การปรับสภาพเบื้องต้นและการผลิตไวน์จากผลแก้วมังกรแดง *Hylocereus polyrhizus*

นายวิทวัส ขวัญเมือง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRETREATMENT AND PRODUCTION OF RED DRAGON FRUIT *Hylocereus polyrhizus* WINE

Mr. Wittawat Khwanmuang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับสภาพเบื้องต้นและการผลิตไวน์จากผลแก้วมังกรแดง *Hylocereus polyrhizus*
โดย	นายวิทวัส ขวัญเมือง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา อาจารย์ ดร.ศรินทิพ สุกใส

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา ธนานุวงศ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.ศรินทิพ สุกใส)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.อรอง จันทร์ประสาทสุข)

วิทวัส ขวัญเมือง : การปรับสภาพเบื้องต้นและการผลิตไวน์จากผลแก้วมังกรแดง *Hylocereus polyrhizus* (PRETREATMENT AND PRODUCTION OF RED DRAGON FRUIT *Hylocereus polyrhizus* WINE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.รมณี สงวนดีกุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา, อ. ดร.ศรินทิพ สุกใส, 92 หน้า.

แก้วมังกรแดงเป็นผลไม้ที่นิยมปลูกในทวีปเอเชีย มีสีสวยและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแก้วมังกรแดงสายพันธุ์ *Hylocereus polyrhizus* พบว่า มีความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และไฟเบอร์ เท่ากับ 88.20, 0.17, 0.40, 0.12 และ 8.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยังพบกรดมาลิกในปริมาณ 7.6 กรัมต่อลิตร รวมทั้งมีค่า % DPPH radical scarvenging และ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 74.36 เปอร์เซ็นต์ และ 155.42 mgGAE/ml ตามลำดับ จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะผลิตไวน์จากแก้วมังกรแดง โดยศึกษาหาชนิดและปริมาณของยีสต์ รวมทั้งวิธีการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตไวน์แก้วมังกรแดง ผลการทดลองพบว่ายีสต์บริสุทธิ์เดี่ยวกลุ่ม Saccharomyces ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^8 cfu/ml มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีที่สุด รวมทั้งสร้างแอลกอฮอล์ได้มากที่สุดเท่ากับ 9.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิที่ดี พบว่า ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากันยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้น้อยกว่ายีสต์กลุ่ม Saccharomyces แต่ไวน์ที่ได้ มีลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นที่ดีกว่าไวน์ที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์กลุ่ม Saccharomyces อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะผลิตไวน์จากแก้วมังกรแดงโดยใช้ยีสต์ทั้งสองกลุ่มนี้มาหมักร่วมกันด้วยวิธีแบบเชื้อผสม และเชื้อผสมลำดับส่วน (Mixed and Sequential Cultures) พบว่าไวน์ที่ได้จากการหมักแบบเชื้อผสมด้วย *Saccharomyces cerevisiae 4019* ร่วมกับ *Saccharomycodes ludwigii* มีปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับ 11.4 เปอร์เซ็นต์ และ 5.6 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคเปรียบเทียบระหว่างการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อผสมทั้ง 2 วิธี พบว่าผู้บริโภคให้คะแนนความชอบสำหรับไวน์ที่ได้จากการหมักแบบเชื้อผสมมากกว่าไวน์ที่ได้จากการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบผลทางประสาทสัมผัสของไวน์แก้วมังกรแดงที่ได้จากการหมักแบบเชื้อผสมและเชื้อผสมลำดับส่วน พบว่าคุณสมบัติด้าน กลิ่น และรสชาติของไวน์ที่ได้จากการหมักแบบเชื้อผสม *Saccharomyces cerevisiae 4019* ร่วมกับ *Saccharomycodes ludwigii* มีความแตกต่างจากไวน์ที่ได้จากการหมักแบบเชื้อผสมลำดับส่วนของ *Saccharomyces cerevisiae 4019* และ *Hanseniaspora uvarum* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักไวน์ในทุกสภาวะ พบว่ามีค่า % DPPH radical scavenging ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับน้ำหมักเริ่มต้น ยกเว้น ไวน์ที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวโดยยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae 4019* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4 x 10^8 cfu/ml. ที่มีค่า% DPPH radical scavenging ไม่แตกต่างกัน ($P \leq 0.05$) ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในไวน์ที่ได้จากการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวด้วยยีสต์กลุ่ม Saccharomyces และการหมักแบบเชื้อผสมทั้ง 2 วิธีด้วยยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae 4019* และ *Saccharomycodes ludwigii* นั้น มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ในวันสุดท้ายของกระบวนการหมัก ดังนั้นจากงานวิจัยนี้การหมักไวน์แก้วมังกรแดงด้วยวิธีเชื้อผสมด้วยยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae 4019* ร่วมกับ *Saccharomycodes ludwigii* จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะพัฒนาต่อไปในกระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดง เนื่องจากใช้ระยะเวลาที่สั้นในกระบวนการหมัก รวมทั้งให้สารประกอบทุติยภูมิและปริมาณแอลกอฮอล์ที่ดีที่สุด

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5372560623 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS: RED DRAGON FRUIT / FRUIT WINE

WITTAWAT KHWANMUANG: PRETREATMENT AND PRODUCTION OF RED DRAGON FRUIT *Hylocereus polyrhizus* WINE. ADVISOR: ASST. PROF. ROMANEE SANGUANDEEKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. CHEUNJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., SARINTIP SOOKSAI, Ph.D., 92 pp.

Red dragon fruit (*Hylecereus polyhizus*) is well known for the attractive and rich nutrient contents. The proximate analysis of red dragon fruit was detected the results showed 88.20 % moisture; 0.17 % protein; 0.40 % fat 0.12 % ash and 8.20 % fiber. The antioxidant properties of red dragon fruit revealed 74.36 % DPPH radical scarvenging and total phenolic compound 155.42 mgGAE/ml. of red dragon fruit. Wine is the product of complex interactions between microorganism. The use of *Saccharomyces cerevisiae 4019, Saccharomycodes ludwigii* and *Hanseniaspora uvarum* in in single pure, mixed and sequential mixtures has been studied to characterize red dragon fruit wine. In pure cultures, *S. cerevisiae 4019* at the level of 8×10^8 cfu/ml could produce highest amount of ethanol compared to different initial concentration of inoculum. The wines obtained from using non-saccharomyces yeast at the same inoculum were evaluated compared to the saccharomyces wine before . It was found that the wine from non-saccharomyces group received more preference in odor. Mixed cultures (mixed and sequential) fermentation had been studied. It was found that the sequential cultures fermentation of *Saccharomyces cerevisiae 4019* and *Saccharomycodes ludwigii* was combination in producing wine with 11.4 % (v/v) ethanol. Antioxidant of red dragon fruit wines was performed by DPPH scavenging and total phenolic compound content. % DPPH radical scavenging of red dragon fruit wines were gradually decreased ($p \leq 0.05$) through the fermentation period except that for wine made from *S. cerevisiae 4019* at the level of 4×10^8 cfu/ml.

Field of Study: Biotechnology
Academic Year: 2014

Student's Signature .....
Advisor's Signature .....
Co-Advisor's Signature .....
Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิทยานิพนต์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาและช่วยเหลือของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่ายิ่งเพื่อให้คำปรึกษาและแนวทางการแก้ไขปัญหา รวมถึงกรุณาช่วยตรวจสอบแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนความเอาใจใส่ดูแลและให้ความช่วยเหลือในทุกๆ เรื่องตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา และ อาจารย์ ดร.ศรินทิพ สุกใส อ.ที่ปรึกษาร่วม สำหรับคำชี้แนะต่างๆ เกี่ยวกับงานวิจัยและให้แนวคิดใหม่ๆ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ และรองศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา ธนานุวงศ์ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. อรอง จันทร์ประสาทสุข กรรมการภายนอก เป็นอย่างสูงที่กรุณาเสียสละเวลาเพื่อตรวจสอบ พร้อมทั้ง ชี้แนะแนวทางในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี และสมาชิกห้อง 452 สำหรับการดูแลและคำแนะนำต่างๆ รวมทั้งให้โอกาสดีๆ ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. บุญเทียม พันธุ์เพ็ง สำหรับคำแนะนำ แรงบันดาลใจและต้นแบบในการเรียนตลอดมา

ขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ และภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่วิจัย

ขอขอบคุณพี่ น้องและเพื่อน ๆ ปริญญาโท-เอก ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร สำหรับความ ช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดการวิจัย รวมถึงพี่ปลา พี่เอื้อย เจ้าหน้าที่ในภาคภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่าน สำหรับการอำนวยความสะดวกตลอดงานการวิจัยเสร็จสิ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.น.สพ.ดร. นพดล พิฆารัตน์ และกลุ่มอิรุ๊บจุ๊บจิ๊บ แบดมินตัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งนายพรศักดิ์ ชินวงศ์วัฒนา, Mr. Joseph Washington "Jellybean" Bryant, นายประเสริฐ ศิริพจนากุลและคณะ สำหรับคำชี้แนะ ประสบการณ์ในการใช้ชีวิตต่างๆ ตลอดการเรียนที่ผ่านมา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่อรวรรณ อินทร์ทองปน พี่สาวปิ่นมณี ขวัญเมือง และครอบครัวที่ได้ ให้กำลังใจ และห่วงใย พร้อมทั้งสนับสนุนในด้านทุนทรัพย์ให้แก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง 1

สารบัญรูปภาพ 2

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์ 3

2.1 แก้วมังกรแดง 3

2.2 สารอนุมูลอิสระ (free radical) 6

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) 10

2.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ 10

2.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ 11

2.3 ไวน์ 15

2.4 กระบวนการผลิตไวน์ 17

2.4.1 กระบวนการเตรียมน้ำผลไม้สำหรับการหมักไวน์ 18

2.4.2 การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ 20

2.4.3 กระบวนการหมัก 20

2.4.4 กระบวนการหลังการหมัก 23

2.5 ยีสต์ (yeast) 25

2.5.1 ยีสต์กลุ่ม Saccharomyces 26

2.5.2 ยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces 27

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

2.6 รูปแบบการหมัก 28
2.6.1 กระบวนการหมักด้วยวิธีธรรมชาติ (Traditional fermentation) 28
2.6.2 กระบวนการหมักด้วยวิธีแบบใหม่ (Modern Fermentation) 28
2.7 กลิ่นรสในไวน์ 31
บทที่3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย 34
3.1 วัสดุ เครื่องมือ/อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี 34
3.1.1 วัตถุดิบ 34
3.1.2 วัสดุ 34
3.1.3 เครื่องมือ/อุปกรณ์ 34
3.1.4 สารเคมี 35
3.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ 36
3.1.6 สายพันธุ์ยีสต์ 36
3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย 36
3.2.1 กระบวนการเตรียมแก้วมังกรแดง 36
3.2.2 กระบวนการเตรียมน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดง (red dragon fruit must) 37
3.2.3 กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดง 38
3.2. การประเมินทางประสาทสัมผัสของไวน์แก้วมังกรแดง 39
บทที่4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 40
4.1 ศึกษาองค์ประกอบพื้นฐานของแก้วมังกรแดง 40
4.2 กระบวนการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวด้วยเชื้อยีสต์กลุ่ม Saccharomyces 42
4.2.1 กระบวนการหมักของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 x 10^6 cfu/ml 43
4.2.2 กระบวนการหมักของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4 x 10^6 cfu/ml 44

หน้า

4.2.3 กระบวนการหมักของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml 45

4.3 กระบวนการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวด้วยเชื้อยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces 48

4.3.1 กระบวนการหมักของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomycodes ludwigii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. 48

4.3.2 กระบวนการหมักของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Pichia guilliermondii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml 49

4.4 กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงแบบเชื้อผสม (Mixed Culture) 52

4.4.1 กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Saccharomycodes ludwigii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml 52

4.4.2 กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Pichia guilliermondii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml 54

4.5 กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมลำดับส่วน (Sequential Cultures) ... 55

4.5.1 กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมลำดับส่วนระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Saccharomycodes ludwigii* ที่การเติมปริมาณเชื้อชนิดละ 4 x 10^6 cfu/ml 55

4.5.2 กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมลำดับส่วนระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Pichia guilliermondii* ที่การเติมปริมาณเชื้อชนิดละ 4 x 10^6 cfu/ml 57

4.6 การเปลี่ยนแปลงการเปลี่ยนแปลงของสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบโพลีฟอลในไวน์แก้วมังกรแดง 59

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 62

รายการอ้างอิง 65

ภาคผนวก 79

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

ภาคผนวก ก. สมบัติทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis) 80
ก 1.การหาปริมาณร้อยละของความชื้น (%Moisture) 80
ก.2 การหาปริมาณร้อยละของไขมัน (%Fat) 80
ก.3 การหาปริมาณร้อยละของโปรตีน (%Protein) 81
ก.4 การหาปริมาณร้อยละของเส้นใยหยาบ (%Fiber) 82
ก.5 การหาปริมาณร้อยละของเถ้า (%Ash) 83
ก 6 .การหาปริมาณร้อยละของคาร์โบไฮเดรต (%Carbohydrate) 84
ก.7 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย 84
ก.8 ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดซิตริก) โดยวิธี titratable acidity (%) 84
ก.9 ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยเครื่องวัดพีเอช 85
ก.10 ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยไฮโดรมิเตอร์ 85
ก.11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS (Bernfeld, 2006) 85
ก.12 ปริมาณเชื้อยีสต์ทั้งหมด โดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง YPD 86
ก.13 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยวิธี Folin-Ciocalteu's (Wolfe et al., 2003) 86
ก.14 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH (Wu et al., 2006) 87
ก. 15 ชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์ 87
ภาคผนวก ข. การประเมินทางประสาทสัมผัส 89
ภาคผนวก ค. กราฟมาตรฐาน 90
ภาคผนวก ง. โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ 91
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 92

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

ตารางที่ 1 องค์ประกอบพื้นฐานของแก้วมังกรแดงสายพันธุ์ *Hylocereus undatus* และ *Hylocereus* ***polyrhizus*** 5

ตารางที่ 2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในไวน์และผลไม้ชนิดต่างๆ 9

ตารางที่ 3 สารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิของกระบวนการหมักไวน์ด้วยเชื้อยีสต์ *Kloeckera apiculata* (K). *Hanseniaspora guiltiermonaii* (H) และ *Saccharomyces cerevisiae* (S) ในรูปแบบการหมักแบบ pure mixed และ sequential cultures..... 30

ตารางที่ 4 องค์ประกอบพื้นฐานทางเคมีและกายภาพของแก้วมังกรแดงสายพันธุ์ *Hylocereus polyrhizus* 41

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของสารต้านอนุมูลอิสระของไวน์แก้วมังกรแดง 59

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกของไวน์แก้วมังกรแดง 60

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพ หน้า

รูปที่ 1 ลักษณะของผลแก้วมังกรแดงสายพันธุ์ *Hylocereus polyrhizus* 4

รูปที่ 2 โครงสร้างของแอนโธไซยานิน 13

รูปที่ 3 โครงสร้างของ betalamic acid (A), betaxanthins (B), and betacyanins (C) 14

รูปที่ 4 กระบวนการผลิตไวน์แดง 17

รูปที่ 5 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ของเชื้อยีสต์ 21

รูปที่ 6 ขั้นตอนการสร้างแอลกอฮอล์ใน glycolysis pathway 22

รูปที่ 7 กระบวนการหมักกลีเซอโร-ไพรูวิก 22

รูปที่ 8 กระบวนการ Ehrlich pathway 23

รูปที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม), ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด), ปริมาณประชากรของยีสต์ (กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 x 10^6 cfu/ml. (Max SD±1.2) 44

รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4 x 10^6 cfu/ml. (Max SD±1.2) 45

รูปที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. (Max SD±1.2) 46

รูปที่ 12 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomycodes ludwigii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. (Max SD±1.2) 49

รูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Pichia guilliermondii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. (Max SD±1.2) 50

รูปที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae 4019* และ *Saccharomycodes ludwigii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. (Max SD±1.2) 53

รูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Pichia guilliermondii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. (Max SD±1.2) 55

รูปที่ 16 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมลำดับส่วนระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae 4019* และ *Saccharomycodes ludwigii* ที่การเติมปริมาณเชื้อชนิดละ 4 x 10^6 cfu/ml (Max SD±1.2) 56

รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อผสมลำดับส่วนระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Pichia guilliermondii* ที่การเติมปริมาณเชื้อชนิดละ 4 x 10^6 cfu/ml (Max SD±1.2) 57

