บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

1. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของวัตถุดิบ

1.1 องค์ประกอบทางเคมี และสมบัติทางกายภาพของผลหม่อน

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและสมบัติทางกายภาพของผลหม่อน ได้ผลดังตารางที่ 4.1 คือ ผลหม่อนมีปริมาณความชื้นร้อยละ 78.55 ซึ่งใกล้เคียงกับในผลองุ่นที่มีความชื้นร้อยละ 70-80 ปริมาณโปรตีนในผลหม่อนค่อนข้างต่ำคือร้อยละ 2.59 เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในผลไม้จะมีเล็กน้อย โปรตีนในผลไม้ส่วนใหญ่จะเป็นพวกเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่างการสุก ส่วนไขมันมีร้อยละ 0.27 ในผลไม้ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของกรดไขมัน (รัชนี ตัณฑะพานิชกุล, 2536) ผลหม่อนมีเถ้าทั้งหมดร้อยละ 0.86 เส้นใยร้อยละ 1.39 คาร์โบไฮเดรทร้อยละ 17.18 ส่วนปริมาณเพคตินในผลหม่อนมีค่อนข้างสูงกว่าผลองุ่นเล็กน้อยโดยมีร้อยละ 0.46 (ในรูปแคลเซียมเพคเตท) ซึ่งปกติในองุ่นจะพบร้อยละ 0.06-0.20 ผลหม่อนมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ค่อนข้างสูงคือมีร้อยละ 16.32 ในรูปกลูโคส ซึ่งใกล้เคียงกับผลองุ่นที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างร้อยละ 12-19 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในผลหม่อนมี 18 °Brix ซึ่งใกล้เคียงกับผลองุ่นที่มีค่าระหว่าง 14-23 °Brix ค่านี้ส่วนใหญ่จะแสดงถึงปริมาณน้ำตาลโดยประมาณที่มีอยู่ในผลไม้ ซึ่งองค์ประกอบนี้เป็นส่วนที่ยีสต์หมักเปลี่ยนให้เป็นแอลกอฮอล์ได้ เกศินี ระมิงค์วงศ์ (2528) รายงานว่าผลหม่อนมีปริมาณน้ำร้อยละ 84 โปรตีนร้อยละ 1.70 และไขมันร้อยละ 0.40 ซึ่งมีปริมาณคุณค่าทางอาหารแตกต่างจากผลหม่อนพันธุ์จีนที่ใช้ในการศึกษานี้เล็กน้อย อาจเนื่องจากสายพันธุ์ การดูแลปฏิบัติ และสถานที่ปลูกแตกต่างกัน ผลหม่อนพันธุ์จีนเป็นผลไม้ที่มีรสชาติค่อนข้างเปรี้ยวเล็กน้อย จากค่า pH ที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 5.11 มีค่าต่ำกว่า pH ของผลองุ่นเล็กน้อย ซึ่งมี pH ระหว่าง 3.4-3.7 ปริมาณกรดในผลหม่อนมีอยู่ร้อยละ 0.44 ส่วนใหญ่เป็นกรดซิตริก ซึ่งเป็นกรดที่มีอยู่มากในผลไม้ชนิดนี้ (Will, Lim and Greenfield, 1987; ศิริพร แก้วแดง, 2540) ปริมาณกรดในผลหม่อนค่อนข้างต่ำ เพราะในระหว่างการสุกกรดอินทรีย์จะลดลงเรื่อยๆอย่างช้าๆ จากการที่กรดอินทรีย์จะถูกใช้ในกระบวนการหายใจของผลไม้ได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ทำให้กรดลดลงในผลไม้ที่สุกจัด (รัชนี ตัณฑะพานิชกุล, 2536) และปริมาณกรดในผลหม่อนมีอยู่ต่ำกว่าผลองุ่นเล็กน้อย โดยผลองุ่นมีปริมาณกรดอยู่ระหว่างร้อยละ 0.46-0.75 (Zoecklein et al., 1995)

ผลหม่อนมีสารประกอบฟีนอลิคค่อนข้างต่ำโดยมี 2444.20 มิลลิกรัม/ลิตร ในรูปกรดแกลลิค (ตารางที่ 4.1) สารในกลุ่มนี้รวมถึงสารประกอบที่ให้สีที่มีขนาดเล็กจนถึงขนาดกลาง ฟลาโวนอยด์ รงควัตถุ และแทนนินซึ่งมาจากผลไม้ สารประกอบฟีนอลิคที่สกัดได้จากผลไม้จะแสดงรวมในรูปของกรดแกลลิค ซึ่งมีอยู่ 2000-6000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนปริมาณแอนโธไซยานินในผลหม่อนมี 550.89 มิลลิกรัม/ลิตร (ตารางที่ 4.1) ซึ่งมีปริมาณต่ำกว่าผลองุ่นที่มีปริมาณแอนโธไซยานินระหว่าง 650-980 มิลลิกรัม/ลิตร Harborne, Mabry และ Mabry (1975) ได้แสดงชนิดของแอนโธไซยานินสำหรับ

ผลหม่อน (*Morus alba* วงศ์ Moraceae) ที่พบคือ cyanidin 3- glucoside, cyanidin 3,5- diglucoside และ delphinidin 3- glucoside ซึ่งชนิดและปริมาณแอนโธไซยานินในผลหม่อนหรือผลไม้อื่นๆ จะขึ้นกับสายพันธุ์ การเพาะปลูก ภูมิอากาศในการเพาะปลูก อายุ (Boyles and Wrostad, 1993) เช่นหม่อนพันธุ์ Mavromournia (*M. nigra*) มีแอนโธไซยานินชนิดเดียวคือ cyanidin 3- grucorutinoside ส่วน Purple mulberries (*M. alba*) มี cyanidin 3- rutinoside หรือ cyanidin 3- glucoside (Markakis, 1982) และ Black mulberries (*M. nigra*) มีเพียง cyanidin 3- glucoside ผลหม่อนพันธุ์จีนที่ใช้ในการศึกษาจัดอยู่ในกลุ่มของ Purple mulberries จึงน่าจะมีแอนโธไซยานินชนิด cyanidin 3-glucoside ศิริพร แก้วแดง (2540) ก็รายงานว่าสารสีแอนโธไซยานินในผลหม่อนเป็นชนิด cyanidin 3- glucoside

1.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) ของผลหม่อน

ผลการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้ผลดังตารางที่ 4.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PE ในผลหม่อนมีค่า 6.0 PMU/ml ส่วนค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PG ของผลหม่อนมีอยู่ 1.28 PGu/ml ตามลำดับ เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีความสัมพันธ์กันโดย PE จะมีหน้าที่ในการสลายหมู่เมทิล(desterified) หรือกำจัดหมู่เมทิลออกจาก polymer ของ galacturonan หรือเพคตินทางด้าน reducing group เกิดหมู่คาร์บอกซิลอิสระ (free carboxyl group) ทำให้เอนไซม์ PG ย่อยสลายเพคตินต่อไปได้ (Pilnik and Rombouts, 1979; Schwimnur, 1981) ดังนั้นการย่อยสลายเพคตินเกิดขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ PG ย่อยสลายเพคตินออกจากผนังเซลล์แต่ต้องมีเอนไซม์ PE ช่วยเตรียมสารตั้งต้น (substrate) ให้เหมาะแก่การย่อยสลาย ซึ่ง Kertesz (1951) รายงานว่าเอนไซม์ PE จากพืชจะทำงานได้ดีที่ pH 4-7 ในขณะเอนไซม์ PG จากพืชจะทำงานได้ดีที่ pH 3-5

1.3 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเพคติเนสเอนไซม์

เพคติเนสเอนไซม์ที่ใช้เป็น commercial grade เมื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PE เป็น 18.10 PMU/ml การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PE ใช้วิธีการวัด free methoxyl group ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายที่ตำแหน่งหมู่เมทิลเอสเทอร์ของเพคตินโดยเอนไซม์ PE ส่วนค่ากิจกรรมของ PG มีค่า 2.19 PGu/ml ดังตารางที่ 4.3 ซึ่งค่าที่ได้แตกต่างจากที่ระบุไว้ที่ฉลาก เนื่องจากวิธีการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน จึงทำให้หน่วยของเอนไซม์ และค่ากิจกรรมแตกต่างกัน ในการศึกษาใช้วิธีการวัด reducing group ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของเพคตินโดยเอนไซม์ PG จะย่อยสลายพันธะ 1,4 glycosidic ใน pectic polyuronide ได้ reducing group และวัดการเพิ่มขึ้นของ reducing power โดยวิธี copper reducing (Jansen and MacDonell, 1945; Kertesz, 1951)

2. วิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ และสมบัติทางกายภาพบางประการของน้ำหมัก

จากการวิเคราะห์เบื้องต้นในไวน์ผลไม้ที่ทดลองผลิตโดยสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง พบว่าไวน์หม่อนมีปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์สูงกว่าไวน์ผลไม้ชนิดอื่นๆคือมี 334 มิลลิกรัม/ลิตร (ส่วนในล้านส่วน, ppm.) ซึ่งภาวะในการทำไวน์หม่อนที่ทดลองผลิตคือ เตรียมน้ำหมักโดยผสมกับน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 ปรับปริมาณกรดด้วยกรดซิตริก ระหว่างร้อยละ 0.4-0.6 และเติมเพคติเนสเอนไซม์ระหว่าง 110-130 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหมัก และหมักน้ำหมักไวน์หม่อนที่มีส่วนของผลหม่อนด้วย ดังนั้นในการศึกษาจึงเตรียมน้ำหมักจากผลหม่อนสุกสีม่วงพันธุ์จีน เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -25 $\pm$ (-2) องศาเซลเซียส ทำให้ละลาย (thawing) ที่อุณหภูมิห้อง บีบผสมกับน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 เติมกรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid) 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เพื่อป้องกันการเกิด oxidation ของผลหม่อน โดยช่วยรักษาปริมาณไวตามินซี และป้องกันการเกิดสีน้ำตาล (Rankine, 1989) และเติมโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชั่น ช่วยรักษาปริมาณไวตามินซี ป้องกันการเกิดสีน้ำตาลและทำลายจุลินทรีย์ที่ในผลหม่อน บีบผสมน้ำหมักด้วยมือให้เข้ากันปรับน้ำหมักให้มีปริมาณน้ำตาลให้เหมาะสมต่อการเจริญและการทำงานของยีสต์ เนื่องจากการเตรียมน้ำหมักเติมน้ำลงไป 3 เท่า ทำให้ปริมาณน้ำตาลในน้ำหม่อนลดลง ในการทดลองนี้ปรับปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักเริ่มต้นต่ำคือ 180 กรัม/กิโลกรัมด้วยน้ำตาลทราย เพื่อให้เชื้อยีสต์ใช้น้ำตาลที่มีในน้ำหม่อนให้หมด ทำให้ได้ไวน์หม่อนชนิดไม่หวาน หรือมีปริมาณน้ำตาลต่ำสุด

ปริมาณกรดมีความสำคัญต่อรสชาติของไวน์ที่ได้ ในการศึกษานี้จึงปรับปริมาณกรดในน้ำหมักแทนปรับค่า pH เพื่อศึกษาอิทธิพลของปริมาณกรดเริ่มต้นที่มีต่อปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ และคุณภาพของไวน์หม่อน จึงปรับปริมาณกรดในน้ำหมัก 2 ระดับ คือร้อยละ 0.4 และ 0.6 ด้วยกรดซิตริก เนื่องจากเป็นกรดหลักที่มีอยู่ในผลหม่อน เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 110 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหมัก เพื่อเพิ่มสารอาหารให้ยีสต์ เนื่องจากมีการเจือจางน้ำทำให้ปริมาณสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนของยีสต์ลดลง ในการศึกษาเติมโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหมัก แล้วตั้งน้ำหมักทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง จึงวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และสมบัติทางกายภาพบางประการของน้ำหมักไวน์หม่อน

ผลการทดลองดังตารางที่ 4.4 พบว่าน้ำหมักที่มีปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 มีปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์อยู่ 2.40 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งสูงกว่าน้ำหมักที่ปรับปริมาณกรดร้อยละ 0.6 ซึ่งมีอยู่ 0.41 มิลลิกรัม/ลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เนื่องจากในน้ำหมักมีเอนไซม์ PE อยู่ ซึ่งจากการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PE ของน้ำหมักที่มีปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 และ 0.6 มีค่า 2.88 และ 2.83 PMU/ml ตามลำดับ เอนไซม์ PE นี้จะย่อยสลายหมู่เมทิลเอสเทอร์ของเพคตินได้เมทิลแอลกอฮอล์ ดังสมการ

Kertesz (1951) รายงานว่า PE จากพืชมี activity ดีที่ pH ประมาณ 4.0-7.0 จากการวิเคราะห์พบว่าน้ำหมักที่ปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 มีค่า pH 3.83 ซึ่งใกล้เคียงกับ pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ PE จึงทำให้การย่อยสลายเพคตินในน้ำหมักได้เมทิลแอลกอฮอล์มากกว่าน้ำหมักที่มีปริมาณกรดเริ่มต้นที่มีปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 ที่มีค่า pH 3.44 (ตารางที่ 4.4)

ปริมาณแอนโธไซยานิน สารประกอบฟีนอลิค (ในรูปกรดแกลลิค) กรดระเหย (ในรูปกรดอะซีติก) อะเซทัลดีไฮด์ เอสเทอร์ (ในรูปเอทิลอะซีเตท) แอลกอฮอล์ น้ำตาลรีดิวซ์ (ในรูปกลูโคส) ความใส (% Transmittance) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PG ของน้ำหมักที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 และ 0.6 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ดังตารางที่ 4.4 โดยปริมาณแอนโธไซยานินในน้ำหมักมี 183.59 และ 183.67 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และมีสารประกอบฟีนอลิค 814.48 และ 814.98 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ องค์ประกอบทั้งสองชนิดนี้จะพบที่เปลือกหรือผิวผลไม้เป็นส่วนใหญ่ มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมักไวน์หรือบ่มไวน์ (Amerine et al., 1979) ดังนั้นปริมาณในน้ำหมักจึงไม่ต่างกัน อะเซทัลดีไฮด์มีอยู่ 12.37 และ 12.39 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และเอสเทอร์มีอยู่ 0.94 และ 0.97 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) อะเซทัลดีไฮด์เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ส่วนเอสเทอร์เป็นสารประกอบที่เกิดจากเอนไซม์ภายในเซลล์ของยีสต์หรือแบคทีเรีย หรือเกิดจากปฏิกิริยา esterification ของกรดอินทรีย์ที่มีในไวน์ เช่น กรดมาลิก กรดซัคซินิก กรดซิตริกโดยแอลกอฮอล์ จะพบการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักและการบ่มไวน์ (Amerine et al., 1972) ดังนั้นในน้ำหมักจึงมีปริมาณค่อนข้างต่ำและไม่แตกต่างกัน ในน้ำหมักไม่พบแอลกอฮอล์เนื่องจากจะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักจนถึงช่วงบ่ม โดยยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ (Amerine et al., 1979) กรดระเหยในน้ำหมักมีปริมาณต่ำมากคือร้อยละ 0.004 และ 0.004 ตามลำดับ ในรูปกรดอะซีติก ที่พบในน้ำหมักเนื่องจากในน้ำหมักที่เตรียมก่อนการทำลายจุลินทรีย์อาจมีแบคทีเรียปนเปื้อน ซึ่งทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) และใช้สารประกอบบางอย่างที่มีในน้ำหมัก เช่น กรดซิตริก น้ำตาล และสารประกอบทาร์เทรท (tartrate compound) เป็นต้น

