเคมีโดยยีสต์

ยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์และไวน์ผลไม้ส่วนใหญ่ จะเป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตและทนแอลกอฮอล์ได้ดี ตกตะกอนแยกออกจากไวน์ได้ง่าย โดยกิจกรรมหลักของยีสต์นั้นจะเปลี่ยนน้ำตาล 1 โมเลกุล ได้เป็นเอธานอล 2 โมเลกุล คาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล และพลังงาน ซึ่งปฏิกิริยาที่แสดงในภาพ 2.2 และ 2.3 เป็นปฏิกิริยาพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลงในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทุกชนิด กระบวนการผลิตเอทานอลในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ส่วนใหญ่เป็นการเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการเมทาบอ

ลิซึมของยีสต์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ขั้นตอนแรก เมื่อยีสต์เจริญในอาหารที่มีน้ำตาล ยีสต์จะย่อยสลายน้ำตาลผ่านวิถีไกลโคไลซีส (glycolytic pathway) หรือ Embden – Meyerhof pathway (EMP) โดยการเปลี่ยนกลูโคส 1 โมเลกุล เป็นไพรูเวท 2 โมเลกุล การเปลี่ยนแปลงในขั้นนี้จะเกิดขึ้นได้ ไม่ว่ายีสต์จะเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน ขั้นตอนต่อมาไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนต่อไปให้ผลผลิตสุดท้ายต่างกัน ตามชนิดของยีสต์และสภาวะแวดล้อมในกระบวนการหมัก โดยจะแบ่งการเปลี่ยนแปลงออกเป็น 2 ประเภท คือ

1) การหายใจโดยใช้อากาศ (oxidative metabolism or aerobic respiration)

ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นไพรูเวท (pyruvate) จากนั้นในสภาวะที่มีออกซิเจน ไพรูเวทจะเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยผ่านวิถีการหายใจได้พลังงาน 30 ATP รวมกับขั้นตอนแรก 6 ถึง 8 ATP (2 ATP รวมกับ 4 ถึง 6 ATP ที่ได้จากการเปลี่ยน $NADH_2$ โมเลกุล) เป็น 36 ถึง 38 ATP ในสภาวะนี้จะมีจำนวนเซลล์ยีสต์เพิ่มมากขึ้น ดังสมการ ภาพ 2.2

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6H_2O + 2CO_2 + 36ATP + \text{ความร้อน}$$

กลูโคส ออกซิเจน → น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์

ภาพ 2.2 สมการการเปลี่ยนแปลงโดยทั่วไปของการหายใจโดยใช้อากาศ

2) การหายใจโดยไม่ใช้อากาศ (fermentative metabolism or anaerobic fermentation)

ในสภาวะที่น้ำตาลกลูโคสมีความเข้มข้นสูงและ/หรือในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ยีสต์จะเปลี่ยนไพรูเวทเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ จะเรียกว่า เกิดการหมัก (fermentation) ขึ้น โดยในสภาวะนี้จะมีเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยและจะมีการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นอะซีตัลดีไฮด์แล้วถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นเอทานอล ส่วน $2NADH_2$ ที่ได้จากขั้นตอนแรกถูกเปลี่ยนเป็น $2NAD^+$ ในขั้นตอนการเปลี่ยนเอทานอล เพื่อนำกลับไปใช้ในการสังเคราะห์ 2ATP อีกรอบหนึ่ง ทำให้วิถีการเจริญเติบโตของยีสต์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนดำเนินต่อไปได้ โดยมี $2NAD^+$ เพียงพอในการใช้งาน ดังสมการ ภาพ 2.3

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP + \text{ความร้อน}$$

กลูโคส → เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์

1 โมล → 2 โมล 2 โมล

180.16 กรัม → (2x46.65 กรัม) (2x44 กรัม)

51.1*เปอร์เซ็นต์ → 48.9 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก)

ภาพ 2.3 สมการการเปลี่ยนแปลงโดยทั่วไปของการหมักโดยไม่ใช้อากาศ

ในทางปฏิบัติจะได้เอทานอลไม่เกิน 47 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น เนื่องจากคาร์บอนบางส่วนถูกนำไปสร้างเป็นคาร์บอนในเซลล์ (0.8 ถึง 1.3 เปอร์เซ็นต์) และผลพลอยได้อื่นๆ เช่น กลีเซอรอล (glycerol) และกรดอินทรีย์ เป็นต้น

ขั้นตอนการผลิตและปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักไวน์และไวน์ผลไม้

ในการผลิตไวน์และไวน์ผลไม้ให้มีคุณภาพดีและได้ไวน์ที่มีรสชาติเยี่ยมนั้น กรรมวิธีการหมักตั้งแต่การคัดเลือกวัตถุดิบ การบ่ม การบรรจุขวดและการเก็บรักษามีความสำคัญต่อคุณภาพไวน์ทั้งสิ้น (ปราโมทย์. 2532,. Zoecklien. 1995)

1. การเตรียมวัตถุดิบและการเตรียมน้ำผลไม้สำหรับการหมัก

น้ำผลไม้บริสุทธิ์ที่ได้มาจากผลไม้สุกเต็มที่ จะมีองค์ประกอบหลักทางเคมีเพียงพอกับความต้องการในการเจริญของยีสต์ตลอดกระบวนการหมัก แต่น้ำผลไม้ที่มีการปนเปื้อนโดยราหรือแบคทีเรียมาก่อน อาจขาดสารอาหารบางอย่างได้ ตลอดจนน้ำผลไม้ที่ผลิตจากผลไม้ที่มีความเป็นกรดสูงหรือเปรี้ยวจัดจะต้องใช้น้ำ และน้ำตาลในการผสมลงไปในอัตราที่สูง มักขาดสารอาหารหลัก คือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ไวตามินและเกลือแร่ จึงอาจต้องเติมสารอาหารลงไป เช่น ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 ถึง 0.6 กรัมต่อลิตร ไทอะมีน 0.4 ถึง 0.6 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร เป็นต้น

1) **ชนิดผลไม้** ผลไม้เกือบทุกชนิดสามารถนำมาทำไวน์ได้ แต่กลิ่น รสชาติและคุณภาพจะแตกต่างกันไป ผลไม้ที่เหมาะสมควรมีคุณภาพดี มีทั้ง รสเปรี้ยว รสฝาด และรสหวาน ประกอบด้วยกรดอินทรีย์ที่เหมาะสม มีสารโพลีฟีนอล ได้แก่ แทนนิน (tannin) และควรมีน้ำตาลอย่างเพียงพอ การเลือกผลไม้ควรคำนึงถึงสายพันธุ์ แหล่งที่ปลูก สภาวะแวดล้อมที่ปลูกควรเหมาะสมต่อชนิดของผลไม้ ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อคุณภาพของไวน์ (ปราโมทย์, 2532)

2) **การเตรียมผลไม้ (น้ำหมัก)** การเตรียมน้ำผลไม้สำหรับการหมักไวน์ เป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในการหมักไวน์ เพราะคุณภาพน้ำหมักมีผลต่อคุณลักษณะและคุณภาพของไวน์ที่หมักได้ทั้งหมด ผลไม้ที่ใช้ควรเลือกผลไม้ที่สุกจัด เพราะผลไม้ที่สุกจัดจะมีความหวานเพิ่มขึ้น มีความเปรี้ยวลดลง จะมีผลทำให้ได้ไวน์ที่มีรสชาติดีขึ้นและมีกลิ่นหอมของผลไม้ที่สุกเต็มที่ ผลไม้ที่อ่อนหรือยังไม่สุกเมื่อนำมาทำไวน์อาจมีรสเฝื่อน ขม และอาจมีกลิ่นของผลไม้อ่อน ส่วนผลไม้ที่มีบางส่วนเน่าเสียไม่ควรนำมาทำไวน์ เพราะเมื่อผลไม้เน่าเสียจะมีเชื้อยีสต์และจุลินทรีย์อื่นๆ เจริญอยู่รอบๆ รอยเน่าเป็นจำนวนมาก เชื้อเหล่านี้จะสร้างกลิ่น รสชาติ ที่ไม่ดีมีผลต่อคุณภาพไวน์ที่ได้ด้วย นอกจากนี้ส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมน้ำหมักและการล้างวัตถุดิบ เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกก็มีผลต่อคุณภาพของไวน์เช่นกัน (ธีรวัลย์, 2545)

การสกัดน้ำผลไม้หรือคั้นน้ำผลไม้ ผลไม้ต้องสะอาดไม่เน่าเสีย ปราศจากยาฆ่าแมลง ผลไม้บางชนิดควรล้าง ก่อนนำมาสกัดระวังไม่ให้เมล็ดแตกในระหว่างการคั้นหรือสกัด เพราะในเมล็ดมีแทนนินสูง จะทำให้รสขมจัด ระวังไม่ให้มีการเติมออกซิเจนแก่น้ำผลไม้ หรือให้น้ำผลไม้สัมผัสกับอากาศนานเกินไป

ผลไม้ที่มีความอ่อนนุ่ม เช่น สตรอเบอรี่ มะม่วง มะขาม การสกัดน้ำผลไม้ทำได้ค่อนข้างยาก เมื่อใช้แรงบีบอัดผลไม้จะทำให้เนื้อผลไม้เละได้ ทำให้ส่วนของเนื้อและน้ำผลไม้รวมกัน (pulp) แทนที่จะได้เฉพาะน้ำผลไม้ ซึ่งจะทำให้ไวน์ที่ได้ขุ่น เพื่อลดความขุ่นควรหั่นผลไม้เป็นชิ้นๆ แช่ในน้ำระหว่างการหมัก

ผลไม้ที่มีความนุ่มปานกลาง เช่น มะเฟือง สับปะรด เสาวรส ส่วนใหญ่จะมีปริมาณน้ำมาก จึงง่ายต่อการสกัดน้ำผลไม้ออกมา หลังจากสับให้ละเอียด ทำการบีบคั้นด้วยผ้าขาวบางหรือเครื่องบีบน้ำผลไม้แบบไฮโดรลิก

ผลไม้ที่มีความแข็งและมีปริมาณน้ำน้อย เช่น มะยม มะเกี๋ยง ลูกหว้า และกระเจี๊ยบแดง โดยทั่วไปจะทำการต้ม เพื่อสกัดน้ำและสารอาหารที่มีในผลไม้ออกมาให้มากที่สุด แต่การต้มจะทำให้สี กลิ่น และรสชาติของน้ำผลไม้เปลี่ยนไป จึงควรใช้วิธีการสกัดที่ไม่ผ่านความร้อนจะดีที่สุด

2. การปรับปริมาณกรดและน้ำตาลในน้ำหมัก

ปริมาณกรดและน้ำตาลในน้ำหมัก ควรมีปริมาณที่เหมาะสมและเพียงพอที่ยีสต์จะเจริญและสร้างแอลกอฮอล์ในระดับที่ต้องการ ปริมาณกรดที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.4 ถึง 0.6 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และปริมาณน้ำตาล 180 ถึง 200 กรัมต่อลิตร (ธีรวัลย์, 2545) ในการปรับปริมาณกรดนั้น ปริมาณกรดที่น้อยเหมาะ ในการทำไวน์ที่ไม่หวาน (ค่าความเป็นกรด ด่าง 4.0 ถึง 4.5) ปริมาณกรดที่มากเหมาะในการทำไวน์หวาน (ค่าความเป็นกรด ด่าง 3.0 ถึง 4.0) เนื่องจากไวน์หวานมีปริมาณน้ำตาลสูงกว่าในไวน์ไม่หวาน จึงต้องการกรดสูงเพื่อให้เกิดความสมดุลของรสชาติ โดยทั่วไปในการหมักจะปรับค่าความเป็นกรด ด่าง ให้อยู่ระหว่าง 3.0 ถึง 3.6 หรือมีปริมาณกรด 0.4 ถึง 0.6 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (ปราโมทย์, 2532; ธีรวัลย์, 2545) ในการปรับปริมาณน้ำตาลในน้ำหมัก นิยมใช้น้ำตาลซูโครสหรือน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (Refined sugar) ในการทำไวน์และไวน์ผลไม้มากที่สุด เนื่องจากมีราคาถูก หาได้ง่าย และยีสต์สามารถใช้เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ได้ ปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักที่เหมาะสมในการทำไวน์และไวน์ผลไม้ คือ ประมาณ 20 ถึง 21 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หรือ 20 ถึง 21 องศาบริกซ์ ในการเติมน้ำตาลในน้ำหมักต้องคำนึงถึงปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำหมักด้วย แต่ถ้าต้องการไวน์หวานก็อาจเพิ่มปริมาณน้ำตาลให้สูงขึ้นเป็น 22 ถึง 25 องศาบริกซ์ และถ้าทำการหมักที่อุณหภูมิสูง เช่นในฤดูร้อน ควรลดปริมาณน้ำตาลให้ลดต่ำลงเล็กน้อย เพราะที่สภาวะอุณหภูมิสูง ยีสต์ทนต่อความเข้มข้นแอลกอฮอล์ต่ำกว่าที่สภาวะอุณหภูมิต่ำ ทำให้ยีสต์ใช้น้ำตาลไม่หมด อาจเป็นสาเหตุให้ยีสต์หยุดการหมักก่อนกำหนด (ปราโมทย์, 2532)

ผลไม้แต่ละชนิดที่นำมาใช้ทำไวน์ผลไม้ จะมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน เช่น มีปริมาณน้ำตาล ปริมาณกรด ไวตามินต่างๆ แร่ธาตุ และสารอาหารอื่นๆ ซึ่งองค์ประกอบที่แตกต่างกันนี้จะมีผลต่อการหมักและคุณภาพของไวน์ผลไม้ที่ได้ ดังนั้นในการหมักไวน์และไวน์ผลไม้ให้ได้คุณภาพค่อนข้างคงที่จึงต้องคำนึงถึงคุณภาพและองค์ประกอบของวัตถุดิบแต่ละประเภท โดยคัดเลือกวัตถุดิบที่มีคุณภาพดี มีความสุกพอเหมาะ ไม่เน่าเสีย น้ำที่ใช้เป็นส่วนผสมในการปรับแต่งน้ำผลไม้ก่อนหมักต้องมีคุณภาพดี ได้มาตรฐานน้ำดื่ม ไม่มีสนิมเหล็ก เพราะเหล็กสามารถทำปฏิกิริยากับแทนนินในน้ำผลไม้ ทำให้ได้น้ำไวน์ที่มีสีคล้ำ และน้ำไม่ควรมีคลอรีน เนื่องจากจะทำให้ไวน์มีกลิ่นผิดปกติ องค์ประกอบหลักที่สำคัญในน้ำผลไม้ที่มักจะปรับแต่ง

ให้เหมาะสมก่อนการหมัก คือ ปริมาณน้ำตาลและกรดทั้งหมด นอกจากนี้ยังมี ปริมาณไนโตรเจน ไวตามิน และแร่ธาตุ อีกด้วย

โดยทั่วไปมักมีการปรับระดับความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำผลไม้ก่อนการหมักให้อยู่ในช่วง 200 ถึง 240 กรัมต่อลิตร หรือ 20 ถึง 24 องศาบริกซ์ และปรับปริมาณกรดทั้งหมดระหว่าง 4.5 ถึง 7.0 กรัมต่อลิตร หรือ 0.45 ถึง 0.70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของไวน์ที่ต้องการผลิต