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

แก้วมังกรแดงเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน และมีการปลูกอย่างแพร่หลายในทวีปเอเชีย เช่น ไต้หวัน มาเลเซีย เวียดนาม และไทย เนื่องจากมีความเหมาะสมทางด้านภูมิประเทศที่ส่งเสริมให้แก้วมังกรแดงเจริญเติบโตได้ดี แก้วมังกรแดงมีรสชาติหวาน สีสันน่ารับประทาน และคุณค่าทางอาหารสูง แต่ไม่ได้รับความนิยมในการรับประทานเท่ากับแก้วมังกรขาว ทำให้ในบางครั้งปริมาณผลผลิตที่ได้ออกมามากจนเกินความต้องการของผู้บริโภคส่งผลให้มีการแปรรูปของผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิด แก้วมังกรแดงมีรงควัตุถสี่เหลี่ยมเป็นสารในกลุ่มเบทาเลน (Betalain) ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี และช่วยในการป้องกันโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ โรคเส้นเลือดในสมอง และโรคความดันสูง เป็นต้น (Homocysteine Studies, 2002; Hu et al., 2000; Morgenstern et al., 2009) แต่แก้วมังกรแดงเป็นผลไม้ที่ไม่มีรสชาติและกลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์ทำให้ผู้บริโภครู้สึกได้เฉพาะรสหวานเท่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับผลไม้ชนิดอื่นๆ และปริมาณน้ำตาลที่สูงกว่า 10 องศาบริกซ์นั้น ทำให้ผู้ที่มีความจำเป็นที่จะต้องควบคุมความหวานไม่สามารถบริโภคได้ ดังนั้นหากสามารถลดปริมาณน้ำตาลและเพิ่มรสชาติกลิ่นรสที่ดีแก่แก้วมังกรแดง โดยที่ยังคงรักษาคุณค่าทางโภชนาการและสีสันที่สวยงามไว้ได้จะเป็นการเพิ่มคุณค่าให้แก่แก้วมังกรแดงอีกด้วย ในการลดปริมาณน้ำตาลและเพิ่มเติมรสชาติให้แก่น้ำแก้วมังกรแดง แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจคือ การแปรรูปแก้วมังกรแดงเป็นเครื่องดื่ม โดยการลดปริมาณน้ำตาลด้วยเชื้อจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการเพิ่มสารประกอบหอมระเหยต่างๆ เป็นสารให้กลิ่นรสแก่เครื่องดื่มอีกด้วย

ยีสต์เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการใช้งานกันมาอย่างยาวนานตั้งแต่อดีตกาลและเป็นที่นิยมจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากมีความปลอดภัยที่สูงกว่าเชื้ออื่นๆ ยีสต์เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และในสภาวะไม่มีอากาศสามารถเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ได้ดีอีกด้วย โดยเฉพาะเชื้อยีสต์กลุ่ม Saccharomyces เช่น *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น ที่สามารถสร้างแอลกอออล์ได้สูงประมาณ 12 -14 เปอร์เซ็นต์ (Larue et al., 1980) นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการผลิตสารประกอบหอมระเหยที่ดี (Secondary metabolites) อีกด้วย โดยเฉพาะเชื้อยีสต์กลุ่ม Non- Saccharomyces เช่น *Saccharomycodes* และ *Hanseniaspora* เป็นต้น โดยสามารถสร้างสารประกอบต่างๆ เช่น n-propanol, isobutanol, isoamyl alcohol และ acetaldehyde เป็นต้น (Ciani & Maccarelli, 1997) ซึ่งสารที่เกิดขึ้นเหล่านี้สามารถช่วยเพิ่มกลิ่นรส และคุณลักษณะที่ดีให้แก่เครื่องดื่มได้ รวมทั้งยังมีความปลอดภัยทางอาหารอีกด้วย ด้วยลักษณะดังที่ได้กล่าวมานั้นเชื้อยีสต์จึงถูกนำมาใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ประเภทไวน์กันอย่าง

แพร่หลายในปัจจุบัน ทั้งนี้ในกระบวนการหมักไวน์ในปัจจุบันนั้นมีหลากหลายวิธี เช่น วิธีกระบวนการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว นั้นมีลักษณะเด่นที่สามารถแสดงลักษณะเฉพาะตัวของเชื้อจุลินทร์ได้ดี แต่หากต้องการความซับซ้อนของกลิ่นรสและมีปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงในระดับที่ต้องการแล้วนั้นจะใช้วิธีแบบเชื้อผสม (Multi starters) (Toro & Vazquez, 2002)

จากคุณสมบัติของเชื้อยีสต์ต่างๆ ที่สามารถใช้น้ำตาลในการสร้างแอลกอฮอล์และสร้างสารประกอบต่างๆ ที่ให้กลิ่นรสที่ดี ในงานวิจยนี้จึงมีความสนใจที่จะประยุกต์ใช้เชื้อยีสต์ประเภทต่างๆ รวมกับกระบวนการหมักที่หลากหลายเพื่อผลิตไวน์แก้วมังกรแดงที่มีคุณภาพที่ดีเพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่แก้วมังกรแดง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพื้นฐานของแก้วมังกรแดง หาปริมาณและชนิดของเชื้อยีสต์และกระบวนการหมักที่เหมาะสมในการผลิตไวน์แก้วมังกรแดง รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกในไวน์แก้วมังกรแดง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 แก้วมังกรแดง

แก้วมังกรแดงเป็นพืชประจำถิ่นที่เจริญเติบโตบริเวณเขตป่าร้อนชื้นของทวีปอเมริกากลาง (Nerd et al., 1999) จากนั้นบาทหลวงชาวฝรั่งเศสได้นำเข้ามาสู่ทวีปเอเชียเมื่อประมาณ 100 ปีที่แล้ว และเป็นที่นิยมเพาะปลูกในประเทศ ไต้หวัน, เวียดนาม, มาเลเซีย และไทย (Sengkhamparn et al., 2013) แก้วมังกรแดงมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Hylocereus polyrhizus* อยู่ในวงศ์เดียวกับพืชตระกูลกระบองเพชรคือ วงศ์ Cactaceae และมีชื่อเรียกทั่วไปที่หลากหลาย เช่น red dragon fruit หรือ pitaya หรือ pitahaya แก้วมังกรแดงนั้นมีหลากหลายสายพันธุ์จึงมีลักษณะของสีเนื้อและรูปลักษณ์ของเปลือกที่แตกต่างกัน แก้วมังกรแดงที่นิยมปลูกในประเทศไทยนั้น เป็นพันธุ์ที่ได้รับการผสมขึ้นมาใหม่จากประเทศไต้หวันซึ่งมีลักษณะทั่วไป ดังนี้

ลำต้น : ลำต้นมีลักษณะเป็นรูปทรงสามเหลี่ยมมีหนามเล็กๆ กระจายอยู่รอบๆ ตาคล้ายต้นกระบองเพชร เมื่อโตเต็มที่จะมีความสูงประมาณ 200 – 300 เซนติเมตร

ดอก : โคนดอกเป็นรูปกลมรี ขนาดประมาณ 7 – 8 เซนติเมตร บานในช่วงเวลากลางคืน เมื่อบานเต็มที่แล้วจะเหี่ยวแห้งร่วงหล่นลงมา

ผล : เปลือกมีลักษณะสีแดง ไม่มีหนาม แต่มีกลีบเลี้ยงมีสีเขียวหรือแดง ผลเป็นรูปทรงกลม มีขนาดเล็กกว่าพันธุ์เนื้อขาวเปลือกแดง เนื้อในมีสีแดง มีรสชาติหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย น้ำหนักประมาณ 200 – 500 กรัม ขนาดผลยาวประมาณ 10 เซนติเมตร มีเมล็ดสีดำคล้ายงาแทรกอยู่ตามเนื้อในของผลเป็นจำนวนมาก สามารถรับประทานได้ ดังรูปที่ 1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 1 ลักษณะของผลแก้วมังกรแดงสายพันธุ์ *Hylocereus polyrhizus*

ที่มา : www.floridahillnursery.com

แก้วมังกรแดงเป็นไม้เลื้อยลำต้นอ่อนจึงจำเป็นจะต้องมีหลักไว้สำหรับยึดเกาะ บริเวณด้านบนของเสาจะทำเป็นนั่งร้านให้กิ่งก้านของแก้วมังกรแดงสามารถยึดเกาะและแผ่ขยายออกไป แก้วมังกรแดงใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 8 – 10 เดือน ก็เริ่มออกผล โดยเริ่มจากการออกดอกที่บริเวณปลายกิ่ง มีลักษณะคล้ายกับดอกโบตั๋น ใช้เวลาประมาณ 2 – 3 วัน ดอกจะแห้งเหี่ยวและร่วงลงมา เหลือแต่ผลที่ยังคงมีกลีบเลี้ยงห่อหุ้ม หลังจากนั้นประมาณ 1 เดือนผลจะเริ่มแก่และสามารถเก็บเกี่ยวได้ โดยปกติใน 1 ปี ต้นแก้วมังกรแดงจะให้ผลผลิตได้ประมาณ 4 ครั้ง เริ่มตั้งแต่ช่วงเดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคมของทุกปี โดยต้นแก้วมังกรแดงจะเริ่ มให้ดอกชุดแรกประมาณเดือนมีนาคมและดอกชุดสุดท้ายในเดือนกรกฎาคม ผลแก้วมังกรแดงที่เก็บเกี่ยวจากต้นแล้วนั้น นิยมเก็บอยู่ในรูปของผลสดก่อนนำไปจำหน่ายพร้อมที่จะบริโภค หรือหากต้องการยืดอายุให้สามารถเก็บได้นานยิ่งขึ้น จะนำใส่ถุงพลาสติกแล้วแช่เย็น ซึ่งทำให้อยู่ได้อีกประมาณ 15 วัน โดยไม่เหี่ยวและเป็นการเพิ่มความหวานให้แก่แก้วมังกรแดงอีกด้วย

ผลไม้เป็นแหล่งของสารอาหารที่สำคัญ มีองค์ประกอบทางเคมีและแร่ธาตุต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของร่างกายและสุขภาพที่ดี แก้วมังกรแดงนั้นมีสารอาหารและแร่ธาตุต่างๆ ที่สำคัญ ได้แก่ วิตามินบี1 วิตามินบี2 วิตามินบี3 วิตามินซี โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ไฟเบอร์ ฟลาโวนอยด์ ไทอามิน ไนอาซิน ไพริดอกซิน โคบาลามิน ฟีนอลิก เบทาเลน เหล็ก แคโรทีน ฟอสฟอรัส และไฟโตอัลบูมิน (Le Bellec et al., 2006; Mizrahi & Nerd, 1999) พบว่าแก้วมังกรแดงสายพันธุ์ *Hylocereus undatus* ที่นิยมปลูกในประเทศมาเลเซีย เวียดนาม และบังคลาเทศนั้น มีองค์ประกอบ

ทางเคมีที่แตกต่างจากสายพันธุ์ *Hylocereus polyrhizus* ซึ่งเป็นแก้วมังกรแดงสายพันธุ์ที่นิยมปลูกของประเทศไต้หวัน และไทย ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันเหล่านี้นั้นมีผลต่อการนำแก้วมังกรแดงไปใช้ประโยชน์ เช่น การทำเจลลี่ สีผสมอาหาร เครื่องสำอาง แยม และน้ำแก้วมังกรแดง เป็นต้น

ตารางที่ 1 องค์ประกอบพื้นฐานของแก้วมังกรแดงสายพันธุ์ *Hylocereus undatus* และ *Hylocereus* ***polyrhizus***

องค์ประกอบทางเคมี	***Hylocereus undatus*** [A]	***Hylocereus polyrhizus*** [B]
ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	87.30	83.00
เถ้า (กรัม)	0.70	0.28
โปรตีน (กรัม)	0.16	0.23
ไขมัน (กรัม)	0.23	0.61
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	1.48	ND
ไฟเบอร์ (กรัม)	10.1	0.9
พีเอช	4.20 [C]	ND
น้ำตาลรีดิวซ์ (เปอร์เซ็นต์)	4.50 [C]	ND
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (องศาบริกซ์)	11.4 [C]	ND
น้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร)	ND	55.4 [D]
น้ำตาลฟรุตโตส (กรัม/ลิตร)	ND	19.2 [D]

ND = Not determined

ที่มา : A : Khalili et al. (2006) B : Jaafar et al. (2009)

C : Islam et al. (2012) D : Stintzing and Carle (2004)

ในโลกปัจจุบันที่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้สภาวะภูมิอากาศ สภาพแวดล้อม และที่อยู่อาศัยเกิดการเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย ซึ่งก่อให้เกิดมลภาวะมากมาย ที่ส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตและการบริโภคของประชากรโลกเป็นอย่างมาก พบว่า จากการบริโภคที่เปลี่ยนแปลงทำให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และกระเพาะอาหารเพิ่มขึ้นเป็นอันดับสองของการเสียชีวิตจากโรคมะเร็ง (Jemal et al., 2006) โดยมีอัตราการตายอยู่ที่ 870,000 คน หรือประมาณร้อยละ 12 ของการตายทั้งหมดจากโรคมะเร็ง (Parkin et al., 1993) ในปัจจุบันมีการบริโภคอาหารจานด่วนมีมากขึ้น เนื่องจากมีความสะดวกรวดเร็ว ราคาไม่แพง พกพาได้ง่าย และรับประทานได้ทุกเพศทุกวัย (French et al., 2000) ซึ่งก่อให้เกิดความเสี่ยงที่จะเป็นโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ (heart disease) โรคเส้นเลือดในสมอง (stroke) และโรคความดันโลหิตสูง (hypertension) เป็นต้น (Homocysteine Studies, 2002; Hu et al., 2000; Morgenstern et al., 2009) สาเหตุการเกิดของโรคต่างๆ ที่กล่าวมานั้น มักเกิดจากสารอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในร่างกายเกิดการสูญเสียสภาวะตามธรรมชาติ ก่อให้เกิดการยึดเกาะและสร้างความเสียหายแก่ระบบภายในที่มีอยู่เดิมให้มีการเปลี่ยนแปลงไป เช่น โรคหัวใจซึ่งมักเกิดจากสารอนุมูลอิสระเข้าไปอุดตันหลอดเลือดหัวใจส่งผลให้ระบบการไหลเวียนของกระแสเลือดหรือการทำงานของหัวใจผิดปกติไป เมื่อเกิดการอุดตันเกินร้อยละ 60 จะเริ่มแสดงสัญญาณของการเป็นโรคหัวใจ และพบว่าสาเหตุการเกิดโรคความดันโลหิตสูงนั้น ก็มีสาเหตุการเกิดที่คล้ายคลึงกับกรณีของโรคหัวใจ (Diaz et al., 1997; Padayatty et al., 2003)

2.2 สารอนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวอยู่วงนอกสุดของออร์บิทัล เกิดการขาดหายไปหนึ่งตัวหรือมากกว่า ทำให้เกิดความไม่เสถียร ส่งผลให้มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นสูงมากขึ้น โดยอนุมูลอิสระจะไปรับหรือให้อิเล็กตรอนจากสารที่อยู่ใกล้เคียงเพื่อให้ตัวเองมีความเสถียร ในขณะที่สารใกล้เคียงมีการสูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนไปนั้น ก็จะเกิดอิเล็กตรอนที่ไม่ครบคู่ ส่งผลให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระตัวใหม่ก็จะไปทำปฏิกิริยากับสารอื่นต่อไปเรื่อยๆ (Brand-Williams et al., 1995; Mahattanatawee et al., 2006) หากกลไกดังกล่าวเกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการใช้ออกซิเจนในระบบการเผาผลาญเพื่อสร้างพลังงาน ผ่านกระบวนการปฏิกิริยาออกซิเดชั่น กล่าวคือ ในสิ่งมีชีวิตออกซิเจนมีหน้าที่ในกระบวนการผลิตพลังงานและเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ซึ่งจะมีระบบการควบคุมการเข้าออกของออกซิเจนอย่างดี เพื่อลดความเป็นพิษจากการสะสมของออกซิเจนเพราะออกซิเจนถือว่าเป็นตัวออกซิไดซ์ที่รุนแรง เนื่องจากเซลล์ส่วนใหญ่ในร่างกายไม่ได้สัมผัสออกซิเจนมากนัก และพบว่าเมื่อระดับออกซิเจนในกระแสเลือดมีค่าต่ำกว่าในบรรยากาศมากๆ นั้น จะส่งผลให้เกิดการ

เปลี่ยนแปลงระดับโครงสร้างและหน้าที่การทำงานของสารชีวโมเลกุลต่างๆ ซึ่งทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ตามมาในลักษณะต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว และต้อกระจก (Singal et al., 1993)

สารอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่

- Superoxide anion radical (O^{2-}) พบในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนทุกชนิด O^{2-} เกิดจากการเติมอิเล็กตรอนอิสระหนึ่งตัวให้โมเลกุลออกซิเจน ทำให้ O^{2-} ไม่สามารถผ่านผนังเซลล์ได้ นอกจากจะนำไปผ่านบางกระบวนการก่อนส่งออกนอกเซลล์ พบว่า O^{2-} มีความสำคัญต่อร่างกายคือ ใช้ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมและกระตุ้นองค์ประกอบบางชนิดในเม็ดเลือดขาว เช่น นิวโทรฟิลและแมคโครฟาจ เป็นต้น (Ward et al., 1988) หากไม่มีสารตัวนี้จะทำให้ร่างกายมีความสามารถในการต่อต้านเชื้อโรคได้น้อยลง แต่ถ้าพบในปริมาณที่มากเกินไปจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตพลังงานและเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน และเมื่อร่างกายมี O^{2-} ในระบบมากจนเกินไปนั้น ร่างกายจะมีระบบสั่งการให้เซลล์ของผนังหลอดเลือดผลิตไนตริกออกไซด์ออกมาเพื่อใช้เป็นสารในการกำจัด O^{2-} ออกจากกระแสเลือดให้อยู่ในรูปของไนเทรทไอออน แล้วจึงค่อยนำออกจากระบบต่อไป

- Hydrogen peroxide (H_2O_2) สารนี้เกิดจากการเติมอิเล็กตรอนอิสระสองตัวให้โมเลกุลออกซิเจนจนเกิดเป็น O_2^{2-} ซึ่งไม่มีอิเล็กตรอนขาดคู่และไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระและเมื่ออยู่ในระดับพีเอชของร่างกายปกติจะมีการรับโปรตรอนเกิดขึ้นกลายเป็น H_2O_2 ในร่างกายของมนุษย์ทั่วไปนั้น H_2O_2 ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณระดับเซลล์ แต่หากมีมากจนเกินไปจะกลายเป็นตัวออกซิไดซ์เข้าทำลายผนังเซลล์ โปรตีน และดีเอ็นเอ ให้เสียหาย ส่งผลทำให้ Ca^{2+} รั่วไหลออกจากแหล่งเก็บภายในเซลล์แล้วไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ไปทำลายระบบการสร้างพลังงานของเซลล์ เช่น เอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลติก ทำให้เซลล์ขาดแคลนพลังงานและตายไปในที่สุด (Freeman & Crapo, 1982)

- Hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) สารชนิดนี้สามารถเกิดได้จากหลายปฏิกิริยา เช่น เกิดจากโมเลกุลน้ำในร่างกายแตกตัว เกิดจากการแตกของพันธะ O-O ของ H_2O_2 เกิดจากการรับรังสีหรือความร้อน หรือเกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 กับ O_2 โดยอัตราการเกิด $OH^{\bullet}$ในร่างกายโดยอาศัยการแตกตัวของสารตั้งต้นอย่างเดียวนั้นต่ำมาก แต่หากเราผสม H_2O_2 กับเกลือของเหล็ก ก็จะทำให้เกิดการเร่งการสร้างได้มากขึ้น เนื่องจากโลหะไอออนสามารถรับอิเล็กตรอนส่วนเกินทำให้แตกพันธะ O-O ได้ง่าย ทองแดง (Cu^{1+}) ก็สามารถเร่งปฏิกิริยาสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลได้ด้วยอัตราที่รวดเร็วกว่าเหล็ก (Aruoma et al., 1989)

เนื่องจาก H_2O_2 และ เกลือของเหล็กหรือทองแดง สามารถพบได้ในร่างกายจึงมีการสร้าง OH• อยู่ตลอดเวลา โดยอัตราในการสร้างจะขึ้นอยู่กับค่าพีเอชของร่างกาย OH• มีอัตราการทำปฏิกิริยาที่สูงมาก ทำให้สามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลทุกอย่างที่พบในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ แต่เนื่องจาก OH• นั้นไม่สามารถผ่านเข้าออกเซลล์ได้และมีช่วงอายุที่สั้นมาก ดังนั้นจึงมักทำปฏิกิริยากับผนังเซลล์ที่พบใกล้ที่สุดโดยเฉพาะของหมู่คาร์บอนิลที่เชื่อมอยู่กับกรดไขมันและกลีเซอรอลบนโมเลกุลของฟอสโฟลิปิดในอวัยวะของร่างกายที่มีสารรีดิวซ์สูงและสัมผัสออกซิเจนมาก เช่น นัยน์ตาและปอด

- Singlet oxygen ($^1O_2$) เกิดจากการดึงอิเล็กตรอนอิสระหนึ่งตัวออกจากโมเลกุลออกซิเจนหรือเติมพลังงานให้แก่โมเลกุลออกซิเจนนั่นคือ $^1O_2$ เป็นภาวะกระตุ้นของ O_2 ทำให้ $^1O_2$ ไม่มีอิเล็กตรอนคู่อิสระและไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระอีกต่อไป พบได้มากในบริเวณที่สารชีวภาพสัมผัสกับออกซิเจน เช่น เลนส์เรตินาและผิวหนัง $^1O_2$ ในร่างกายมักทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณ แต่หากมีมากเกินไป $^1O_2$ เข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับกรดไขมันอิ่มตัวของผนังเซลล์เกิดเป็น Peroxide radical (Escobar et al., 1996)

- Peroxynitrite (ONOO•) เป็นสารออกซิไดซ์อย่างแรง เกิดจาก NO• ทำปฏิกิริยาสร้างพันธะโคเวเลนท์กับ O_2^- อย่างรวดเร็ว ได้เป็น ONOO• สำหรับ NO• เป็นตัวส่งสัญญาณที่สำคัญและเป็นอนุมูลอิสระที่สร้างโดยเซลล์บุผนังหลอดเลือด เซลล์สมอง และเซลล์เม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ NO• ยังมีหน้าที่ควบคุมการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบรอบหลอดเลือด การส่งกระแสสัญญาณประสาท และสามารถป้องกันเซลล์ผนังหลอดเลือดจากภาวะ Oxidative damage (Santos et al., 1999)

- Peroxyl radical (LOO•) เป็นสารที่เกิดจากการที่ OH• เข้าทำปฏิกิริยากับฟอสโฟลิปิดของผนังเซลล์ในส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหรือในบริเวณที่มีพันธะคู่มากโดยเฉพาะที่กรดไขมันตำแหน่งที่ 2 ของกลีเซอรอลฟอสโฟลิปิด เช่น phosphatidylcholine และ arachidonic เป็นต้น จนเกิดเป็น hydroxyl aldehydes พบว่า LOO• ที่เกิดขึ้นทำปฏิกิริยากับกรดไขมันตัวอื่นนั้นเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อเนื่องเรียกว่า lipid peroxidation รวมทั้งทำให้เกิดการออกซิเดชั่นของโปรตีนบนผนังเซลล์ด้วย ทำให้ผนังเซลล์สูญเสียความยืดยุ่น และองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์เกิดการหลุดออกส่งผลทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Pieri et al., 1994)

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าร่างกายจะมีการสร้างอนุมูลอิสระจากกระบวนการเผาผลาญต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย จะเห็นว่าหากพบมากเกินไปร่างกายก็จะได้รับความเสียหายด้วยเช่นกัน จึงมีการสร้างระบบป้องกันความเสียหายจากปฏิกิริยาดังกล่าวนี้ด้วยวิธีต่างๆ โดยหนึ่งในนั้นคือการสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ขึ้นมา ซึ่งประกอบไปด้วยสารและเอนไซม์ต่างๆ ที่แม้ว่ามีความเข้มข้นต่ำ แต่ก็ยังสามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอนุมูลอิสระ

ได้ หากพบว่ามีการเสียสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและระบบต้านอนุมุลอิสระ กล่าวคือ มีสภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินกว่าที่ระบบต้านอนุมุลอิสระจะป้องกันได้ จนเกิดภาวะ oxidative stress ขึ้นมา ส่งผลให้อนุมุลอิสระที่ยังเหลืออยู่นั้นทำลายเซลล์ให้เกิดความเสียหายหรือเป็นต้นเหตุของโรคต่างๆ ตามมาในที่สุด

ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น ผู้คนในปัจจุบันจึงเริ่มสนใจที่จะดูแลสุขภาพกันมากขึ้น มีการบริโภคอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น อาหารเสริมต่างๆ แต่อาหารเสริมทั่วไปจะมีราคาที่แพงและมีรสชาติที่ไม่ค่อยถูกปากนัก จึงนิยมที่จะบริโภคผักและผลไม้ซึ่งหาได้ง่าย มีราคาที่ถูกกว่า และรสชาติที่ดีกว่านั้นเอง ในปัจจุบันมีผลไม้หลากหลายชนิดที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคภัยต่างๆได้ (MatÉs et al., 1999) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในไวน์และผลไม้ชนิดต่างๆ

ชนิด	**ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ มิลลิกรัมต่อ100กรัม**
ส้ม (*Citrus sinensis)* [A]	211 ± 11.8
เชอร์รี่ (*Prunus avium*) [C]	165 ± 12.8
แอปเปิ้ล (*Malus domestica*) [C]	143 ± 47.3
องุ่นแดง (*Vitis vinifera*) [A]	137 ± 13.0
แก้วมังกรแดง (*Hylocereus polyrhizus*) [A]	79 ± 0.02
มะละกอสุก (*Carica papaya*) [A]	46 ± 5.1
อะโวกาโด (*Persea americana Mille*) [C]	41± 6.4
ไวน์แดง [C]	196 ± 0.1
ไวน์ขาว [C]	30 ± 1.9
ที่มา A : (Vijaya Kumar Reddy et al., 2010) B : (Normala & Mardhiah Hayati Abdul, 2010) C : (Floegel et al., 2011)	

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน และป้องกันไม่ให้เกิดการดึงอิเล็กตรอน โดยเข้าไปจับกับสารอนุมูลอิสระแล้วทำให้สารอนุมูลอิสระ ไม่สามารถทำปฏิกิริยาสร้างความเสียหายได้อีกต่อไป โดยทั่วไปร่างกายมีสารต้านออกซิเดชั่นหลายชนิด ไม่ว่าจะอยู่ในรูปของเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase), เอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) และเอนไซม์แคททาเลส (catalase) เป็นต้น หรืออยู่ในรูปที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น ทองแดง สังกะสี วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี บิลิรูบิน และกรดยูริก เป็นต้น (Liebler, 1993; Machlin & Bendich, 1987; Seddon et al., 1994) สารต้านอนุมุลอิสระ สามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ 1. ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ 2. ดักจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น และ 3. ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ (Thaipong et al., 2006) สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในปัจจุบันมีมากมายหลายชนิดขึ้นอยู่กับการนำไปใช้งาน จึงนิยมจำแนกประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระตามแหล่งที่มาสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้ดังนี้ คือ

2.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ส่วนใหญ่จะถูกออกแบบโดยใช้โครงสร้างสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในธรรมชาติมาดัดแปลงให้มีฤทธิ์ที่ดียิ่งขึ้น เช่น สารต้านอนุมูลอิสระที่พัฒนามาจากโครงสร้างของวิตามินอีหรือโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก อย่างไรก็ตามแม้ว่าสารสังเคราะห์เหล่านี้จะมีประสิทธิภาพและความเสถียรมากกว่าสารตามธรรมชาติ แต่ก็มีข้อจำกัดในด้านผลข้างเคียงของการใช้ หากนำไปใช้ในปริมาณที่มากจนเกินไป ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ได้แก่

- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) มีสูตรโมเลกุลทางเคมี คือ $C_{14}H_{18}O_4$ เป็นการดัดแปลงโครงสร้างของอนุพันธ์วิตามินอี ทำให้มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้นและจากความสามารถดังกล่าวจึงทำให้ trolox สามารถออกฤทธิ์ได้รวดเร็วกว่าวิตามินอี กล่าวคือ การออกฤทธิ์ของวิตามินอีต้องใช้เวลานานเป็นหลายชั่วโมง ในขณะที่ trolox สามารถออกฤทธิ์ได้ทันที ดังนั้นในงานวิจัยจึงนิยมใช้ trolox เป็นสารมาตรฐานในการตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (Doba et al., 1985)

- Gallic acid (3,4,5-hydroxybenzoic acid) มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_7H_6O_5$ เป็นส่วนประกอบของเทนนิน พบมากในองุ่น, ใบชา, เปลือกไม้โอ๊ค และพืชอื่นๆ โดยทั่วไปจะใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมทางยา คุณสมบัติของกรดแกลลิกคือ สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีอีกด้วย (Yilmaz & Toledo, 2003)

- EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_{10}H_{16}N_2O_8$ มีคุณสมบัติสามารถจับกับธาตุโลหะที่มีประจุ เช่น ตะกั่ว เหล็ก สังกะสี แคดเมียม และทองแดง มีประโยชน์ทางการแพทย์โดยนำมาใช้กำจัดไอออนของโลหะต่างๆ ได้ (Hininger et al., 2005)

2.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วๆ ไป โดยอาจอยู่ในรูปของวิตามินหรือสารพฤกษเคมีที่มีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก เช่น ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติกำลังเป็นเรื่องที่ได้รับความนิยม และมีการศึกษากันอย่างกว้างขว้าง เนื่องจากแนวคิดในเรื่องการประยุกต์ใช้สารจากธรรมชาติ เพื่อส่งเสริมสุขภาพให้ดีและมีความปลอดภัยมากขึ้น ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ได้แก่

- วิตามินซี หรือกรดแอสคอร์บิก (ascobic acid) เป็นวิตามินที่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี มีฤทธิ์เป็นกรด สลายตัวอย่างรวดเร็ว และมีความว่องไวต่อออกซิเจนสูง มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ เข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลไฮดรอกซิลอนุมูลเพอร์ออกไซด์ อนุมูลไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ นอกจากนี้ยังเป็นตัวเสริมประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอีอีกด้วย (Paolini et al., 1999)

- วิตามินอี หรือโทโคฟีรอล (tocopherol) เป็นวิตามินที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสามารถละลายในไขมันได้ดี โดยวิตามินอีเป็นสารที่ไวต่อการถูกออกซิไดซ์มากจึงนิยมใช้เป็นตัวถูกออกซิไดซ์ทดแทนสารอื่นที่มีความไวน้อยกว่า นอกจากนี้ยังสามารถทำงานได้ดียิ่งขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ เช่น วิตามินซี และซิลีเนียม เป็นต้น ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลากหลายชนิด โดยจะแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ tocopherols และ tocotrienols และในแต่ละกลุ่มจะแยกเป็นวิตามินย่อยๆได้อีก 4 ชนิด ได้แก่ alpha, beta, gamma และ delta ซึ่งกลุ่ม alpha tocopherols จัดเป็นกลุ่มที่มีบทบาทสำคัญในด้านการปกป้องเซลล์เมมเบรนจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ลิปิดเพอร์ออกซิเดชั่น (lipid peroxidation chain reaction) ของอนุมูลอิสระ (Ascherio et al., 1999)

- สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) เป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี โดยทั่วไปจะมีฤทธิ์เป็นกรด สารประกอบฟีนอลิก ที่พบอยู่ในพืชตามธรรมชาตินั้นนอกจากมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลิก ด้วยกันเองแล้วนั้น พบว่ามีการรวมตัวกับสารอื่นๆ ด้วย เช่น รวมตัวกับโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ หรืออาจจะรวมตัวกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก กรดอินทรีย์ หมู่เอมีน และไขมันอีกด้วย สารประกอบฟีนอลิก ในธรรมชาติมีอยู่หลายชนิด เช่น สารประกอบฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก กรดไฮโดรซินามิกและอนุพันธ์หรือสารลิกนิน เป็นต้น (Cai et al., 2004; Robards et al., 1999)

สารประกอบฟีนอลิก มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยจะทำหน้าที่ดักจับอนุมูลอิสระ ดักจับไอออนของโลหะ ยับยั้งการเกิดลิปิดเพอร์ออกิเดชั่น ลดการเกิดอนุมูลไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และโลหะหนักที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนหรือไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ หรือกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟอย่างรวดเร็ว ทำให้อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกเสถียร จึงไม่มีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นอีกต่อไป นอกจากนี้อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิก บางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นต่อไปได้อีกด้วย เพิ่มเพื่อประสิทธิภาพการทำงานจึงช่วยทำให้สามารถลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้มากขึ้นอีก จากเหตุผลที่กล่าวมา ทำให้สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่งในปัจจุบัน (Kähkönen et al., 1999; Zheng & Wang, 2001)