น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 และ 0.6 มีร้อยละ 18.66 และ 18.67 ตามลำดับ ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีอยู่ในผลหม่อนบางส่วนและจากน้ำตาลซูโครสที่เติมลงไปในน้ำหมัก น้ำตาลรีดิวซ์เป็นน้ำตาลที่เชื้อยีสต์นำไปใช้ในการเจริญและการหมักโดยตรง จากการวิเคราะห์ค่าที่ได้ค่อนข้างสูง อาจเป็นผลจากความร้อนสามารถทำให้น้ำตาลซูโครสแตกตัวเป็นกลูโคส และฟรุกโตส (Zoecklein et al., 1995)

ด้านความใสผลการวิเคราะห์ในน้ำหมักที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 และ 0.6 มีค่า Transmittance ร้อยละ 44.50 และ 44.50 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4 ค่าความใสของน้ำหมักมีค่าต่ำเนื่องจากในน้ำหมักมีสารประกอบหรือตะกอนที่ทำให้ขุ่นเช่น โปรตีน สารประกอบเพคติค สารประกอบฟีนอลิค ไวตามิน รงควัตถุ และแทนนิน เป็นต้น (ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, 2532)

จากการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 4.4 พบว่าน้ำหมักที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 มีค่าสี (0.503) ต่ำกว่าที่ปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 (0.532) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เพราะสารสีในผลหม่อนเป็นแอนโธไซยานิน ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะความเป็นกรดด่าง (pH) ในสภาวะที่เป็นกลางจะมีสีม่วง สภาวะที่เป็นกรดจะมีสีแดง และสภาวะที่เป็นด่างจะมีสีน้ำเงิน (Harborne, 1967; Ikan, 1976) ดังนั้นน้ำหมักที่มีปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 ค่า Hue ที่วัดได้จึงมีค่าต่ำ ค่า Hue เป็นการวัดค่าสีระบบหนึ่ง ได้จากอัตราส่วนของค่า absorbance ที่ 420 และ 520 นาโนเมตร (Hue = A_{420}/A_{520}) โดยใช้ spectrophotometer ถ้าค่าสีที่วัดได้มีค่าต่ำจะมีสีอยู่ในกลุ่มแดงม่วง (RP) เมื่อค่าเริ่มสูงขึ้นสีจะเปลี่ยนไปอยู่ในกลุ่มสีแดงเหลือง (RY) หรือแดงน้ำตาล (Zoecklein et al., 1995)

การปรับปริมาณน้ำตาลหรือของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (°Brix) ในน้ำหมักไวน์หม่อนจะปรับปริมาณน้ำตาลก่อนปรับปริมาณกรดเริ่มต้น ดังนั้นน้ำหมักที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 จึงมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (17.80 °Brix) สูงกว่าน้ำหมักที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 (16.98 °Brix) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังตารางที่ 4.4 เนื่องจากการวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเป็นการวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ในน้ำหมัก ซึ่งรวมถึงน้ำตาลและกรดด้วย จึงเป็นผลให้น้ำหมักที่ปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงกว่า

น้ำหมักที่ปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 จากการวิเคราะห์พบว่ามีปริมาณกรด (ในรูปกรดซิตริก) อยู่ร้อยละ 0.60 ซึ่งสูงกว่าน้ำหมักที่ปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 ที่มีอยู่ร้อยละ 0.41 ดังตารางที่ 4.4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และมีผลให้ค่า pH ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย และในน้ำหมักมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ polygalcturonase 0.59 และ 0.63 PGu/ml ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\geq0.05$)

ในการศึกษานี้เพคตินเนสเอนไซม์ที่เติมลงในกระบวนการทำไวน์ เป็นเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus niger* เป็น commercial grade ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย PE, PG และ pectinlyase (PL) อยู่ในสัดส่วนที่ต่างกัน PE จะทำหน้าที่ย่อยสลายเพคตินตรงตำแหน่งหมู่เมทิลเอสเทอร์ได้กรดเพคตินิค กรดเพคติค และได้เมทิลแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นสารพิษ ปริมาณของสารนี้จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ (Amerine et al., 1972; Zoecklein et al., 1995) ปาริชาติ วัฒนา (2519) รายงานว่าการเติมเพคติเนสเอนไซม์จากเชื้อรา *A. niger* ในไวน์องุ่นภายหลังการหมักมีแนวโน้มทำให้เกิดเมทิลแอลกอฮอล์มากกว่าการเติมเอนไซม์ในน้ำหมักแต่ทำให้ปริมาณแอลกอฮอล์ลดลง ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาขั้นตอนการเติมเพคติเนสเอนไซม์ 2 ขั้นตอน คือ เติมเพคติเนสเอนไซม์ในน้ำหมัก และเติมหลังการหมักหรือในไวน์หม่อนใหม่ และแปรปริมาณของเพคติเนสเอนไซม์ 3 ระดับ คือ 110, 130 และ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (ส่วนในล้านส่วน)

3. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์และคุณภาพบางประการของไวน์หม่อน

3.1 <u>การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพระหว่างการหมักไวน์</u>

โดยทั่วไปการติดตามการหมักหรือการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักจะพิจารณาจาก การลดลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด การเพิ่มขึ้นของปริมาณแอลกอฮอล์ รวมทั้งปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดซิตริก) และค่า pH ซึ่งการวัดปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักเลือกใช้ vinometer ซึ่งเป็นเครื่องมือในการวัดแอลกอฮอล์ โดยอาศัยหลักการของแรงตึงผิว อังคณา เชวงภูษิต (2539) พบว่าจากการสุ่มเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการวัดปริมาณแอลกอฮอล์ของ vinometer กับ gas chromatography (GC) พบว่า vinometer สามารถอ่านค่าได้ใกล้เคียงกับ GC ดังนั้นจึงเป็นเครื่องมือที่สามารถใช้ในการวัดปริมาณแอลกอฮอล์ได้แม่นยำและสะดวกรวดเร็ว (Vine,1991)

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.1-4.4 จะเห็นว่าค่า TSS ของทุกทรีตเมนต์ในระหว่างการหมักมีค่าลดลง เนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลเพื่อเปลี่ยนให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะในช่วงสัปดาห์แรกของการหมักมีการลดลงของค่า TSS มาก โดยเหลือระหว่าง 9-11 ^{0}Brix ส่วนปริมาณแอลกอฮอล์จะเพิ่มขึ้นอยู่ในระหว่างร้อยละ 7.0-8.5 เนื่องจากในน้ำหมักมีสารอาหารต่าง ๆ อย่างเพียงพอ มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม หลังจากนั้นเมื่อเกิดการหมักสภาพแวดล้อมจะเริ่มเป็นกรดมากขึ้น สารอาหารต่างๆลดลง และปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจากการหมักของเชื้อยีสต์จะทำให้ยีสต์มีความแข็งแรงลดลง ทำให้การลดลงของค่า TSS และการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอลกอฮอล์ช้าลง และคงที่ในที่สุด (Reed and Nagodawithana, 1991; Amerine et al.,1972) เมื่อสิ้นสุดการหมักค่า TSS ในไวน์หม่อนมีค่าค่อนข้างสูงโดยมีค่าระหว่าง 5.2-6.0 ^{0}Brix (รูปที่ 4.1 และตารางภาคผนวก ก.1) ในการวัดน้ำผลไม้ค่าที่ได้จะเป็นค่าของน้ำตาลที่มีในผลไม้นั้นๆ แต่ในการวัดปริมาณน้ำตาลที่มีในไวน์ ปริมาณของแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักโดยเชื้อยีสต์จะมีผลต่อการหักเหของแสง ดังนั้นในการวัดด้วย hand refractometer ทำให้ค่าที่ได้ไม่ใช่ปริมาณน้ำตาลที่เหลือจริงหลังจากการหมักโดยเชื้อยีสต์เพื่อสร้างแอลกอฮอล์ (Amerine and Ough,1974 ; Zoecklein et al ., 1995)

เมื่อสิ้นสุดการหมักปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักในทรีตเมนต์ต่าง ๆ อยู่ในช่วงร้อยละ 10.45-10.85 โดยปริมาตร (รูปที่ 4.2 และตารางภาคผนวก ก.2) จากทฤษฎีในกระบวนการหมัก ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยผ่าน Embden-Meyerhof –Parnas pathway ซึ่งมีปฏิกิริยาดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{เอนไซม์จากยีสต์}} 2C_2H_5OH + 2CO_2 + \text{energy}$$

ตามทฤษฎีน้ำตาล 1 โมเลกุลจะได้แอลกอฮอล์ 2 โมเลกุล และคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุลคิดเป็นร้อยละ 51.10 และ 48.90 โดยน้ำหนัก คิดเป็นปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับร้อยละ 12.38 โดยปริมาตร Amerine และ Singleton (1972) และ Rankine (1989) กล่าวว่าในทางปฏิบัติจะได้แอลกอฮอล์โดยปริมาตรน้อยกว่าคือประมาณร้อยละ 48 และมีสารอื่นปนมาด้วย ในงานวิจัยนี้หลังการหมักไวน์หม่อนมี

ปริมาณแอลกอฮอล์ในช่วงร้อยละ 10.45-10.85 คิดเป็นร้อยละ 47.50-48.18 โดยน้ำหนัก จากน้ำตาลเริ่มต้น 180 กรัม/กิโลกรัม ค่าที่ได้น้อยกว่าทฤษฎี อาจเนื่องจากการระเหยของแอลกอฮอล์ การเปลี่ยนรูปของแอลกอฮอล์ไปอยู่ในรูปสารระเหย และเชื้อยีสต์ใช้น้ำตาลในการเจริญด้วยนอกเหนือจากการเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ (Kunkee and Amerine, 1970) และ Henick-Kling (1996) รายงานว่ายีสต์ใช้น้ำตาลประมาณร้อยละ 95 เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ ประมาณร้อยละ 1 ถูกนำกลับไปใช้ในเซลล์ของยีสต์ อีกประมาณร้อยละ 4 จะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ (other metabolites) และอาจจะมีแอลกอฮอล์บางส่วนระเหยไป

ในระหว่างการหมักไวน์หม่อน ปริมาณกรด (ในรูปกรดซิตริก) ของน้ำหมักในทุกทรีตเมนต์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระหว่างร้อยละ 0.64-0.90 (รูปที่ 4.3 และตารางภาคผนวก ก.3) ในช่วงสัปดาห์แรกของการหมัก จากนั้นจะค่อยๆลดลงเล็กน้อยจนเกือบคงที่ จนสิ้นสุดการหมักมีปริมาณกรดอยู่ระหว่างร้อยละ 0.62-0.87 ส่วนค่า pH ของน้ำหมักในทุกทรีตเมนต์จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงสัปดาห์แรกของการหมัก โดยมีค่า pH ระหว่าง 3.02-3.29 (รูปที่ 4.4 และตารางภาคผนวก ก.4) จากนั้น pH จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อย จนสิ้นสุดการหมักมีค่า pH ระหว่าง 3.22-3.51 ในช่วงแรกของการหมักเชื้อยีสต์ใช้น้ำตาลในการสร้างแอลกอฮอล์ และเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นด้วย ซึ่งส่วนหนึ่งจะละลายในน้ำให้กรดคาร์บอนิก (Kunkee and Amerine,1970; Fleet, 1992) และเชื้อยีสต์ยังสร้างและปลดปล่อยกรดอินทรีย์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายใน Kreb's cycle สู่น้ำหมัก เช่น กรดซัคซินิค กรดมาลิก กรดซิตริก และ α - ketoglutaric acid เป็นต้น (Amerine and Singleton, 1972; Rankine,1989) จึงทำให้ปริมาณกรดในน้ำหมักเพิ่มขึ้น และค่า pH ของน้ำหมักลดลง ปริมาณกรดในช่วงหลังของการหมักไปจนสิ้นสุดการหมักในทุกทรีตเมนต์แนวโน้มลดลงเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างการหมักในสภาวะที่ไม่มีอากาศและสารอาหารไนโตรเจนลดลง กรดอินทรีย์อาจจะเปลี่ยนเป็นเอสเทอร์ (Berry and Watson, 1987)

ในช่วงเริ่มต้นการหมักถึงสัปดาห์ที่ 2 ค่า pH ของทุกทรีตเมนต์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากงานวิจัยนี้ทำการหมักน้ำหมักที่มีผลหม่อนด้วย ซึ่ง Cabaroglu et al. (1997) รายงานว่าการหมักไวน์จากผลไม้ทั้งผลหรือทั้งเปลือก จะทำให้องค์ประกอบต่างๆที่ผิวถูกสกัดออกมามาก เช่น ash alkalinity โปแตสเซียม โซเดียม แคลเซียม เป็นต้น และ Van Balen (1984) กล่าวว่าโปแตสเซียมที่ถูกสกัดออกมาจากผิวผลไม้จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยระหว่างช่วงแรกของการหมัก ทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมัก หรืออาจเกิดจากกรดอินทรีย์เปลี่ยนไปเป็นเอสเทอร์ ทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้น (Berry and Watson, 1987) แต่ค่า pH ก็ยังต่ำกว่าน้ำหมักเล็กน้อย เมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่าไวน์หม่อนในทุกทรีตเมนต์มีค่าใกล้เคียงกัน (pH ระหว่าง 3.22-3.51) เนื่องจากเกิด buffer capacity ขึ้นในระหว่างการหมัก (Amerine et al., 1979)