3. การปรับสารอาหารหรือการเติมสารอาหารอื่นๆ ในน้ำผลไม้ก่อนหมัก

ผลไม้ที่นำมาใช้ทำไวน์ผลไม้อาจจะต้องมีการเจือจางด้วยน้ำ จึงทำให้สารอาหารต่างๆ รวมทั้งแร่ธาตุและไวตามิน มีปริมาณไม่เพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการหมักหยุดชะงักและได้ไวน์ผลไม้ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำ มีรสหวานเกินไป ดังนั้นจึงควรเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มเติมก่อนการหมัก สารอาหารที่ควรเติมลงในน้ำผลไม้ที่ใช้ในการหมัก

1) สารประกอบไนโตรเจน

ไนโตรเจน มีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญของยีสต์ โดยยีสต์สามารถสร้างหรือสังเคราะห์กรดอะมิโนที่ต้องการจากแอมโมเนียมไอออน (ammonium ion) หรือจากแหล่งไนโตรเจนในรูปอื่น เช่น แอมโมเนีย เกลือแอมโมเนีย แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ คือ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate salt) แอมโมเนียมฟอสเฟต (ammonium phosphate) ไดแอมโทเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-ammonium hydrogen phosphate) และยูเรีย (urea) ควรหลีกเลี่ยงการใช้สารประกอบยูเรีย ในขั้นตอนการผลิตไวน์และไวน์ผลไม้ เพราะการใช้ยูเรียจะมีการสร้างยูรีเทนโดยเชื้อยีสต์ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (Amerine. *et al*., 1992)

ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต หรือเรียกย่อๆ ว่า ดีเอพี (DAP) โดยนิยมใช้ในปริมาณ 0.5 ถึง 1.0 กรัมต่อน้ำผลไม้ 1 ลิตร แต่ในองุ่นไม่จำเป็นต้องเติมเนื่องจากมีปริมาณเพียงพออยู่แล้ว ปริมาณไนโตรเจนที่ต่ำที่สุดที่ยีสต์ต้องการในการเจริญเติบโตมีค่าเท่ากับ 267 มิลลิลิตรต่อปริมาตร 1 ลิตร เมื่อคิดจากสูตรโมเลกุลของดีเอพี พบว่า ดีเอพี มีไนโตรเจนประมาณ 21 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังนั้นการเติมดีเอพีลงไปในน้ำผลไม้ในปริมาณ 0.5 ถึง 1.0 กรัมต่อลิตร จะทำให้น้ำผลไม้มีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 0.1 ถึง 0.2 กรัมต่อลิตร หรือ 100 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อรวมกับปริมาณไนโตรเจนที่มีอยู่แล้วในน้ำผลไม้ก็จะทำให้มีความพอเหมาะแก่การเจริญเติบโตของยีสต์ การขาดสารประกอบไนโตรเจนนอกจากจะทำให้ยีสต์ไม่เจริญเต็มที่แล้วยังทำให้ยีสต์สร้างปริมาณไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือแก๊สไข่เน่าได้สูง ทำให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์

2) กรดแพนโทเธนิค (Pantothenic Acid) หรือไวตามินบี 5

ถ้าน้ำผลไม้มีกรดแพนโทเธนิค (pantothenic acid) ต่ำ อาจทำให้ยีสต์สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้สูง เช่นเดียวกันกับการขาดไนโตรเจน ดังนั้นจึงอาจมีการเติมกรดแพนโทเธนิคลงไปเล็กน้อยในน้ำผลไม้ก่อนหมัก

3) ไวตามินบี 1 (Thiamine)

ไวตามินบี 1 ช่วยในการเจริญเติบโตของยีสต์ ใช้ในรูปสารละลายไธอามีนไฮโดรคลอไรด์ ปริมาณขึ้นอยู่กับชนิดของผลไม้

4) สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)

สารสกัดจากยีสต์ ใช้เติมลงไปในน้ำผลไม้เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของยีสต์และป้องกันการเกิดการหมักหยุดชะงัก เนื่องจากในสารสกัดจากยีสต์ มีแหล่งของไวตามินหลายๆ ชนิด และกรดอะมิโนชนิดต่างๆ สารสกัดจากยีสต์นิยมใช้เติมในน้ำผลไม้ก่อนหมัก ในปริมาณ 5 ถึง 10 กรัมต่อน้ำหมัก 1 ลิตร ถ้าเติมสารสกัดจากยีสต์มากเกินไปจะทำให้ไวน์หรือไวน์ผลไม้มีกลิ่นผิดปกติ

5) ความเข้มข้นของซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระและค่าความเป็นกรด ด่าง

สำหรับน้ำผลไม้ที่เตรียมหากมีค่าความเป็นกรด ด่าง ระหว่าง 2.9 ถึง 3.3 ควรมีซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระในอัตรา 20 ถึง 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนการเติมกล้าเชื้อยีสต์เพื่อเริ่มหมัก หากมีความเข้มข้นซัลเฟอร์ไดออกไซด์รวมสูงเกินควร ซึ่งทำให้ค่าซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระสูง จะทำให้การเริ่มต้นการหมักล่าช้าเป็นเวลา 3 ถึง 4 วันได้

การยับยั้งและ/หรือทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในน้ำหมัก

วิธีในการฆ่าเชื้อหรือทำลายจุลินทรีย์ในน้ำหมักได้แก่

1) **การใช้ความร้อน** โดยต้มให้เดือดประมาณ 5 นาที หรือพาสเจอร์ไรซ์ 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ถึง 15 นาที แล้วรีบทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เหมาะกับน้ำผลไม้ปริมาณไม่มากนัก การฆ่าเชื้อโดยวิธีนี้จะทำให้รสชาติของน้ำผลไม้ และไวน์ที่ได้ มีการเปลี่ยนแปลงไป (ประดิษฐ์, 2545)

2) **การใช้สารเคมี** สารเคมีที่นิยมใช้ คือ สารประกอบซัลเฟอร์หรือสารประกอบซัลไฟด์ เช่น โซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ (SMS) หรือโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟด์ (KMS) โดยสารเคมีต้องสลายตัวง่าย ไม่สะสมในน้ำหมัก ปริมาณที่ใช้อยู่ระหว่าง 0.01 ถึง 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หรือ 150 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นกับคุณภาพของน้ำผลไม้และชนิดของผลไม้ที่นำมาทำไวน์ผลไม้ (ประดิษฐ์, 2545) การเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์จำเป็นต้องเติมในระดับที่คงอยู่ในไวน์มากเพียงพอ คือ ประมาณ 20 ถึง 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในรูปซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระเพื่อรักษาคุณภาพของไวน์ผลไม้ ป้องกันการเจริญของแบคทีเรียอื่นๆ และการเกิดออกซิเดชันของไวน์ในระหว่างการผลิตจนกระทั่งบรรจุขวด ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระที่ต้องการในการช่วยรักษาคุณภาพของไวน์ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด ด่าง ของไวน์ผลไม้ โดยที่ค่าความเป็นกรด ด่างต่ำ ปริมาณที่ใช้จะต่ำลงเพราะในสภาวะที่มีความเป็นกรดจะช่วยยับยั้งหรือป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ได้เช่น ในไวน์แดงที่ค่าความเป็นกรด ด่าง ประมาณ 3.4 ถึง 3.6 ต้องการซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระประมาณ 10 ถึง 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมด 50 ถึง 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อป้องกันหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและการออกซิเดชันในระหว่างขบวนการผลิต (Zoecklein.*et al*., 1995)

การแยกส่วนใส (racking)

หลังจากหมักเสร็จควรถ่ายแยกตะกอนไวน์ (กาก) ทิ้งและเก็บน้ำไวน์ (ส่วนใส) ไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เติม โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ หรือ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ปริมาณ 60 ถึง 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ควรถ่ายตะกอนไวน์ทิ้ง 1 ถึง 2 ครั้ง ภายในสองสัปดาห์ จากนั้นเร่งทำให้ไวน์ใส โดยวิธีการปั่นแยกตะกอน (centrifuge) วิธีการเติมสารเพื่อตกตะกอนให้ไวน์ใส (fining) สารตกตะกอนไวน์ (fining agent) ได้แก่ bentonite, gelatin, tannin, chitin, chitosan, casein, egg white, ox blood, isinglass, silica solution เป็นต้น และวิธีการกรองโดยใช้เครื่องกรองพร้อมไส้กรองหรือแผ่นกรองที่มีขนาดเหมาะสม (ประดิษฐ์, 2545)

การเก็บและการบ่มไวน์

การบรรจุไวน์และไวน์ผลไม้ที่ผ่านการแยกตะกอนจนได้ไวน์ใสแล้วควรบรรจุหรือบ่มในถังสแตนเลสที่สะอาดหรือถังไม้โอ๊คก็ได้ โดยบรรจุเกือบเต็มถังเพื่อป้องกันอากาศเข้าไปสัมผัสกับไวน์มากเกินไป ซึ่งจะทำให้สี กลิ่น หรือรสชาติของไวน์เปลี่ยนแปลง ถ้าถังบรรจุไวน์มีช่องว่างสัมผัสกับอากาศมาก อาจเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือไนโตรเจนลงไปแทนที่อากาศภายในถัง (ธีรวัลย์, 2545) เก็บหรือลดอุณหภูมิของไวน์ในถังประมาณ 10 ถึง 15 องศาเซลเซียส รักษาระดับปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ 30 ถึง 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ไวน์ที่ผลิตจากองุ่นพันธุ์ดี เช่น Carbernet Sauvignon, Merlot, Pinot noir, Shiraz (Syrah), Chardonnay มักนิยมบ่มในถังไม้โอ๊ค (ประดิษฐ์, 2545) ในระหว่างการบ่มจะเกิดปฏิกิริยาทางเคมีอย่างช้าๆ เพื่อเปลี่ยนแปลงสารที่มีอยู่ในไวน์ให้อยู่ในสมดุลเป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นและรสชาติ ปฏิกิริยาที่สำคัญระหว่างการบ่ม คือปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation), โพลีเมอร์ไรเซชั่น (polymerization), เอสเทอริฟิเคชั่น (esterification) และ ไฮโดรไลซีส (hydrolysis) โดยเริ่มจากการเกิดสารประกอบฟีนอลิคจากถังไม้โอ๊ค โดยการเกิดออกซิไดซ์กับออกซิเจนเกิดเป็นสารประกอบเปอร์ออกไซด์ (peroxide) และตกตะกอนสารประกอบเปอร์ออกไซด์ในภายหลัง (Amerine *et. al*., 1992)

การทำให้ไวน์และไวน์ผลไม้ใส (wine clarification)

ความใสของไวน์จัดเป็นลักษณะปรากฏที่สำคัญที่มีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค ไวน์ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการทำให้ใส ถึงแม้ว่าจะมีลักษณะใส แต่เมื่อเก็บบ่มที่อุณหภูมิต่ำระยะหนึ่งจะเกิดการตกตะกอนได้ ทั้งนี้เนื่องจากไวน์มีองค์ประกอบต่างๆ ละลายอยู่หลายชนิด การทำให้ไวน์ใสเป็นปัญหาอย่างหนึ่งที่พบในไวน์ โดยทั่วไปการผลิตไวน์จะต้องทำให้ไวน์ตกตะกอนตามธรรมชาติจนกว่าจะใส แต่ถ้าไวน์ที่ผลิตได้ไม่ใส อาจจะใช้วิธีเติมสารช่วยตกตะกอน ซึ่งมีหน้าที่จับตะกอนขนาดเล็กที่แขวนลอยอยู่ในไวน์ให้มีขนาดใหญ่ขึ้นและตกตะกอนลงสู่ก้นถัง หรือใช้วิธีการกรองให้ไวน์ใส โดยใช้เครื่องกรองขนาดละเอียด (filter plate) ขนาด 0.45 ไมครอน และการเติมสารละลายซัลไฟต์หลังจากการแยกส่วนใสออก จะช่วยทำให้ไวน์ใสได้ เพราะซัลไฟต์จะทำให้เกิดการรวมตัวของตะกอนและตกตะกอนลงสู่ก้นถัง นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการเจริญยีสต์ที่หลงเหลืออยู่ด้วย (ธีรวัลย์, 2545) ความขุ่นของไวน์เกิดจากการมีเซลล์ของยีสต์หรือแบคทีเรียตกค้างอยู่

การมีตะกอนรูปร่างไม่แน่นอนของสารโปรตีน คาร์โบไฮเดรท สารประกอบฟีนอล ไวตามิน รงควัตถุ เช่น เม็ดสี (pigment) แทนนิน (tannin) รวมทั้งสารให้กลิ่น รสชาติต่างๆ สารพวกแพคตินที่มีอยู่ในน้ำผลไม้ ผลึกของ potassium acid tartrate หรือบางทีเรียกว่า cream of tartar ไอออนของโลหะ เช่น โพแทสเซียม เหล็ก ทองแดง แคลเซียม เป็นต้น นอกจากนี้ความขุ่นของไวน์ยังเกิดจากโปรตีน (haze forming) โดยที่กรดอะมิโนโพรลีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ยิ่งมีปริมาณโพรลีนสูงยิ่งทำให้เกิดความขุ่นมากขึ้น ส่วนสารประกอบฟีนอลที่ทำให้เกิดความขุ่นในไวน์แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

1) monomeric polyphenols ได้แก่ catechin resocinal และ prolycatechol เป็นต้น

2) oligomeric and polymeric polyphenol คือ proanthocyanidin ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ จะมีความสามารถในการรวมตัวจับกับโปรตีน เกิดตะกอนได้ดีกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของ proanthrocyanidin กับ carbonyl oxygen ของพันธะเปปไทด์ในโปรตีน

การฆ่าเชื้อและการบรรจุ

ก่อนการบรรจุขวดควรนำไวน์และไวน์ผลไม้มาทำการฆ่าเชื้อ โดยการใช้ความร้อน หรืออาจใช้สารเคมีก็ได้ ความร้อนที่ใช้ควรอยู่มนช่วง 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส บรรจุขวดที่ล้างสะอาดแล้ว ปิดจุก ปิดฉลาก ส่วนสารเคมีที่นิยมใช้ คือ เกลือซัลเฟอร์ เช่น โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ในปริมาณ 200 ถึง 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไวน์และการปนเปื้อนของแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นๆ หรืออาจใช้โพแทสเซียมซอร์เบทก็ได้ ปริมาณที่ใช้ขึ้นกับปริมาณแอลกอฮอล์ที่มีในไวน์

การบรรจุเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในการทำไวน์ ต้องทำด้วยความระมัดระวัง การเลือกสีของขวดบรรจุไวน์เป็นสิ่งสำคัญที่ควรคำนึง ไวน์ที่บรรจุในขวดสีเข้มมีแนวโน้มที่จะเกิดการออกซิไดซ์น้อยกว่าไวน์ที่บรรจุในขวดสีอ่อน ไวน์แดงควรบรรจุในขวดสีเขียวเข้มหรือสีน้ำตาลเข้ม เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงสีของไวน์ ส่วนไวน์ขาวอาจบรรจุในขวดใสก็ได้ (ธีรวัลย์, 2545)

หลักการและวิธีการที่ดีในการควบคุม ติดตามและวิเคราะห์คุณภาพไวน์ผลไม้

เมื่อมีการเติมกล้าเชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้ไม่ว่าจะในรูปของยีสต์สด หรือ ยีสต์ผงลงไปในน้ำผลไม้ที่ปรับแต่งปริมาณสารประกอบที่สำคัญและสารอาหาร ถือว่าเป็นการเริ่มต้นของกระบวนการหมัก ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงต่างๆ มากมายทั้งองค์ประกอบในน้ำผลไม้และเซลล์ยีสต์ การติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักจึงมีความสำคัญ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพิจารณา และควบคุมการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นให้เป็นไปตามที่ควรจะเป็น ที่สำคัญคือ เมื่อเกิดปัญหาแล้วสามารถที่จะรู้ถึงสาเหตุแล้วแก้ปัญหาได้อย่างรวดเร็วและถูกต้องจากข้อมูลที่บันทึกไว้ในระหว่างการหมัก