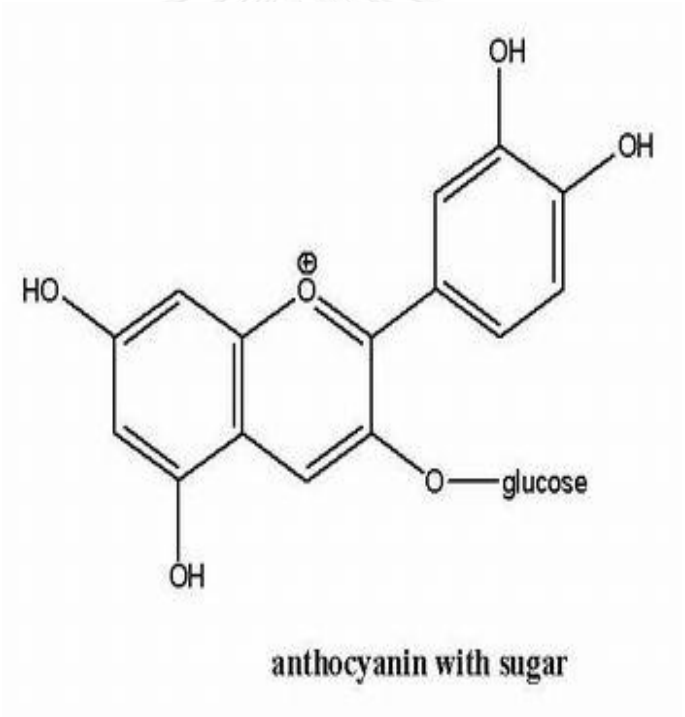
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

- สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกชนิดหนึ่ง มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารนั้นเป็นหลัก สารฟลาโวนอยด์มีหลายชนิด เช่น แอนโธไซยานิน (anthocyanin), ฟลาโวโนนส์ (flavonones), ฟลาวาน-3-ออลส์ (flavan-3-ols), แทนนิน (tannin) หรือ โปรแอนโธไซยานิดิน (proanthocyanidins) เป็นต้น

สารประกอบฟลาโวนอยด์จะทำหน้าที่ดักจับอนุมูลอิสระหรือ ไอออนของโลหะ โดยสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของฟลาโวนอยด์มีตำแหน่งและจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลที่ทำให้เกิดการต้านอนุมูลอิสระ กล่าวคือ หมู่ไฮดรอกซิลของวงแหวนบี ซึ่งถือว่าเป็นปัจจัยที่ใช้พิจารณาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่าตำแหน่ง 3 และ 4 -ไฮดรอกซิลของวงแหวนบีจะมีผลอย่างมากต่อการมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้การที่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ห้า ของวงแหวนเอ

หรือคาร์บอนตำแหน่งที่สามของวงแหวนซี ร่วมกับหมู่คีโตนที่คาร์บอนตำแหน่งที่สี่ของวงแหวนซี จะทำให้มีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับโลหะมากขึ้น ซึ่งเป็นการช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้อีกทางหนึ่ง ส่วนตำแหน่งที่สามของไฮดรอกซิลของวงแหวนซีและพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่สองและสามในวงแหวนซีนั้น จะมีผลเล็กน้อยต่อคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้จำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลก็มีผลต่อคุณสมบัติดังกล่าวอีกด้วย (Robak & Gryglewski, 1988)

- แอนโธไซยานิน (Anthocyanin) เป็นรงควัตถุสี่เหลี่ยมหรือน้ำเงินม่วงที่มีความสามารถละลายน้ำได้ดี พบได้ในพืช จัดเป็นสารประกอบฟีนอลิก อยู่ในกลุ่มสารฟลาโวนอยด์ โดยแอนโธไซยานินประกอบด้วยส่วนที่เป็นน้ำตาลและส่วนที่เป็นแอนโธไซยานิดิน มีโครงสร้างพื้นฐานทางเคมีประกอบด้วยวงแหวน benzopyran จำนวน 2 วง ต่ออยู่กับวงแหวน phenyl จำนวน 1 วง ซึ่งจะมีน้ำตาลมาติดอยู่ เช่น กลูโคส กาแลคโตส และอาราบิโนส เป็นต้น ดังรูปที่ 2



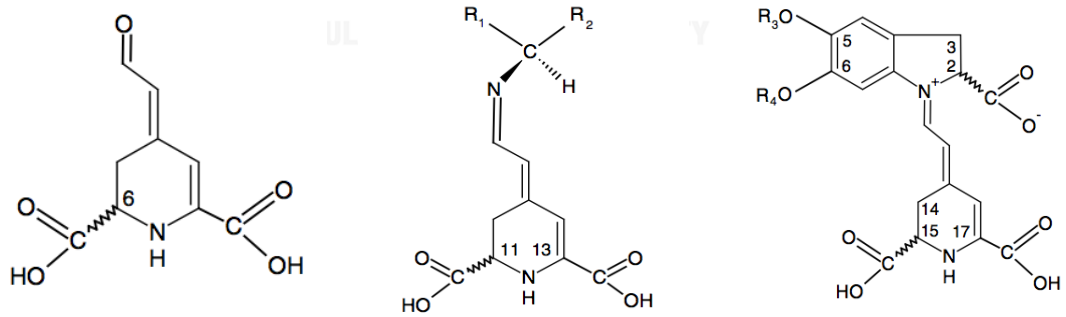
รูปที่ 2 โครงสร้างของแอนโธไซยานิน
ที่มา : http://harvardforest.fas.harvard.edu/

ในปัจจุบันมีการค้นพบแอนโธไซยานินแล้วมากกว่า 400 ชนิด โดยจะแบ่งตามชนิดของสารแอนโธไซยานิดินและน้ำตาลที่มาจับ พบว่าแอนโธไซยานิดินที่เป็นส่วนประกอบในแอนโธไซยานินที่พบมากในผักและผลไม้มีเพียง 6 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ pelargonidin, peonidin, cyanidin, malvidin,

petunidin และ delphinidin โดยในพืชแต่ละชนิดก็จะมีอัตราส่วนของแอนโธไซยานินแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดและองค์ประกอบของพืชนั้นๆ (Iglesias et al., 2008; Kalt et al., 1999; Zafra-Stone et al., 2007)

- เบทาเลน (Betalain) เป็นรงควัตถุสีแดงหรือเหลืองที่พบได้ในธรรมชาติ ได้แก่ บีทรูท หงอนไก่ บานไม่รู้โรย เฟื่องฟ้า แก้วมังกร และเห็ดในจีนัส Amanita โดยมีสารโคลีน (choline) เป็นสารตั้งต้นในการสร้างเป็นเบทาเลน (Mar & Zeisel, 1999) ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ Chromoalkaloids เป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิที่พบในออเดอร์ Caryophyllales แต่ยกเว้นแฟมิลี่ Caryophyllaceae และ Molluginaceae (Sepúlveda-Jiménez et al., 2004)

รงควัตถุชนิดนี้มีอยู่ด้วยกัน 2 กลุ่มคือ เบต้าไซยานิน (Betacyanin) ที่ให้สีในสีม่วงแดง และเบต้าแซนทีน (Betaxanthin) ที่ให้สีเหลือง ในเชิงโครงสร้างทางเคมีเบทาเลนเป็นอนุพันธ์ของกรดเบทาลามิก (Betalamic acid) โดยเบต้าไซยานินจะอยู่ในรูปที่มีน้ำตาลมาต่อได้เป็นไกลโคไซด์ (glycoside) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น 5-o-glycoside ส่วนของเบต้าแซนทีนนั้นมีหมู่เอมีนหรือกรดอะมิโนอยู่ด้วย (Cai et al., 2003, 2005; Stintzing & Carle, 2004) ดังรูปที่ 3 การเกิดสีของเบทาเลนขึ้นอยู่กับอัตราส่วนโครงสร้างของเบต้าไซยานินและเบต้าเซนทีน เช่น หัวบีทมีปริมาณเบต้าไซยานินอยู่ 95 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้เกิดสีแดงเข้ม (Girod & Zryd, 1991)



รูปที่ 3 โครงสร้างของ betalamic acid (A), betaxanthins (B), and betacyanins (C)

ที่มา : (Herbach et al., 2006)

ในแก้วมังกรแดงมีรงควัตถุที่ให้สีแดงนั้นคือเบต้าไซยานินมีคุณสมบัติคือ สามารถละลายน้ำได้ดี สีจะไม่เปลี่ยนแปลงตามพีเอชจึงไม่มีคุณสมบัติเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีแล้ว จะไม่สามารถย้อนกลับคืนดังเดิมได้ (irreversible) ในทางอุตสาหกรรมนิยมใช้เป็นสีผสมอาหารสีแดง ในอาหารชนิดต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ที่มีเจลาตินเป็นส่วนผสม ผลไม้แปรรูป ซอส ลูกวาด และเครื่องดื่ม เป็นต้น เพื่อทดแทนสีแดงจากบีทรูทที่ให้กลิ่นรสที่ไม่พึ่งประสงค์ (Kujala et al., 2002) ในปัจจุบันจึงเปลี่ยนมาใช้สีผสมอาหารสีแดงของแก้วมังกรแดงแทน นอกจากจะมีความสามารถในด้านสีแล้ว ยังมีประโยชน์ด้านสุขภาพ เนื่องจากเบตาเลนที่พบในแก้วมังกรแดงนั้นเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี พบว่าสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าวิตามินซี สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเนื้องอกได้หลายชนิด รวมถึงเป็นสารต้านไวรัสและแบคทีเรียอีกด้วย เหมาะสำหรับผู้ที่มีความต้องการลดน้ำหนัก เนื่องจากมีแคลอรีต่ำ เส้นใยอาหารสูง และมีส่วนช่วยลดคอเลสเตอรอล แก้อาการท้องผูก ป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ แก้วมังกรยังช่วยควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดไม่ต้องพึ่งอินซูลินด้วย (Kanner et al., 2001)

2.3 ไวน์

การทำไวน์ (Enology) ถือว่าเป็นศิลปะแขนงหนึ่ง เป็นที่เกิดจากการประยุกต์นำศาสตร์ 3 แขนงเข้ามารวมกันเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตไวน์ คือ สาขาชีวเคมี เพื่อศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ และกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารประกอบอินทรีย์เป็นสารให้กลิ่นรสในไวน์ สาขาจุลชีววิทยา เพื่อศึกษาถึงกระบวนการหมักและสภาวะในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์และ แบคทีเรีย และสุดท้าย สาขาพฤกษศาสตร์ เพื่อศึกษากระบวนการเพาะปลูกและคัดเลือกวัตถุดิบ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการทำไวน์ให้มีคุณภาพตามที่ต้องการ (Ribéreau-Gayon et al., 2006) ไวน์ (Wine) เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในประเภทของสุราแช่ ไวน์ที่ผลิตในเชิงพาณิชย์ส่วนใหญ่ใช้องุ่นในกระบวนการหมัก ไวน์ที่ผลิตจากท้องถิ่นต่างๆ จะมีรสชาติที่แตกต่างกันออกไป รสชาติที่เฉพาะของไวน์นั้นจะเกิดจากสายพันธุ์ขององุ่นที่ใช้ วิธีการปลูก การเก็บเกี่ยว การหมัก และการบ่มไวน์ สายพันธุ์องุ่นที่นิยมนำมาปลูกเพื่อผลิตไวน์มากที่สุดคือ *Vitis vinifera* แต่นอกจากนี้ไวน์บางท้องถิ่นอาจผลิตโดยองุ่นสายพันธุ์อื่นและสายพันธุ์ลูกผสมต่างๆ เช่น *Vitis labruca Vitis rotundifolia Vitis rupestris Chenin blanc* และ *Cabernet Sauvignon* เป็นต้น (Bowers & Meredith, 1997; Jolly et al., 2003; Thudichum & Dupre, 1872) แต่ไวน์ที่ผลิตในครัวเรือนเพื่อบริโภคนั้น อาจใช้ผลไม้ที่มีอยู่ตามฤดูกาลหรือภูมิประเทศนั้นๆ ซึ่งจะให้กลิ่นและรสชาติที่โดดเด่นเฉพาะตัวแตกต่างออกไปจากการหมักด้วยองุ่น ไวน์ที่ใช้ผลไม้ชนิดอื่นนอกเหนือจากองุ่นในการผลิตจะเรียกว่า ไวน์ผลไม้ (Fruit wine) โดยจะเรียกชื่อผลไม้ก่อนแล้วจึง

ตามหลังด้วยคำว่าไวน์ เช่น Apple Wine, Kiwi wine และ Pineapple wine เป็นต้น (Muller et al., 1964; Shoseyov et al., 1990)

การแบ่งประเภทของไวน์นั้นโดยทั่วไปจะแบ่งตามสี ความหวาน ปริมาณแอลกอออล์ ลักษณะคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปรากฏ พื้นที่เพาะปลูกองุ่นและแหล่งผลิตไวน์ แต่อย่างไรก็ตามหากแบ่งตามลักษณะของการผลิตไวน์นั้นสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ เทเบิลไวน์ สปาร์คกลิ้งไวน์ และฟอร์ติไฟไวน์ ดังนี้

1. เทเบิล ไวน์ (Table wine) เป็นไวน์ไม่มีฟอง มีปริมาณแอลกอฮอล์ประมาณ 9 – 14 เปอร์เซ็นต์ที่ได้จากกระบวนการหมักตามธรรมชาติ ไม่มีการเติมสารใดลงไป (Oczkowski, 1994) ซึ่งสามารถแบ่งได้ตามสีของไวน์ จะสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

- ไวน์แดง (red wine) ทำจากองุ่นดำที่ผ่านกระบวนการหมักทั้งเปลือกและเนื้อ มีลักษณะสี่เหลี่ยมอ่อนๆ จนถึงเข้ม ขึ้นอยู่กับประเภทขององุ่นที่นำมาใช้ มีลักษณะเด่นคือ มีรสชาติความฝาด กลิ่น ความเข้มข้น และความหวานมากกว่าไวน์ชนิดอื่นๆ

- ไวน์ขาว (white wine) เป็นไวน์ที่ทำจากองุ่นเขียวหรือองุ่นชนิดใดก็ได้ โดยจะนำมาเฉพาะน้ำมาหมักเป็นไวน์ มีลักษณะสีเหลืองอ่อนจนถึงสีน้ำตาล มีลักษณะเฉพาะคือ รสชาติอ่อนและกลิ่นน้อย

- ไวน์โรเซ่ (Rosé wine หรือ Pink wine) ทำจากองุ่นดำหรือองุ่นแดงที่ผ่านกระบวนการหมักเช่นเดียวกับไวน์แดง แต่จะมีการกรองเปลือกและเนื้อออกจากน้ำหมัก โดยทั่วไปใช้เวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง ทำให้ไวน์ที่ได้นั้นมีลักษณะเป็นสีชมพูอ่อนจนเกือบแดง

2. สปาร์คกลิ้ง ไวน์ (Sparkling wine) มักเป็นไวน์คุณภาพดี เนื่องจากนิยมนำองุ่นที่มีคุณภาพดีมาผลิตเป็นไวน์ มีปริมาณแอลกอฮอล์ประมาณ 9 -14 เปอร์เซ็นต์และมีฟองก๊าซที่จากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากกระบวนการหมักครั้งที่สองภายในขวดไวน์ (secondary fermentation) เมื่อเปิดขวดและรินใส่แก้วจึงเกิดฟองก๊าซและความซ่าเมื่อดื่ม เช่น แชมเปญ (champagne) (Riu-Aumatell et al., 2006) นิยมดื่มฉลองในโอกาศพิเศษต่างๆ

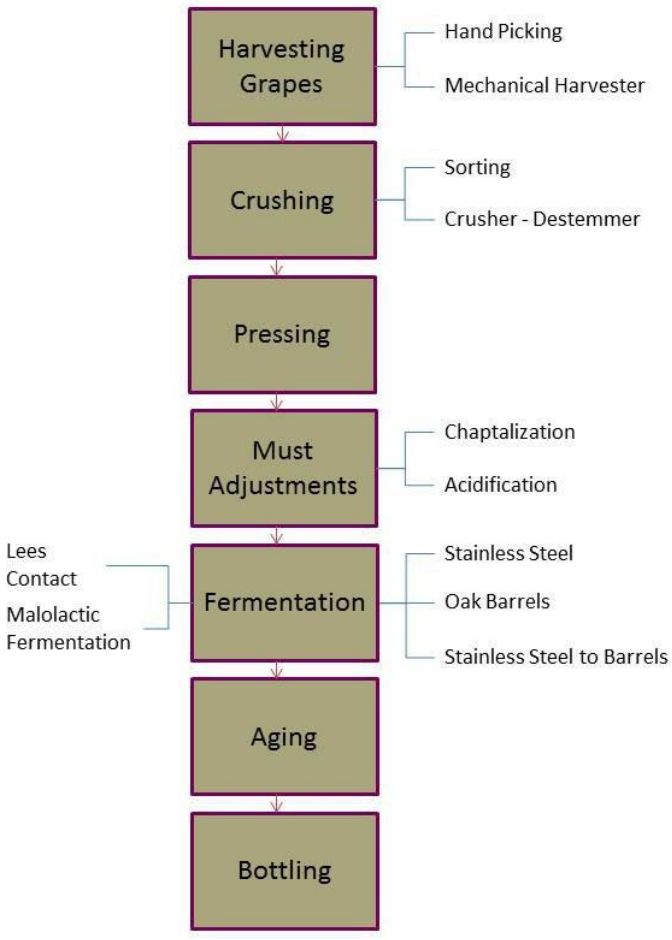
3. ฟอร์ติไฟด์ ไวน์ (Fortified wine) เป็นไวน์ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงประมาณ 16 – 23 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บไว้นานกว่าเทเบิลไวน์และสปาร์คกลิ้งไวน์ ในกระบวนการผลิตจะมีการเติมแอลกอฮอล์ที่ได้จากกระบวนการกลั่นเหล้าองุ่นหรือจากตัววัตถุดิบเองลงไป (Cutzach et al., 1999) ไวน์ที่จัดอยู่ในประเภทนี้ได้แก่ พอร์ต (port) เชอร์รี (sherry) มาเดียรา (madiera) มาร์ซาลา (marsala) เป็นต้น สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