3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ของไวน์หม่อน

3.2.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ระหว่างการหมัก และการบ่มของไวน์หม่อน

ในระหว่างการหมัก ไวน์หม่อนหลังหมัก และระหว่างการบ่มในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียสนาน 12 สัปดาห์ พบว่าปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ของไวน์หม่อนมีการเปลี่ยนแปลงดังรูปที่ 4.5 (ตารางภาคผนวก ก.5) โดยน้ำหมักก่อนหมัก(สัปดาห์ที่ 0) ที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 และ 0.6 มีปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ 2.40 และ 0.41 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ในทุกทรีตเมนต์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นระหว่างการหมัก (สัปดาห์ที่ 0-3) แต่ในทรีตเมนต์ชุดที่เติมเอนไซม์ในน้ำหมักส่วนใหญ่ปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ (150-240 มิลลิกรัม/ลิตร) มีแนวโน้มเพิ่มสูงกว่าไวน์หม่อนในทรีตเมนต์ชุดที่เติมเอนไซม์หลังการหมัก (74.15-83.63 มิลลิกรัม/ลิตร) เนื่องจากการเติมเอนไซม์ในน้ำหมัก เอนไซม์ PE ที่มีอยู่ในน้ำหมักและจากเพคติเนสเอนไซม์ที่เติมจะย่อยสลายเพคตินในน้ำหมักได้เมทิลแอลกอฮอล์มากขึ้น และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามปริมาณเอนไซม์ที่เติม (รูปที่ 4.5 และตารางภาคผนวก ก.5) ในขณะที่ไวน์หม่อนในทรีตเมนต์ที่เติมเอนไซม์หลังหมักมีเพียงเอนไซม์ PE ในน้ำหมักเท่านั้นที่ย่อยสลายเพคตินที่มีในน้ำหมัก จึงทำให้มีปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ต่ำกว่า

ระหว่างการบ่มในสัปดาห์ที่ 3-12 (รูปที่ 4.5 และตารางภาคผนวก ค.5) ไวน์หม่อนในทุกทรีตเมนต์ปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยไวน์หม่อนชุดที่เติมเอนไซม์ในน้ำหมักมีแนวโน้มการเพิ่มของปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์สูงกว่าไวน์หม่อนชุดที่เติมเอนไซม์หลังหมัก และเพิ่มขึ้นตามปริมาณเอนไซม์ที่เติม เนื่องจากการเติมเพคติเนสเอนไซม์ก่อนหมักหรือในน้ำหมัก เอนไซม์จะช่วยสกัดสารประกอบเพคติคต่างๆ จากผิวของผลหม่อนมากกว่าการเติมหลังหมัก ซึ่งสมบัติของเพคติเนสเอนไซม์ที่ใช้ระบุว่าประกอบด้วย pectolytic และ hemicellulytic activities อยู่สูง ดังนั้นเอนไซม์ที่เติมจึงช่วยสลายเพคติน ใน middle lamella และในส่วนของผนังเซลล์ออกมา (Pilnik and Rombouts, 1979; Baumann, 1981) นอกจากนี้ Brown และ Ough (1982) พบว่าโมเลกุลของโปรโตเพคติน (protopectin) ซึ่งเป็นสารประกอบเพคติคที่ไม่ละลายน้ำสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ PE และ PG ได้เป็น low methoxy pectin และ high methoxy pectin จึงทำให้มีสารตั้งต้นในการเกิดเมทิลแอลกอฮอล์มากกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่ง high methoxy pectin Montedoro และ Angelini (1973) รายงานว่าในระหว่างการบ่มปริมาณหรือความเข้มข้นของเมทิลแอลกอฮอล์ในไวน์แดง อาจเพิ่มขึ้นเกิดจากการย่อยสลายแบบไม่มีเอนไซม์หรือ non-enzyme (autocatalytic) hydrolysis ของ residual water-soluble pectins และโพลีฟีนอลที่มีในไวน์

ระหว่างการบ่มในสัปดาห์ที่ 12-15 (รูปที่ 4.5 และตารางภาคผนวก ค. 5) ไวน์หม่อนในบางทรีตเมนต์ปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์มีแนวโน้มลดลง อาจเนื่องจากเปลี่ยนรูปไปอยู่ในรูปสารระเหย

3.2.2 <u>อิทธิพลของปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนสเอนไซม์ ปริมาณเอนไซม์ที่เติม และการบ่มต่อปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ของไวน์หม่อน</u>

ปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนสเอนไซม์ ปริมาณเอนไซม์ และการบ่มมีผลต่อปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ของไวน์หม่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4.6 (ตารางภาคผนวก ค.6) โดยไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 มีปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ (265.38 มิลลิกรัม/ลิตร) สูงกว่าไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 (257.94 มิลลิกรัม/ลิตร) เนื่องจากเมทิลแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นในไวน์หม่อนมาจากการย่อยสลายเพคตินของเอนไซม์ PE ซึ่งเพคติเนสเอนไซม์ที่เติมลงไปเป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *A. niger* Kertesz (1951) รายงานว่าเอนไซม์จากเชื้อราทำงานได้ดีที่ pH ประมาณ 4.0-5.5 จะมี activities สูง และมีความเสถียร ดังนั้นน้ำหมักไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 มีค่า pH 3.83 และในระหว่างการหมักและบ่มค่า pH มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น pH 3.90-4.05 จึงอาจเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์จาก PE ที่มีในน้ำหมักร่วมกับเอนไซม์ PE ที่มีในเพคติเนสเอนไซม์ จึงทำให้ปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์สูงกว่า

อิทธิพลของขั้นตอนการเติมเพคติเนสเอนไซม์พบว่า การเติมเอนไซม์ในน้ำหมักทำให้ปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ในไวน์หม่อน (280.21 มิลลิกรัม/ลิตร) สูงกว่าการเติมเอนไซม์หลังการหมัก (243.11 มิลลิกรัม/ลิตร) ดังรูปที่ 4.6 (ตารางภาคผนวก ค.6) เนื่องจากเพคติเนสเอนไซม์ที่เติมลงไปในน้ำหมักจะย่อยสลายเพคตินจากผนังเซลล์หรือผิวของผลไม้ในน้ำหมักออกมาได้มาก (Baumann, 1981) และเอนไซม์ PE และ PG จะย่อยสลายโปรโตเพคตินในผลไม้ได้ low methoxy pectin และ high methoxy pectin (Brown and Ough, 1982) ทำให้น้ำหมักมีเพคตินอยู่มากกว่า ดังนั้นเอนไซม์ PE จึงย่อยสลายเพคตินได้เมทิลแอลกอฮอล์มากกว่าไวน์หม่อนชุดที่เติมเอนไซม์หลังการหมักซึ่งแยกกากของผลหม่อนออกไปในช่วงแยกส่วนใสและเปลี่ยนถังก่อนนำไปบ่ม Endo (1961) รายงานว่าถ้าเติมเพคติเนสเอนไซม์ลงในไวน์หลังการหมักสมบูรณ์แล้ว กิจกรรม (activity) ของเอนไซม์อาจลดลงไป เนื่องจากแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น ดังนั้นจึงต้องเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากขึ้น

ปริมาณเพคติเนสที่เติมมีผลต่อปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์คือ ไวน์หม่อนที่เติมเอนไซม์ปริมาณ 130 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์สูงสุดคือ 290.90 มิลลิกรัม/ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.6 (ตารางภาคผนวก ค.6) เนื่องจากปริมาณเพคติเนสที่เติมปริมาณมาก จึงทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ PE มากขึ้น เป็นผลให้ปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์เพิ่มมากขึ้นด้วย ซึ่งคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Brown และ Ough (1981) ที่พบว่าเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของเพคติเนสมีผลให้ปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ในไวน์แดงเพิ่มสูงขึ้นด้วย เนื่องจากมีผลให้เอนไซม์ PE อยู่ในระดับสูงด้วย แต่จากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เป็น 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม กลับมีผลให้ปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ต่ำสุด คือ 237.36 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของปาริชาติ วัฒนา (2519) ที่เติมเอนไซม์เพคติเนสสดที่ผลิตจาก *A. niger* ที่แยกได้จากกลีบกระเจี๊ยบแดงที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ ในกระบวนการหมักไวน์ขาว พบว่า เมื่อเติมเอนไซม์ 0.6 กรัม/กิโลกรัมองุ่นหลังการหมักไวน์ ไวน์ที่ได้มี

ปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์สูงสุด แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เป็น 0.8-1.0 กรัม/กิโลกรัมองุ่น มีผลให้ปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ลดลง สันนิษฐานว่าเป็นผลจากการตกตะกอนของเพคติเนสเมื่อปริมาณหรือความเข้มข้นของเอนไซม์มากเกินไป เนื่องจากเพคติเนสเอนไซม์เป็นโปรตีน จึงอาจรวมตัวกันตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำ และ pH ต่ำ (Tuttobello and Mill, 1961)

การบ่มที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส นาน 12 สัปดาห์ มีผลให้ไวน์หม่อนมีปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 261.66 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าไวน์หม่อนที่ไม่ผ่านการบ่มที่มี 129.59 มิลลิกรัม/ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4.6 (ตารางภาคผนวก ค.6) ในระหว่างการบ่มปริมาณ หรือความเข้มข้นของเมทิลแอลกอฮอล์อาจเพิ่มขึ้นจากการย่อยสลายของ PE และเกิดจากการย่อยสลายแบบไม่มีเอนไซม์ หรือ non-enzyme hydrolysis ของ residual water-soluble pectins และโพลีฟีนอล (Montedoro and Angelini, 1973)

3.2.3 <u>อิทธิพลร่วมของปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนสเอนไซม์ และปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ของไวน์หม่อน</u>

เนื่องจากปัจจัยหลักคือ ปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนส และปริมาณเอนไซม์ที่เติมมีผลต่อปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ของไวน์หม่อน จึงเป็นผลให้อิทธิพลร่วมระหว่างปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนส และปริมาณเอนไซม์ ทุกทรีตเมนต์เป็นไปในแนวทางที่คล้ายคลึงกับอิทธิพลของปัจจัยหลัก โดยไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 ร่วมกับการเติมเอนไซม์ในน้ำหมัก 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์สูงสุดคือ 347.47 มิลลิกรัม/ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.7 (ตารางภาคผนวก ค.7) จะเห็นได้ว่าเป็นอิทธิพลจากความเป็นกรด หรือค่า pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ PE (เอนไซม์จากเชื้อรามี activity ดีที่ pH 4.0-5.5) ที่เติมลงไปในน้ำหมักในระดับสูงร่วมกับเอนไซม์ PE ที่มีในน้ำหมักย่อยสลายเพคตินที่ถูกสกัดออกมาจากผลไม้ในน้ำหมักให้ได้ปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์สูง ในขณะที่การปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 ร่วมกับการเติมเอนไซม์หลังหมัก 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมมีผลให้ไวน์หม่อนมีปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ต่ำสุดคือ 122.02 มิลลิกรัม/ลิตร ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาวะความเป็นกรดอาจไม่เหมาะสมกับการย่อยสลายเพคตินของเอนไซม์ และเพคตินหรือสารตั้งต้นในการเกิดเมทิลแอลกอฮอล์มีต่ำ ประกอบกับ activity ของเอนไซม์ลดลงเมื่อปริมาณแอลกอฮอล์สูงขึ้น และอาจเกิดการตกตะกอนของเพคติเนสเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่ำ และ pH ต่ำ (Tuttobello and Mill, 1961) ในระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส

จากการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ในไวน์หม่อนพบว่ามีค่าระหว่าง 122.02-347.47 มิลลิกรัม/ลิตร คิดเป็นปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์เฉลี่ย 232.80 มิลลิกรัม/ลิตร ดังตารางภาคผนวก ก.3 ซึ่งมีปริมาณต่ำกว่าที่กฎหมายของประเทศสหรัฐอเมริกากำหนดไว้คือไม่เกิน 350 มิลลิกรัม/ลิตร และเป็นเมทิลที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติจากกระบวนการทำไวน์หม่อน บุญสรรพ์ บุญธินันท์ (2530) ได้วิเคราะห์ปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ในไวน์แดงที่นำเข้าจากต่างประเทศพบว่าไวน์แดงจากประเทศอิตาลี อเมริกา

ฝรั่งเศส สเปน ออสเตรเลีย โปรตุเกส นิวซีแลนด์ และเดนมาร์ค มีปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์เฉลี่ยเป็น 164, 212, 252, 301, 384, 142, 170 และ 136 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังตารางภาคผนวกก.3 จะเห็นว่าปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์เฉลี่ยในไวน์หม่อนมีปริมาณต่ำกว่าไวน์แดงจากประเทศฝรั่งเศส สเปน และออสเตรเลีย แต่มีปริมาณสูงกว่าไวน์แดงจากประเทศอเมริกา โปรตุเกส นิวซีแลนด์ และเดนมาร์ค หากจะพิจารณาถึงอันตรายซึ่งอาจเกิดขึ้นจากการดื่มไวน์หม่อน อาจกล่าวได้ว่าผู้บริโภคยังมีความปลอดภัยจากอันตรายอันเนื่องจากพิษของเมทิลแอลกอฮอล์ เพราะเมทิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร จึงจะทำให้ผู้บริโภคตาบอดได้ (Reynolds and Prasad, 1982) ฉะนั้นต้องดื่มไวน์หม่อนขนาดบรรจุ 750 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์เฉลี่ย 232.80 มิลลิกรัม/ลิตร ประมาณ 30 ขวด ในช่วงระยะเวลาเดียวกัน จึงจะได้รับปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์ปริมาณดังกล่าว และต้องดื่มไวน์หม่อนมากกว่านี้ 10-20 เท่า จึงจะทำให้เสียชีวิตได้

3.3 <u>ปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบต่างๆ และสมบัติทางกายภาพของไวน์หม่อนระหว่างการหมักและการบ่ม</u>

ในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์จะมีผลิตภัณฑ์ และ by- product ต่างๆถูกผลิตออกมามาก ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญในด้านกลิ่นรส และความเข้มข้น (body) ของไวน์ ในงานวิจัยนี้จึงวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมี กายภาพและสมบัติบางประการที่มีความสำคัญในไวน์หม่อน เมื่อสิ้นสุดการหมัก นำไวน์หม่อนใหม่แยกเอากากหม่อนออกจากไวน์ส่วนที่ใส เพื่อช่วยป้องกันการเกิดกลิ่น และรสชาติที่ไม่ดีของไวน์ที่เกิดจากเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้วที่ตกตะกอนรวมกับกาก นอกจากนี้เป็นการกำจัดยีสต์ออกจากไวน์ให้มากที่สุดเพื่อป้องกันไม่ให้ไวน์มีปัญหาเนื่องจากยีสต์ที่หลงเหลือ เมื่อเก็บไวน์หม่อนไว้ที่อุณหภูมิสูงอาจจะทำให้เกิดการหมักอีกครั้งได้ (re-fermentation) หรืออาจเกิดการย่อยสลายตัวเองของเซลล์ยีสต์อาจทำให้เกิดกลิ่นรสแปลกปลอม และอาจเป็นอาหารอย่างดีของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆเจริญปนเปื้อนได้ ทำให้ไวน์เสียรสชาติ (Amerine et al., 1979; ธีรวัลย์ ชาญฤทธิเสน, 2542) แล้วบ่มในถังพลาสติกใส (PET) ที่ปิดสนิทที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไวน์มีการเปลี่ยนแปลงด้านเคมีให้อยู่ในสมดุล เพื่อพัฒนากลิ่นรสของไวน์ เพื่อให้สารแขวนลอยบางชนิด และสารประกอบที่ทำให้เกิดความขุ่นตกตะกอน และลดความฝาดเฝื่อนของไวน์ (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2535; Amerine et al., 1979)

3.3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิค แอนโธไซยานิน และค่าสี (Hue) ของไวน์หม่อน

ในระหว่างการหมักและบ่มไวน์หม่อนปริมาณสารประกอบฟีนอลิค และแอนโธไซยานินในทุกทรีตเมนต์มีแนวโน้มลดลงในระหว่างการหมัก ดังรูปที่ 4.8-4.9 (ตารางภาคผนวก ก.8-ก.9) เนื่องจากการตกตะกอนของสารประกอบฟีนอลิค เช่น แทนนินบางตัวโดยโปรตีน การเกิด condensation ของสารประกอบฟีนอลิคและแอนโธไซยานิน การดูดซับสารประกอบฟีนอลิคโดยเซลล์ยีสต์แล้วตกตะกอน (Nagel and Wulf, 1979) นอกจากนี้อาจสูญเสียเนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมการทำงานของยีสต์ในการใช้น้ำตาลในระหว่างการหมัก (Amerine et al., 1979) แต่ในทรีตเมนต์ชุดที่เติมเพคติเนสเอนไซม์ในน้ำหมัก ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค และแอนโธไซยานินที่มีในไวน์หม่อนมีแนวโน้มมากกว่าทรีตเมนต์ชุดที่เติมเอนไซม์หลังการหมัก เนื่องจากเพคติเนสเอนไซม์ที่เติมลงไปจะช่วยย่อยหรือทำลายผนังเซลล์ ทำให้สกัดสารประกอบฟีนอลิคต่างๆ ลงสู่น้ำหมักได้มาก (Lao et al, 1996) จึงมีเหลือในไวน์หม่อนอยู่สูง

ในระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิ 5 ± 2 องศาเซลเซียส ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค และแอนโธไซยานินในไวน์หม่อนมีแนวโน้มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Scudamore-Smith et al. (1990) ที่พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิคและแอนโธไซยานินจะลดลงในระหว่างการบ่ม เนื่องจากการเกิดออกซิเดชั่น polymerization หรือการตกตะกอนของแทนนินบางตัวโดยโปรตีน การดูดซับสารฟีนอลิคโดยเซลล์ยีสต์แล้วตกตะกอน ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคลดลงอย่างช้าๆในระหว่างการบ่ม (สัปดาห์ที่ 3-15) ดังรูปที่ 4.8 (ตารางภาคผนวก ค.8) ส่วนการลดลงของแอนโธไซยานินในระหว่างการบ่มอาจเป็นผลจากการเปลี่ยนรูปของแอนโธไซยานินไปเป็นรูปแบบที่คงตัว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rommel, Healtherbell และ Wrolstad (1990) ที่รายงานว่า cyanidin 3-glucoside ซึ่งพบมากในผลหม่อนเป็นรงควัตถุที่ไม่คงตัวมากที่สุด ดังนั้นจึงมีการเปลี่ยนรูปไปเป็นรูปแบบที่คงตัวกว่า ในช่วงการบ่มออกซิเจนจะกระตุ้นการเปลี่ยนรูปทางเคมีของรงควัตถุ อะเซทัลดีไฮด์ที่เกิดจากการ couple oxidation ของสารประกอบฟีนอลิคได้เป็นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (ซึ่งจะออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ไปเป็นอะเซทัลดีไฮด์) จะกระตุ้นการเกิด copolymerization ของแอนโธไซยานินกับสารประกอบฟีนอลิคหรือแทนนินบางชนิดไปอยู่ในรูป condensed form ทำให้แอนโธไซยานินมีมากขึ้นกว่าในรูปอิสระ และเมื่อเกิดการ condensation ถึงระดับหนึ่งจะเกิดการตกตะกอนของพวกที่มีโมเลกุลใหญ่ (Pascal, Paul and Yves, 1983) ทำให้แอนโธไซยานินลดลงในทุกทรีตเมนต์ดังรูปที่ 4.9(ตารางภาคผนวก ก.9) และเป็นการอธิบายได้ว่าในระหว่างการบ่มค่าสีแดงของไวน์หม่อนจะเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณแอนโธไซยานินลดลง ดังรูปที่ 4.10 (ตารางภาคผนวก ค.10) จะเห็นว่าค่าสี (Hue) ของทุกทรีตเมนต์ลดลงเรื่อยๆในระหว่างการบ่ม

ในระหว่างการหมัก (สัปดาห์ที่ 0-3) ไวน์หม่อนมีค่า Hue เพิ่มขึ้น อาจเป็นผลจากแอนโธไซยานินถูกสกัดออกมาอยู่ในรูปอิสระ ซึ่งไม่ทนต่อการฟอกสีจากไบซัลไฟท์ที่แตกตัวจากซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เติมลงไปทำให้เกิดสีน้ำตาลขึ้น (Zoecklein et al., 1995) ประกอบกับในระหว่างการหมักมี

ความร้อนเกิดขึ้นเนื่องจากกิจกรรมการทำงานของยีสต์ในการใช้น้ำตาล จึงเกิดสีน้ำตาลมากขึ้น ทำให้ค่า Hue มีค่าสูง จึงวัดค่า absorbance ที่ 420 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงของสีน้ำตาลได้สูง แสดงว่าไวน์มีสีในกลุ่มสีแดงน้ำตาล (Amerine et al., 1979; Zoecklein et al., 1995) ในระหว่างการบ่มค่าสีหรือ Hue ในทุกทรีตเมนต์มีแนวโน้มลดลง เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิค เช่น แทนนินทำปฏิกิริยากับแอนโธไซยานินได้เป็น tannin anthocyanate complex ทำให้ไวน์มีสีแดงหรือแดงม่วงจึงเป็นผลให้ค่า Hue ลดลง (Zoecklein et al., 1995) ค่าสีของไวน์ขึ้นกับความเป็นกรดในไวน์ด้วย Jackson et al. (1978) รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงสมดุลของแอนโธไซยานิน (anthocyanin equilibria) ในภาวะความเป็นกรดของไวน์แดงในระหว่างการบ่มจะเกิด polymeric pigment ที่มีสี และทนต่อไบซัลไฟท์ ถ้า pH เพิ่มขึ้นจะได้ polymeric pigment ที่ไม่มีสี แสดงว่าไวน์ที่ pH ต่ำ หรือมีความเป็นกรดสูงจะมีการ polymerization ทำให้สูญเสียแอนโธไซยานินอิสระ จึงมีปริมาณลดลง แต่เกิด polymeric pigment ที่มีสี และทนต่อการฟอกสีของไบซัลไฟท์

การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิค แอนโธไซยานิน และค่า Hue ของไวน์ มีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ดังในการศึกษาพบว่าปริมาณกรดเริ่มต้นของน้ำหมักมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิคและแอนโธไซยานินของไวน์หม่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่มีผลต่อค่าสี (Hue) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\geq0.05$) ดังรูปที่ 4.23-4.25 (ตารางภาคผนวก ค.23) โดยไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิค (628.30 มิลลิกรัม/ลิตร) และแอนโธไซยานิน (134.82 มิลลิกรัม/ลิตร) สูงกว่าไวน์หม่อนที่ปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 ทั้งนี้เนื่องจากในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง แอนโธไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิคสามารถคงตัวได้ดี จึงมีความเสถียรดีกว่า (Amerine et al., 1972) เป็นผลให้ปริมาณแอนโธไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิคเหลืออยู่สูง นอกจากนี้ Sims และ Morris (1985) อธิบายว่าความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นจะทำให้เกิด polymerization ของแอนโธไซยานินเพิ่มขึ้น ทำให้แอนโธไซยานินอยู่ในรูปของ red carbonium ion form หรือ colored anthocyanin ทำให้มีสีแดง และมีความเสถียร (Van Buren, Hrazdina and Robinson, 1974; Zoecklein et al., 1995) จะมีผลทำให้ค่า optical density ในช่วงสีแดงหรือที่ 520 นาโนเมตรเพิ่มขึ้น ทำให้ค่า Hue ต่ำ ไวน์จะมีสีแดงม่วง

ขั้นตอนการเติมเพคติเนสมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิค และแอนโธไซยานินของไวน์หม่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$) แต่ไม่มีผลต่อค่าสี (Hue) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\geq0.05$) ดังรูปที่ 4.23-4.25 (ตารางภาคผนวก ค.23) โดยไวน์หม่อนจากทรีตเมนต์ชุดที่เติมเอนไซม์ในน้ำหมักมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิค (635.05 มิลลิกรัม/ลิตร) และแอนโธไซยานิน (134.70 มิลลิกรัม/ลิตร) สูงกว่าไวน์หม่อนที่เติมเอนไซม์หลังการหมัก เนื่องจากเพคติเนสที่เติมลงไปในน้ำหมักเป็น commercial grade จึงอาจมีเอนไซม์อื่นๆ ประกอบอยู่ด้วย (Kertesz, 1951; Zoecklein et al., 1995) เอนไซม์ที่เติมจึงช่วยย่อยผนังเซลล์ (Bayanove et al., 1992) และสกัดสารประกอบฟีนอลิครวมทั้งแอนโธไซยานินลงสู่น้ำหมักเพิ่มมากขึ้น (Cruess et al., 1955) ซึ่งสอดคล้องกับที่ Godfrey และ West (1996) รายงานว่า

commercial pectinase enzyme จาก *A. niger* ส่วนใหญ่ประกอบด้วยเอนไซม์ PE, PG และ PL และมี second activities ด้วย เช่นกลูโคไซด์ หรือโปรติเอสซึ่งเพคติเนสจะไปย่อยสลาย cell lamella ที่ผิวขององุ่น แล้ว second activities จะช่วยสกัดแอนโธไซยานินและแทนนินจาก vacuoles ของเซลล์ออกมาได้

ปริมาณเพคติเนสที่เติมมีผลต่อสารประกอบฟีนอลิค แอนโธไซยานิน และค่าสี (Hue) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิคและแอนโธไซยานินจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.23-4.25 (ตารางภาคผนวก ค.23) การเติมเอนไซม์ปริมาณ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทำให้ไวน์หม่อนมีสารประกอบฟีนอลิค (639.28 มิลลิกรัม/ลิตร) และแอนโธไซยานิน (137.49 มิลลิกรัม/ลิตร) สูงสุด แต่ปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นมีผลให้ค่าสีหรือ Hue ของไวน์หม่อนสูงสุดด้วย ซึ่ง Huang (1955) อธิบายว่าเอนไซม์เพคติเนสที่ได้จากเชื้อรา โดยเฉพาะ *A. niger* จะมี anthocyanin-decolorizing activity ค่อนข้างสูง ซึ่งอาจเป็น β-glucosidases เอนไซม์นี้จะย่อยสลาย แอนโธไซยานินให้เกิดเป็นแอนโธไซยานิดินส์ และกลูโคส ตามด้วยการเกิด spontaneous transformation ของ aglycone กลายเป็น colorless derivatives หรือ pseudobase forms เช่น 2-carbinol, tautomer, ketone และ chalcone หรือเกิดสีน้ำตาล แต่ pseudobase forms นี้ อาจเปลี่ยนมาอยู่ในสภาพที่มีสีได้ในสภาวะที่เป็นกรด

การบ่มมีผลต่อองค์ประกอบเหล่านี้เช่นกัน โดยไวน์หม่อนหลังการบ่มมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิค (625.59 มิลลิกรัม/ลิตร) แอนโธไซยานิน (134.27 มิลลิกรัม/ลิตร) และค่า Hue (0.63) ต่ำกว่าไวน์หม่อนก่อนบ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.23-4.25 (ตารางภาคผนวก ค.23) เนื่องจากในระหว่างการบ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิค โดยการเกิดออกซิเดชั่น polymerization, precipitation หรือการตกตะกอนของแทนนินบางตัวโดยโปรตีน การดูดซับสารฟีนอลิคของเซลล์ยีสต์แล้วตกตะกอนหรือเกิด degradation ของสารประกอบฟีนอลิค ทำให้ปริมาณลดลง (Amerine and Ough, 1974) ส่วนแอนโธไซยานินอาจเปลี่ยนไปอยู่ในรูปแบบที่คงตัว (Rommel et al., 1990) พวกที่มีโมเลกุลใหญ่จะตกตะกอน ทำให้แอนโธไซยานินลดลง แต่ทำให้ค่าสีแดง (absorbance ที่ 520 นาโนเมตร) เพิ่มขึ้น (Pascal et al., 1983) จึงทำให้ค่า Hue ลดลง แสดงว่าไวน์ที่บ่มมีสีแดง หรือแดงม่วง (Zoecklein et al., 1995)