ไวน์ผลไม้ จัดเป็นสุราแช่ชนิดหนึ่งที่มีแรงแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรี (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ตามมาตรฐานอุตสาหกรรมสุราแช่ (มอก. 2087-2544) การผลิตไวน์ผลไม้นั้น กรรมวิธีการผลิตเป็นสิ่งหนึ่งที่

มีความสำคัญอย่างยิ่งนอกเหนือจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต เช่น ผลไม้ ยีสต์และน้ำ เป็นต้น ที่จะทำให้ได้ไวน์ผลไม้ที่มีคุณภาพดีและมีความคงตัวสม่ำเสมอ ดังนั้นผู้ผลิตไวน์ผลไม้ควรมีการปฏิบัติอย่างเคร่งครัดคือต้องคำนึงถึงหลักการและวิธีการที่ดีในการควบคุม ติดตาม และวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ทุกครั้งเสมอ ซึ่งหลักการและวิธีการที่ดีในการควบคุม ติดตาม และวิเคราะห์คุณภาพไวน์ผลไม้ มีดังนี้

1) **การบันทึก** ข้อมูลที่ต้องบันทึกได้แก่ วัน เดือน ปี ที่เริ่มกระบวนการผลิต ชนิดและปริมาณของน้ำผลไม้ที่ใช้ สายพันธุ์และชนิดของยีสต์ที่ใช้ และ สัดส่วนของเชื้อตั้งต้นหรือหัวเชื้อยีสต์ที่เติมต่อปริมาณของน้ำผลไม้ เป็นต้น
2) **ตรวจวัดปริมาณความหวาน** การติดตามการเปลี่ยนของน้ำตาลในกระบวนการผลิต ปริมาณน้ำตาลควรลดลงอย่างรวดเร็วในระยะแรก และหมดไปเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก เนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนเซลล์ และกิจกรรมของเซลล์อื่นๆ ส่วนใหญ่ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์กับคาร์บอนไดออกไซด์เป็นหลัก และมีสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดซักซินิก กลีเซอรอล กรดคีโตกลูตาริก บ้างเล็กน้อย ดังนั้นการติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลจะทำให้ทราบว่ากิจกรรมของยีสต์ดำเนินไปตามปกติหรือไม่ และน้ำตาลในน้ำผลไม้หมดแล้วหรือยังเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ซึ่งการหาปริมาณน้ำตาลมีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมนำมาใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงส่วนใหญ่จะใช้ แฮนด์รีเฟรคโตมิเตอร์ (hand refractometer) ซึ่งวัดออกมาในหน่วยของ องศาบริกซ์ วิธีนี้ไม่สามารถบอกปริมาณน้ำตาลได้ถูกต้องร้อยเปอร์เซ็นต์ เพราะเป็นการวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด แต่เนื่องจากน้ำตาลเป็นของแข็งที่ละลายน้ำที่มีปริมาณมากที่สุดในน้ำผลไม้ที่เตรียมเพื่อใช้ผลิตแอลกอฮอล์ ดังนั้นค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ที่ตรวจวัดได้จึงสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักน้ำตาลถูกใช้หมดไป แต่ปริมาณของแข็งที่ละลายได้อาจจะไม่เป็นศูนย์ เนื่องจากของแข็งที่ละลายน้ำชนิดอื่นมีผลต่อค่าของ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ดังนั้นปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่จริงจะมีปริมาณน้อยกว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ที่วัดได้เสมอ
3) **ตรวจวัดปริมาณกรดทั้งหมดและค่าความเป็นกรด ด่าง** การติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมด เนื่องจากในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารประกอบในน้ำผลไม้โดยยีสต์นั้นจะมีการผลิตกรดบางชนิดออกมาในปริมาณเล็กน้อย เช่น กรดซักซินิก กรดคีโตกลูตาลิกและกรดอะซิติก ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณกรดทั้งหมดในระหว่างการหมักมีปริมาณเพิ่มขึ้น ส่วนใหญ่แล้วจะเพิ่มขึ้นไม่เกิน 2 กรัมต่อลิตร ถ้าปริมาณกรดรวมเพิ่มมากกว่า 2 กรัมต่อลิตร อาจเป็นไปได้ว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียสร้างกรดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งจะต้องพิจารณาและแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นโดยเร็ว การหาปริมาณกรดทั้งหมดนั้นจะใช้การไตรเตรทตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยใช้สารละลายฟีนอฟทาลีนเป็นตัวบอกจุดยุติ โดยการวิเคราะห์กรดทั้งหมดจะมีการวิเคราะห์ตั้งแต่การเตรียมวัตถุดิบจนถึงการติดตามการเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมัก การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็น

กรด ด่าง ตามหลักการโดยทั่วไปแล้วการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด ด่าง จะสอดคล้องกับปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น โดยค่าความเป็นกรด ด่าง จะมีค่าลดลงแต่จะลดลงมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น ถ้ากรดที่เกิดขึ้นเป็นกรดที่มีค่าคงที่ของการแตกตัวของกรดสูง (K_A) การลดลงของค่าความเป็นกรด ด่างจะลดลงมากขึ้น ซึ่งการลดลงของค่าความเป็นกรด ด่างมีผลต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์จะเจริญได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด ด่าง 3 ถึง 4 แต่ถ้าค่าความเป็นกรด ด่าง ต่ำกว่า 3 อาจยับยั้งการเจริญของยีสต์และเป็นเหตุให้เกิดการหมักหยุดชะงักได้ การหาค่าความเป็นกรด ด่าง ทำได้โดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter) ในการวัด

4) **ตรวจวัดปริมาณแอลกอฮอล์** การติดตามการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอลกอฮอล์จึงเป็นดัชนีตัวหนึ่งที่บอกว่าการหมักดำเนินไปตามปกติหรือไม่ ตามทฤษฎี กลูโคส 1 กรัม จะเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ได้ 0.51 กรัม คือ ประมาณ 51 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แต่เนื่องจากมีการเปลี่ยนกลูโคสบางส่วนเป็นกลีเซอรอลและกรดบางชนิด ในทางปฏิบัติจึงได้แอลกอฮอล์ไม่เกิน 47 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ถ้าปริมาณน้ำตาลไม่ลดลงและปริมาณแอลกอฮอล์ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อถึงเวลา ให้สันนิษฐานว่าเกิดการหมักหยุดชะงัก ซึ่งจะต้องทำการแก้ไขนอกจากนี้แล้วแอลกอฮอล์ยังมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ ซึ่งยีสต์สายพันธุ์ทำไวน์โดยทั่วไปจะทนแอลกอฮอล์ได้ 12 ถึง 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แต่มีบางสายพันธุ์เท่านั้นที่ทนได้ ถึง 18 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ดังนั้นการคำนวณปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเพื่อให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์ ในช่วงความเข้มข้นที่ไม่เป็นอันตรายต่อการทำงานของยีสต์ ก็เป็นการป้องกันกระบวนการหมักหยุดชะงักได้ทางหนึ่ง การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์มีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมนำมาใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมัก ได้แก่ การวัดปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่อง Ebuliometer ไวนอมิเตอร์ (Vinometer) หรือการใช้แอลกอฮอล์ไฮโดรมิเตอร์ (alcoholhydrometer) เป็นต้น

5) **ตรวจวัดอุณหภูมิ** การติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในสภาวะการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์นั้น เป็นการเปลี่ยนแปลงโดยไม่ใช้ออกซิเจน ทำให้ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนพลังงานจากการออกซิเดชันของกลูโคสให้อยู่ในรูปของ ATP ลดลง คือ กลูโคส 1 โมเลกุลจะได้พลังงานได้ 2 ATP เท่านั้น พลังงานที่เหลือจะอยู่ในรูปของพลังงานความร้อน ดังนั้นในระหว่างกระบวนการหมักอุณหภูมิของน้ำหมักจะเพิ่มขึ้น ถ้าน้ำผลไม้ที่ใช้หมักมีปริมาณไม่มากนัก ความร้อนที่เกิดขึ้นสามารถระบายได้ทัน ทำให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นไม่มากไม่มีผลต่อเซลล์ยีสต์ทำให้กระบวนการหมักยังดำเนินต่อไปได้ แต่ถ้าน้ำผลไม้ที่ใช้หมักมีปริมาณมากอุณหภูมิในถังหมักจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีผลต่อเซลล์ยีสต์ทำให้การหมักหยุดชะงักได้ ดังนั้น การติดตามอุณหภูมิในถังหมักจึงความสำคัญ ในกรณีหมักไวน์ผลไม้ในปริมาณมากๆ อาจจะต้องมีระบบหล่อเย็นถังหมักเพื่อลดอุณหภูมิที่เกิดขึ้นภายในถังหมักในระยะสอง

สัปดาห์แรกของการหมัก การหมักไวน์ผลไม้ก็คล้ายกับการหมักไวน์องุ่น ซึ่งจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิ ควรมีอุณหภูมิอยู่ที่ 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส แต่ไม่ควรให้อุณหภูมิน้ำหมักสูงกว่า 38 องศาเซลเซียส เพราะจะทำให้ยีสต์ตายได้ ดังนั้นถังหมักที่มีขนาดใหญ่กว่า 800 ลิตร ในสภาพอุณหภูมิประเทศไทยจึงควรต้องมีระบบการระบายความร้อนออกจากถังหมัก เนื่องจากความร้อนที่เกิดจากการหมักของยีสต์อาจทำให้อุณหภูมิของน้ำหมักสูงขึ้นมากกว่าอุณหภูมิอากาศ 7 ถึง 12 องศาเซลเซียส ได้ การติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิโดยทั่วไปใช้เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer) หรือเทอร์โมคับเปิล (thermocouple) ในการวัดอุณหภูมิภายในถังหมัก ดังนั้นเพื่อการควบคุมอุณหภูมิระหว่างกระบวนการหมัก ควรมีการตรวจวัดอุณหภูมิอย่างสม่ำเสมอ

6) **ตรวจวัดปริมาณและชนิดจุลินทรีย์** โดยใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยา ซึ่งการตรวจวัดทำให้ทราบว่ามีจุลินทรีย์อื่นปนเปื้อนมากน้อยเพียงใด และมีปริมาณจุลินทรีย์ที่ต้องการมากน้อยเพียงใด ถ้าปริมาณจุลินทรีย์ที่ต้องการมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการหมัก อาจต้องมีการเติมจุลินทรีย์เพิ่มลงไปในถังหมักเพื่อให้การหมักดำเนินต่อไปได้ ปริมาณเซลล์ยีสต์เริ่มต้นของกระบวนการหมักนับได้ว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการหมัก เพราะการเปลี่ยนแปลงต่างๆ นั้นเกิดจากกิจกรรมของยีสต์ ปริมาณเซลล์ยีสต์เริ่มต้นจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรกๆ เพราะมีการใช้ออกซิเจนที่มีในน้ำผลไม้ เมื่อออกซิเจนหมดยีสต์จะหยุดเพิ่มจำนวน และจะเปลี่ยนน้ำตาลที่เหลืออยู่ให้เป็นแอลกอฮอล์โดยใช้วิถีของการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน การวัดปริมาณเซลล์ยีสต์นั้นมีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมนำใช้ตรวจวัดในการผลิตไวน์ผลไม้นั้นจะเป็นการหาปริมาณเซลล์ยีสต์โดยการใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) และในระหว่างการหมักนั้นอาจจะสังเกตฟองแก๊สผุดขึ้นมาจากน้ำผลไม้ เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์โดยกิจกรรมของยีสต์รวมด้วย

7) **ตรวจวัดปริมาณไนโตรเจน** โดยวิธีฟอร์โมลไตรเตรชั่น (formol titration) หรือวิธีอื่นที่เหมาะสมเพื่อที่จะทำให้ทราบว่ามีปริมาณไนโตรเจนเพียงพอต่อกระบวนการหมักหรือไม่ ถ้าพบว่าปริมาณไนโตรเจนต่ำเกินไปก็ให้เพิ่มแหล่งสารอาหารที่ไนโตรเจนลงไป เช่น ไดแอมโนเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (diammonium hydrogen phosphate, DAP) หรือเปลือกเซลล์ยีสต์ เป็นต้น เพื่อให้การหมักสามารถดำเนินการต่อไปได้

8) **ตรวจวัดปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์** โดยวิธี Ripper หรือวิธีอื่นที่เหมาะสม เพื่อให้ทราบว่าปริมาณโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ หรือแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ที่จะเติมลงไปในน้ำผลไม้ก่อนการหมักนั้นมีปริมาณเพียงพอที่จะฆ่าหรือยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นไม่ให้เจริญและยีสต์สามารถเจริญและเกิดกระบวนการหมักได้หรือไม่ นอกจากนี้จะทำให้ทราบว่าเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจะต้องเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ หรือแก๊สซัลเฟอร์ได

ออกไซด์ปริมาณเท่าใดเพื่อป้องกันเกิดการออกซิไดซ์ในไวน์ผลไม้ ซึ่งมีผลทำให้สีของไวน์ผลไม้เปลี่ยนไป

9) **ตรวจสอบและวิเคราะห์คุณภาพไวน์ผลไม้โดยการทดสอบด้านประสาทสัมผัส** ดูความคงตัว และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของไวน์ผลไม้ การตรวจสอบและวิเคราะห์คุณภาพของไวน์ผลไม้ ด้วยวิธีดังกล่าวจะทำให้ทราบว่าไวน์ผลไม้ผ่านเกณฑ์มาตรฐานอุตสาหกรรมสุราแช่ (มอก. 2087-2544) หรือไม่ มีความคงตัวและรสชาติเป็นอย่างไรก่อนที่จะนำผลิตภัณฑ์ไปบรรจุขวด ปิดฉลาก และจำหน่ายต่อไป

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและปัจจัยต่างๆ ในระหว่างกระบวนการหมักล้วนมีความสัมพันธ์กับการเจริญและกิจกรรมของยีสต์ซึ่งผู้ผลิตไวน์ผลไม้ควรคำนึงถึงความสำคัญของการจดบันทึกและการติดตามการเปลี่ยนแปลง ปริมาณเซลล์ยีสต์ ปริมาณน้ำตาล ปริมาณกรดทั้งหมด ค่าความเป็นกรด ด่าง และปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างกระบวนการหมัก

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพการหมัก (fermentability)

1) เตรียม stock indicator โดยชั่ง bromothymol blue 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร
2) เตรียม basal medium โดยชั่ง yeast extract 0.225 กรัม และ peptone 0.375 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสาร indicator จาก stock 2 มิลลิลิตร ลงใน basal medium ละลายให้เข้ากัน ปรับความเป็นกรด ด่าง เป็น 7 แบ่งใส่หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 12 x 150 มิลลิเมตร หลอดละ 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดดักก๊าซลงไปทุกหลอด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
3) เตรียม stock สารละลายน้ำตาล กาแลกโตส (galactose) กลูโคส (glucose) แลคโตส (lactose) มอลโทส (maltose) และ ซูโครส (sucrose) ชนิดละ 6 เปอร์เซ็นต์ กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง 0.2 ไมครอน
4) เติม stock สารละลายน้ำตาลแต่ละชนิด 1 มิลลิลิตร ในอาหาร basal medium แต่ละหลอด เขี่ยเชื้อที่คัดเลือกได้แต่ละสายพันธุ์ และใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิด active dried yeast เป็นชุดควบคุม ลงใน basal medium ที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 5 วัน สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อและการสร้างก๊าซ