- แอปพิไทเซอร์ ไวน์ (Appetizer wine) เป็นไวน์ที่เติมสารให้กลิ่นรสและสารสกัดตามธรรมชาติลงไปตามต้องการ ก่อนนำไปบรรจุขวด เป็นไวน์ที่ใช้สำหรับเรียกน้ำย่อย ก่อนรับประทานอาหาร

- ไวน์หวาน (Dessert wine) เป็นไวน์ที่ไม่มีการเติมกลิ่นรสและสารสกัดตามธรรมชาติ แต่มีลักษณะที่แตกต่างจากไวน์ธรรมดาคือ มีรสหวาน กลิ่นรส และแอลกอฮอล์มากกว่าไวน์ชนิดอื่นๆ

2.4 กระบวนการผลิตไวน์

กระบวนการผลิตไวน์นั้นประกอบด้วยกระบวนการเตรียมน้ำหมัก กระบวนการหมัก และกระบวนการหลังการหมัก โดยแสดงขั้นตอนดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 กระบวนการผลิตไวน์แดง

ที่มา : http://www.corkquiz.com

ในกระบวนการผลิตไวน์จะนำองุ่นที่ได้จากการเก็บเกี่ยวมาคัดแยกกิ่งก้านและใบออกจนหมด แล้วจึงทำการบดองุ่นและเมล็ดไปพร้อมๆ กัน ในขั้นตอนนี้น้ำองุ่น เอนไซม์ รวมทั้งสารให้กลิ่นรสต่างๆ ออกมาจากองุ่น ถูกแช่ไปพร้อมๆ กับองุ่นที่ผ่านกระบวนการบด ระยะเวลาการแช่นั้นจะขึ้นอยู่กับวิธีการและชนิดของไวน์ที่จะหมัก ในกระบวนการหมักสำหรับไวน์ขาวนั้นจะทำการแยกเปลือกออกจากน้ำหมักเพื่อไม่ให้เกิดสีในไวน์ขาว สำหรับไวน์แดงนั้นจะทำการหมักไปพร้อมกันทั้งเนื้อ เปลือก และเมล็ด เนื่องจากต้องการให้แอลกอฮอล์ที่ได้นั้นไปทำการสกัดสี แทนนิน และฟลาโวนอลย์ ออกมาให้ได้มากที่สุด ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 – 3 สัปดาห์ แต่สำหรับไวน์โรเซ่นั้น จะให้เนื้อและเปลือกองุ่นในถังหมักอยู่ในระยะเวลาอันสั้นเท่านั้นหลังจากเติมลงในถังหมักคือประมาณ 24 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสีที่ต้องการ อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการหมักไวน์แดงและไวน์โรเซ่นั้นอยู่ที่ประมาณ 24 - 27 องศาเซลเซียส และไวน์ขาวอยู่ที่ประมาณ 10 -15 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ไวน์แดงส่วนใหญ่จะมีกระบวนการหมักมาโลแลคติกและการบ่มเพื่อเพิ่มกลิ่นที่ดียิ่งขึ้น กระบวนการทำให้ใสในไวน์โดยทั่วไปนั้นจะเติมสารที่ช่วยเร่งการตกตะกอนของไวน์ด้วย สารซึ่งนิยมใช้คือ สารเบนโทไนท์ เนื่องจากมีความปลอดภัยและสามารถตกตะกอนได้ดี (Mihucz et al., 2006) แล้วจึงนำไวน์ที่ได้ไปผ่านกระบวนการกรองด้วยกระดาษแบบต่างๆ เช่น เซลลูโลส พอลิเมอร์สังเคราะห์ หรือแผ่นกรองอินทรีย์และอนินทรีย์ เป็นต้น (Ribéreau-Gayon et al., 2006) เมื่อได้ไวน์ที่ผ่านกระบวนการกรองจะทำการบรรจุขวด จากนั้นเติมสารโพแตสเซียมเมตาไบซัลไฟต์เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชันและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของไวน์ ซึ่งส่งผลต่อกลิ่นรสในไวน์

2.4.1 กระบวนการเตรียมน้ำผลไม้สำหรับการหมักไวน์

ไวน์แต่ละประเภทที่ผลิตนั้นจะมีคุณภาพ คุณลักษณะและรสชาติที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับส่วนประกอบต่างๆ คือ ดิน ภูมิอากาศ สายพันธุ์ การเพาะปลูก และกระบวนการผลิต ทำให้การคัดเลือกผลไม้ที่ใช้สำหรับการผลิตไวน์นั้นมีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยทั่วไปนิยมเลือกผลไม้ที่มีปริมาณน้ำตาลสูงและแก่จัดมีการเปลี่ยนแปลงภายในอย่างสมบูรณ์เต็มที่ ซึ่งทำให้ได้ไวน์ที่มีรสชาติดี มีลักษณะเฉพาะตัวของผลไม้นั้นๆ ดังนั้นหลังจากที่ได้รับผลไม้ที่มีคุณภาพแล้วนั้น ควรมีขั้นตอนการเตรียมที่มีคุณภาพด้วย เพื่อไม่ให้ผลไม้ที่ได้เกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้สูญเสียสภาพที่ดีไป

- ขั้นตอนการเตรียมน้ำหมัก

กระบวนการทำความสะอาด หั่นและคั้นน้ำ โดยในการคั้นจะต้องระมัดระวังไม่ให้เมล็ดแตก เนื่องจากในเมล็ดทั่วไปจะมีสารแทนนินสูงทำให้รสขมหรือฝาด และไม่ควรให้น้ำผลไม้สัมผัสกับอากาศ

นานเกินไปเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ซึ่งมีผลทำให้น้ำผลไม้มีสีคล้ำขึ้น จึงนิยมเติมสารโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์เพื่อใช้ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยานี้ จากนั้นจะนำน้ำผลไม้มาปรุงแต่งรสชาติให้มีความเหมาะสมตามที่ต้องการ โดยจะคำหนึ่งถึงรสชาติและกลิ่นดั้งเดิมของผลไม้เป็นหลัก เพื่อไม่ให้สูญเสียลักษณะเฉพาะตัวไป และแต่งเติมเสริมกลิ่นรสที่ขาดหายไปของผลไม้นั้นๆ โดยจุดประสงค์ของการปรุงแต่งน้ำผลไม้มี 2 ประการ คือ

- การปรุงแต่งเพื่อให้เชื้อยีสต์มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ

โดยทั่วไปน้ำองุ่นจะมีปริมาณสารอาหารที่เพียงพอต่อการหมักของเชื้อยีสต์อยู่แล้ว แต่ในน้ำผลไม้ทั่วๆ ไปบางชนิดนั้น เช่น ผลไม้ที่มีรสชาติเปรี้ยวจัดโดยทั่วไปจะต้องมีการปรับลดความเป็นกรดลงมเพื่อให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักของยีสต์ ซึ่งในบางครั้งจะทำให้ปริมาณสารอาหารที่มีอยู่ถูกเจือจางลงไป ทำให้น้ำผลไม้มีสารอาหารที่ไม่เพียงพอต่อกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการเติมสารอาหารลงไปเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของยีสต์ โดยทั่วไปจะมีการเติมสารอาหารดังนี้

- แหล่งไนโตรเจน นิยมเติมในรูปของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium salt) ในปริมาณ 0.05 – 0.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้อาจเติมในรูปแบบของเกลือแอมโมเนียมฟอสเฟต (ammonium phosphate) หรือสารยูเรีย (urea) ก็ได้

- วิตามินและเกลือแร่ แม้เชื้อยีสต์มีความต้องการวิตามินและเกลือแร่ในปริมาณที่น้อย แต่ไม่สามารถขาดได้เนื่องจากมีผลต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการหมักของเชื้อยีสต์ให้ดียิ่งขึ้น โดยทั่วไปในน้ำผลไม้จะมีปริมาณวิตามินและเกลือแร่ที่เพียงพออยู่แล้วจึงนิยมเติมในรูปแบบของน้ำผลไม้เข้มข้นแทนการเติมลงไปโดยตรง เช่น น้ำองุ่น หรือ น้ำสัปปะรด เป็นต้น แต่ควรระวังในเรื่องของกลิ่นรสที่อาจเปลี่ยนแปลงไปของน้ำผลไม้ด้วย ในบางกรณีอาจเติมในรูปของสารสกัดยีสต์ (yeast extract) ซึ่งมีสารอาหารเกลือแร่และวิตามินอยู่มาก แต่มีราคาแพงและกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์เท่าใดนัก

- การปรุงแต่งเพื่อให้ไวน์มีรสชาติกลมกล่อม

การปรับปริมาณน้ำตาลให้หมาะสม มีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการทำไวน์ผลไม้ เนื่องจากน้ำผลไม้ส่วนใหญ่มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลไม่เพียงพอที่จะทำให้หมักเป็นไวน์ได้ และในบางครั้งการลดความเป็นกรดในน้ำผลไม้ จะทำให้ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลลดลงตามไปอีกด้วย จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเติมน้ำตาลลงไป เพื่อให้เหมาะสมต่อกระบวนการหมักไวน์ การจัดปริมาณน้ำตาลในกระบวนการหมักไวน์ทั่วไปนั้นนิยมใช้ในรูปของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Total soluble solid) ซึ่งสามารวัดได้ด้วยเครื่องรีเฟรกโตมิเตอร์ (Refractometer) มีหน่วยการวัดเป็นองศาบริกซ์ (°Brix) ปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักไวน์และการเจิญเติบโตของเชื้อยีสต์จะอยู่

ในช่วง 15 – 25 องศาบริกซ์ (Reddy & Reddy, 2005) แต่ในบางครั้งการเติมน้ำตาลในปริมาณที่มากจนเกินไป จะมีผลกระทบต่อบอดี้และดุลยภาพของรสชาติของไวน์ าในประเทศแถบยุโรป เช่น ฝรั่งเศส โปรตุเกส ไม่อนุญาตให้มีการเติมน้ำหรือน้ำตาลลงไปเพื่อเพิ่มปริมาณแอลกอฮอล์ หากพบว่ามีการเติมน้ำตาลหรือสารอื่นๆ ลงไป ไวน์ชนิดนั้นจะถูกลดระดับคุณภาพลงไปในทันที

ไวน์ทั่วไปมีปริมาณความเป็นกรดอยู่ที่ประมาณ 0.5 – 0.7 เปอร์เซ็นต์ (ในรูปกรดทาร์ทาริก) และค่าพีเอชประมาณ 3.3 – 4.0 ซึ่งในผลไม้แต่ละชนิดก็จะมีกรดอินทรีย์ที่แตกต่างกัน เช่น องุ่นพบกรดทาร์ทาริก ส้มและมะนาวพบกรดซิตริก และแอปเปิ้ลพบกรดมาลิก เป็นต้น (Gökmen et al., 2001; Kelebek & Selli, 2011; Soyer et al., 2003) ดังนั้นในกระบวนการเตรียมน้ำผลไม้เพื่อที่ใช้ในกระบวนการผลิตไวน์นั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีปรับเปลี่ยนสภาวะให้เหมาะก่อนนำไปใช้ในกระบวนการหมักไวน์

2.4.2 การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

- ความร้อน นิยมใช้วิธีพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) คือความร้อนที่ต่ำในระยะเวลาสั้นในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ แต่มักประสบปัญหาด้านการสูญเสียกลิ่นรส ทำให้คุณภาพที่ได้ต่ำลง จึงนิยมใช้วิธีนี้ในการฆ่าเชื้อหลังจากกระบวนการหมักไวน์เสร็จสิ้นมากกว่า (Mok et al., 2006)

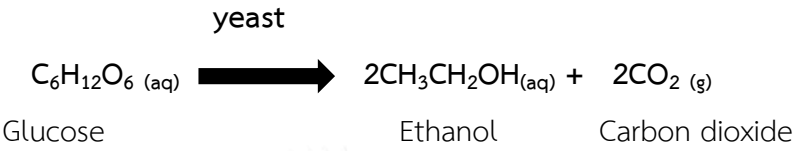
- สารเคมี นิยมใช้สารเคมีในรูปของสารประกอบซัลเฟอร์หรือเกลือซัลไฟต์ เช่น โซเดียมหรือโพแตสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ สารในกลุ่มนี้เมื่อเติมลงไปในน้ำผลไม้จะละลายอยู่ในรูปของกรดซัลฟิวริกแล้วเปลี่ยนเป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์ จากนั้นแตกตัวอยู่ในรูปแบบซัลไฟต์อิสระ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำผลไม้ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลและการสูญเสียวิตามินซีในน้ำผลไม้ได้อีกด้วย รวมทั้งยังช่วยเร่งการสร้างกลีเซอรอลทำให้ไวน์มีบอดี้มากขึ้นอีกด้วย วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน (Henick et al., 1998)

2.4.3 กระบวนการหมัก

หลังเสร็จสิ้นกระบวนการเตรียมน้ำผลไม้ให้เหมาะสมเพื่อใช้ในกระบวนการหมักไวน์แล้วนั้น จะทำการเติมกล้าเชื้อยีสต์ลงไปเพื่อเริ่มขั้นตอนการหมักให้เป็นไวน์ที่สมบูรณ์ ซึ่งในกระบวนการหมักไวน์ทั่วๆไป คือ กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ (Alcoholic fermentation)

- กระบวนการหมักแอลกอฮอล์

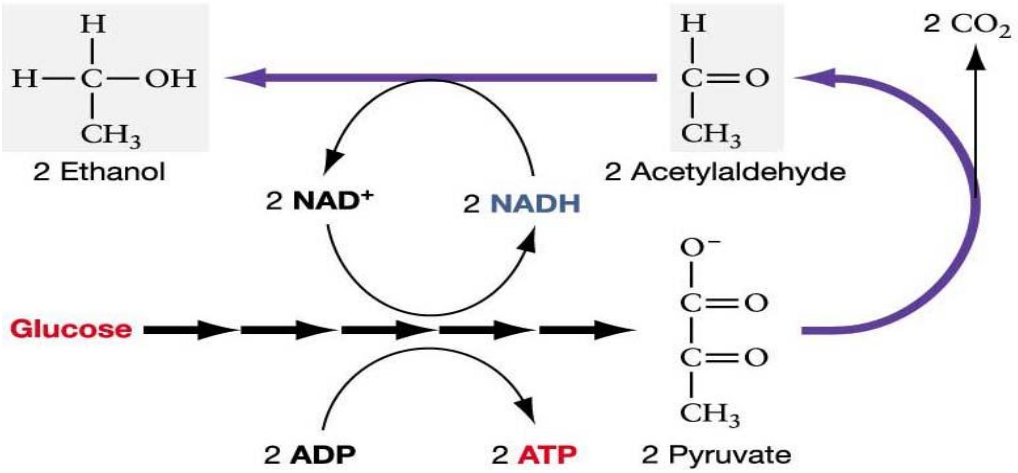
ในช่วงแรกของกระบวนการหมักเชื้อยีสต์ยังคงใช้ออกซิเจนที่ยังหลงเหลืออยู่ในระบบเพื่อช่วยในการปรับตัวให้พร้อมสำหรับกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ แล้วจึงเริ่มกระบวนการหมักแอลกอฮอล์เป็นลำดับต่อไป เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมี มีการเปลี่ยนน้ำตาลในน้ำผลไม้คือ กลูโคสและฟรุกโตส ให้เป็นแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์ในสภาะที่ไม่ใช้อากาศ ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยกระบวนการทางเคมีของกระบวนการหมัก โดยแสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ของเชื้อยีสต์