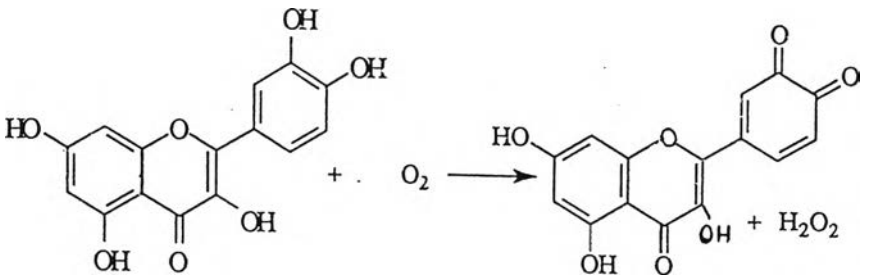
ปัจจัยหลักของปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนส และปริมาณเอนไซม์ มีผลต่อสารประกอบฟีนอลิค และแอนโธไซยานิน จึงเป็นผลให้อิทธิพลร่วมของปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อองค์ประกอบทั้ง 2 ชนิดนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่มีผลต่อค่า (Hue) ของไวน์หม่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\geq0.5$) ดังรูปที่ 4.38-4.40 (ตารางภาคผนวก ค.28) โดยไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 เติมเอนไซม์ก่อนหมักปริมาณ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัมมีสารประกอบฟีนอลิค (710.32 มิลลิกรัม/ลิตร) และแอนโธไซยานิน (141.57 มิลลิกรัม/ลิตร) สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ปริมาณแอนโธไซยานินในทรีตเมนต์นี้ไม่แตกต่างในทางสถิติ ($p\geq0.05$) กับทรีตเมนต์ที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 เติมเอนไซม์ในน้ำหมักปริมาณ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (140.69 มิลลิกรัม/ลิตร) ส่วนค่า Hue ของไวน์หม่อนในทุกทรีตเมนต์ไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.545-0.696 แสดงว่าไวน์หม่อนที่ได้

มีสีอยู่ในกลุ่มแดงม่วง (RP) และเมื่อศึกษาเพิ่มโดยการนำไวน์หม่อนที่ผ่านการบ่ม 24 สัปดาห์ไปวัดค่า Hue พบว่ามีค่าเปลี่ยนแปลงจากไวน์หม่อนหลังการบ่ม 12 สัปดาห์เล็กน้อย โดยมีค่า Hue ระหว่าง 0.547-0.699 และเมื่อเปรียบเทียบกับค่า Hue angle [arctan(b/a)] ที่ได้จากการวัดค่าสีโดยใช้เครื่องวัดสี Minolta พบว่า ไวน์หม่อนมีค่า Hue angle ระหว่าง 28.69-34.96 ดังตารางภาคผนวก ก.6 แสดงว่าไวน์หม่อนมีสีอยู่ในกลุ่มสีแดงเหลืองหรือน้ำตาลเล็กน้อย

3.3.2 <u>ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณกรดระเหย ของไวน์หม่อน</u>

การเปลี่ยนแปลงของกรดระเหย (ในรูปกรดอะซีติก) ในน้ำหมัก หลังการหมัก และระหว่างการบ่มไวน์หม่อนแสดงดังรูปที่ 4.11 (ตารางภาคผนวก ค.11) โดยในทุกทรีตเมนต์ปริมาณกรดระเหยในน้ำหมัก (สัปดาห์ที่ 0) มีค่าร้อยละ 0.004 และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังการหมักอยู่ระหว่างร้อยละ 0.019-0.03 เนื่องจากยีสต์สามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้ในระหว่างการหมัก ซึ่งจะมีทั้งกรดระเหย และกรดไม่ระเหย ในระหว่างการบ่มในสัปดาห์ที่ 3-15 ปริมาณกรดระเหยมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยโดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในบางทรีตเมนต์ เมื่อสิ้นสุดการบ่มปริมาณกรดระเหยมีค่าใกล้เคียงกันระหว่างร้อยละ 0.024-0.035 ในงานวิจัยนี้ในระหว่างการหมักและบ่มไวน์หม่อน กรดระเหยที่พบมีปริมาณค่อนข้างต่ำและเปลี่ยนแปลงน้อย แสดงว่าระหว่างการทำไวน์หม่อนไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างกรดอะซีติก ซึ่งปกติในระหว่างการหมักควรมีกรดระเหยไม่เกินร้อยละ 0.03 (Amerine et al., 1979; Rankine, 1989) และ US Federal กำหนดปริมาณของกรดระเหยในไวน์แดงต้องมีไม่เกินร้อยละ 0.14 (Magalith, 1981)

ปัจจัยหลักในด้านปริมาณกรดเริ่มต้น ปริมาณเอนไซม์ และการบ่ม ไม่มีผลต่อปริมาณกรดระเหยของไวน์หม่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ดังรูปที่ 4.26 (ตารางภาคผนวก ค. 24) อาจเป็นผลจากในงานวิจัยนี้ใช้เชื้อยีสต์สายพันธุ์เดียวกัน คือ *S. bayanus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างกรดอะซิติกต่ำ กระบวนการหมักคล้ายคลึงกัน ไม่มีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียอื่นๆ อุณหภูมิระหว่างการหมักค่อนข้างต่ำคือ 25±2 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิในระหว่างการบ่มต่ำคือ 5±2 องศาเซลเซียส ซึ่ง Rankine (1955) พบว่ากรดระเหยจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส ประกอบกับมีการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ด้วย จึงช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นๆ จึงทำให้ปริมาณกรดระเหยเกิดในระดับต่ำและไม่ต่างกัน ส่วนขั้นตอนการเติมเพคติเนสเอนไซม์มีผลต่อปริมาณกรดระเหยคือ การเติมเอนไซม์ในน้ำหมักมีผลให้ปริมาณกรดระเหยในไวน์หม่อน (ร้อยละ 0.032) สูงกว่าการเติมเอนไซม์หลังการหมัก (ร้อยละ 0.028) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เนื่องจากเพคติเนสเอนไซม์จะช่วยสกัดสารประกอบฟีนอลิคจากผลหม่อนลงสู่น้ำหมัก (Bayanove et al., 1992) และ Zoecklein et al. (1995) รายงานว่าปริมาณกรดอะซีติกในไวน์เพิ่มขึ้นได้จากการเกิด coupled oxidation ของสารประกอบฟีนอลิคในไวน์ ได้เป็น peroxide ซึ่งจะเปลี่ยนหรือ oxidize แอลกอฮอล์ไปเป็นอะเซทัลดีไฮด์ ซึ่งอาจจะเปลี่ยนเป็นกรดอะซีติกต่อไปได้



Step I

$$H_2O_2 + C_2H_5OH \longrightarrow CH_3CHO + 2H_2O$$

Step II

จากรูปการเกิด coupled oxidation ของ dihydroxy phenol ได้เป็น quinone และ hydrogen peroxide และการเกิดออกซิเดชั่นของเอทิลแอลกอฮอล์เป็นอะเซทัลดีไฮด์ และกรดอะซีติกต่อไป (Zoecklein et al., 1995)

อิทธิพลร่วมของปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนส และปริมาณเอนไซม์ ไม่มีผลต่อปริมาณกรดระเหยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ดังรูปที่ 4.41 (ตารางภาคผนวก ค.29) โดยมีปริมาณกรดระเหยหลังบ่มระหว่างร้อยละ 0.025-0.035 ซึ่งไม่เกินที่ US Federal กำหนดไว้ คือ กรดระเหยในไวน์แดงต้องมีไม่เกินร้อยละ 0.140 (Amerine and Ough, 1974; Magalith, 1981) แสดงว่าไวน์หม่อนที่ได้ไม่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่สร้างกรดอะซีติก และไม่มีการออกซิเดชั่นของแอลกอฮอล์มาก

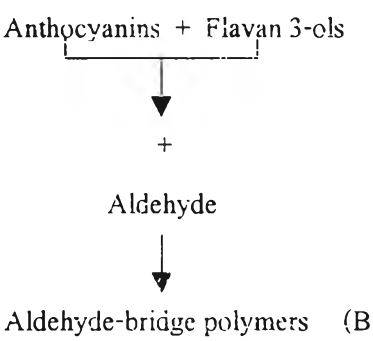
3.3.3 <u>ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ของไวน์หม่อน</u>

จากการทดลองในระหว่างการหมักไวน์หม่อนในทุกทรีตเมนต์มีปริมาณอะเซทัลดีไฮด์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในระดับใกล้เคียงกัน ดังในรูปที่ 4.12 (ตารางภาคผนวก ค.12) โดยในน้ำหมักที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 และ 0.6 มีปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ 12.39 และ 12.37 มิลลิกรัม/ลิตรตามลำดับ ในระหว่างการหมักปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อสิ้นสุดการหมักในสัปดาห์ที่ 3 มีปริมาณระหว่าง 17.49-21.02 มิลลิกรัม/ลิตร อาจเป็นผลจาก metabolism ของยีสต์ โดยในระหว่างการหมักยีสต์จะหมักน้ำตาลหรือเกิด degradation ของน้ำตาลได้เป็นอะเซทัลดีไฮด์ ซึ่งอะเซทัลดีไฮด์จะเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์โดย enzymatic reduction ต่อไป (Rapp and Versini, 1991) ในระหว่างการบ่มปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ในไวน์หม่อนทุกทรีตเมนต์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดการบ่ม (สัปดาห์ที่ 15) โดยมีปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ระหว่าง 170-190 มิลลิกรัม/ลิตร อาจเกิดจากการเกิด couple oxidation ของแอลกอฮอล์ และ orthohydroxyphenol เช่น caffeic acid, 4-methylcatechol (Ough and Amerine, 1958; Wildenradt and Singleton, 1974) และ Etievant (1991) รายงานว่าระหว่างการบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ และ/หรือมีปริมาณแอลกอฮอล์มากกว่าร้อยละ 10 อะเซทัลดีไฮด์มีแนวโน้มสะสมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจากการศึกษาไวน์

หม่อนมีปริมาณแอลกอฮอล์ระหว่างร้อยละ 10.40-10.80 ดังนั้นปริมาณอะเซทัลดีไฮด์จึงสะสมเพิ่มขึ้นในระหว่างการบ่ม

ปัจจัยหลักด้านปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนส ปริมาณเอนไซม์ และการบ่มมีผลต่อปริมาณอะเซทัลดีไฮด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.27 (ตารางภาคผนวก ค.24) โดยการปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 มีผลให้ไวน์หม่อนมีปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ (180.83 มิลลิกรัม/ลิตร) สูงกว่าการปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 (177.96 มิลลิกรัม/ลิตร) เนื่องจากในสภาวะที่มีความเป็นกรดต่ำ หรือ pH สูง แอลกอฮอล์จะเกิด chemical oxidation ได้ดีกว่าในสภาวะความเป็นกรดสูง หรือ pH ต่ำ

ขั้นตอนการเติมเพคติเนสมีผลต่อปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ คือ การเติมเอนไซม์หลังการหมัก (ในไวน์ใหม่) มีผลให้ไวน์หม่อนมีปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ (182.30 มิลลิกรัม/ลิตร) สูงกว่าการเติมเอนไซม์ในน้ำหมัก (176.49 มิลลิกรัม/ลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.27 (ตารางภาคผนวก ค.24) Nykanen (1986) รายงานว่าในระหว่างการหมัก ถ้ามีสารประกอบไนโตรเจนไม่เพียงพอต่อการเกิด biosynthesis ของกรดอะมิโนโดยยีสต์ จะทำให้ปริมาณอะเซทัลดีไฮด์และสารประกอบอัลดีไฮด์เพิ่มขึ้น ดังนั้นการเติมเอนไซม์ในน้ำหมัก เพคติเนสเอนไซม์เป็น commercial grade อาจมีเอนไซม์โปรติเอสเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย จึงช่วยสกัดสารประกอบไนโตรเจนจากผลหม่อนลงสู่ในน้ำหมักด้วย ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนจึงมากกว่าการเติมเอนไซม์หลังการหมัก เป็นผลให้ปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ต่ำกว่า นอกจากนี้การเติมเอนไซม์ในน้ำหมักเพคติเนสเอนไซม์จะช่วยสกัดสารประกอบฟีนอลิค และแอนโธไซยานินออกมาจาก vacuole ของพืชลงสู่น้ำหมักมาก (Cruess et al., 1955) สารประกอบฟีนอลิคและแอนโธไซยานินจะไปทำปฏิกิริยากับพวกอัลดีไฮด์ที่เรียกว่า Baeyer-type complexes ที่มีอัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมระหว่างแอนโธไซยานินกับ flavan-3-ol เช่น catechins และ procyanidin จึงอาจทำให้อัลดีไฮด์ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอะเซทัลดีไฮด์ลดลง (Bakker and Timberlake, 1986)



Aldehyde-bridge polymers (Bakker and Timberlake, 1986)

ผลการทดลองที่ได้คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Ribereau-Gayon, Pontallier and Glories (1983) ที่พบว่าปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ในไวน์แดงลดลง เนื่องจากไปทำปฏิกิริยากับแอนโธไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิค

การหมักไวน์หม่อนเป็นการหมักทั้งผล และมีการเติมเอนไซม์ที่ปริมาณต่างๆ เอนไซม์จะช่วยย่อยผนังเซลล์และเนื้อเยื่อ ทำให้องค์ประกอบต่างๆถูกสกัดออกมามาก เช่น ash alkalinity โปแตสเซียม โซเดียม และแคลเซียม เป็นต้น จึงทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้น (Cabaroglu et al, 1997) ซึ่งที่ pH สูง แอลกอฮอล์จะเกิด chemical oxidation ได้ดีกว่าที่ pH ต่ำ (Wucherpfenning and Semmler, 1973; Reed and Nagodawithana, 1991) และอาจช่วยสกัดสารประกอบประกอบฟีนอลิคด้วย ซึ่งสารประกอบฟีนอลิคอาจเกิด couple oxidation ได้เป็นเปอร์ออกไซด์ซึ่งจะเปลี่ยนหรือออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ไปเป็นอะเซทัลดีไฮด์ได้ (Zoecklein et al., 1995) ดังนั้นเมื่อปริมาณเอนไซม์ที่เติมเพิ่มขึ้น จึงช่วยสกัดสารประกอบต่างๆ ออกมามากขึ้น โดยปริมาณเอนไซม์ที่เติม 130 และ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีผลให้ปริมาณอะเซทัลดีไฮด์สูงสุด (179.70 และ 179.88 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.27 (ตารางภาคผนวก ค.24)