การทดลองที่ 2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟตที่จำเป็นต่อกระบวนการหมัก

ขั้นตอนการเตรียมน้ำหมัก

1) เตรียมน้ำมะเกี๋ยงที่ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ เริ่มต้นเท่ากับ 20 องศาบริกซ์ ปริมาณน้ำตาลที่ต้องเติมในการปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ คำนวณจากสมการ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลที่ต้องเติม} = \frac{(\text{บริกซ์ที่ต้องการ} - \text{บริกซ์เริ่มต้น}) \times \text{ปริมาตรของน้ำหมัก}}{100 - \text{บริกซ์ที่ต้องการ}}$$

2) ปรับค่าความเป็นกรด ด่างเริ่มต้นที่ 3.5
3) เติม Di-Ammonium hydrogen phosphate และ magnesium sulphate ดังตาราง 3.1

ตาราง 3.1 สูตรอัตราส่วนการเติมสารอาหารแหล่งไนโตรเจนและซัลเฟต

สูตร / สารอาหาร (%)	1	2	3	4	5	6
Di-Ammonium hydrogen phosphate	-	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
magnesium sulphate	-	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05

4) ฆ่าเชื้อด้วยโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าให้ KMS กระจายตัว
5) บรรจุถังหมักปิดจุกสำลี ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ

1) เตรียมหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหมัก โดยปรับของแข็งที่ละลายได้เริ่มต้นเท่ากับ 10 องศาบริกซ์ ค่าความเป็นกรด ด่างเริ่มต้นที่ 3.5
2) ต้มเดือด 10 ถึง 15 นาที บรรจุใน ฟลาส ขณะร้อน ปิดด้วยจุกสำลีตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมเชื้อยีสต์ ที่คัดเลือกได้จากการทดลอง เขย่าที่สภาวะ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนการหมัก

1) เติมหัวเชื้อยีสต์ลงในน้ำหมักด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เขย่าให้เชื้อกระจายตัวในน้ำหมัก
2) ปิดฝาถังหมักด้วยจุกสำลี ตั้งหมักไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
3) สังเกตการหมักจากฟองก๊าซที่ดัน air lock (หลังจากเติมหัวเชื้อแล้วประมาณชั่วโมงที่ 6)
4) เริ่มเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 ถึง 14 ของการหมัก 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด ด่าง และปริมาณแอลกอฮอล์
5) ทำการกรองแยกกากด้วยผ้าขาวบางในวันที่ 7 ของการหมักแล้วบรรจุถังหมักปิดฝาถังด้วย air lock หมักต่อจนกว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้คงที่
6) หยุดการหมักด้วยการเติม โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าให้ KMS กระจายตัว ปิดฝาให้สนิท ตั้งบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน ทำการกรองลักน้ำเอาเฉพาะส่วนใส บรรจุถังปิดฝาให้สนิท ตั้งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

การทดลองที่ 3 ศึกษาอัตราส่วนระหว่างเนื้อมะเกี๋ยงต่อปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการผลิตไวน์มะเกี๋ยง

ขั้นตอนการเตรียมน้ำหมัก

1) เตรียมน้ำมะเกี๋ยงที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตาราง 3.2

ตาราง 3.2 สูตรอัตราส่วนการเตรียมน้ำหมัก (เนื้อมะเกี๋ยง ต่อ น้ำ)

สูตร / อัคราส่วน(เท่า)	1	2	3	4	5	6	7
เนื้อมะเกี๋ยง	1	1	1	1	1	1	1
น้ำ	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4

อัตราส่วน (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

2) เก็บตัวอย่างน้ำมะเกี๋ยงในแต่ละสูตรวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด ด่าง และปริมาณของแข็งที่ละลายได้
3) ปรับของแข็งที่ละลายได้เริ่มต้นเท่ากับ 20 องศาบริกซ์ ค่าความเป็นกรด ด่างเริ่มต้นที่ 3.5
4) บรรจุถังหมัก ปิดจุกสำลี ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ

1) เตรียมหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหมัก โดยปรับของแข็งที่ละลายได้เริ่มต้นเท่ากับ 10 องศาบริกซ์ ค่าความเป็นกรด ด่างเริ่มต้นที่ 3.5
2) ต้มเดือด 10 ถึง 15 นาที บรรจุในฟลาส ขณะร้อนปิดด้วยจุกสำลีตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้จากการทดลอง เขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนการหมัก

1) เติมหัวเชื้อยีสต์ลงในน้ำหมักด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เขย่าให้เชื้อกระจายตัวในน้ำหมัก
2) ปิดฝาถังหมักด้วยจุกสำลี ตั้งหมักไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
3) สังเกตการหมักจากฟองก๊าซที่ดัน air lock (หลังจากเติมหัวเชื้อแล้วประมาณชั่วโมงที่ 6)
4) เริ่มเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 ถึง 14 ของการหมัก ทุกๆ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด ด่าง และปริมาณแอลกอฮอล์
5) ทำการกรองแยกกากด้วยผ้าขาวบางในวันที่ 7 ของการหมัก แล้วบรรจุถังหมักปิดฝาถังด้วย air lock หมักต่อจนกว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้คงที่
6) หยุดการหมักด้วยการเติม โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าให้ KMS กระจายตัว ปิดฝาให้สนิท ตั้งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน ทำกาลักน้ำเอาเฉพาะส่วนใสบรรจุถังปิดฝาให้สนิท ตั้งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

การทดลองที่ 4 ศึกษาการบ่มไวน์มะเกี๋ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

1) หลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักในขั้นตอนที่ 3 ทำการแยกกากออกโดยวิธีแรคกิ้ง (racking) ใช้สายยางซิลิโคนทำการลักน้ำและกรองผ่านผ้าขาวบางอีกชั้นหนึ่งภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ โดยให้น้ำไวน์สัมผัสกับอากาศน้อยที่สุด
2) ทำการฆ่าเชื้อโดยใช้สารเคมี potassium metabisulfite (KMS) 150 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร บรรจุถังบ่ม โดยปิดจุกหรือฝาถังให้สนิท
3) นำไวน์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
4) สังเกตการตกตะกอน ความใสของน้ำไวน์

การทดลองที่ 5 ศึกษาการกระบวนการตกตะกอน การทำใส

1) โดยใช้ bentonite 0.75 เปอร์เซ็นต์ (7.5 กรัมต่อลิตร) ละลายในน้ำอุ่นตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน รินน้ำทิ้งแล้วผสมลงในไวน์ (bentonite อาจจะละลายยากในขนาดการผลิตที่มากกว่า 10 ลิตร ขึ้นไป จึงควรละลาย bentonite ในน้ำแช่น้ำเป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้)
2) บ่มไว้ 3 ถึง 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3) ทำการถ่ายส่วนใสออกโดยใช้วิธีกาลักน้ำ
4) ส่วนใส (น้ำไวน์) เติม KMS 100 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มไวน์ต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน
5) ทำการถ่ายส่วนใสออกโดยใช้วิธีกาลักน้ำ นำส่วนใส (น้ำไวน์) มาเติม KMS 100 มิลลิกรัมต่อลิตรบ่มไวน์ต่อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน

การทดลองที่ 6 ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส (ชิม)

1) ใช้วิธีการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการให้คะแนนความชอบแบบ 20 – POINTS – WINE (แบบประเมินผลิตภัณฑ์ไวน์มะเกี๋ยง)
2) ใช้ผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสจำนวน 21 คน
3) รวบรวมคะแนนจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสและทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

บทที่ 4
ผลการทดลอง

จากโครงการวิจัยปีที่ 1 ได้คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์จากผลมะเกี๋ยงสดในธรรมชาติ 2 แหล่ง คือ ตัวอย่างจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย (วาวี) จังหวัดเชียงราย จำนวน 18 ตัวอย่าง ตามรหัสตัวอย่างดังนี้ 2156/27, 2165/5, 2156/9, 2156/16, 1097/21, 2143/7, 2042/18, 1097/3, 2156/20, 2156/4, 1097/25, 1068/9, 2183/8, 1097/22, 2153/14, 2148/18, 2153/17, 2156/8 และ ตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชสวนห้างฉัตร อำเภอห้างฉัตร จังหวัดลำปาง จำนวน 1 ตัวอย่าง (ตัวอย่างรวมชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2)

ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อยีสต์ โดยวิธี spread plate ตัวอย่างผลมะเกี๋ยงทั้งหมด 19 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และกลุ่มที่ 2 บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 96 ไอโซเลท สามารถคัดเลือกเชื้อยีสต์ได้ 8 ไอโซเลท นำมาศึกษาความสามารถในการเจริญ ผลดังตาราง 4.1

ตาราง 4.1 ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้

Isolate	ความสามารถในการเจริญที่สภาวะต่างๆ			Film forming or surface yeasts
	15 % ethahol	100 ppm KMS	22°Brix Sucrose	
control	+	+	+	-
I1	-	+	+	+
I2	+	-	-	-
I3	+	+	+	-
I4	+	+	+	-
I5	-	+	+	+
I6	+	+	+	-
I7	+	-	-	-
I8	+	+	+	+

\+ Positive reaction - Negative reaction

ในโครงการวิจัยปีที่ 1 พบว่ามียีสต์ 3 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกประกอบด้วย ไอโซเลทที่ 3 ไอโซเลทที่ 4 และไอโซเลทที่ 6 ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงเลือกใช้เชื้อยีสต์ที่มีความโดดเด่น เหมาะสมในความจำเพาะต่อการผลิตไวน์มะเกี๋ยง ซึ่งมีส่วนสำคัญในการสร้างสารให้กลิ่นรส และมีประสิทธิภาพต่อการหมักแอลกอฮอล์ในขั้นตอนการผลิต คือ มีคุณสมบัติที่ไม่สร้างฟิล์มที่ผิวน้ำหมัก ทนและสามารถเจริญได้ในน้ำหมักที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้สูงสุด 22 องศาบริกซ์ และปริมาณซัลเฟอร์สูงสุด 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลการทดลองที่ 1 การศึกษาประสิทธิภาพการหมักในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

ผลไม้ที่นำมาผลิตไวน์ผลไม้มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน เช่น ปริมาณน้ำตาล แร่ธาตุ กรดและสารอื่นๆ ซึ่งองค์ประกอบที่แตกต่างกันนี้ มีผลต่อการหมักและคุณภาพของไวน์ผลไม้ ดังนั้นในการหมักไวน์มะเกี๋ยงให้ได้คุณภาพคงที่ ต้องคำนึงถึงคุณภาพและองค์ประกอบของวัตถุดิบเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการปรับแต่งน้ำหมักมะเกี๋ยงก่อนการหมัก องค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ ปริมาณน้ำตาล ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณซัลเฟต เป็นต้น จึงได้ศึกษาการหมักในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ผลดังตาราง 4.2

ตาราง 4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการหมักในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

สายพันธุ์ยีสต์	**แหล่งคาร์บอน**				
	กาแลคโทส	**กลูโคส**	**แลคโทส**	**มอลโทส**	**ซูโครส**
Control	+	+	+	+	+
I3	+	+	+	+	+
I4	+	+	+	+	+
I6	+	+	+	+	+

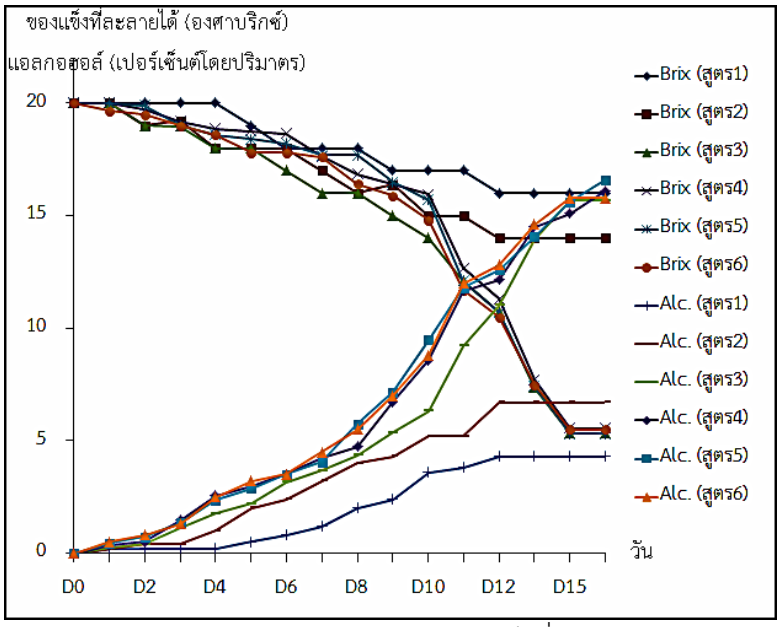
+ Positive reaction - Negative reaction

จากการทดสอบประสิทธิภาพการหมักในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนทุกชนิดที่นำมาทดสอบ โดยสามารถเจริญและสร้างกิจกรรมของยีสต์ในระหว่างการหมัก เปลี่ยนแหล่งคาร์บอน (น้ำตาล) เป็นแอลกอฮอล์และสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้

ผลการทดลองที่ 2 การศึกษาการหมักในน้ำหมักมะเกี๋ยงที่เติมแหล่งไนโตรเจนและเกลือแร่ที่จำเป็นต่อการหมัก

การผสมและการปรับระดับความเข้มข้นของน้ำตาลและกรดอินทรีย์ ต้องคำนวณหาสัดส่วนโดยน้ำหนักของปริมาณน้ำเชื่อมหรือน้ำตาล น้ำ และกรดอินทรีย์ที่จำเป็นต้องใช้ โดยทั่วไปจะทำการปรับระดับความเข้มของ ของแข็งที่ละลายได้น้ำหมักให้อยู่ในช่วง 20 ถึง 24 องศาบริกซ์ เพื่อให้ยีสต์สามารถเจริญได้ดีและเกิดการหมักจนสิ้นสุดกระบวนการ ให้ปริมาณแอลกอฮอล์ อยู่ในช่วง 10 ถึง 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในน้ำผลไม้ที่มีกรดสูง และผ่านการเติมน้ำและน้ำตาลเพิ่มเติมในสัดส่วนที่สูง เช่น การเตรียมน้ำหมักมะเกี๋ยงจะต้องเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มเติม ได้แก่ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (diammonium hydrogen phosphate, DAP) และ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)

จากแผนการทดลองเติมสารอาหารตามสูตร ที่แสดงในตาราง 3.1 ศึกษาประสิทธิภาพการหมักน้ำหมักมะเกี๋ยง ที่สภาวะอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 วัน วิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด ด่าง และปริมาณแอลกอฮอล์ ได้ผลดังกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแข็งที่ละลายได้ที่ลดลง กับปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้น จากการหมักน้ำมะเกี๋ยง สูตรที่ 3 ภาพ 4.1