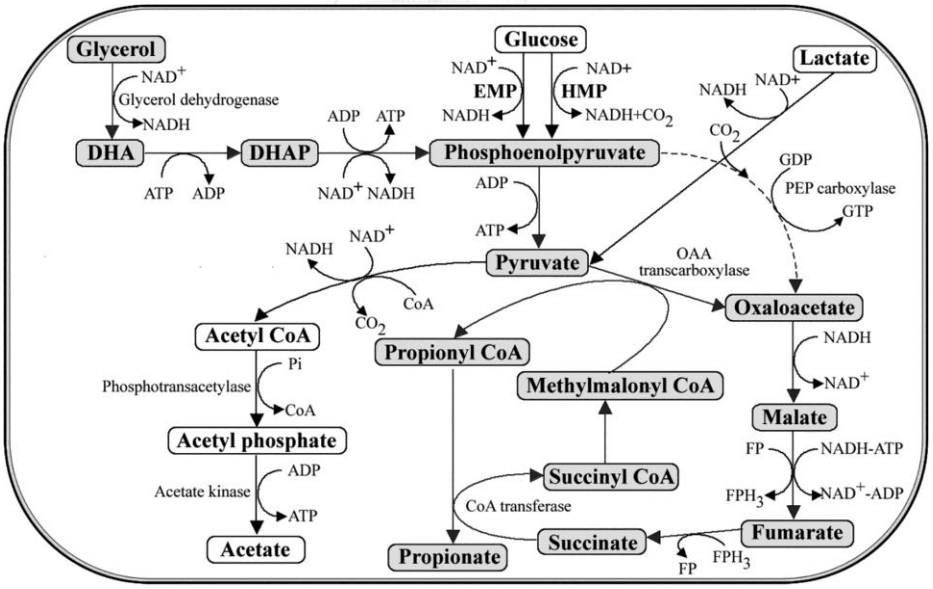
จากสมการทางเคมีข้างต้น น้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุลสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นแอลกอฮอล์จำนวน 2 โมเลกุล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จำนวน 2 โมเลกุล ผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมที่เรียกว่าไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) โดยแสดงดังรูปที่ 6 ซึ่งกระบวนการนี้จะต้องเกิดภายใต้สภาวะไร้อากาศ (Anaerobic) โดยเชื้อยีสต์ใช้น้ำตาลกลูโคส หรือ ฟรุกโตสเป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ของไวน์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 6 ขั้นตอนการสร้างแอลกอฮอล์ใน glycolysis pathway
ที่มา : http://bio1510.biology.gatech.edu

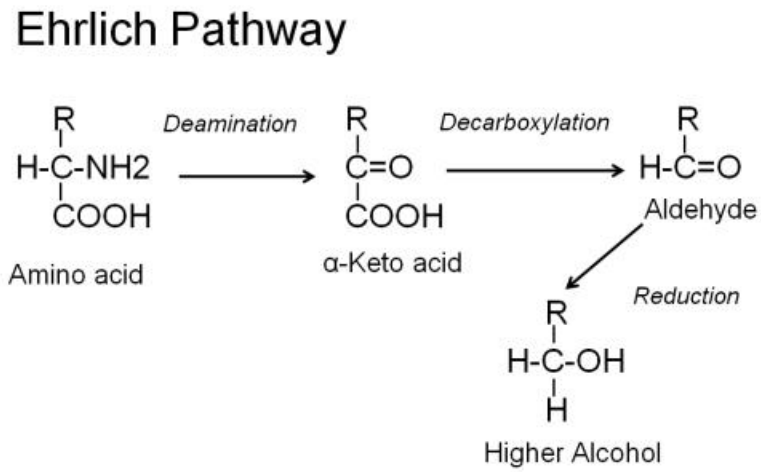
ในกระบวนการหมักไวน์ในน้ำหมักนั้นนอกจากแอลกอฮอล์ที่เป็นเป้าหมายหลักแล้วนั้น ยังมีองค์ประกอบอื่นๆ ที่ช่วยในการส่งเสริมให้ไวน์มีรสชาติที่ดียิ่งขึ้น พบว่าในกระบวนการหมักไวน์มีการสร้างสารประกอบต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมลำดับที่ 2 (secondary metabolism) ออกมา สารประกอบที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมลำดับที่ 2 นี้มาจากกระบวนการหมักกลีเซอโร-ไพรูวิก (Glycero-pyruvic fermentation) โดยดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งจะได้ กลีเซอรอล กรดไพรูวิก และอะซิตัลดีไฮด์ โดยที่กรดไพรูวิกนั้นจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นอะซิติล-โคเอก่อนเข้าสู่ทีซีเอไซเคิล ส่วนไพรูเวทจะถูกกระบวนการดีคาร์บอกซิเลทไปเป็นอะซิตัลดีไฮด์ จนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือแอลกอฮอล์ (Guymon & Nakagiri, 1957)



รูปที่ 7 กระบวนการหมักกลีเซอโร-ไพรูวิก
ที่มา : (Zhuge et al., 2013)

นอกจากนี้เชื้อยีสต์สามารถใช้ประโยชน์จากแหล่งไนโตรเจนและกรดอะมิโนที่มีอยู่ในน้ำหมักซึ่งนอกจากจะช่วยในการเจริญเติบโตให้ดีและรวดเร็วขึ้นแล้วนั้นยังสร้างสารประกอบไฮเออร์

แอลกอฮอล์อีกด้วยผ่าน Ehrlich pathway ดังรูปที่ 8 ซึ่งเป็นสารประกอบให้กลิ่นรสในไวน์และมีบทบาทสำคัญต่อคุณภาพของไวน์ในรูปของกลิ่นรสอีกด้วย (Hazelwood et al., 2008)



รูปที่ 8 กระบวนการ Ehrlich pathway
ที่มา : http://wineserver.ucdavis.edu

สารประกอบแอลกอฮอล์มวลโมเลกุลสูงเหล่านี้ ถูกสร้างมาจากโปรตีนที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงจากการเจริญเติบโตของยีสต์และกระบวนการหมัก โดยกรดอะมิโนจะถูกเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนียและแอลกอฮอล์มวลโมเลกุลสูงใน Ehrlich pathway ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4.4 กระบวนการหลังการหมัก

การทำให้ใส (Clarify)

ไวน์ที่ดีนั้นควรมีลักษณะใส ไม่มีตะกอนแขวนลอย แต่ในบางครั้งตะกอนอาจเกิดขึ้นได้จากการคัดแยกเนื้อผลไม้ไม่ดี เช่น ไฟเบอร์ เพคติน เป็นต้น หรือเศษเซลล์ของเชื้อยีสต์ที่ยังคงปะปนออกมากับน้ำหมักซึ่งอยู่ในรูปของโปรตีน จึงควรทำให้ไวน์มีลักษณะใสก่อนนำไปบรรจุขวด ซึ่งมีวิธีต่างๆ ดังนี้

- เบนโทไนท์ เป็นสารที่มีความปลอดภัยสูงและใช้ได้ดีสำหรับตกตะกอนสารที่มีประจุเป็นบวก เช่น โปรตีน เป็นต้น เนื่องจากมีอนุภาคของอะลูมิเนียมซิลิเขตที่มีประจุเป็นลบอยู่ (Salazar & Achaerandio, 2006)

- เอนไซม์ ในน้ำผลไม้ทั่วไปจะพบว่าสารขนาดใหญ่ในกลุ่มโพลีแซคคาร์ไรด์คือ เพคติน เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดความขุ่นในไวน์ จึงนิยมใช้เอนไซม์เพคติเนส ซึ่งสามารถทำให้เกิดการย่อยสลายของเพคตินได้ ทำให้สามารถนำไปกรองแยกได้ง่ายขึ้น เอนไซม์เพคติเนสทั่วไปสร้างจากเชื้อ *Aspergillus sp*. (Ducasse et al., 2010) หากในไวน์มีสารจำพวกแป้งมากจนเกิดไป เช่น ไวน์กล้วย หรือไวน์มะม่วง เป็นต้น จะเติมเอนไซม์อะไมเลส เพื่อย่อยสลายแป้งลงไปด้วย

- ไข่ขาว นิยมใช้เพื่อตกตะกอนแทนนิน ซึ่งให้รสฝาดในไวน์ โดยไข่ขาวจะไปจับตัวกับแทนนินแล้วตกตะกอนลงมา (Weber et al., 2009)

- ไอซิงกลาส (ising glass) นิยมใช้รวมกับเบนโทไนท์จะทำให้มีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น ใช้สำหรับกำจัดสารในกลุ่มฟีนอลิกและแทนนิน ถึงแม้จะมีราคาแพง แต่ประสิทธิภาพสูงเมื่อเทียบกับปริมาณที่ใช้ (Walker et al., 2007)

การทำให้เสถียร

หลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมักไวน์ ในน้ำหมักจะมีเศษเซลล์เชื้อยีสต์และแบคทีเรียปะปนอยู่ หรือเกลือโพแทสเซียมทาร์เทรท การทำให้ไวน์เกิดการคงตัวจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยทั่วไปจะใช้วิธีการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ซึ่งสามารถกรองได้ทั้งเชื้อยีสต์และแบคทีเรียได้ทั้งหมด แต่หากเกิดปัญหาจากเกลือโพแทสเซียมทาร์เทรต จะนำไวน์ที่ได้ไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ แล้วจึงแยกเอาส่วนใสออกมาใช้ประโยชน์ต่อไป

การบ่ม

ไวน์ผลไม้จะไม่นิยมนำไปบ่มเนื่องจากต้องการกลิ่นรสของผลไม้และความสดของตัวไวน์ผลไม้เท่านั้น แต่ในไวน์องุ่นจะนิยมนำไปบ่มในถังไม้โอ๊ค ซึ่งจะให้ได้กลิ่นรสและสีจากถังไม้โอ๊คด้วย ข้อดีของการบ่มคือ ทำให้ไวน์มีคุณภาพที่ดี รสชาติกลมกล่อม เกิดกลิ่นรสที่สมบูรณ์ที่ได้รับจากปฏิกิริยาของแอลกอฮอล์และสารประกอบในไวน์นั้นเอง เช่น ออกซิเดชัน พอลิเมอร์ไรเซชั่น เอสเทอร์ฟิเคชั่น และไฮโดรไลซิส เป็นต้น

การบรรจุขวด

ก่อนที่จะนำไวน์ไปบรรจุขวดจะมีการฆ่าเชื้อ โดยอาจใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 – 70 องศาเซลเซียส หรือเติมสารเคมี เช่น โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ปริมาตร 100 - 200 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปบรรจุขวดเก็บรักษาไว้ในที่และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป

ในกระบวนการผลิตไวน์นอกเหนือไปจากวัตถุดิบและวิธีการหมักแล้วนั้น เชื้อจุลินทรีย์ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการหมักไวน์ พบว่าในการหมักไวน์จะมีเชื้อเยีสต์เป็น เชื้อจุลินทรีย์

หลักที่ทำหน้าที่ต่างๆ เพื่อให้ไวน์มีรสชาติและกลิ่นรสที่ดี ซึ่งเชื้อยีสต์แต่ละชนิดจะมีหน้าที่และบทบาทที่สำคัญแตกต่างกันออก ขึ้นอยู่กับว่าผู้ผลิตนั้นต้องการสิ่งใดจากกระบวนการผลิตไวน์

2.5 ยีสต์ (yeast)

ความเข้าใจในความซับซ้อนของกลิ่นรสในไวน์นั้นเกิดจากการสั่งสมความรู้และการทดลองต่างๆ ทำให้ทราบว่าอิทธิพลต่อกลิ่นรสนั่นเกิดจากสิ่งใด (Thorngate, 1997) พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของไวน์นั้นมีความสำคัญที่ส่งผลต่อกลิ่นรสพื้นฐานในไวน์ ซึ่งเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ขององุ่น วิธีการปลูกองุ่น ลักษณะภูมิประเทศ ลักษณะนิเวศวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ กระบวนการหมัก รวมทั้งความชำนาญของผู้ผลิต (Cole & Noble, 1995)

จุลินทรีย์เป็นปัจจัยหลักในกระบวนการผลิตไวน์ ซึ่งมีผลโดยตรงต่อองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ทั้งก่อนการเก็บเกี่ยวและระหว่างกระบวนการหมัก ปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ เช่น การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ รวมทั้งสารเมตาบอไล์ทุติยภูมิอีกหลายชนิด ซึ่งมีผลเป็นอย่างมากต่อลักษณะของไวน์อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ (Lambrechts & Pretorius, 2000) พบว่ายีสต์ แบคทีเรีย และเชื้อราต่างๆ นั้น มีระบบนิเวศของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตและองค์ประกอบทางเคมีของไวน์ทั้งสิ้น ถึงแม้ว่ายีสต์จะใช้ในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์เป็นหลักก็ตาม (Fleet, 1997) จากทฤษฎีเรื่องระบบนิเวศ (Ecological theory) นั้น ได้แสดงให้เห็นถึงปฏิสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ ภาวะการล่าเหยื่อ (Predation) ภาวะปรสิต (Parasitism) ภาวะพึ่งพากัน (Mutualism) ภาวะอิงอาศัย (Commenselism) ภาวะได้ประโยชน์ซึ่งกันและกัน (Protocooperation) ภาวะแข่งขัน(Competition) ภาวะเป็นกลาง(Neutralism) และภาวะต่อต้าน (Antibiosis) (Boddy & Wimpenny, 1992) กล่าวคือ ในทุกความสัมพันธ์นั้นอาจมีผลซึ่งกันและกันหรือไม่มีก็ได้ หรือในบางครั้งอาจเกื้อหนุนซึ่งกันและกันก็ได้ ตัวอย่างเช่น ช่วงแรกของกระบวนการหมักไวน์การเจริญเติบโตของยีสต์ในระยะเริ่มต้น สารอาหารจะลดลง รวมทั้งสร้างแอลกอฮอล์และกรดไขมันต่างๆ ก่อให้เกิดความเป็นพิษภายในระบบส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์อื่นๆ ด้วย (Bisson, 1999) หรือกระบวนการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์นั้นก่อให้เกิดการขับไล่ออกซิเจนออกจากระบบของน้ำหมักส่งผลต่อจุลิทรีย์สายพันธุ์ที่ใช้อากาศโดยตรง ซึ่งอาจทำให้เชื้อจุลินทรีย์บางสายพันธุ์สร้างสารยับยั้งต่างๆ เช่น killer toxic หรือ เอนไซม์ต่างๆ ใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์เพื่อทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Berlanga, 2010) หรือการสร้างแอลกอฮอล์และซัลเฟอร์ไดร์ออกไซด์ของ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีผลต่อ *Oenococcus oeni* ทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Arnink & Henick-Kling, 2005) หรือความสัมพันธ์ระหว่างยีสต์กันเอง พบว่า ยีสต์กลุ่ม Non-

Saccharomyces จะตายหลังจากยีสต์กลุ่ม Saccharomyces สร้างแอลกอฮอล์ เนื่องจากสามารถทนแอลกอฮอล์ได้น้อยกว่านั้นเอง (Boulton et al., 1996)

ด้านปฏิสัมพันธ์สำหรับกรณีของยีสต์กับยีสต์นั้น ส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพและกลิ่นรสในไวน์อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ แม้ว่ายีสต์ชนิด *Saccharomyces cerevisiae* จะมีหน้าที่หลักในกระบวนการผลิตไวน์ แต่ยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ ก็มีบทบาทสำคัญไม่ต่างกัน กล่าวคือ ในกระบวนการผลิตไวน์นั้นยีสต์แต่ละชนิดที่มีปฏิสัมพันธ์กันนั้นจะส่งผลต่อการสร้างกลิ่นรสของไวน์ต่างๆ เช่น กลีเซอรอล และกรดอะซิติก เป็นต้น ซึ่งพฤติกรรมเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับระดับของชนิดและสายพันธุ์นั้นๆ ด้วย (Zimmermann & Entian, 1997)

ในกระบวนการหมักไวน์แบบดั้งเดิมจะใช้กระบวนการหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ซึ่งเกิดขึ้นจากเชื้อจุลินทรีย์ที่บนเปลือกองุ่นและเครื่องมือสำหรับทำไวน์ พบว่าเชื้อยีสต์ที่อยู่ตามธรรมชาติมีถึง 18 สกุล และมากกว่า 150 สปีชีส์ โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มหลักคือ กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักไวน์ กลุ่มที่มีผลน้อยหรือไม่มีผลต่อกระบวนการหมักไวน์ และกลุ่มที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย ดังนั้นกระบวนการหมักและคุณภาพของไวน์ จึงขึ้นอยู่กับยีสต์เป็นสำคัญด้วย ซึ่งนอกเหนือไปจากกระบวนการหมัก สภาวะอากาศ สภาวะของการปลูกองุ่น และการจัดการเกี่ยวกับองุ่นก็มีผลเช่นกัน