การบ่มมีผลให้ปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ในไวน์หม่อนเพิ่มขึ้น โดยไวน์หม่อนหลังบ่มมีปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ (179.39 มิลลิกรัม/ลิตร) สูงกว่าไวน์หม่อนก่อนบ่ม (19.66 มิลลิกรัม/ลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.27 (ตารางภาคผนวก ค.24) เนื่องจากอะเซทัลดีไฮด์มีแนวโน้มสะสมเพิ่มมากขึ้นในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ และ/หรือมีปริมาณแอลกอฮอล์มากกว่าร้อยละ 10 (Etievant, 1991) และอาจเกิดจากการเกิด couple oxidation ของแอลกอฮอล์และสารประกอบฟีนอลิค (Zoecklein et al., 1995)

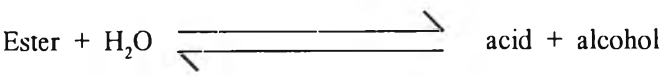
ถึงแม้ว่าปัจจัยหลักทั้งหมดมีผลต่อปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ในไวน์ แต่อิทธิพลร่วมของปัจจัยเหล่านี้ไม่มีผลต่อปริมาณอะเซทัลดีไฮด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\geq0.15$) ดังรูปที่ 4.42 (ตารางภาคผนวก ค.29) โดยมีปริมาณระหว่าง 170.81-189.32 มิลลิกรัม/ลิตร อาจเป็นผลจากทุกปัจจัยที่มีผลกับปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ เมื่อมีอิทธิพลร่วมกันอาจจะมีผลให้ปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างกัน หรือใกล้เคียงกัน

ปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ในไวน์หม่อนมีปริมาณค่อนข้างสูง สันนิษฐานว่าสารประกอบฟีนอลิคในไวน์หม่อนบางชนิดเกิด couple oxidation ได้เป็นอะเซทัลดีไฮด์สะสมในระดับสูง เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในไวน์หม่อนในทุกทรีตเมนต์ลดลงหลังการบ่ม

3.3.4 <u>ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเอสเทอร์ของไวน์หม่อน</u>

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอสเทอร์พบว่า น้ำหมักไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 และ 0.6 มีปริมาณเอสเทอร์ (ในรูปเอทิลอะซีเตท) ใกล้เคียงกันคือ 0.87 และ 1.05 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.13 (ตารางภาคผนวกที่ ค.13) ในระหว่างการหมักปริมาณเอสเทอร์ในทุกทรีตเมนต์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดการหมักมีปริมาณระหว่าง 21.23-43.47 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่ง Etievant (1991) อธิบายว่าเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักเกิดจาก secondary metabolism ของยีสต์ในระหว่างการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ และ Rapp (1988) รายงานว่าเอสเทอร์ที่เกิดและเพิ่มขึ้นระหว่างการหมักเกิดจากขบวนการเมตาโบลิซึ่มของยีสต์ โดยเกิดจาก acetate, เอทิลแอลกอฮอล์ และ higher

การหมักเกิดจากขบวนการเมตาโบลิซึ่มของยีสต์ โดยเกิดจาก acetate, เอทิลแอลกอฮอล์ และ higher alcohol หรือจาก long-chain fatty acid ในระหว่างการบ่ม (สัปดาห์ที่ 3-15) ปริมาณเอสเทอร์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกทรีตเมนต์ อาจเป็นผลจากปฏิกิริยา esterification ของกรดอินทรีย์โดยแอลกอฮอล์ ดังสมการ



นอกจากนี้ Etievant (1991) กล่าวว่าในระหว่างการบ่มถ้าค่า pH เพิ่มขึ้น ปริมาณเอสเทอร์ในไวน์จะมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น จากการทดลองในระหว่างการบ่มค่า pH ของไวน์หม่อนในทุกทรีตเมนต์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.18 จึงอาจเป็นผลให้ปริมาณเอสเทอร์ของไวน์หม่อนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

ปัจจัยของปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนส ปริมาณเอนไซม์ และการบ่มมีผลต่อปริมาณเอสเทอร์ของไวน์หม่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.28 (ตารางภาคผนวก ค.24) โดยไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 มีปริมาณเอสเทอร์ (80.61 มิลลิกรัม/ลิตร) สูงกว่าไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 (78.04 มิลลิกรัม/ลิตร) เนื่องจากเอสเทอร์เกิดจากปฏิกิริยา esterification ของกรดอินทรีย์โดยแอลกอฮอล์ (Maarse and Visscher, 1989) ดังนั้นการปรับปริมาณกรดในระดับสูง จึงอาจทำให้มีเอสเทอร์สูงด้วย

การเติมเอนไซม์ในน้ำหมักทำให้ไวน์หม่อนมีปริมาณเอสเทอร์สูง (85.70 มิลลิกรัม/ลิตร) กว่าการเติมเอนไซม์หลังหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การเติมเอนไซม์ลงในน้ำหมักเป็นการเพิ่ม suspended solid ประกอบกับเพคติเนสเอนไซม์จะช่วยสกัดองค์ประกอบต่างๆลงสู่น้ำหมักมาก ยอกซิเจนที่มีในน้ำหมักอาจถูก adsorb ไว้ในองค์ประกอบเหล่านี้ ทำให้เกิด higher alcohol มากขึ้นในระหว่างการหมัก ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นเอสเทอร์ต่อไป (Crowell and Guymon, 1963; Ribereau-Gayon, Lafon-Lafourcads and Bertrand, 1975; Liu,Gallander and Wilker, 1987) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Williams, Ough และ Berg (1978) ที่พบว่าการเติมเอนไซม์ในน้ำหมักจะทำให้ fusel oil และ higher alcohol เพิ่มขึ้น จึงทำให้ปริมาณเอสเทอร์สูง นอกจากนี้เพคติเนสเอนไซม์จะช่วยสกัดกรดอินทรีย์ต่างๆจากเนื้อผลไม้ลงสู่น้ำหมักมาก ซึ่งกรดอินทรีย์อาจเปลี่ยนไปเป็นเอสเทอร์ (Etievant, 1991) ทำให้มีปริมาณเอสเทอร์ระดับสูง

ปริมาณเอสเทอร์ในไวน์หม่อนจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณเพคติเนสเอนไซม์ โดยปริมาณเอนไซม์ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีผลให้ไวน์หม่อนมีปริมาณเอสเทอร์สูงสุด (82.47 มิลลิกรัม/ลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.28 (ตารางภาคผนวก ค.24)

การบ่มมีผลให้ปริมาณเอสเทอร์ของไวน์หม่อนเพิ่มขึ้นเป็น 79.32 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าไวน์หม่อนก่อนบ่ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) อาจเป็นผลจากปฏิกิริยา esterification ของกรดอินทรีย์โดยแอลกอฮอล์ (Maarse and Visscher, 1989)

เนื่องจากปัจจัยหลักทั้งหมดมีผลต่อปริมาณเอสเทอร์ จึงเป็นผลให้อิทธิพลร่วมของปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อปริมาณเอสเทอร์ของไวน์หม่อน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ด้วย ดังรูปที่ 4.43 (ตารางภาคผนวก ค.29) ซึ่งเป็นไปในแนวทางที่คล้ายคลึงกับอิทธิพลของปัจจัยหลัก โดยไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 ร่วมกับการเติมเอนไซม์ในน้ำหมัก 130 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีผลให้ปริมาณเอสเทอร์ในไวน์สูงสุด (105.04 มิลลิกรัม/ลิตร)

ปริมาณเอสเทอร์ในไวน์หม่อนในทุกทรีตเมนต์พบปริมาณค่อนข้างต่ำ อาจเป็นผลจากการบ่มไวน์หม่อนที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาสั้นประมาณ 12 สัปดาห์ การพัฒนาการเกิดเอสเทอร์จึงเกิดในระดับต่ำ

3.3.5 <u>ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณแอลกอฮอล์ของไวน์หม่อน</u>

การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ของไวน์หม่อนแสดงในรูปที่ 4.14 (ตารางภาคผนวก ค.14) จะเห็นว่าในระหว่างการหมัก (สัปดาห์ที่ 0-3) ปริมาณแอลกอฮอล์ในทุกทรีตเมนต์เพิ่มขึ้นมากในระดับที่ใกล้เคียงกัน เมื่อสิ้นสุดการหมักไวน์หม่อนมีปริมาณแอลกอฮอล์ระหว่างร้อยละ 10.45-10.85 ในระหว่างการบ่มปริมาณแอลกอฮอล์ค่อนข้างคงที่ เมื่อสิ้นสุดการบ่มในแต่ละทรีตเมนต์มีแอลกอฮอล์ระหว่างร้อยละ 10.40-10.80 ซึ่งจะลดลงจากก่อนบ่มเล็กน้อย อาจเนื่องจากการระเหยระหว่างการเก็บตัวอย่าง หรือการเปลี่ยนรูปของแอลกอฮอล์ไปอยู่ในรูปสารระเหย (Kunkee and Amerine, 1970) หรือเกิด couple oxidation ไปเป็นอะเซทัลดีไฮด์ (Vine, 1991)

ปัจจัยหลักของปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนส ปริมาณเอนไซม์ที่เติม และการบ่มไม่มีผลต่อปริมาณแอลกอฮอล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\geq0.05$) ดังรูปที่ 4.29 (ตารางภาคผนวก ค.25) จึงเป็นผลให้อิทธิพลร่วมของปัจจัยเหล่านี้ไม่มีผลต่อปริมาณแอลกอฮอล์ด้วย ดังรูปที่ 4.44 (ตารางภาคผนวก ค.30) เนื่องจากในการหมักปรับปริมาณสารอาหาร และน้ำตาลที่ยีสต์ใช้ในการหมักใกล้เคียงกัน ยีสต์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์เดียวกัน สภาวะในการหมักและการบ่มคล้ายคลึงกันจึงเป็นผลให้ปริมาณแอลกอฮอล์ไม่ต่างกัน ถึงแม้หลังการบ่มปริมาณแอลกอฮอล์จะลดลงเล็กน้อย

3.3.6 <u>ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไวน์หม่อน</u>

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ในรูปกลูโคส) ในน้ำหมักเริ่มต้นมีปริมาณร้อยละ 18.66 และ 18.67 ดังรูปที่ 4.15 (ตารางภาคผนวก ค.15) ในระหว่างการหมัก (สัปดาห์ที่ 0-3) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในทุกทรีตเมนต์ลดลงอย่างรวดเร็วโดยเมื่อสิ้นสุดการหมักเหลือร้อยละ 0.43-0.56 เนื่องจากในกระบวนการหมักไวน์ ยีสต์จะใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำหมักเพื่อสร้างแอลกอฮอล์ ในระหว่างการบ่ม (สัปดาห์ที่ 3-15) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย หรือค่อนข้างคงที่ แต่ส่วนใหญ่มีแนวโน้มลดลงอาจเนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์เปลี่ยนรูปไป หรือน้ำตาลไปทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่นๆ เช่น ไบซัลไฟท์ (Zoecklein et al., 1995) ในระหว่างการบ่มปริมาณจึงลดลง

ปัจจัยหลักของปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนส และปริมาณเอนไซม์ที่เติม ไม่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ดังรูปที่ 4.30 (ตารางภาคผนวก ค.25) แต่การบ่มมีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ อาจเนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์เปลี่ยนรูปไป หรือไปทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่น (Zoecklein et al., 1995) จึงทำให้ปริมาณลดลง แต่อิทธิพลร่วมของปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนสเอนไซม์ และปริมาณเอนไซม์ที่เติมไม่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังรูปที่ 4.45 (ตารางภาคผนวก ค.30) โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างร้อยละ 0.300-0.337 เนื่องจากยีสต์ *A. bayanus* ที่ใช้ในการหมักเหมือนกันจึงใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่สภาวะการหมักไม่แตกต่างกัน ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น และสารอาหารสำหรับการเจริญของยีสต์ไม่ต่างกัน อุณหภูมิในการหมักและบ่มใกล้เคียงกัน

3.3.7 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ของไวน์หม่อน

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid, °Brix) ในน้ำหมักหรือในไวน์หม่อนส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงปริมาณคล้ายคลึงกับน้ำตาลรีดิวซ์คือ ในระหว่างการหมัก (สัปดาห์ที่ 0-3) ในทุกทรีตเมนต์ค่า TSS มีแนวโน้มลดลง และในระหว่างการบ่มค่า TSS มีแนวโน้มลดลงอย่างช้าๆ ดังรูปที่ 4.16 (ตารางภาคผนวก ค.16) เป็นผลจากการลดลงของปริมาณกรดทั้งหมด (รูปที่ 4.17) และปริมาณแอนโธไซยานิน (รูปที่ 4.9) จึงเป็นผลให้ค่า TSS ลดลงด้วย เนื่องจากค่า TSS เป็นการวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในไวน์รวมทั้งกรด และสารสีด้วย (Zoecklein et al., 1995)

ปัจจัยหลักของปริมาณกรดเริ่มต้น และการบ่มมีผลต่อค่า TSS ของไวน์หม่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) คือ ไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 มีค่า TSS (5.56 °Brix) สูงกว่าไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.31 (ตารางภาคผนวก ค.25 และการบ่มมีผลให้ไวน์หม่อนมีค่า TSS ต่ำกว่าก่อนบ่มเป็นผลจากการลดลงของปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณแอนโธไซยานินทำให้ปริมาณกรดลดลง จึงเป็นผลให้ค่า TSS ลดลง

ปัจจัยหลักของขั้นตอนการเติมเพคติเนสและปริมาณเอนไซม์ไม่มีผลต่อค่า TSS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ดังรูปที่ 4.31 (ตารางภาคผนวก ค.25) เนื่องจากค่า TSS ที่ลดลงเป็นผลจากการที่เชื้อยีสต์ใช้น้ำตาลที่มีในน้ำหมัก ไม่ได้เป็นผลจากเพคติเนสเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Liu et al. (1987) ที่รายงานว่าเพคติเนสเอนไซม์ที่เติมไม่มีผลต่อค่า TSS

ถึงแม้ปัจจัยหลักของปริมาณกรดเริ่มต้นจะมีผลต่อค่า TSS แต่อิทธิพลร่วมของปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนส และปริมาณเอนไซม์ไม่มีผลต่อค่า TSS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ดังรูปที่ 4.46 (ตารางภาคผนวก ค.30) โดยไวน์หม่อนมีค่า TSS อยู่ระหว่าง 5.10-5.60 °Brix