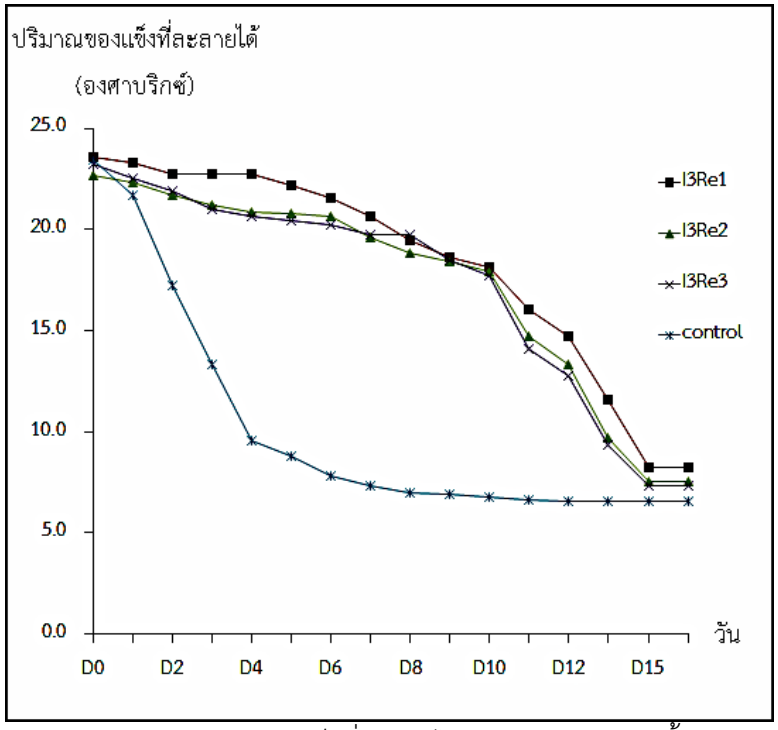


ภาพ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแข็งที่ละลายได้กับปริมาณแอลกอฮอล์ จากการหมักน้ำมะเกี๋ยง สูตรที่ 3

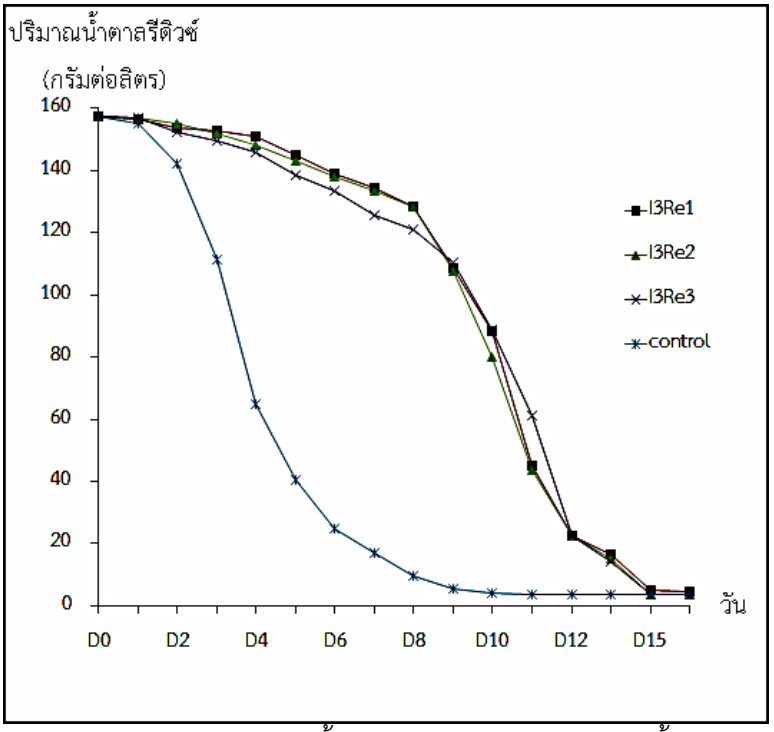
ผลการศึกษา ทำให้ทราบว่าปริมาณไนโตรเจนและซัลเฟต ที่ได้จากการหมัก คือ สูตรที่ 3, 4, 5 และ 6 เมื่อเปรียบเทียบผลจากกราฟ จะเห็นได้ว่าอัตราการใช้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ที่ลดลง และปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นการเติมสารอาหารที่เพิ่มมากขึ้นในน้ำหมัก สูตรที่ 4, 5 และ 6 มีปริมาณมากเกินความจำเป็นต่อการนำไปใช้ในกิจกรรมของเชื้อยีสต์และหลงเหลือตกค้างใน

น้ำหมักได้ แสดงว่าปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมในการเติมลงไปในน้ำหมักมะเกี๋ยงคือ สูตรที่ 3 เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.02 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าเชื้อยีสต์ I3 มีการใช้แหล่งคาร์บอนในกิจกรรมของเชื้อยีสต์ ทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง เหลือ 7.7±0.48 องศาบริกซ์ และ 3.9±0.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด ด่าง 3.3±0.02 และปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นมากที่สุด 16.1±0.47 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ผลการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ค่าความเป็นกรด ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณแอลกอฮอล์ ดัง**ตาราง ผ-1(ภาคผนวก)** และ**ภาพ 4.2 ถึง 4.5**

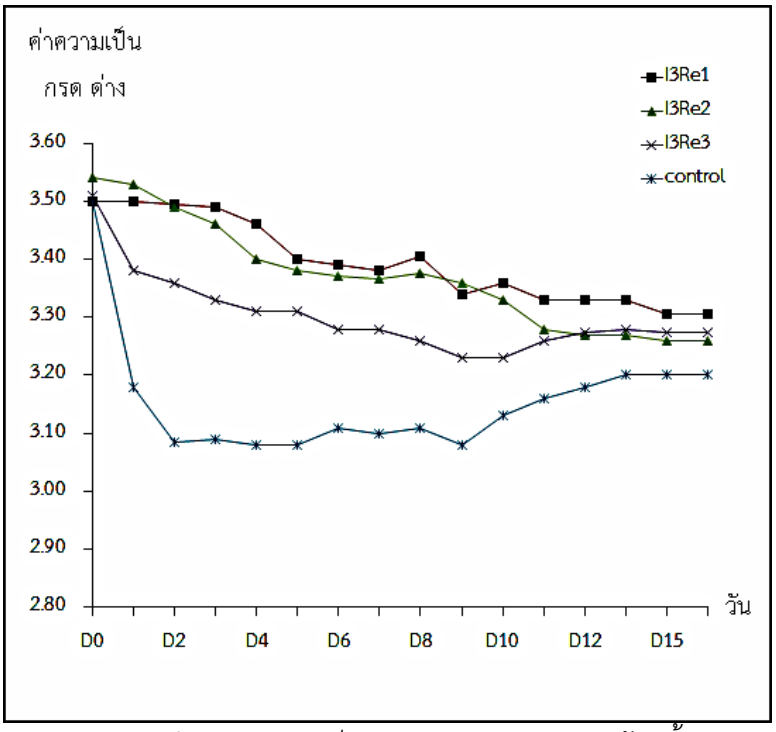
ส่วนน้ำหมักในสูตรที่ 1 และ 2 กระบวนการหมักเกิดขึ้นได้ช้าเมื่อวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าลดลงเหลือ 19.4±0.34, 16.2±0.26 องศาบริกซ์ และ 128.59±3.56, 68.4±5.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด ด่าง และปริมาณแอลกอฮอล์ 3.4±0.03, 3.5±0.02 และ4.3±0.23 และ 6.7±0.32 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตามลำดับ



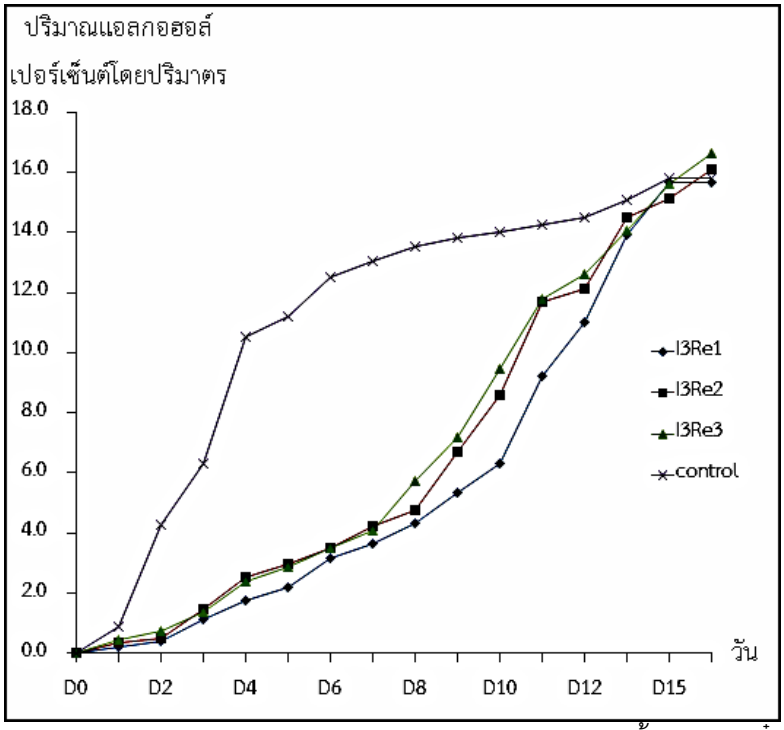
ภาพ 4.2 แสดงผลการศึกษาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ จากการหมักด้วยน้ำหมักมะเกี๋ยง สูตรที่ 3



ภาพ 4.3 แสดงผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการหมักด้วยน้ำหมักมะเกี๋ยง สูตรที่ 3



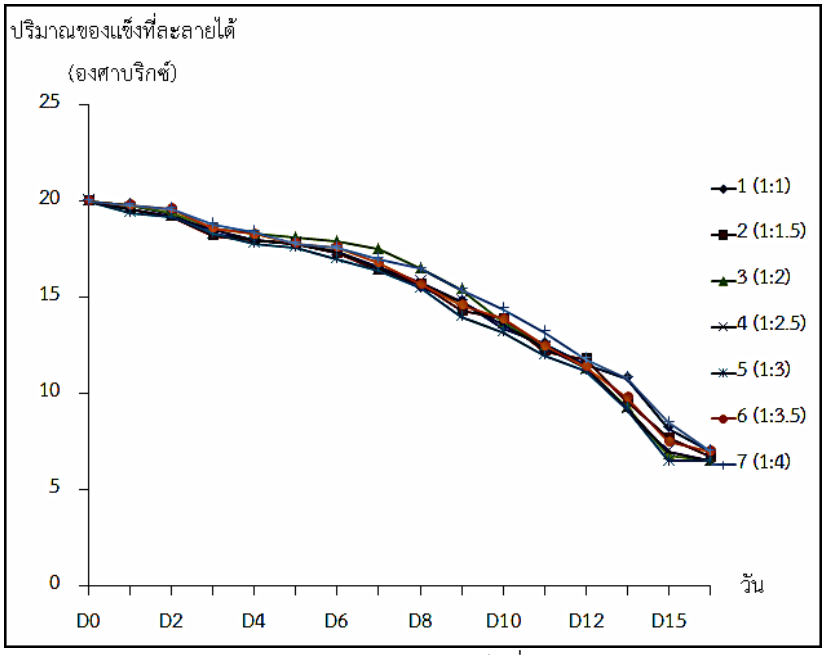
ภาพ 4.4 แสดงผลการศึกษาค่าความเป็นกรด ด่าง จากการหมักด้วยน้ำหมักมะเกี๋ยง สูตรที่ 3



ภาพ 4.5 แสดงผลการศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์ จากการหมักด้วยน้ำหมักมะเกี๋ยง สูตรที่ 3

ผลการทดลองที่ 3 ผลการศึกษาอัตราส่วนระหว่างเนื้อมะเกี๋ยงต่อปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการผลิตไวน์มะเกี๋ยง

จากการทดลองศึกษาสารอาหาร (แหล่งไนโตรเจนและเกลือแร่ที่จำเป็นต่อการหมัก) ทำให้ทราบปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำหมักมะเกี๋ยง คือ เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.02 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงนำสภาวะดังกล่าว มาทำการทดลองต่อ โดยเตรียมน้ำหมักให้มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้เริ่มต้น เท่ากับ 20 องศาบริกซ์ ค่าความเป็นกรด ด่าง เริ่มต้นที่ 3.5 แล้ววางแผนการทดลองเตรียมน้ำหมักให้มีอัตราส่วนระหว่างเนื้อมะเกี๋ยงต่อปริมาณน้ำ ดังตาราง 3.2 เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง ตั้งแต่เริ่มหมัก วันที่ 0 จนสิ้นสุดกระบวนการหมักวันที่ 17 วิเคราะห์ ผลปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรด ด่าง และปริมาณแอลกอฮอล์ ผลดัง**ตาราง ผ-2 ถึง ผ-5 (ภาคผนวก)**



ภาพ 4.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแข็งที่ละลายได้กับระยะเวลาในการหมัก

จากการศึกษาพบว่าเชื้อเจริญและสร้างกิจกรรมของเซลล์ใช้น้ำตาลในน้ำหมัก ตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมัก ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ลดลงอย่างต่อเนื่อง ตามระยะเวลาจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ดังกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแข็งที่ละลายได้กับระยะเวลา ภาพ 4.6

ตาราง 4.3 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติปริมาณของแข็งที่ละลายได้

General Linear Model: Brix versus Treatment

Factor Type Levels Values
Treatment fixed 7 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

Analysis of Variance for Brix, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Treatment	6	0.5181	0.5181	0.0863	0.80	0.589
Error	14	1.5200	1.5200	0.1086		
Total	20	2.0381				

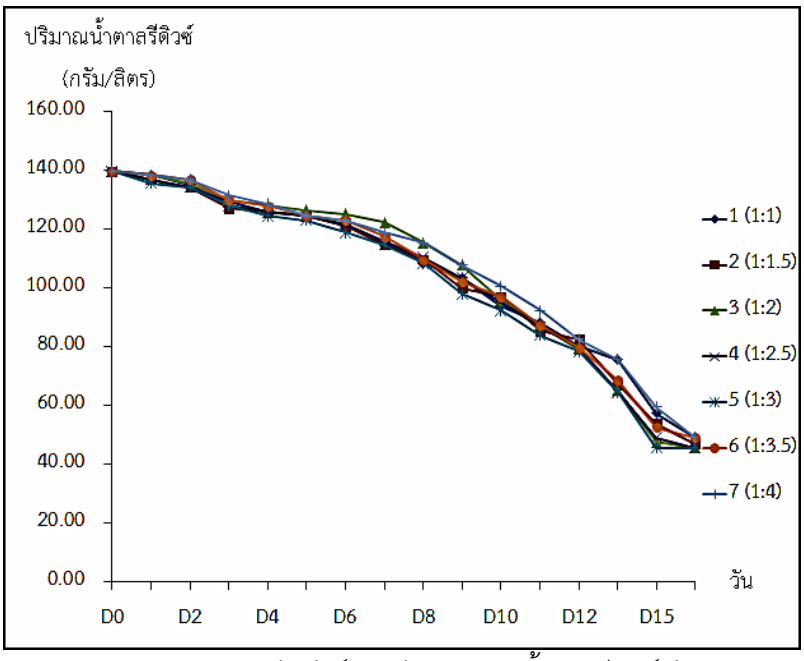
S = 0.329502 R-Sq = 25.42% R-Sq(adj) = 0.00%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Treatment	N	Mean	Grouping
7	3	7.1	A
6	3	7.1	A
1	3	7.0	A
4	3	6.9	A
3	3	6.9	A
5	3	6.7	A
2	3	6.7	A

Means that do not share a letter are significantly different.