กระบวนการหมักไวน์ตามธรรมชาตินั้นเกิดจากกระบวนการที่ซับซ้อนทางชีวภาพและชีวเคมีของน้ำหมัก และเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ โดยมียีสต์เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีความหลากหลายของสายพันธุ์และชนิดของเชื้อจุลินทรีย์นั้นทำให้เกิดความแตกต่างของไวน์ที่ผลิตแม้ว่าจะใช้วัตถุดิบชนิดเดียวกันก็ตาม โดยทั่วไปในกระบวนการหมักไวน์จะแบ่งยีสต์ไว้ 2 ประเภทตามคุณลักษณะและพฤติกรรมของเชื้อยีสต์ ดังนี้

2.5.1 ยีสต์กลุ่ม Saccharomyces

เชื้อยีสต์ในกลุ่มนี้มีหน้าที่หลักในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ในกระบวนการผลิตไวน์ ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญเฉพาะของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ปัจจุบัน *Saccharomyces cerevisiae* นิยมใช้ในกระบวนการหมักไวน์เนื่องจากมีความสามารถสร้างแอลกอฮอล์และทนได้สูงอยู่ที่ประมาณ 12 - 14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเกิดจากเมื่อเข้าสู่สภาวะการหมักแบบไม่ใช้อากาศแล้วนั้นจะพบว่าผนังเซลล์มีการสะสมของสารในกลุ่มเสตอรอล ฟอสโฟไลปิด และไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณมาก (Larue et al., 1980) และทนต่อพีเอชที่ต่ำอยู่ที่ระดับประมาณ 3.5- 3.8 (Cerdán et al., 2004) ซึ่งเหมาะสมต่อกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ โดยแอลกอฮอล์เหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารต่างๆ ที่อยู่ในรูปของแข็งในวัตถุดิบ เช่น สารประกอบฟีนอลิก เป็นต้น (Butera et al.,

2002; Cai et al., 2003) และช่วยกระตุ้นให้สารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิในน้ำหมักเกิดความแอคทีฟขึ้น รวมทั้งช่วยย่อยสลายเซลล์ที่ตายแล้วอีกด้วย (Cole & Noble, 1995; Lambrechts & Pretorius, 2000) ส่งผลให้กลิ่นรสที่ดีแก่ไวน์ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะที่มีน้ำตาลสูงได้ดีในไวน์ผลไม้ที่ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ (Osho, 2005) และมีช่วงอุณหภูมิในการหมักที่กว้างอยู่ที่ประมาณ 10 – 30 องศาสเซลเซียส โดยมีค่าที่เหมาะสมอยู่ที่ประมาณ 20 องสาเซลเซียส (Charoenchai et al., 1998; Gao & Fleet, 1988)

2.5.2 ยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces

เชื้อยีสต์ในกลุ่มนี้สามารถพบได้บ่อยในองุ่นและช่วงเริ่มต้นของกระบวนการหมักไวน์ ยีสต์ในกลุ่มนี้มีลักษณะเด่นในการสร้างสารประกอบต่างๆ ที่ให้กลิ่นรสที่เป็นลักษณะเฉพาะของไวน์แต่ละชนิด ยีสต์ในกลุ่มนี้มีความสามารถในการสร้างแอลกอฮอล์ต่ำและช้าอยู่ที่ประมาณ 3 – 4 เปอร์เซ็นต์ สามารถทนปริมาณแอลกอฮอล์ได้ประมาณ 4 - 7 เปอร์เซ็นต์และจะตายก่อนเข้าสู่ระยะกลางของกระบวนการหมัก และไม่สามารถทนต่อปริมาณน้ำตาลที่ความเข้มข้นสูงๆได้ รวมทั้งยังมีความสามารถในการใช้ออกซิเจนที่ต่ำอีกด้วย (Moreira et al., 2005; Moreira et al., 2011) แต่มีความสามารถในการผลิตสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิได้ดี เช่น เชื้อ *Hanseniaspora uvarum* สามารถสร้างสาร n-propanol isobutanol isoamyl alcohol acetaldehyde acetoin และ acetic acid ได้ปริมาณ 30 45 50 40 150 และ 2,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นต้น (Ciani & Maccarelli, 1997; Romano et al., 2003) จึงสามารถพบการเจริญเติบโตได้ในช่วงระยะเริ่มต้นของกระบวนการหมักไวน์และจะหยุดการทำงานหรือตายเมื่อการหมักผ่านไปซักระยะหนึ่ง เนื่องจากปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงขึ้น (Nissen & Arneborg, 2003) เชื้อยีสต์ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Candida Saccharomycodes Hanseniaspora Metschnikowia Pichia* และ *Kluyveromyces* เป็นต้น ในปัจจุบันเชื้อยีสต์ที่นิยมใช้ในกระบวนการหมักไวน์ ได้แก่

1. *Pichia guilliermondii* มีลักษณะกลมยาว ขนาดไม่ใหญ่มากนัก มีความสามารถในการหมักต่ำ เป็นเชื้อยีสต์ที่สามารถพบได้ที่บริเวณเปลือกผิวขององุ่น โกโก้ ตามธรรมชาติ และน้ำหมักของไวน์ (Garcia-Martos, 1998) เป็นเชื้อยีสต์ที่เจริญเติบโตได้ดีในช่วงเริ่มต้นกระบวนการหมักไวน์และมีความสามารถในการสร้างสารให้กลิ่นรสที่มีลักษณะเฉพาะตัวแก่ไวน์ แต่ไม่สามารถทนสภาวะแอลกอฮอล์ที่สูงได้ จึงนิยมนำมาหมักร่วมกับยีสต์ในกลุ่ม Saccharomyces (Fleet et al., 1984)

2. *Saccharomycodes ludwigii* มีลักษณะเซลล์เป็นรูปมะนาว เซลล์ขนาดใหญ่ มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส ซูโครส ราฟิโนส มักพบหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก

(Romano et al., 1999) สามารถเจริญเติบโตได้ในภาวะที่มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์และแอลกอฮอล์สูงได้ดี (Boulton et al., 1995) เป็นยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสและซูโครสให้เป็นแอลกอฮอล์ รวมทั้งยังสามารถทนและสร้างแอลกอฮอล์ได้สูงระดับหนึ่ง ใกล้เคียงกับยีสต์ในกลุ่ม Saccharomyces แต่มีลักษณะที่เด่นกว่าคือ สามารถทนสภาวะที่มีซัลเฟอไดออกไซด์ได้สูงถึง 1000 – 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสภาวะที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Ciani & Maccarelli, 1997; Henick et al., 1998)

2.6 รูปแบบการหมัก

2.6.1 กระบวนการหมักด้วยวิธีธรรมชาติ (Traditional fermentation)

กระบวนการหมักด้วยวิธีธรรมชาติเป็นกระบวนการหมักแบบเก่าที่อาศัยเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดอยู่กับพื้นผิวของวัตถุดิบ ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ลงไปในกระบวนการหมัก โดยในช่วงแรกของการหมักจะเริ่มด้วยเชื้อยีสต์ในกลุ่มที่ทนแอลกอฮอล์ได้ต่ำคือยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces เช่น *Kloeckera* หรือ *Hanseniaspora* เป็นต้น โดยสามารถหมักแอลกอฮอล์ได้ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (Margalith, 1981) แล้วหลังจากนั้น 3 - 4 วันจะเป็นหน้าที่ของเชื้อในกลุ่ม Saccharomyces ซึ่งสามารถผลิตและทนแอลกอฮอล์ได้ดี จนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก (Martini, 1993) แต่มักจะประสบปัญหาด้านคุณภาพที่ไม่แน่นอนและการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ เนื่องจากไม่สามารถควบคุมกระบวนการหมักและเชื้อที่ต้องการได้ เชื้อในธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นเชื้อในกลุ่ม Non-Saccharomyces เช่น Candida Hanseniaspora Metschnikowia Pichia Torulaspora และ Kluyveromyces (Fleet, 2003; Fleet et al., 1984; Pardo et al., 1989) โดยเชื้อในกลุ่มนี้มีความสามารถในสร้างสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิและผลิตแอลกอฮอล์ได้เล็กน้อย เนื่องจากไม่สามารถทนต่อสภาวะที่มีแอลกอฮล์ที่สูงได้มากนัก จึงนิยมนำไปหมักร่วมกับเชื้อยีสต์ในกลุ่ม Saccharomyces ซึ่งมีอัตราการเจริญและผลิตแอลกอฮอล์ที่สูงกว่า แต่ความสามารถในการสร้างเมตาบอไลท์ทุติยภูมิต่างๆ ได้น้อยกว่า ทำให้ไวน์ที่ได้มีลักษณะที่ดียิ่งขึ้น (Banks & Overton, 2010)

2.6.2 กระบวนการหมักด้วยวิธีแบบใหม่ (Modern Fermentation)

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนากระบวนการหมักเพื่อทดแทนกระบวนการหมักด้วยวิธีธรรมชาติ อาจเรียกได้อีกอย่างหนึ่งว่าเป็นการหมักในรูปแบบของหัวเชื้อ (Starter culture fermentation) (Wu et al., 2012) ซึ่งสามารถช่วยป้องกันปัญหาต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น เช่น ลดปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อก่อโรคหรือการเน่าเสีย ช่วยให้การหมักไวน์มีคุณภาพที่แน่นอนมากยิ่งขึ้น เป็นต้น กระบวนการหมักด้วยวิธี

สมัยใหม่นี้ เลือกใช้วิธีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่รู้ถึงความสามารถและคุณสมบัตินั้นๆ ลงไปในน้ำหมัก ทำให้สามารถควบคุมความต้องการและปริมาณของเชื้อต่างๆ ที่จะมีผลต่อกระบวนการหมักไวน์ได้ดียิ่งขึ้น สามารถแบ่งกระบวนการหมักด้วยลักษณะการเติมเชื้อยีสต์ ได้ดังนี้

แบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว (Single pure culture)

เป็นกระบวนการหมักที่เลือกใช้เชื้อจุลินทรีย์เพียงหนึ่งชนิดในกระบวนการหมัก ซึ่งไวน์ที่ได้ก็จะมีลักษณะเฉพาะของเชื้อยีสต์นั้นๆ แต่ไม่มีความซับซ้อนในด้านกลิ่นรสและขาดซึ่งความกลมกล่อมในไวน์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* ก็จะให้แอลกอฮอล์ที่สูง แต่ขาดกลิ่นรสที่ดี หรือ *Kloeckera/Hanseniaspora* ที่สามารถสร้างสารประกอบต่างๆ ที่เป็นสารให้กลิ่นรสที่ดี แต่สร้างแอลกอฮอล์ได้ในปริมาณต่ำ เป็นต้น (Thornton, 1982)

แบบเชื้อผสม (Mixed cultures)

จากปัญหาด้านความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว จึงได้มีการนำเชื้อยีสต์มาเป็นเชื้อตั้งต้นร่วมกันเป็นหัวเชื้อผสม เพื่อให้ไวน์ที่ผลิตนั้นมีทั้งกลิ่นรสที่ดีและปริมาณแอลกอฮอล์ตามที่ต้องการ ซึ่งช่วยแก้ไขปัญหาความสามารถในการทนแอลกอฮอล์ที่ต่ำของเชื้อในกลุ่ม Non-Saccharomyces วิธีการนี้จะเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วลงไปพร้อมๆ กันในน้ำหมักไวน์ ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆ ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดในน้ำหมักไวน์ ซึ่งการหมักด้วยวิธีนี้เชื้อยีสต์กลุ่ม Non-saccharomyces จะลดปริมาณและตายลงเมื่อการหมักผ่านไประยะหนึ่งเมื่อเทียบเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สามารถมีชีวิตอยู่ได้จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก (Erten, 2002) ซึ่งสาเหตุอาจเกิดการแข่งขันของเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำหมักหรือมีการสร้างสารบางชนิดขึ้น เช่น แอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้น การสร้างสารพิษหรือสารเมตาบอไล้ทุติยภูมิต่างๆ ทำให้การหมักหยุดชะงัก (Stuck fermentation) มีผลให้การเจริญเติบโตนั้นเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์หรือตายไปก่อนที่จะสร้างสารที่ดีให้แก่ไวน์ ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพและกลิ่นรสของไวน์โดยตรง (Sablayrolles et al., 1996)

แบบเชื้อผสมลำดับส่วน (Sequential Cultures)

เป็นการเติมเชื้อยีสต์หนึ่งชนิดลงไปในช่วงเริ่มต้นลงไปทำหน้าที่ของตัวเองซึ่งนิยมเติมเชื้อกลุ่ม Non-Saccharomyces ที่ทนแอลกอฮอล์ได้ต่ำแต่มีความสามารถในการสร้างสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิที่ดีและเมื่อผ่านไประยะเวลาหนึ่งของการหมักจะเติมเชื้อยีสต์กลุ่ม Saccharomyces ลงไปอีกชนิดหนึ่งเพื่อทำอีกหน้าที่หนึ่งจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก เมื่อเทียบกับแบบเชื้อผสมปริมาณเซลล์ของเชื้อกลุ่ม Non-Saccharomyces จะลดลงเร็วกว่า แต่การสร้างแอลกอฮอล์ในการหมักนั้นจะใช้ระยะเวลาสั้นกว่าเนื่องจากต้องรอเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างแอลกอออล์ลงมาช่วยในการหมัก (Toro

& Vazquez, 2002) วิธีนี้เป็นการแก้ปัญหาการหมักของเชื้อกลุ่ม Non-Saccharomyces ที่ทนแอลกอฮอล์ได้ต่ำ วิธีการนี้เป็นวิธีที่ดี แต่ไม่ค่อยได้รับความนิยมในระดับ อุตสาหกรรมการหมักไวน์ เนื่องจากมีความยุ่งยากในกระบวนการเติมเชื้อจุลินทรีย์

กระบวนการหมักไวน์ด้วยยีสต์สายพันธุ์เดียวกันเช่นยีสต์กลุ่ม Saccharomyces ในปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน จากรายงานของ Moreno et al. (1991) เชื้อยีสต์ *Saccharomyees cerevisiae* ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ต่างกันคือ 1 x 10^8 and 2 x 10^8 cells/ml ให้ปริมาณแอลกอฮอล์และกรดที่ระเหยได้ที่แตกต่างกัน คือ 10.9 11.2 เปอร์เซ็นต์ และ 3.65 10.1 meq/l ตามลำดับ นอกจากนี้การหมักไวน์ด้วยเชื้อและรูปแบบการหมักที่แตกต่างกันจะให้สารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิที่แตกต่างกันอีกด้วย โดยแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิของกระบวนการหมักไวน์ด้วยเชื้อยีสต์ *Kloeckera apiculata* (K). *Hanseniaspora guiltiermonaii* (H) และ *Saccharomyces cerevisiae* (S) ในรูปแบบการหมักแบบ pure mixed และ sequential cultures.

compound	ชนิดของเชื้อยีสต์และวิธีการหมัก						
	P_S	P_H	P_K	M_H+S	M_K+S	Sq_H+S	Sq_K+S
Ethanol (%)	9.5	4.26	4.42	9.64	9.56	9.54	9.57
n-propanol (mg/l)	59	17	14	81	82	95	111
Isobutanol (mg/l)	43	16	13	36	36	37	39
D-amyl alcohol (mg/l)	37	7	8	28	29	16	22
Isoamyl alcohol (mg/l)	198	22	23	130	125	73	84
Acetoin (mg/l)	-	184	147	-	-	-	-
2,3-butanediol (mg/l)	448	653	791	415	446	620	654

P = Pure Culture, M=Mixed Cultures และ Sq = Sequential Cultures

S = *Saccharomyces cerevisiae* 4019 , K = *Kloeckera apiculata* และ H = *Hanseniaspora guiltiermonaii*

ที่มา : (Zironi et al., 1993)

ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักไวน์นั้นจะเห็นว่าเชื้อยีสต์ในกลุ่ม Non-Saccharomyces สร้างได้น้อยกว่าการหมักไวน์ที่มีเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ร่วมอยู่ด้วยประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเกิดจากความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ที่ต่ำของเชื้อกลุ่มนี้ นอกจากนี้ยังพบว่าในการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์ยีสต์ *Pichia guilliermondii* สามารถผลิตสาร Ethyl acetate ได้ในปริมาณสูงกว่าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* อยู่ที่ปริมาณ 1,606 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ผลิตได้เพียง 59.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณแอลกอฮอล์ได้สูงถึง 15.9 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (Ciani et al., 2006)

2.7 กลิ่นรสในไวน์

ในกระบวนการหมักไวน์ นอกเหนือไปจากแอลกอฮอล์ที่บ่งบอกถึงความเป็นไวน์แล้วนั้น สารประกอบต่างๆที่ให้กลิ่นรสแก่ไวน์ก็มีความสำคัญด้วย ซึ่งสัดส่วนและองค์ประกอบของสารประกอบเหล่านี้เป็นตัวการบ่งบอกถึงลักษณะเฉพาะของไวน์แต่ละชนิด ที่เกิดจากกระบวนการที่ซับซ้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากกระบวนการหมักนั้นเอง โดยทั่วไปในกระบวนการผลิตไวน์จะมีสารประกอบสำคัญๆ (Fleet, 2003; Romano et al., 2003) ดังนี้