เมื่อสิ้นสุดการหมักค่า TSS ในไวน์หม่อนมีค่าค่อนข้างสูง เนื่องจากปริมาณของแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักโดยเชื้อยีสต์จะมีผลต่อการหักเหของแสง ดังนั้นในการวัดด้วย hand refractometer จึงทำให้ค่าที่ได้ไม่ใช่ค่าของปริมาณน้ำตาลที่มีจริงหลังจากการหมัก (Amerine and Ough, 1974 ; Zoecklein et al .. 1995)

3.3.8 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณกรดทั้งหมด (titratable acidity) ของไวน์หม่อน

จากการศึกษาในระหว่างการหมัก (สัปดาห์ที่ 0-3) ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดซิตริก) มีปริมาณเพิ่มขึ้นมากโดยเฉพาะในทรีตเมนต์ชุดที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 ดังแสดงในรูปที่ 4.17 (ตารางภาคผนวก ค.17) เนื่องจากในระหว่างการหมัก ยีสต์ใช้น้ำตาลผลิตแอลกอฮอล์และปลดปล่อยกรดอินทรีย์ต่างๆ ออกมาด้วย เช่น กรดซัคซินิก กรดซิตริก และกรดมาลิก (Rankine, 1989) จึงทำให้ปริมาณกรดเพิ่มขึ้น ซึ่งจะอยู่ระหว่างร้อยละ 0.62-0.87 ในระหว่างการบ่ม (สัปดาห์ที่ 3-15) ปริมาณกรดทั้งหมดในไวน์หม่อนมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ส่วนใหญ่มีแนวโน้มลดลงอาจเป็นผลจากกรดอินทรีย์เกิดปฏิกิริยา esterification โดยแอลกอฮอล์ (Maarse and Visscher, 1989) หรือเนื่องจากการเกิด malo-lactic fermentation ในระหว่างการบ่ม ทำให้เกิด reduction ของ titratable acidity จึงทำให้ปริมาณกรดทั้งหมดลดลง (Rankine, 1989) แต่เมื่อสิ้นสุดการบ่มไวน์หม่อนในทุกทรีตเมนต์มีปริมาณกรดทั้งหมดสูงกว่าปริมาณกรดเริ่มต้นของน้ำหมัก เนื่องจากในระหว่างการหมักมีปริมาณกรดถูกปลดปล่อยจากยีสต์มาก จึงทำให้ปริมาณกรดเพิ่มสูงขึ้น และในระหว่างการบ่มปริมาณกรดมีการเปลี่ยนแปลงน้อย จึงเป็นผลให้ปริมาณกรดทั้งหมดในไวน์หม่อนหลังการบ่มมีค่าสูง โดยเฉพาะไวน์หม่อนในทรีตเมนต์ที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6

ปัจจัยหลักของปริมาณกรดเริ่มต้นของน้ำหมัก มีผลต่อปริมาณกรดทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.32 (ตารางภาคผนวก ค.26) โดยไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 มีปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละ 0.81) สูงกว่าไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดร้อยละ 0.4 ที่มีปริมาณกรดร้อยละ 0.63 เนื่องจากไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นในน้ำหมักสูง หลังกระบวนการหมักและบ่ม จึงเป็นผลให้ปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นมีระดับสูงกว่า

ปัจจัยหลักของขั้นตอนการเติมเพคติเนส ปริมาณเอนไซม์ที่เติม และการบ่มไม่มีผลต่อปริมาณกรดทั้งหมดของไวน์หม่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\geq0.05$) เนื่องจากปริมาณกรดอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักเกิดจากกระบวนการใช้น้ำตาลของเซลล์ยีสต์ ซึ่งผลที่ได้คล้ายคลึงกับ Liu et al. (1987) ที่พบว่าเพคติเนสเอนไซม์ไม่มีผลกับปริมาณกรดหรือ titratable acidity

ถึงแม้ปัจจัยหลักของปริมาณกรดเริ่มต้นจะมีผลต่อปริมาณกรดทั้งของไวน์หม่อน แต่อิทธิพลร่วมของปริมาณกรดเริ่มต้น ร่วมกับขั้นตอนการเติมเพคติเนส และปริมาณเอนไซม์ที่เติม ไม่มีผลต่อปริมาณกรดทั้งหมดของไวน์หม่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\geq0.05$) ดังรูปที่ 4.47 (ตารางภาคผนวก ค.31) โดยไวน์หม่อนมีปริมาณกรดทั้งหมดระหว่างร้อยละ 0.61-0.82

3.3.9 ปัจจัยที่มีผลต่อค่า pH ของไวน์หม่อน

ในระหว่างการหมัก (สัปดาห์ที่ 0-3) ค่า pH ของไวน์หม่อนในทุกทรีตเมนต์มีแนวโน้มลดลงมาก โดยเฉพาะในทรีตเมนต์ชุดที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 ดังรูปที่ 4.18 (ตารางภาคผนวก ค.18) เนื่องจากในระหว่างการหมักยีสต์ปลดปล่อยกรดอินทรีย์ต่างๆ ออกมา และในระหว่างการหมักยีสต์สร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยนอกจากแอลกอฮอล์ ซึ่งส่วนหนึ่งจะละลายน้ำให้กรดคาร์บอนิก (Kunkee and Amerine, 1970) จึงทำให้ค่า pH ลดต่ำลงอยู่ระหว่าง pH 3.30-3.50 ในระหว่างการบ่มค่า pH จะค่อยๆเพิ่มขึ้น เป็นผลจากการเกิด malo-lactic fermentation ในระหว่างการบ่ม ทำให้เกิด reduction ของ titratable acidity (Rankine, 1989) และเป็นผลจากการลดลงของปริมาณกรดในระหว่างการบ่ม จึงทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้น

ปัจจัยหลักของปริมาณกรดเริ่มต้นมีผลต่อค่า pH ของไวน์หม่อนโดยการปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 มีผลให้ค่า pH ของไวน์หม่อน (pH 3.88) ต่ำกว่าการปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 (pH 4.00) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.33 (ตารางภาคผนวก ค.26) เนื่องจากปริมาณกรดเริ่มต้นสูงทำให้ค่า pH ต่ำ และการบ่มมีผลให้ไวน์หม่อนมีค่า pH เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เนื่องจากผลของการเกิด malo-lactic fermentation (Rankine, 1989) และการจากการลดลงของปริมาณกรดในระหว่างการบ่ม

ปัจจัยหลักของขั้นตอนการเติมเพคติเนส และปริมาณเอนไซม์ไม่มีผลต่อค่า pH ของไวน์หม่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\geq0.05$) ดังรูปที่ 4.33 (ตารางภาคผนวก ค.26) เนื่องจากค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงในไวน์เป็นผลมาจากการปรับปริมาณกรดเริ่มต้น และการทำงานของยีสต์ในระหว่างการหมัก ซึ่งคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Liu et al. (1987) ที่พบว่าเพคติเนสเอนไซม์ที่เติมไม่มีผลต่อค่า pH ของไวน์

ถึงแม้ปัจจัยของปริมาณกรดเริ่มต้นจะมีผลต่อค่า pH แต่อิทธิพลร่วมของปัจจัยทั้งหมดไม่มีผลต่อค่า pH ของไวน์หม่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\geq0.05$) ดังรูปที่ 4.48 (ตารางภาคผนวก ค.31) อาจเนื่องจากเกิด buffer capacity ในระหว่างการหมัก ซึ่ง Amerine et al. (1979) รายงานว่าในช่วง pH 3.0-4.0 กรดทาร์ทาริก และกรดมาลิกจะทำให้น้ำหมักมีความเป็นบัฟเฟอร์ที่ดี มีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ไม่มาก เมื่อสิ้นสุดการหมักและบ่มจึงมีค่าใกล้เคียงกัน

3.3.10 ปัจจัยที่มีผลต่อค่าความใส (%Transmittance) ของไวน์หม่อน

การวัดความใสของไวน์หม่อนพบว่า น้ำหมักเริ่มต้นมีค่า Transmittance ค่อนข้างต่ำคือร้อยละ 44.50 เนื่องจากในน้ำหมักมีองค์ประกอบต่างๆละลายอยู่หลายชนิดจึงทำให้น้ำหมักขุ่น ค่า Transmittance จึงต่ำ แต่จะมีค่าเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก (สัปดาห์ที่ 0-3) โดยเฉพาะในทรีตเมนต์ชุดที่เติมเอนไซม์ในน้ำหมัก ดังรูปที่ 4.19 (ตารางภาคผนวก ค.19) ไวน์หม่อนมีความใสเพิ่มขึ้นเป็นผลจากเพคติเนสเอนไซม์ที่มีในน้ำหมักหรือที่เติมลงไป ย่อยสลายสารประกอบเพคตินที่ทำให้เกิดความขุ่นหลักในไวน์ ทำให้เพคตินมีอนุภาคเล็กลงและไม่ไปขัดขวางองค์ประกอบอื่นๆ ที่ทำให้ไวน์ขุ่นจึงทำให้ตกตะกอนลง ไวน์

จึงมีความใสเพิ่มขึ้น (Kertesz, 1930; Cruess et al., 1955) ในระหว่างการบ่มไวน์ (สัปดาห์ที่ 3-15) ความใสของไวน์หม่อนในทุกทรีตเมนต์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยเมื่อสิ้นสุดการบ่มมีค่าความใสหรือ Transmittance ระหว่างร้อยละ 63-75 เป็นผลจากการย่อยสลายเพคตินของเพคติเนสเอนไซม์ และการบ่มที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้องค์ประกอบที่ทำให้เกิดความขุ่นมีความสามารถในการละลายลดลง จึงตกตะกอน และทำให้ไวน์ใสขึ้น (ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม, 2535)

ปัจจัยหลักของปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนส ปริมาณเอนไซม์ที่เติม และการบ่มมีผลต่อความใสหรือค่า Transmittance ของไวน์หม่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.34 (ตารางภาคผนวก ค.26) โดยไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 มีค่า % Transmittance (ร้อยละ 67.83) สูงกว่าไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 (ร้อยละ 67.04) ซึ่ง Kirk และ Othmer (1965) กล่าวว่าเพคตินมีบทบาทมากในการทำให้ไวน์ขุ่น โดยเพคตินมีลักษณะเป็นร่างแหธรรมชาติของมันเป็นพวกที่ชอบน้ำมาก (highly hydrophilic colloid) มีประจุลบ เมื่ออยู่ในน้ำจะพองตัวและแขวนลอยอยู่ในน้ำ เกิดเป็นสารละลายที่ค่อนข้างหนืด ซึ่งจะป้องกันการตกตะกอนของพวกอนุภาคต่างๆ ที่กระจายอยู่ในไวน์ แต่ความสามารถในการพองตัวของเพคตินจะลดลงเมื่อความเป็นกรดเพิ่มขึ้นหรือ pH ต่ำลง อนุภาคต่างๆ จึงตกตะกอน ทำให้ไวน์ใส และ Endo (1961) ก็พบว่าการเติมเพคติเนสเอนไซม์เพื่อทำให้ไวน์ใสควรทำที่ค่า pH ต่ำ จะมีประสิทธิภาพมากกว่า

ปัจจัยหลักของขั้นตอนการเติมเพคติเนสมีผลต่อค่า % Transmittance ของไวน์หม่อน คือ ไวน์หม่อนที่เติมเอนไซม์ในน้ำหมักจะมีค่า % Transmittance (ร้อยละ 67.88) สูงกว่าทรีตเมนต์ที่เติมเอนไซม์หลังหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.34 (ตารางภาคผนวก ค.26) เนื่องจากการเติมเอนไซม์ลงไปในไวน์หลังการหมักสมบูรณ์แล้ว activity ของเอนไซม์อาจลดลงไปเนื่องจากแอลกอฮอล์ (Endo, 1961) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Cruess et al. (1955) ที่พบว่าการเติมเอนไซม์ในระหว่างการหมักจะทำให้ไวน์ใสเร็วกว่าและใสกว่าการเติมหลังหมัก

ความใสของไวน์หม่อนเพิ่มขึ้นตามปริมาณเอนไซม์ที่เติม โดยการเติมเพคติเนสเอนไซม์ที่ระดับ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีผลให้ความใสหรือค่า % Transmittance (ร้อยละ 69.70) สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.34 (ตารางภาคผนวก ค.26) เนื่องจากเมื่อเพคติเนสเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นจะช่วยย่อยสลายเพคติน และทำให้องค์ประกอบที่ทำให้ไวน์ขุ่นรวมตัวกันตกตะกอนได้ ไวน์จึงใสมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sims, Johnson และ Bates (1988) ที่พบว่าการเติมเพคติคเอนไซม์ในกระบวนการทำไวน์ทำให้ไวน์ใสมากขึ้น และจะช่วยทำให้องค์ประกอบต่างๆที่มีผลต่อความขุ่นของไวน์ตกตะกอนได้มากขึ้นตามปริมาณเอนไซม์ที่ใช้

การบ่มไวน์มีผลต่อค่า % Transmittance เช่นกัน คือ ไวน์หม่อนหลังการบ่มจะมีค่า % Transmittance (ร้อยละ 67.44) สูงกว่าไวน์หม่อนก่อนบ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.34 (ตารางภาคผนวก ค.26) เนื่องจากการบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 7-15 องศาเซลเซียส ทำให้สารประกอบต่างๆ ที่ทำให้เกิดความขุ่นตกตะกอน เพราะสารประกอบเหล่านี้มีความสามารถในการละลายลดลงที่

อุณหภูมิต่ำ จึงตกตะกอนได้ (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2535) ประกอบกับการเติมเพคติเนสเอนไซม์ทำให้สารประกอบพวกที่แขวนลอยรวมทั้งส่วนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ตกตะกอนแยกออกมาได้ดีขึ้นที่อุณหภูมิต่ำ (Endo, 1965)

เนื่องจากปัจจัยหลักทั้งหมดมีผลต่อค่า % Transmittance ดังนั้นอิทธิพลร่วมของปัจจัยทั้งหมด จึงมีผลต่อค่า % Transmittance ของไวน์หม่อน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 เติมเอนไซม์หลังหมัก 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีค่า % Transmittance ของ (ร้อยละ 75.00) สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 4.49 (ตารางภาคผนวก ค.31)