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติในการทดลองศึกษาอัตราส่วนระหว่างเนื้อมะเกี๋ยงต่อปริมาณน้ำที่เหมาะสมในสูตรต่างๆ จากการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ หลังสิ้นสุดกระบวนการหมัก เมื่อพิจารณาจากค่า P ที่มากกว่า 0.05 ทำให้ทราบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในแต่ละสูตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับระยะเวลาในการหมัก

จากการศึกษาทดลองพบว่าเชื้อเจริญและสร้างกิจกรรมของเซลล์ใช้น้ำตาลในน้ำหมัก ตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมัก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่อง ตามระยะเวลาจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ดังกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับระยะเวลาในการหมัก

ตาราง 4.4 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

General Linear Model: Reducing sugar versus Treatment

Factor Type Levels Values
Treatment fixed 7 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

Analysis of Variance for Reducing sugar, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Treatment	6	11.6054	11.6054	1.9342	3.41	0.027
Error	14	7.9319	7.9319	0.5666		
Total	20	19.5373				

S = 0.752706 R-Sq = 59.40% R-Sq(adj) = 42.00%

Unusual Observations for Reducing sugar

Obs	Reducing sugar	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
1	45.4000	47.1733	0.4346	-1.7733	-2.89 R
3	48.8700	47.1733	0.4346	1.6967	2.76 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

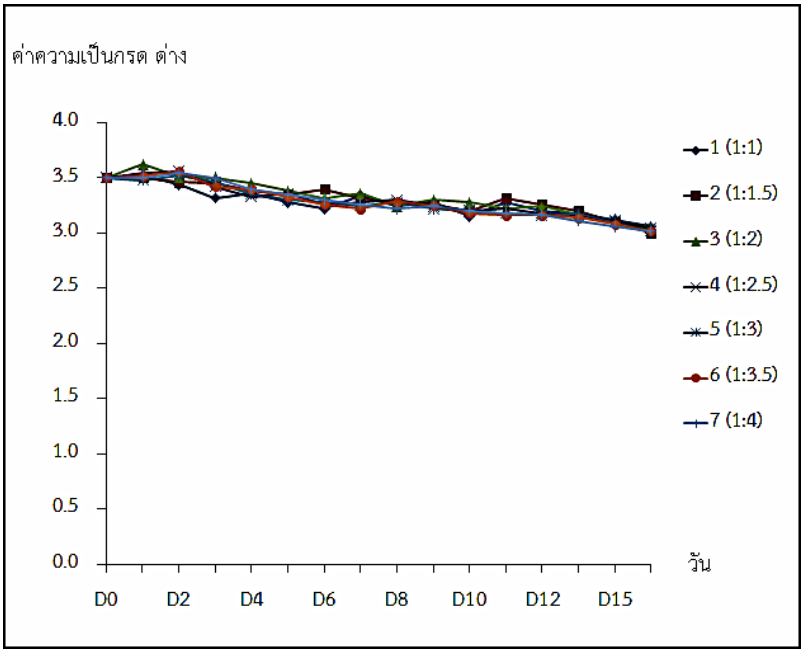
Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Treatment	N	Mean	Grouping
1	3	47.2	A

2	3	46.9	A
6	3	46.2	A
7	3	45.9	A
5	3	45.3	A
3	3	45.3	A
4	3	45.2	A

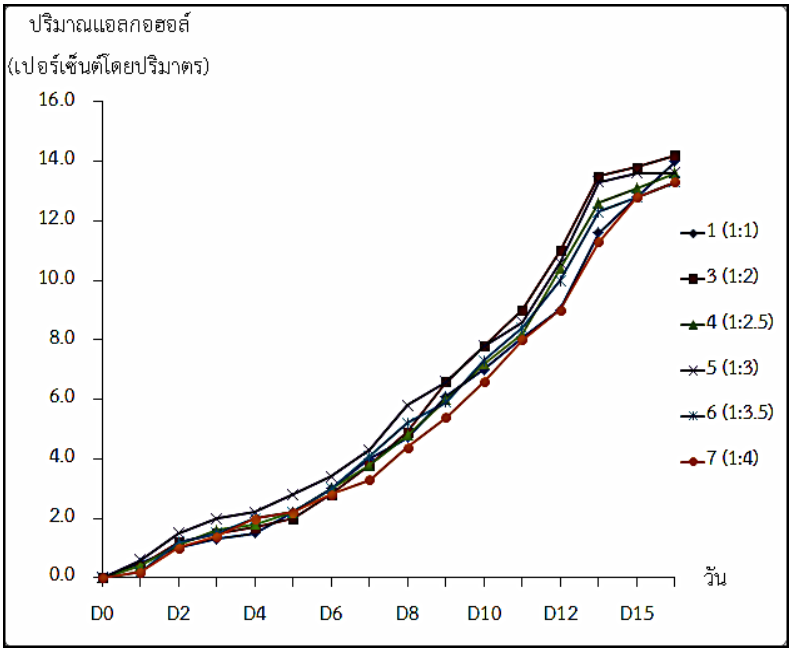
Means that do not share a letter are significantly different.

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติในการทดลองศึกษาอัตราส่วนระหว่างเนื้อมะเกี๋ยงต่อปริมาณน้ำที่เหมาะสมในสูตรต่างๆ จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หลังสิ้นสุดกระบวนการหมัก เมื่อพิจารณาจาก ตารางสามารถสรุปได้ว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในแต่ละสูตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด ด่าง กับระยะเวลาในการหมัก

จากการศึกษาทดลองพบว่าเชื้อเจริญและสร้างกรด ในระหว่างกระบวนการหมักและมีค่าความเป็นกรด ด่าง อยู่ในช่วงที่เชื้อเจริญได้ดัง ภาพ 4.8



ภาพ 4.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอลกอฮอล์ กับระยะเวลาในการหมัก

จากการศึกษาพบว่าเชื้อเจริญและสร้างกิจกรรมของเซลล์เปลี่ยนน้ำตาลในน้ำหมักเป็นแอลกอฮอล์ ตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมัก ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น ตามระยะเวลาจนสิ้นสุดกระบวนการในการหมักอย่างต่อเนื่อง ดังกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอลกอฮอล์กับระยะเวลา ภาพ 4.9

ตาราง 4.5 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติปริมาณแอลกอฮอล์

General Linear Model: Alcohol versus Treatment

Factor	Type	Levels	Values
Treatment	fixed	7	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

Analysis of Variance for Alcohol, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Treatment	6	0.37333	0.37333	0.06222	1.05	0.434
Error	14	0.82667	0.82667	0.05905		
Total	20	1.20000				

S = 0.242997 R-Sq = 31.11% R-Sq(adj) = 1.59%

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Treatment	N	Mean	Grouping
1	3	13.8	A
5	3	13.5	A
3	3	13.5	A
7	3	13.5	A
6	3	13.5	A
4	3	13.4	A
2	3	13.3	A

Means that do not share a letter are significantly different.

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติในการทดลองศึกษาอัตราส่วนระหว่างเนื้อมะเกี๋ยงต่อปริมาณน้ำที่เหมาะสมในสูตรต่างๆ จากการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ หลังสิ้นสุดกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ในแต่ละสูตรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองที่ 4 ศึกษาการกระบวนการตกตะกอน การทำใส และการบ่มไวน์มะเกี๋ยง

จากการศึกษาเกี่ยวกับค่าการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ระหว่างกระบวนการหมักไวน์มะเกี๋ยง คือปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ความเป็นกรด ด่าง และปริมาณแอลกอฮอล์ โดยกระบวนการหมักจะเสร็จสิ้นเมื่อน้ำตาลในน้ำหมักมะเกี๋ยงถูกใช้ไปจนเกือบหมด (6 ถึง 7 องศาบริกซ์) และได้ปริมาณแอลกอฮอล์ 14 ถึง 16 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่ายีสต์จะตายแล้วเกาะตัวตกลงไปนอนที่ก้นถังหมักและไม่มีการสร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อีก หากทิ้งไว้เป็นเวลานาน ยีสต์ส่วนหนึ่งจะเริ่มสลายตัวทำให้มีกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์เกิดขึ้น ดังนั้นเมื่อการหมักเสร็จสิ้น ต้องแยกน้ำไวน์มะเกี๋ยงออกจากตะกอน บรรจุในถังใหม่ โดยวิธี แรคกิ้ง (racking) ในการทดลองศึกษาการกระบวนการตกตะกอนไวน์มะเกี๋ยงครั้งนี้ จะทำการแรคกิ้งสองครั้ง คือแรคกิ้งครั้งแรก (First racking) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก นำไปบรรจุในถังใหม่ที่สะอาดและให้มีพื้นที่อากาศที่ปากถังเหลือเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ ของถัง เพื่อให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่หลงเหลืออยู่ในน้ำไวน์มีพื้นที่ระบาย และแรคกิ้งครั้งที่สอง (Second racking) วันที่ 14 ของการบ่ม นำไปบรรจุในถังใหม่ที่สะอาดถึงระดับเต็มปริ่มของปริมาตรถัง โดยเติม โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อช่วยป้องกันการเจริญจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นและปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่เป็นองค์ประกอบในไวน์มะเกี๋ยงที่อาจเกิดขึ้นได้ เช่น สารประกอบฟีนอลลิก

ซึ่งจะมีผลต่อ สี กลิ่น และรสชาติของไวน์ เพื่อนำน้ำไวน์มะเกี๋ยงที่ได้ไปทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส (ชิม) ปัจจัยด้านความใส ในขั้นตอนต่อไป

ผลการทดลองที่ 6 ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส (ชิม)

การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสไวน์มะเกี๋ยง เลือกผู้ทดสอบจากนักศึกษาที่ผ่านการเรียนกระบวนวิชา Alcoholic Fermentation จำนวน 21 คน และต้องมีสุขภาพดี ไม่เป็นไข้หวัด ไม่อิ่มหรือหิวเกินไป และไม่มีปัจจัยภายนอกอื่นๆ รบกวน ไม่พูดคุยปรึกษาหารือกัน

ใช้ระบบการประเมินด้านประสาทสัมผัส 20 คะแนน (20 – POINTS – WINE) องค์ประกอบหลักที่ใช้ประเมินมี 4 ปัจจัย ดังนี้

1. ความใส 0 – 2 คะแนน
2. สี 0 – 2 คะแนน
3. กลิ่น 0 – 4 คะแนน
4. รสชาติ 0 – 12 คะแนน

ตัวอย่างไวน์ป้องกันไม่ให้เกิดความรู้สึกลำเอียงจึงใช้วิธีกำหนดรหัสแบบสุ่ม 3 หลัก ที่ไม่ซ้ำซ้อนกัน ดังนี้ 818 401 762 405 545 611 386 และ 725

ตาราง 4.6 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัส

ตัวอย่างไวน์ / องค์ประกอบ		818	401	762	405	545	611	386	725
ความใส	0 – 2	2±0.36	2±0.36	2±0.30	2±0.36	2±0.30	2±0.22	2±0.22	2±0.00
สี	0 – 2	2±0.00	2±0.00	2±0.44	2±0.50	1±0.44	1±0.30	0±0.31	0±0.22
กลิ่น	0 – 4	2±0.45	4±0.40	4±0.46	4±0.48	4±0.51	3±0.48	2±0.46	2±0.50
รสชาติ	0 – 12	8±0.62	10±0.62	10±0.51	9±0.59	9±0.44	8±0.44	7±0.48	7±0.40
รวม		**14**	**18**	**18**	**17**	**16**	**14**	11	**11**

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าคะแนนรวม ทั้ง 4 ปัจจัย ที่ใช้ทดสอบ ไวน์มะเกี๋ยง สูตรที่มีคะแนนรวมสุงสุดคือ 401 (1:1) และ 762 (1:1.5) รองลงมาคือ 405 (1:2) , 545 (1:2.5) , 611 (1:3) และ 818 (control) และน้อยที่สุดคือ 386 (1:3.5) และ 725 (1:4) ตามลำดับ

ตาราง 4.7 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติการทดสอบทางประสาทสัมผัส ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

General Linear Model: Tested versus Treatment

Factor Type Levels Values
Treatment fixed 8 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

Analysis of Variance for Tested, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Treatment	7	190.000	190.000	27.143	59.22	0.000
Error	16	7.333	7.333	0.458		
Total	23	197.333				

S = 0.677003 R-Sq = 96.28% R-Sq(adj) = 94.66%

Unusual Observations for Tested

Obs	Tested	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
23	9.0000	10.3333	0.3909	-1.3333	-2.41 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Treatment	N	Mean	Grouping
2	3	18.3	A
3	3	17.7	A
4	3	16.7	A B
5	3	15.7	B C
1	3	14.3	C D
6	3	13.7	D
7	3	10.7	E
8	3	10.3	E

Means that do not share a letter are significantly different.

ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติการทดสอบทางประสาทสัมผัสไวน์มะเกี๋ยงสูตรต่างๆ เมื่อพิจารณาจากค่า P มีค่าน้อยกว่า 0.05 ทำให้ทราบว่าความพึงพอใจโดยรวมของผลิตภัณฑ์ไวน์มะเกี๋ยง สูตรที่ 2, 3 และ 4 ได้รับการยอมรับในตัวผลิตภัณฑ์มากที่สุด ตามลำดับ มีความแตกต่างกันในสูตรที่ 5, 1, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ ในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงทดสอบความผันแปรทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไวน์มะเกี๋ยง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ต่อไป

ตาราง 4.8 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติการทดสอบทางประสาทสัมผัส ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

General Linear Model: Tested versus Treatment

Factor Type Levels Values
Treatment fixed 8 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

Analysis of Variance for Tested, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Treatment	7	190.000	190.000	27.143	59.22	0.000
Error	16	7.333	7.333	0.458		
Total	23	197.333				

S = 0.677003 R-Sq = 96.28% R-Sq(adj) = 94.66%

Unusual Observations for Tested

Obs	Tested	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
23	9.0000	10.3333	0.3909	-1.3333	-2.41 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Grouping Information Using Tukey Method and 99.0% Confidence

Treatment	N	Mean	Grouping
2	3	18.3	A
3	3	17.7	A B
4	3	16.7	A B C
5	3	15.7	B C D
1	3	14.3	C D
6	3	13.7	D
7	3	10.7	E
8	3	10.3	E

Means that do not share a letter are significantly different.

พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาจากค่า P มีค่าน้อยกว่า 0.05 ทำให้ทราบว่าความพึงพอใจโดยรวมของผลิตภัณฑ์ไวน์มะเกี๋ยง สูตรที่ 2, 3 และ 4 ยังได้รับการยอมรับในตัวผลิตภัณฑ์มากที่สุด ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันในสูตรที่ 5, 1, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ ในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากโครงการวิจัยปีที่ 1 สามารถคัดเลือกเชื้อยีสต์ในธรรมชาติจากตัวอย่างผลมะเกี๋ยงสด ได้ยีสต์สายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการผลิต มีประสิทธิภาพต่อการหมักแอลกอฮอล์ในขั้นตอนการผลิต มีความจำเพาะในการสร้างสารให้กลิ่นและรสชาติ ไม่สร้างฟิล์มที่ผิวหน้าน้ำหมักที่อาจก่อให้เกิดความเสียหายในไวน์ ทนและสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีปริมาณแอลกอฮอล์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทนความเข้มข้นของน้ำตาลสูงที่ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 20 องศาบริกซ์ และปริมาณซัลเฟอร์สูงสุด 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 13 ถึง 16 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่สภาวะอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นำเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้มาศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการหมักต่อสามารถสรุปผลได้ดังนี้

การศึกษาประสิทธิภาพการหมักในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ประกอบด้วย กาแลคโทส กลูโคส แลคโทส มอลโทส และซูโครส พบว่าเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้และเชื้อควบคุม สามารถเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์และสร้างกิจกรรมของยีสต์โดยมีการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นระหว่างการหมักได้ ดังนั้นในขั้นตอนการผลิตต่อไปจึงเลือกใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลซูโครสหรือน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (Refined sugar) เป็นน้ำตาลหลักที่ใช้ในการทดลอง เนื่องจากน้ำตาลทรายขาวได้รับความนิยมและถูกนำมาใช้ในการทำไวน์มากที่สุด เพราะมีราคาถูก หาได้ง่าย และยีสต์สามารถใช้และเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ได้ โดยซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ยีสต์จะต้องย่อยสลายให้กลายเป็นโมเลกุลเดี่ยวโดย เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ที่ยีสต์สามารถสร้างขึ้นเองซึ่งสามารถเปลี่ยนซูโครส เป็นกลูโคสและฟรุคโตส ก่อนนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตและหมักแอลกอฮอล์ (Verstrepen *et al*., 2004)

มะเกี๋ยงสดที่นำมาผลิตไวน์จะต้องนำมาเจือจางด้วยน้ำ ทำให้สารอาหารต่างๆ มีปริมาณไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ จากการศึกษาการหมักในน้ำหมักมะเกี๋ยงที่เติมสารอาหารที่จำเป็นต่อกระบวนการหมัก เพื่อให้ทราบปริมาณไนโตรเจนและซัลเฟตที่เพียงพอต่อการหมัก ดังนั้นต้องมีการปรับแต่งน้ำหมักมะเกี๋ยงให้เหมาะสมก่อนการหมัก โดยใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Di-Ammonium hydrogen phosphate : $[(NH_4)_2PO_4]$) เป็นแหล่งไนโตรเจน และแมกนีเซียมซัลเฟต Magnesium sulphate ($MgSO_4$) เป็นแหล่งเกลือแร่ พบว่า ปริมาณไนโตรเจนและซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการหมักคือ สูตรที่ 3 เติมสารอาหารไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.02 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าเชื้อยีสต์ใช้แหล่งคาร์บอนในกิจกรรมของเชื้อยีสต์ ทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงต่ำสุดเหลือ 7.7±0.48 องศาบริกซ์ และ 3.9±0.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด ด่าง 3.3±0.02 และปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นมากที่สุด 16.1±0.47 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติพบว่าน้ำหมักใน สูตรที่ 3 ไม่แตกต่างกับ สูตรที่ 4 5 และ 6 ที่เติมสารอาหารในปริมาณที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการเติมสารอาหารที่มากขึ้น ไม่มีความ

จำเป็นต่อการนำไปใช้ในกิจกรรมของเชื้อยีสต์ และอาจเกิดการหลงเหลือตกค้างในน้ำหมักได้ นอกจากนี้ยังเป็นการสุญเสียต้นทุนการผลิตเพิ่มโดยเปล่าประโยชน์ เมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติน้ำหมักใน สูตรที่ 3 กับสูตรที่ 1 และ 2 ที่ไม่เติมสารอาหารกับเติมสารอาหารในปริมาณที่น้อยกว่า พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าในน้ำหมักสูตรที่ไม่เติมสารอาหารและสูตรที่เติมน้อยกว่าไม่เหมาะสมต่อการเจริญและกระบวนการหมัก

การศึกษาอัตราส่วนระหว่างเนื้อมะเกี๋ยงต่อปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการผลิตไวน์มะเกี๋ยง โดยใช้สภาวะการเตรียมน้ำหมักที่เติมสารอาหาร ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.02 กรัมต่อลิตร ควบคุมปริมาณของแข็งที่ละลายได้เริ่มต้น 20 องศาบริกซ์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 140 กรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรด ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 3.5 พบว่าเชื้อยีสต์เจริญและสร้างกิจกรรมของยีสต์ ในน้ำหมักทุกอัตราส่วนไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อยีสต์ใช้แหล่งคาร์บอนทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงต่ำสุดเหลือ 6.5±0.64 องศาบริกซ์ และ 45.0±1.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด ด่างเท่ากับ 3.00±0.02 และปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นมากที่สุด 13.8±0.14 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของทุกปัจจัยการทดลอง พบว่าปัจจัยการผลิตหลังสิ้นสุดกระบวนการหมักทุกสูตรอัตราส่วนผสม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าส่วนผสมเนื้อมะเกี๋ยงต่อน้ำ อัตราส่วน 1 ต่อ 1 จนถึง 1 ต่อ 4 สามารถสร้างกิจกรรมของยีสต์ใช้ในการผลิตไวน์มะเกี๋ยงได้

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยใช้ระบบการประเมินด้านประสาทสัมผัส วิธี 20 – POOINTS – WINE ประเมินจากความพึงพอใจในผลิตภัณฑ์ 4 ปัจจัยหลัก คือ ความใส สี กลิ่นและรสชาติ พบว่าคะแนนรวม ทั้ง 4 ปัจจัย ที่ใช้ทดสอบ ไวน์มะเกี๋ยงสูตรที่มีคะแนนรวมสุงสุดคือ 401 (สูตรที่ 2, 1:1) และ 762 (สูตรที่ 3, 1:1.5) รองลงมาคือ 405 (สูตรที่ 4, 1:2) , 545 (สูตรที่ 5, 1:2.5) , 611 (สูตรที่ 6, 1:3) และ 818 (สูตรที่ 1, control) และน้อยที่สุดคือ 386 (สูตรที่ 7, 1:3.5) และ 725 (สูตรที่ 8, 1:4) ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ผลิตภัณฑ์ไวน์มะเกี๋ยง สูตรที่ 2, 3 และ 4 ได้รับการยอมรับในตัวผลิตภัณฑ์มากที่สุด มีความแตกต่างกันในสูตรที่ 5, 1, 6, 7 และ 8 ตามลำดับในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงทดสอบความผันแปรทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไวน์มะเกี๋ยงที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ทราบว่าความพึงพอใจโดยรวมของผลิตภัณฑ์ไวน์มะเกี๋ยง สูตรที่ 2 ได้รับ การยอมรับในตัวผลิตภัณฑ์มากที่สุด ไม่แตกต่างกันในสูตรที่ 3 และ 4 ส่วนในสูตรที่ 5, 1, 6, 7 และ 8 ความพึงพอใจโดยรวมของผลิตภัณฑ์ไวน์มะเกี๋ยงมีความแตกต่างกัน ในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

บรรณานุกรม

ธีรวัลย์ ชาญฤทธิเสน. 2545. เรียนรู้การทำไวน์ผลไม้ด้วยตนเอง กรุงเทพฯ: บาร์โค้ดอินเตอร์เนชั่นเนล.

ประดิษฐ์ ครุวัฒนา. 2545. ไวน์: ศาสตร์และศิลป์. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ปราโมทย์ ธรรมรัตน์. 2532. หลักการเตรียมน้ำผลไม้ให้มีรสอร่อย. อาหาร 19(1) 33-47.

Amerine, M.A., Berg, H.W., Kunkee, R.E., Ough, C.S., Singleton, V.L. and Webb, A.D. 1992. The Technology of Wine Making. 4th ed. Westpost: AVI Publishing.

Anfang N. Brajkovich M. Goddard MR. 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. Austr J Grape Wine Res 15:1–8.

Barnett J.A. Payne R.W. Yarrow D., 1990. Yeasts, Characterisation and Identification. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarede I, Dubourdieu D., 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii* - *Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. Int J Food Microbiol. 122:312–320.

Cabranes C. Mangas J.J. Blanco D., 1997. Selection and biochemical characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains isolated from Spanish cider. J. Inst.Brew. 103, 165–169.

Fleet GH., 2003. Yeast interactions and wine flavour. Int J Food Microbiol 86:11–22.

Fugelsang KC. Edwards CG. 2007. Wine microbiology : practical applications and procedures. Springer, New York.

Goto S. Yokotsuka I., 1997. Wild yeast populations in fresh grape musts of different harvest times. J. Ferment Technol. 55:417-422.

Heard, G.M. Fleet, G.H., 1988. The effect of sulfur dioxide in yeast growth during natural and inoculated wine fermentation. Australian and New Zealand Wine Ind. J. 3 : 57–60.

Lambrechts M.G. Pretorius I.S., 2000. Yeast and its importance to wine aroma. South African Journal of Enology and Viticulture, 21 (2000), pp. 97–129.

Pretorius IS., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium : novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast. 16:675–729.

Querol A. Jiménez M. Huerta T., 1990. A study on microbiological and enological parameters during fermentation of must from poor and normal grape harvest in the region of Alicante (Spain). Journal of Food Science. 55. pp. 1603–1606.

Remize F. Roustan JL. Sablayrolles JM. Barre P. Dequin S., 1999. Glycerol overproduction by engineered *saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in By-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. Appl Environ Microbiol. 143-9.

Romano P. Caruso M. Capece A. Lipani G. Paraggio M. Fiore C., 2002. Metabolic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented grape must. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19Kerala, India.

Sua´rez B. Pando R. Ferna´ndez N. Gonza´lez A. Rodriguez R., 2005. Analytical differentiation of cider inoculated with yeast (*Saccharomyce cerevisiae*) isolated from Asturian (Spain) apple juice. Lebens.-Wiss. Technol. 38, 455–461.

Thomas, S. and Davenport, R.R., 1985. *Zygosaccharomyces baillii* – a profile of characteristics and spoilage activities. Food Microbiol. 2 : 157–169.

Verstrepen K.J., Iserentant D., Malcorps P., Derdelinckx G., Dijck P., 2004. Glucose and sucrose; Hazardous fast-food for industail yeast. Trends Biotechnol., 22: 531-537.

Zoecklien B.W. Fugelsang K.C. Gump B.H. Nury F.S., 1995. Microbiology of wine making. In : Wine Analysis and procuction. New York : Chapman & Mall. Pp. 280–203.

ภาคผนวก

ตาราง ผ-1 ผลการหมักน้ำหมักมะเกี๋ยงที่เติมสารอาหาร สูตรที่ 3

เวลา (วัน)	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (องศาบริกซ์)		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)		ความเป็นกรด ด่าง		ปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	
	control	I3	control	I3	control	I3	control	I3
D0	23.5±0.25	23.2±0.45	157.5±0.00	157.5±0.00	3.5±0.00	3.5±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
D1	21.7±0.43	22.7±0.52	155.0±0.85	156.8±0.32	3.2±0.02	3.5±0.08	0.9±0.13	0.3±0.11
D2	17.3±0.65	22.1±0.57	142.1±2.54	153.7±1.52	3.1±0.01	3.4±0.08	4.3±0.16	0.5±0.17
D3	13.3±0.84	21.6±0.95	111.4±2.03	151.4±1.62	3.1±0.05	3.4±0.09	6.3±0.14	1.3±0.17
D4	9.6±1.05	21.4±1.15	65.0±2.78	148.3±2.56	3.1±0.06	3.4±0.08	10.5±0.32	2.2±0.42
D5	8.8±0.76	21.1±0.92	40.2±4.62	142.1±3.37	3.1±0.03	3.4±0.05	11.2±0.28	2.7±0.43
D6	7.8±0.89	20.8±0.70	24.6±2.31	136.9±2.89	3.1±0.07	3.3±0.06	12.5±0.22	3.4±0.20
D7	7.3±0.66	20.0±0.54	16.8±5.44	131.2±4.91	3.1±0.07	3.3±0.05	13.0±0.34	4.0±0.29
D8	7.0±0.52	19.3±0.46	9.7±4.98	126.0±4.20	3.1±0.02	3.3±0.08	13.5±0.55	4.9±0.73
D9	6.9±0.32	18.5±0.11	5.5±2.01	108.9±1.51	3.1±0.04	3.3±0.07	13.8±0.73	6.4±0.94
D10	6.8±0.24	17.9±0.22	3.8±2.63	85.7±5.05	3.1±0.04	3.3±0.07	14.0±0.95	8.1±1.63
D11	6.7±0.62	14.9±0.98	3.5±6.41	50.0±9.73	3.2±0.02	3.3±0.04	14.3±1.34	10.9±1.47
D12	6.5±0.87	13.6±1.02	3.4±1.22	22.3±0.00	3.2±0.02	3.3±0.03	14.5±0.62	11.9±0.81
D13	6.5±0.94	10.2±1.17	3.4±1.78	15.3±1.27	3.2±0.02	3.3±0.03	15.1±0.43	14.2±0.30
D15	6.5±0.32	7.7±0.48	3.4±0.29	4.0±0.65	3.2±0.05	3.3±0.02	15.8±0.46	15.5±0.31
D17	6.5±0.35	7.7±0.48	3.4±0.26	3.9±0.56	3.2±0.02	3.3±0.02	15.8±0.34	16.1±0.47

ตาราง ผ-2 ผลการศึกษาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ จากการหมักน้ำหมักมะเกี๋ยงในอัตราส่วนต่างๆ

สูตร / เวลา (Day)	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (องศาบริกซ์)						
	1 (1:1)	2 (1:1.5)	3 (1:2)	4 (1:2.5)	5 (1:3)	6 (1:3.5)	7 (1:4)
D0	20.0±0.00	20.0±0.00	20.0±0.00	20.0±0.00	20.0±0.00	20.0±0.00	20.0±0.00
D1	19.8±0.26	19.6±0.34	19.8±0.32	19.6±0.28	19.4±0.32	19.8±0.27	19.8±0.26
D2	19.3±0.65	19.2±0.56	19.4±0.48	19.2±0.36	19.2±0.44	19.6±1.06	19.6±0.53
D3	18.3±0.56	18.2±0.58	18.6±0.56	18.5±0.78	18.3±0.38	18.6±0.56	18.8±0.61
D4	18.0±1.20	18.0±0.29	18.3±1.02	18.0±1.02	17.8±1.23	18.3±0.45	18.4±0.28
D5	17.8±0.68	17.8±1.05	18.1±1.34	17.8±1.34	17.6±1.06	17.8±0.87	17.8±0.58
D6	17.3±0.75	17.3±1.23	17.9±0.67	17.4±0.65	17.0±0.54	17.6±0.56	17.6±0.67
D7	16.5±0.96	16.4±1.75	17.5±0.55	16.6±0.45	16.4±0.68	16.8±1.04	17.0±0.74
D8	15.5±1.06	15.7±1.66	16.5±1.34	15.8±0.87	15.5±0.79	15.7±1.55	16.5±1.22
D9	14.8±1.54	14.3±0.86	15.4±1.60	14.8±0.55	14.0±1.23	14.6±1.32	15.4±1.65
D10	13.4±0.55	13.9±0.82	13.7±0.55	13.6±1.20	13.2±1.05	13.9±0.68	14.4±0.98
D11	12.6±0.86	12.2±1.02	12.5±1.78	12.4±1.64	12.0±0.88	12.5±0.54	13.2±1.08
D12	11.5±1.06	11.8±1.74	11.3±0.54	11.4±0.86	11.2±1.26	11.4±0.66	11.8±1.34
D13	10.8±1.25	9.6±0.96	9.3±1.48	9.2±0.88	9.2±1.44	9.8±0.84	10.8±0.55
D15	8.2±0.24	7.7±0.58	6.8±1.22	7.0±0.57	6.5±0.89	7.5±1.02	8.5±1.23
D17	7.0±0.86	6.7±1.24	6.9±0.87	6.9±1.21	6.5±0.64	7.1±1.38	7.1±1.28

ตาราง ผ-3 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการหมักน้ำหมักมะเกี๋ยงในอัตราส่วนต่างๆ

สูตร / เวลา(Day)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)						
	1 (1:1)	2 (1:1.5)	3 (1:2)	4 (1:2.5)	5 (1:3)	6 (1:3.5)	7 (1:4)
D0	139.6±0.00	139.6±0.00	139.6±0.00	139.6±0.00	139.6±0.00	139.6±0.00	139.6±0.00
D1	138.2±2.78	136.8±3.22	138.2±1.52	136.8±2.12	135.4±3.01	138.2±3.65	138.2±2.84
D2	134.7±3.22	134.0±3.65	135.4±2.44	134.0±1.68	134.0±2.44	136.8±4.02	136.8±3.65
D3	127.7±3.56	127.0±2.58	129.8±2.68	129.1±3.44	127.7±5.61	129.8±2.87	131.2±4.33
D4	125.6±4.12	125.6±4.02	127.7±3.05	125.6±2.56	124.2±2.37	127.7±3.55	128.4±3.85
D5	124.2±3.56	124.2±4.11	126.3±4.66	124.2±2.31	122.8±3.88	124.2±3.76	124.2±4.21
D6	120.7±4.55	120.7±3.56	124.9±1.37	121.4±2.33	118.6±4.21	122.8±4.22	122.8±3.55
D7	115.2±3.89	114.5±2.98	122.1±6.55	115.9±4.65	114.5±3.65	117.2±1.65	118.6±3.41
D8	108.2±3.77	109.6±2.77	115.2±5.48	110.3±6.75	108.2±3.33	109.6±3.44	115.2±2.15
D9	103.3±2.56	99.8±3.01	107.5±2.03	103.3±3.48	97.7±2.18	101.9±2.87	107.5±2.66
D10	93.5±2.46	97.5±2.65	95.6±3.67	94.9±2.61	92.1±2.06	97.0±3.06	100.5±2.78
D11	87.9±2.88	85.1±2.77	87.7±2.78	86.5±1.55	83.7±2.11	87.7±2.88	92.1±1.23
D12	80.2±1.34	82.3±1.36	78.9±1.68	79.5±1.32	78.2±1.65	79.9±2.16	82.9±1.44
D13	75.4±1.88	67.0±1.59	64.9±1.55	64.2±1.78	64.3±1.23	68.2±1.56	75.4±1.25
D15	57.2±1.05	53.7±1.22	47.4±2.23	48.8±1.65	45.8±1.44	52.6±1.37	59.3±1.56
D17	47.2±1.22	46.9±1.45	45.3±1.44	45.2±1.44	45.0±1.53	46.0±1.11	45.9±1.32

ตาราง ผ-4 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด ด่าง จากการหมักน้ำหมักมะเกี๋ยงในอัตราส่วนต่างๆ

สูตร / เวลา(Day)	ค่าความเป็นกรด ด่าง						
	1 (1:1)	2 (1:1.5)	3 (1:2)	4 (1:2.5)	5 (1:3)	6 (1:3.5)	7 (1:4)
D0	3.50±0.00	3.50±0.00	3.50±0.00	3.50±0.00	3.50±0.00	3.50±0.00	3.50±0.00
D1	3.52±0.02	3.50±0.02	3.62±0.03	3.55±0.02	3.48±0.02	3.52±0.01	3.50±0.02
D2	3.44±0.01	3.46±0.02	3.51±0.03	3.56±0.02	3.52±0.02	3.56±0.02	3.55±0.03
D3	3.32±0.06	3.45±0.03	3.50±0.02	3.42±0.03	3.46±0.01	3.42±0.03	3.50±0.03
D4	3.36±0.03	3.38±0.04	3.45±0.01	3.33±0.04	3.35±0.01	3.40±0.06	3.40±0.04
D5	3.28±0.03	3.35±0.03	3.38±0.01	3.36±0.04	3.30±0.02	3.33±0.02	3.35±0.02
D6	3.22±0.02	3.40±0.03	3.32±0.02	3.26±0.02	3.28±0.01	3.26±0.03	3.30±0.02
D7	3.34±0.01	3.32±0.02	3.36±0.03	3.28±0.02	3.25±0.01	3.22±0.03	3.26±0.04
D8	3.25±0.04	3.28±0.05	3.24±0.02	3.30±0.01	3.28±0.02	3.29±0.02	3.22±0.03
D9	3.28±0.02	3.26±0.01	3.30±0.02	3.24±0.03	3.22±0.03	3.25±0.01	3.25±0.04
D10	3.15±0.02	3.20±0.01	3.28±0.04	3.20±0.02	3.20±0.03	3.18±0.01	3.20±0.01
D11	3.28±0.01	3..32±0.02	3.22±0.01	3.22±0.02	3.18±0.01	3.16±0.01	3.18±0.02
D12	3.20±0.03	3.26±0.01	3.24±0.01	3.18±0.02	3.16±0.01	3.16±0.03	3.16±0.02
D13	3.18±0.01	3.20±0.03	3.16±0.02	3.16±0.01	3.18±0.02	3.14±0.02	3.11±0.03
D15	3.12±0.01	3.10±0.02	3.10±0.03	3.11±0.01	3.10±0.03	3.08±0.02	3.06±0.03
D17	3.06±0.01	3.00±0.02	3.05±0.02	3.04±0.01	3.02±0.02	3.02±0.01	3.02±0.03

ตาราง ผ-5 ผลการศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์ จากการหมักน้ำหมักมะเกี๋ยงในอัตราส่วนต่างๆ

สูตร / เวลา (Day)	ปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)						
	1 (1:1)	**2 (1:1.5)**	**3 (1:2)**	**4 (1:2.5)**	**5 (1:3)**	**6 (1:3.5)**	**7 (1:4)**
D0	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
D1	0.5±0.11	0.4±0.15	0.4±0.12	0.4±0.11	0.6±0.14	0.2±0.16	0.2±0.12
D2	1.0±0.22	1.4±0.24	1.2±0.18	1.1±0.21	1.5±0.12	1.2±0.24	1.0±0.18
D3	1.3±0.25	1.6±0.36	1.5±0.24	1.6±0.16	2.0±0.24	1.5±0.22	1.4±0.21
D4	1.5±0.17	1.8±0.32	1.7±0.23	1.8±0.18	2.2±0.22	2.0±0.31	2.0±0.25
D5	2.2±0.23	2.3±0.28	2.0±0.34	2.2±0.25	2.8±0.18	2.2±0.18	2.2±0.18
D6	3.0±0.34	3.2±0.17	2.8±0.38	3.0±0.36	3.4±0.36	3.0±0.24	2.8±0.34
D7	4.0±0.18	3.9±0.22	3.8±0.42	3.8±0.17	4.3±0.34	4.1±0.16	3.3±0.26
D8	4.7±0.36	5.3±0.24	4.9±0.22	4.8±0.24	5.8±0.25	5.2±0.25	4.4±0.35
D9	6.1±0.42	5.8±0.18	6.6±0.28	6.0±0.34	6.6±0.26	5.9±0.37	5.4±0.36
D10	7.0±0.28	6.5±0.42	7.8±0.16	7.2±0.35	7.8±0.18	7.3±0.42	6.6±0.33
D11	8.1±0.17	7.2±0.36	9.0±0.28	8.2±0.46	8.6±0.35	8.4±0.25	8.0±0.38
D12	9.0±0.43	9.4±0.28	11.0±0.34	10.4±0.22	10.6±0.36	10.0±0.22	9.0±0.46
D13	11.6±0.25	11.3±0.32	13.5±0.29	12.6±0.26	13.3±0.21	12.3±0.18	11.3±0.15
D15	12.8±0.31	12.3±0.25	13.8±0.33	13.1±0.19	13.6±0.11	12.8±0.32	12.8±0.25
D17	13.8±0.14	13.3±0.23	13.5±0.18	13.4±0.22	13.5±0.14	13.5±0.19	13.5±0.21

ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Yeast extract Peptone Dextrose broth (YPDB)

Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Dextose	10.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 ถึง 5.0 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Yeast extract Peptone Dextrose agar (YPDA)

Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Dextose	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 ถึง 5.0 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

วิธีวิเคราะห์ ค่าความเป็นกรด ด่าง โดยใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด ด่าง (pH meter)

วิธีการวัด

1) ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างแท่งแก้วอิเล็คโทรดให้สะอาด แล้วใช้กระดาษทิชชูเนื้อละเอียดซับให้แห้ง
2) ปรับเครื่องมือให้ได้มาตรฐานด้วยสารละลายมาตรฐาน pH 4, 7 และ 10 ตามลาดับ
3) ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างแท่งแก้วอิเล็คโทรดอีกครั้ง ซับให้แห้ง
4) จุ่มอิเล็คโทรดลงไปในตัวอย่างที่ต้องการวัดค่าความเป็นกรด ด่าง
5) ล้างอิเล็คโทรด ด้วยน้ำกลั่นแล้วซับให้แห้ง เพื่อทำการวัดตัวอย่างต่อไปหรือเมื่อใช้งานเสร็จแล้ว

วิธีวิเคราะห์ ปริมาณแอลกอฮอล์ ด้วยเครื่อง Ebuliometer

1. หาจุดเดือดของน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นประมาณ 20 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์เสียบด้วยเทอร์โมมิเตอร์ เติมน้ำประปาลงในส่วนของเครื่องควบแน่น (condenser) ต้มน้ำในคอลัมน์ด้วยตะเกียงจำเพาะที่ใต้ฐานของเครื่อง เมื่อน้ำเดือดแล้วให้อ่านอุณหภูมิที่ค่าคงที่ ค่าที่อ่านได้นำไปปรับแผ่นสไลด์โดยให้ขีดศูนย์ของสเกลนอกตรงกับขีดอุณหภูมิที่เป็นจุดเดือดของน้ำในแผ่นสเกลใน

2. เติมสารตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์เสียบด้วยเทอร์โมมิเตอร์ เติมน้ำประปาลงในส่วนของเครื่องควบแน่น (condenser) ต้มน้ำในคอลัมน์ด้วยตะเกียงจำเพาะที่ใต้ฐานของเครื่อง เมื่อตัวอย่างเดือดจนอุณหภูมิคงที่แล้ว อ่านค่าเปอร์เซ็นต์ของแอลกอฮอล์จากสเกลนอกที่ตรงกับขีดจุดเดือดของสารตัวอย่างสเกลในได้

วิธีวิเคราะห์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS method

การเตรียมสารละลายดีเอ็นเอส สารเคมีประกอบด้วย

Sodium hydroxide (NaOH)	10.0	กรัม
Sodium sulfite (Na_2SO_3)	0.5	กรัม
3-5 Dinitrosalicylic acid	10.0	กรัม
Potassium sodium tartrate	182.0	กรัม
Phenol	2.0	กรัม
Distill water	1000	มิลลิลิตร

ละลาย Sodium hydroxide ในน้ำกลั่น และละลาย Potassium sodium tartrate จากนั้นค่อยๆ เติมสาร Dinitrosalicylic acid พร้อมทั้งคนตลอดเวลา เมื่อสารละลายหมดแล้วจึงเติม Sodium sulfite และ Phenol ตามลำดับ

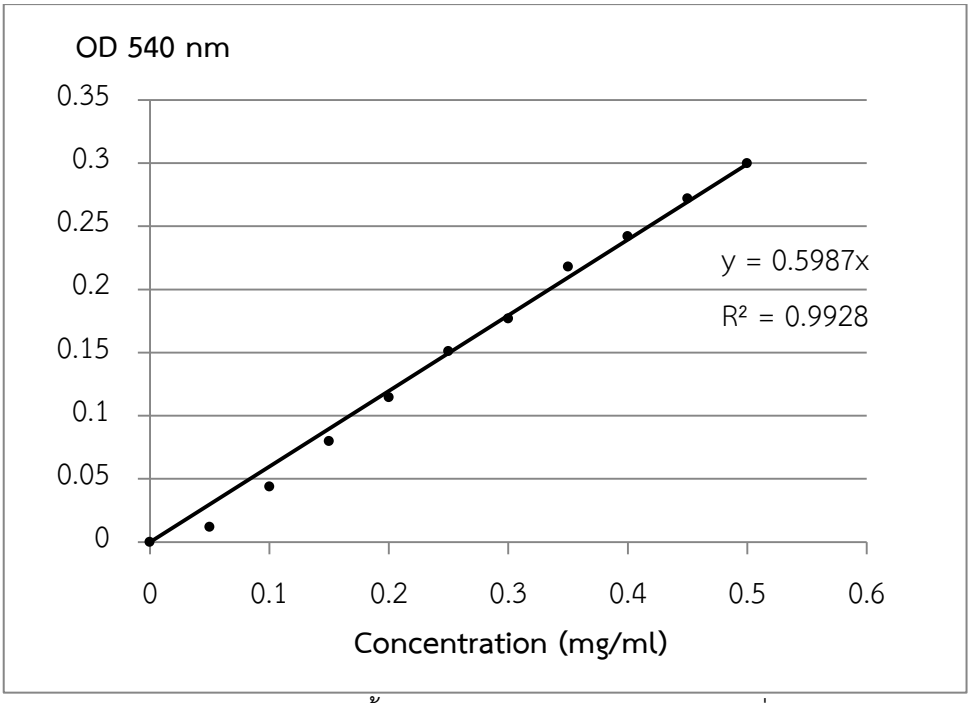
ทำกราฟมาตรฐาน

1. ละลายน้ำตาลกลูโคส ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำตาลที่ใช้เป็นน้ำตาลมาตรฐาน (ใช้น้ำตาลชนิดเดียวกับที่ต้องการทราบปริมาณ)

2. จากนั้นทำการเจือจางสารละลายน้ำตาลด้วยน้ำกลั่นระดับความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. นำสารละลายน้ำตาลปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลาย DNS 0.5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วรีบทำให้เย็นในกระบะน้ำแข็ง เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบมาตรฐาน

4. ทำการพล็อตกราฟระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่วัดได้จากแต่ละหลอด (แกน x) กับค่าความเข้มข้นต่างๆ และปริมาณน้ำตาลมาตรฐานที่ใช้ (แกน y) จะได้กราฟมาตรฐานตาม ภาพภาคผนวกที่ 1



ภาพ ผ-1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวส์และค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

การวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางตามที่ต้องการมา 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DNS 0.5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วรีบทำให้เย็นลงในกระบะน้ำแข็ง เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบมาตรฐาน
2. ค่าที่วัดได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานก็จะทราบปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในตัวอย่างหรือทำการคำนวณจากค่าความชันของกราฟมาตรฐาน

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{A540}{0.5987} \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

แบบประเมินผลิตภัณฑ์ไวน์มะเกี๋ยง

(Production of Makiang (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*) Wine.)

วัน/เดือน/ปี ที่ทดสอบ .....เวลาที่ทดสอบ .....

เพศ ☐ ชาย ☐ หญิง อายุ .....

<u>คำชี้แจง</u> ให้ผู้ทดสอบผลิตภัณฑ์ไวน์มะเกี๋ยง (Production of Makiang (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*) Wine. ต่อไปนี้ ให้คะแนนระดับความชอบและไม่ชอบในแต่ละผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง โดยใช้สเกลที่เหมาะสมเพื่ออธิบายถึงความรู้สึกที่มีต่อแต่ละผลิตภัณฑ์ที่ระดับต่างๆ ถึงลักษณะ ความใส สี กลิ่นและรสชาติตามแบบทดสอบ

ตัวอย่างไวน์ / องค์ประกอบ		818	401	762	405	545	611	386
สี	คะแนน							
สีจืด	0							
สีแดง	0							
สีแดงอ่อน	1							
สีตามสายพันธ์	2							
ความใส	คะแนน							
ไม่ใส (ขุ่น)	0							
ใส่ (แต่ใสไม่จริง)	1							
ใสเป็นประกาย มองทะลุแก้วได้	2							
กลิ่น	คะแนน							
กลิ่นผิดปกติ/ไม่พึงประสงค์	0							
กลิ่นอ่อนไม่สร้างความประทับใจใดๆ	1							
กลิ่นที่เป็นแบบฉบับ	2							
กลิ่นหอมละไม	3							
กลิ่นหอมชวนดม/ประทับใจมาก	4							
รสชาติ	คะแนน							
ผิดปกติ (เปรี้ยว ฝาด ขม หวานเกินควร)	0							
ไม่มีความเป็นตัวของตัวเอง	1-3							
อ่อน ปานกลาง แต่เป็นฉบับสายพันธุ์	4-6							
ได้สมดุลมีสุนทรียภาพ	7-9							
เข้มและประทับใจอย่างยิ่ง	10-12							
คะแนนรวม (20)								

ข้อเสนอแนะ

.....