3.3.11 <u>ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ของไวน์หม่อน</u>

ในการศึกษาการทำไวน์หม่อนเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในขั้นตอนการเตรียมผลหม่อน ในน้ำหมัก และในไวน์หม่อนหลังหมักในรูปของโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ รวมเป็นปริมาณทั้งหมด 350 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งจะแตกตัวให้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ได้ประมาณร้อยละ 50 (Rankine, 1989) เนื่องจากข้อกำหนดในเรื่องความปลอดภัย และความเป็นพิษของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และคุณภาพของไวน์จึงวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ถูกตรึง และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมดในระหว่างการบ่มไวน์หม่อนพบว่า การเปลี่ยนแปลงของปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ถูกตรึง และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมดในระหว่างการบ่มคล้ายคลึงกัน โดยจะมีปริมาณลดลงเรื่อยๆในระหว่างการบ่ม ดังรูปที่ 4.20-4.22 (ตารางภาคผนวก ค.20-ค.22) เนื่องจากในระหว่างการบ่มจะเปลี่ยนถ่ายไวน์หม่อนส่วนที่ใสทุกๆ 4 สัปดาห์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในไวน์จึงอาจลดลงเพราะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ นอกจากนี้อาจลดลงเนื่องจากไบซัลไฟท์ไปรวมตัวหรือทำปฏิกิริยากับอะเซทัลดีไฮด์ แอนโธไซยานิน และน้ำตาล (Zoecklein et al., 1995)

ปัจจัยหลักของปริมาณกรดเริ่มต้น มีผลต่อปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่มีผลต่อปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ถูกตรึงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\geq0.05$) ดังรูปที่ 4.35-4.37 (ตารางภาคผนวก ค.27) โดยไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 มีปริมาณปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ (11.00 มิลลิกรัม/ลิตร) สูงกว่าไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 เนื่องจากในสภาวะที่ความเป็นกรดต่ำ หรือ pH สูง ไบซัลไฟท์ที่แตกตัวจากซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่นๆ เช่น อัลดีไฮด์ เด็กซ์ตริน สารประกอบเพคติค โปรตีน แอนโธไซยานิน และน้ำตาลได้เป็น bisulfite addition compounds หรือซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ถูกตรึงมากขึ้น (Amerine et al., 1979) จึงทำให้ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระลดลง และ Joslyn และ Braverman (1954) พบว่าที่ pH ต่ำ ไบซัลไฟท์จะทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่นๆ ได้ช้าและลดลง และในสภาวะที่ความเป็นกรดสูง กรดจะช่วยจำกัดการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆด้วย จึงทำให้ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระมีเหลืออยู่สูง จึงเป็นผลให้ไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้น

ร้อยละ 0.6 มีปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมด (111.09 มิลลิกรัม/ลิตร) สูงกว่าไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 (110.57 มิลลิกรัม/ลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ปัจจัยหลักของขั้นตอนการเติมเพคติเนสมีผลต่อปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ถูกตรึงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$) แต่ไม่มีผลต่อปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\geq0.05$) โดยการเติมเอนไซม์ในน้ำหมักมีผลให้ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระในไวน์หม่อน (10.45 มิลลิกรัม/ลิตร) ต่ำกว่าการเติมเอนไซม์หลังหมัก (10.99 มิลลิกรัม/ลิตร) ดังรูปที่ 4.35-4.37 (ตารางภาคผนวก ค.27) เนื่องจากการเติมเอนไซม์ในน้ำหมัก เอนไซม์จะช่วยสกัดสารประกอบต่างๆ เช่น แอนโธไซยานิน สารประกอบฟีนอลิค สารประกอบเพคติคลงสู่น้ำหมักมาก จึงเป็นผลให้ไบซัลไฟท์ที่แตกตัวมาไปทำปฏิกิริยากับสารประกอบเหล่านี้ จึงทำให้ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระลดลง แต่ทำให้ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ถูกตรึง (100.36 มิลลิกรัม/ลิตร) ในไวน์หม่อนสูงกว่าการเติมเอนไซม์หลังการหมัก

ปัจจัยหลักของปริมาณเอนไซม์ที่เติม และอิทธิพลร่วมของปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนส และปริมาณเอนไซม์ที่เติมไม่มีผลต่อปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ถูกตรึง และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\geq0.05$) ดังรูปที่ 4.35-4.37 (ตารางภาคผนวก ค.27) และรูปที่ 4.50-4.52 (ตารางภาคผนวก ค.32) ไวน์หม่อนที่ได้มีปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระอยู่ระหว่าง 10.07-11.35 มิลลิกรัม/ลิตร มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ถูกตรึงระหว่าง 100.00-100.22 มิลลิกรัม/ลิตร และมีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมดระหว่าง 110.27-111.65 มิลลิกรัม/ลิตร

จะเห็นว่าปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระในไวน์หม่อนหลังการบ่ม 12 สัปดาห์มีระหว่าง 10.07-11.35 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับที่ Zoecklein et al. (1995) รายงานว่าไวน์แดงที่ pH 3.4-3.6 ต้องการซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระประมาณ 10-20 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อช่วยรักษาคุณภาพของไวน์ โดยช่วยป้องกันหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และการเกิดออกซิเดชั่นในระหว่างการขนส่งหรือรอจำหน่าย ส่วนปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมดมีปริมาณ 110.27-111.65 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานขององค์การอนามัยโลก (WHO) ที่กำหนดว่าไวน์ควรมีปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมดไม่เกิน 350 มิลลิกรัม/ลิตร (Patrick et al., 1993) และต่ำกว่าที่มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม สุรา มอก.39-2516 ที่กำหนดให้ไวน์มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ หรือเกลือที่แตกตัวให้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์คำนวณเป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไม่มากกว่า 450 ส่วนในล้านส่วน (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2539) แสดงว่าปริมาณโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ที่เติมในกระบวนการทำไวน์หม่อนอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมในการช่วยป้องกันหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ช่วยรักษาคุณภาพของไวน์ และอยู่ในระดับถือว่าปลอดภัย และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย

4. ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไวน์หม่อน

จากการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส พบว่าปริมาณกรดเริ่มต้นไม่มีผลต่อคะแนนคุณภาพด้านลักษณะปรากฏ กลิ่น รสชาติ และคุณลักษณะโดยรวม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ดังตารางที่ 4.5 เนื่องจากไวน์หม่อนที่ได้มีสีแดงม่วงค่อนข้างเข้มใกล้เคียงกัน ผู้ทดสอบชิมจึงอาจแยกความแตกต่างได้ยาก ถึงแม้ว่าจากการวิเคราะห์พบว่าปริมาณกรดเริ่มต้นจะมีผลต่อสี (Hue) และความใสของไวน์ และในช่วงระหว่างการบ่ม ไวน์หม่อนอาจมีการพัฒนากลิ่นรสต่างๆใกล้เคียงกันเนื่องจากบ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน ประกอบกับปริมาณกรดของไวน์หม่อนที่ลดลงในระหว่างการบ่มใกล้เคียงกัน จึงอาจทำให้กลิ่นและรสชาติที่ได้ใกล้เคียงกัน เป็นผลให้คุณลักษณะโดยรวมใกล้เคียงกันด้วย แต่การปรับปริมาณกรดเริ่มต้นมีผลคะแนนด้านต่อกลิ่นและรสที่ค้างอยู่ในปากหลังดื่ม โดยไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 ได้รับคะแนนเฉลี่ย (2.04 คะแนน) สูงกว่าไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังตารางที่ 4.5 Zoecklein et al. (1995) รายงานว่าในไวน์ที่มีปริมาณกรดต่ำ รสของแทนนินในไวน์จะเด่นชัด ซึ่ง procyanidins หรือ แทนนิน จะเป็นองค์ประกอบหลักที่ให้รสฝาดเฝื่อน (astringent) และรสขม (bitter) กับไวน์ (Arnold and Noble, 1978)

เนื่องจากปริมาณกรดเริ่มมีผลต่อคะแนนความรู้สึกหลังดื่ม จึงมีผลต่อคะแนนรวมคุณภาพทั้งหมดของไวน์หม่อนด้วย ดังตารางที่ 4.5 โดยไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.4 ได้คะแนนเฉลี่ย (13.92 คะแนน) สูงกว่าไวน์หม่อนที่ปรับปริมาณกรดเริ่มต้นร้อยละ 0.6 (เฉลี่ย 13.53 คะแนน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ขั้นตอนการเติมเพคติเนส และปริมาณเอนไซม์ไม่มีผลต่อคะแนนคุณภาพด้านประสาทสัมผัสทั้งหมดของไวน์หม่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังตารางที่ 4.5 ถึงแม้ว่าปัจจัยทั้ง 2 ปัจจัยนี้จะมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิค แอนโธไซยานิน ค่า Hue ปริมาณเอสเทอร์ อะเซทัลดีไฮด์ และความใสของไวน์หม่อน แต่ผู้ทดสอบชิมให้คะแนนไม่แตกต่างกัน

การบ่มมีผลต่อคะแนนด้านลักษณะปรากฏของไวน์หม่อน โดยการบ่มไวน์หม่อนเป็นระยะเวลานาน 24 สัปดาห์ มีผลให้ไวน์หม่อนได้คะแนนเฉลี่ย (2.19 คะแนน) ต่ำกว่าการบ่มเป็นระยะเวลานาน 12 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.5 อาจเป็นผลจากการลดลงของสารสีแอนโธไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิคในระหว่างการบ่มไวน์ดังผลการวิเคราะห์ทางเคมี รวมทั้งแทนนินและแอนโธไซยานินในไวน์อาจจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในไวน์อย่างช้าๆ แล้วตกตะกอน ทำให้สีของไวน์จะเปลี่ยนแปลงจากสีแดงม่วงของไวน์แดงใหม่ ไปเป็นสีแดงคล้ำ (dark red) (Zoecklein et al., 1995; ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2541) จากการที่ไวน์แดงเปลี่ยนเป็นสีแดงคล้ำจึงอาจเป็นผลให้สังเกตความใสของไวน์ได้ยากและดูเหมือนไวน์เกิดการออกซิไดซ์ ผู้ทดสอบชิมจึงให้คะแนนลดลง การบ่มมีผลต่อคะแนนคุณภาพโดยรวมของไวน์หม่อน คือไวน์หม่อนที่บ่มเป็นระยะเวลานาน 24 สัปดาห์ ได้คะแนนเฉลี่ยคุณภาพโดยรวม หรือความพอใจในคุณภาพโดยรวม (1.28 คะแนน) สูงกว่าไวน์หม่อนที่บ่มนาน 12 สัปดาห์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.5) อาจเป็นผลจากในระหว่างการบ่มนานขึ้น

ไวน์มีการพัฒนากลิ่นรสต่างๆ มากขึ้น หรือกลิ่นรสต่างๆ มีความสมดุลมากขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ polymerization และ esterification ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิด oxidation อย่างนุ่มนวลของไวน์ที่เก็บบ่มไว้นาน pH แอลกอฮอล์ และปริมาณกรดในไวน์จะนุ่มขึ้น เพราะสารประกอบอื่นๆ ของไวน์เกิดการเปลี่ยนแปลง และมีความซับซ้อนขึ้น ไวน์จึงมีความฝาดเฝื่อนลดลง (ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2541) แต่การบ่มไม่มีผลต่อคะแนนด้านกลิ่น รสชาติ กลิ่นและรสที่ค้างในปากหลังดื่ม และคะแนนรวมคุณภาพทั้งหมด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ดังตารางที่ 4.5

อิทธิพลร่วมของปริมาณกรดเริ่มต้น ขั้นตอนการเติมเพคติเนสเอนไซม์ และปริมาณเอนไซม์ไม่มีผลต่อคะแนนเฉลี่ยคุณภาพทางประสาทสัมผัสทุกด้านของไวน์หม่อน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.7 โดยได้คะแนนเฉลี่ยด้านลักษณะปรากฏระหว่าง 2.13-2.43 คะแนน จากคะแนนเต็ม 3คะแนน แสดงว่าไวน์หม่อนที่ได้มีลักษณะปรากฏค่อนข้างดี หรืออยู่ในระดับที่ดี มีความใส ค่อนข้างวาวและมีสีตามธรรมชาติของไวน์ ด้านกลิ่นได้คะแนนเฉลี่ยระหว่าง 3.90-4.50 คะแนน จากคะแนนเต็ม 6 คะแนน แสดงว่ากลิ่นของไวน์หม่อนมีความสมดุลเล็กน้อย เพราะยังมีกลิ่นหม่อนเด่นออกมา อาจเป็นผลจากการบ่มเป็นระยะเวลาสั้น การพัฒนาด้านกลิ่นจึงเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ปริมาณเอสเทอร์ที่พบว่ามีปริมาณค่อนข้างต่ำ ส่วนด้านรสชาติได้คะแนนเฉลี่ยระหว่าง 3.88-4.23 คะแนน จากคะแนนเต็ม 6 คะแนน แสดงว่าไวน์หม่อนที่ได้มีรสชาติอยู่ในระดับที่ค่อนข้างสมดุลในด้านปริมาณกรด แอลกอฮอล์ และน้ำตาล ไวน์ได้ที่จัดเป็น dry red wine เนื่องจากมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือต่ำประมาณร้อยละ 0.300-0.337 ด้านกลิ่นและรสที่ค้างในปากหลังดื่มได้คะแนนเฉลี่ยระหว่าง 1.82-2.15 คะแนน จากคะแนนเต็ม 3 คะแนน แสดงว่าไวน์หม่อนมีกลิ่นและรสชาติค้างในปากที่ทำให้เกิดความรู้สึกที่น่าพึงพอใจ และอยู่ได้นานประมาณ 10 วินาที ด้านคะแนนคุณภาพโดยรวมหรือความพอใจในคุณภาพโดยรวมได้คะแนนเฉลี่ยระหว่าง 1.05-1.39 คะแนน จากคะแนนเต็ม 2 คะแนน แสดงว่าคุณภาพอยู่ในระดับที่สามารถใช้เป็นตัวแทนของไวน์หม่อนหรือไวน์ชนิดนั้นๆ ได้ และด้านคะแนนรวมคุณภาพทั้งหมดได้คะแนนเฉลี่ยระหว่าง 12.86-14.59 คะแนน จากคะแนนเต็ม 20 คะแนน แสดงว่าเป็นไวน์หม่อนที่ได้เป็นไวน์ที่ดีถึงค่อนข้างดีเยี่ยม อาจมีลักษณะที่ไม่ดีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น