- แอลกอฮอล์ เป็นองค์ประกอบที่บ่งบอกถึงความเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไวน์ ซึ่งเกิดจากกระบวนการหมักของเชื้อยีสต์ในสภาวะที่ไม่ใช้อากาศ แอลกอฮอล์ถือว่าเป็นตัวทำละลายที่ดีสำหรับสารให้กลิ่น สี แทนนิน และกลิ่นรสที่ระเหยได้ มีค่าthreshold ในการให้กลิ่นอยู่ที่ประมาณ 0.004 – 0.0052 กรัมต่อ100มิลลิลิตร (Rankine, 1967) นอกจากนี้ยังช่วยลดความฝาดที่เกิดจากแทนนินอีกด้วย

- เมทิลแอลกอฮอล์ เป็นสารพิษที่ควบคุมไม่ให้มีการบริโภคเกิน 340 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว เนื่องจากจะให้ตาบอดหรือเสียชีวิตได้ โดยมักเกิดจากการเติมเอนไซม์เพคติเนสทำให้เกิดการย่อยสลายเพคตินที่มีอยู่ในผิวของผลไม้ ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับหมู่ เมโทซิล (methoxy, OCH_3) เกิดเป็นเมทานอล (MacDonald & Fall, 1993) พบว่าในไวน์แดงมีปริมาณเมทิลแอลกอฮอล์มากกว่า ไวน์โรเซ่และไวน์ขาว เนื่องจากมีปริมาณเพคตินที่มีอยู่ในผิวของผลไม้ที่มากกว่า

- สารประกอบเอสเทอร์ เป็นสารให้กลิ่นรสที่ดีในไวน์ที่เกิดจากกระบวนการหมักหรือเอนไซม์ต่างๆ ภายในเซลล์ของยีสต์และแบคทีเรีย เช่น เอทิลอะซิเทตให้กลิ่นผลไม้ เอทิลคาร์โพรเอทให้กลิ่นแอปเปิ้ล ไอโซเอมิลอะซิเตทให้กลิ่นกล้วยหอมและแอปเปิ้ล และ2-ฟีนิลเอทิลอะซิเตทให้กลิ่นกุหลาบ

น้ำผึ้งและแอปเปิ้ล เป็นต้น เอนไซม์เอสเทอร์เรสที่ได้จากกระบวนการหมักใหม่ๆ จะเกิดปฏิกิริยาได้ 2 แบบคือ

- ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น (esterification) เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์ ทำให้เกิดสารประกอบเอสเทอร์ กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ในขั้นตอนการบ่มไวน์ (Alcalde Eon et al., 2006)

- ปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น (transesterification) สายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก ปริมาณออกซิเจน และกรดไขมันอิ่มตัว มีผลต่อปริมาณของสารประกอบเอสเทอร์ โดยสารประกอบเอสเทอร์ที่สำคัญมีด้วยกัน 2 กลุ่มคือ เอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid ethyl ester) และ อะซิเตทเอสเทอร์ (acetate ester) จะให้กลิ่นดอกไม้หรือผลไม้ที่ดีแก่ไวน์ และเป็นที่ยอมรับ ตัวอย่างเช่น เอทิลอะซิเตท จะพบได้ในไวน์ทั่วๆไป ประมาณ 200 – 400 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าถ้ามีน้อยกว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตรจะให้กลิ่นรสที่ดีแก่ไวน์ แต่หากพบมากเกินไปจะให้กลิ่นรสที่ไม่ดี

ในบางครั้ง อาจเกิดจากสารอะซิติล-โคเอ (acethyl-CoA) ทำปฏิกิริยากับกรดไขมัน ด้วยเอนไซม์ เอซิล โคเอนไซม์ เอ (acyl coenzyme A) ได้เป็น เอซิล-โคเอ ซึ่งจะใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารประกอบเอสเทอร์

- แอลกอฮอล์มวลโมเลกุลสูง หรือ ฟูเซลออยล์ เป็นแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอนมากกว่า 2อะตอม มีความสำคัญช่วยในการพัฒนากลิ่นรสให้มีความซับซ้อน (bouquet) มากยิ่งขึ้นจากปฏิกิริยากับกรดอินทรีย์ในการบ่มไวน์ แอลกอฮอล์มวลโมเลกุลสูงเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการหมักของเชื้อยีสต์

ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทั่วไปพบแอลกอฮอล์มวลโมเลกุลสูงมากกว่า 40 ชนิด แต่มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่มีความสำคัญต่อกลิ่นรสในไวน์ เช่น โพรพานอล, ไอโซบิวทานอล, แอคทีฟเอมิลแอลกอฮอล์, ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์, อะโรมาติกแอลกอฮอล์ เฮกซานอล และ2-ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ เป็นต้น ปริมาณแอลกอฮอล์มวลโมเลกุลสูงที่เหมาะสมในไวน์อยู่ที่ประมาณ น้อยกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร จะช่วยให้ไวน์มีกลิ่นรสที่ซับซ้อนและดียิ่งขึ้น หากมากกว่านี้จะทำให้มีกลิ่นรสที่ไม่ดีและอาจกลบกลิ่นรสที่ดีของสารตัวอื่น นอกจากนี้ยังมีสารบางตัวที่ให้กลิ่นรสไม่ดี แต่มีความสำคัญเนื่องจากเป็นตัวทำละลายสารที่ให้กลิ่นและสารระเหยในไวน์ จะพบอยู่ที่ประมาณ 0.14 – 0.41 กรัมต่อลิตร เช่น ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ จะให้กลิ่นคล้ายน้ำมัน เป็นต้น (Greenshields, 1974)

- อะซิทัลดีไฮด์ ในกระบวนการหมักจะมีการสร้างอะซิทัลดีไฮด์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่จะเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่การบ่มไวน์ เนื่องจากแอลกอฮอล์ในไวน์เกิดการออกซิไดซ์ เปลี่ยนไปเป็นอะซิตัลดีไฮด์

หรืออาจเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อยีสต์สร้างฟิล์ม เช่น *Saccharomyces fermentati* เป็นต้น (Webb & Noble, 1976)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ เครื่องมือ/อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

แก้วมังกรแดง (*Hylocereus polyrhizus*) จากสวนเกษตรแก้วมังกร รังสิต คลอง 10 จังหวัดปทุมธานี เก็บเกี่ยวผลผลิตในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2556

3.1.2 วัสดุ

Pipette tip 0.01 ml (Corning Incorporated, USA)

Pipette tip 0.2 ml (Corning Incorporated, USA)

Pipette tip 1 ml (Corning Incorporated, USA)

15×90 mm. plastic petri dish (Eurotubo® Deltalab, Spain)

Centrifuge tube 50 ml (Hycon, USA)

96 well plate (Thermo scientist, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.1.3 เครื่องมือ/อุปกรณ์

Autoclave (SX-700Tomy,USA)

Laminar flow (BioULTRA, Telstar, Spain)

Incubator (Memmert, Germany)

Kjeldahl nitrogen (BuCHI, Switzerland)

Soxhlet extraction (Gerhardt, USA)

Distillation unit (BuCHI, Switzerland)

Freezer, SF-C95 (Sanyo, Japan)

Micropipette P10 (Gilson, France)

Micropipette P200 (Gilson, France)

Micropipette P1000 (Gilson, France)

Microscope (CH30 OLYMPUS, USA)

pH meter (AG 8603 Mettler Toledo, Switzerland)

Refractometer 0 – 32 °Brix (ATAGO CO.,LTD, Japan)

Micro plate reader (Jasco, USA)

Vortex mixer (Lab-line Instrument Inc., USA)

Hydrometer (Alla, France)

Hemacytometer (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.4 สารเคมี

Phenolphthalein, analytical grade (Merck, Germany)

Sodium hydroxide, analytical grade (Merck, Germany)

Potassium metabisulphite (Merck, Germany)

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, USA)

Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich, USA)

Sodium carbonate (Merck, Germany)

Gallic acid (Sigma-Aldrich, USA)

Petroleum ether (Merck, Germany)

Potassium sulphate (Merck, Germany)

Copper sulphate heptahydrate (Sigma-Aldrich, USA)

Sulfuric acid (Merck, Germany) (Sigma-Aldrich, USA)

Sodium hydroxide (Sigma-Aldrich, USA)

Boric acid (Sigma-Aldrich, USA)

Hydrochloric acid (Merck, Germany)

Mixed indicator (methyl red + bromocresol green) (Merck, Germany)

Ethyl alcohol (Merck, Germany)

3.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast extract (Fisher Scientific, USA)

Peptone (Becton, USA)

Glucose (40%, w/v)

Agar (Becton, Dickinson and Company)

3.1.6 สายพันธุ์ยีสต์

- เชื้อยีสต์กลุ่ม Saccharomyces คือ *Saccharomyces cerevisiae 4019* (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.), ไทย) ที่คัดแยกได้จากสัปปะรด

- เชื้อยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces คือ *Saccharomycodes ludwigii* และ *Pichia guilliermondii จาก* ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา ที่คัดแยกจากสัปปะรด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 กระบวนการเตรียมแก้วมังกรแดง

แก้วมังกรแดงที่ใช้ในการศึกษาคือแก้วมังกรแดง สายพันธุ์ *Hylocereus polyrhizus* จากสวนเกษตรแก้วมังกร รังสิต คลอง 10 จังหวัดปทุมธานี ที่เก็บเกี่ยวผลผลิตในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2556 ลักษณะแก้วมังกรแดงที่เลือกใช้คือ ผลสุก สีแดงสด กลีบเลี้ยงมีสามเหลี่ยมเล็กน้อย มีอายุการเก็บเกี่ยวหลังจากออกดอกประมาณ 30 – 45 วัน แล้วทำการปอกเปลือกออก หั่นเป็นชิ้นขนาด 1 × 1 เซนติเมตร และบดด้วยมือระวังไม่ให้เมล็ดสีดำแตก ผสมให้เข้ากัน ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 ซ้ำ เพื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีพื้นฐาน ดังข้อที่ 1 – 13 ส่วนแก้วมังกรแดงที่เหลือนำไปเติมสารละลายน้ำตาลเข้มข้นเพื่อปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ใน

สารละลายให้เท่ากับ 15 องศาบริกซ์ ระหว่างนี้เติมโพแทสเซียมเมทาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมให้แก้วมังกรแดงเข้ากัน แบ่งตัวอย่างแก้วมังกรแดงเป็นส่วนๆ ละ 2,000 กรัม ใส่ถุงพลาสติกทนความเย็นสูง เก็บตัวอย่างโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการหมักต่อไป

1. ปริมาณของความชื้น (แสดงในภาคผนวก ก.1)
2. ปริมาณของไขมัน (แสดงในภาคผนวก ก.2)
3. ปริมาณของโปรตีน (แสดงในภาคผนวก ก.3)
4. ปริมาณของเส้นใยหยาบ (แสดงในภาคผนวก ก.4)
5. ปริมาณของเถ้า (แสดงในภาคผนวก ก.5)
6. ปริมาณของคาร์โบไฮเดรต (แสดงในภาคผนวก ก.6)
7. ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย โดยใช้ รีเฟรคโทมิเตอร์ (AOAC, 1984)
8. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS (Bernfeld, 2006)
9. ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยเครื่องวัดพีเอช (AOAC, 1984)
10. ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดซิตริก) โดยวิธีการไตเทรต (AOAC, 1984)
11. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยวิธี Folin-Ciocalteu's (ดัดแปลงจาก Wolfe et al. (2003))
12. ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH ดัดแปลงจาก Wu et al. (2006))
13. ชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์ด้วย High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) (แสดงในภาคผนวก ก.15)

3.2.2 กระบวนการเตรียมน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดง (red dragon fruit must)

นำถุงแก้วมังกรแดงที่แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ออกมาเพื่อละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำหมักแก้วมังกรแดงให้ได้ 24 องศาบริกซ์ เติมลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมโพแทสเซียมเมทาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 18 – 24 ชั่วโมง

3.2.3 กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดง

กระบวนการหมักแบ่งออกเป็น 3 วิธี คือ 1. เชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว (Single pure culture) 2.เชื้อผสม (Mixed cultures) และ 3. เชื้อผสมลำดับส่วน (Sequential cultures) โดยเลือกใช้เชื้อยีสต์ 3 ชนิด คือ *Saccharomyces cerevisiae* 4019, *Saccharomycodes ludwigii* และ *Pichia guilliermondii*

สำหรับการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว ในกรณีของเชื้อยีสต์กลุ่ม Saccharomyces เติมเชื้อยีสต์ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อยีสต์ในน้ำหมักเท่ากับ 1, 4 และ 8 x 10^6 cfu/ml ตามลำดับ และสำหรับในกรณีเชื้อยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces จะใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อยีสต์ในน้ำหมักเท่ากับ 8 x 10^6 cfu/ml ทั้งสองชนิด

สำหรับการหมักแบบเชื้อผสม (Mixed cultured) นั้น จะผสมเชื้อยีสต์กลุ่ม Saccharomyces กับ Non-Saccharomyces เข้าด้วยกัน โดยการเติมเชื้อตั้งต้นความเข้มข้นกลุ่มละ 4 x 10^6 cfu/ml ลงไป ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อยีสต์ในน้ำหมักเท่ากับ 8 x 10^6 cfu/ml

สำหรับการหมักแบบเชื้อผสมลำดับส่วนนั้น จะเติมเชื้อยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces ลงไปก่อนที่ความเข้มข้น 4 x 10^6 cfu/ml หลังจากผ่านกระบวนการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจะทำการเติมเชื้อยีสต์กลุ่ม Saccharomyces ลงไปที่ความเข้มข้น 4 x 10^6 cfu/ml

ในระหว่างกระบวนการหมักจะเก็บตัวอย่างมาทดสอบทุกๆ 2 วันจนครบ 10 วัน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีของไวน์แก้วมังกรแดง โดยนำน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วแยกส่วนใสประมาณ 40 มิลลิลิตร ใส่หลอดเซนทริฟิวซ์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมโพแทสเซียมเมทาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่แข็งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส ทำการทดลองหมัก 2 ซ้ำ นำไปการทดสอบต่อไปในระหว่างกระบวนการหมักและวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ดังนี้

1. ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้ไฮโดรมิเตอร์ (Bakoyianis et al., 1992)
2. ปริมาณเชื้อยีสต์ทั้งหมด โดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง YPD (Di Maro et al., 2007)
3. ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย โดยใช้รีเฟรคโทมิเตอร์ (AOAC, 1984)
4. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS (Bernfeld, 2006)
5. ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยเครื่องวัดพีเอช (AOAC, 1984)
6. ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดซิตริก) โดยวิธีการไตเทรต (AOAC, 1984)

7. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยวิธี Folin-Ciocalteu's (ดัดแปลงจาก Wolfe et al., 2003)

8. ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH (ดัดแปลงจาก Wu et al., 2006)

สำหรับไวน์แก้วมังกรแดงที่เสร็จสิ้นกระบวนการหมักในวันที่ 10 นั้น จะทำการแยกส่วนใส แล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน นำของเหลวที่ได้บรรจุลงในขวด ปิดจุกด้วยสำลี ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้ไวน์เกิดการคงตัว ดูดไวน์ส่วนใสลงในขวดไวน์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมโพแทสเซียมเมทาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมให้เข้ากัน บรรจุขวดแล้วปิดฝาจุกให้สนิท เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการทดสอบต่อไป

3.2. การประเมินทางประสาทสัมผัสของไวน์แก้วมังกรแดง

เก็บไวน์แก้วมังกรแดงทุกประเภทในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อประเมินผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของไวน์แก้วมังกรแดงโดย กำหนดรหัสตัวอย่างไวน์แก้วมังกรแดงทั้ง 3 รูปแบบเป็นตัวเลขชุด ชุดละ 3 ตัว ให้มีความแตกต่างกัน

การประเมินผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของไวน์แก้วมังกรแดง ใช้การทดสอบความชอบด้านกลิ่นโดยผู้เชี่ยวชาญด้านไวน์ จัดชิมพร้อมกันทุกตัวอย่าง โดยที่ไวน์แก้วมังกรแดงจะต้องมีอุณหภูมิไม่เกินกว่า 18 องศาเซลเซียสเสมอในขณะที่ให้ผู้ทดสอบประเมินการทดสอบ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสทางด้านสี กลิ่น รส บอดี้ และความชอบโดยรวม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การผลิตไวน์แดงจากผลแก้วมังกรแดง สำหรับงานวิจัยนี้จะใช้แก้วมังกรแดงจากจังหวัดปทุมธานีที่ผลเจริญเติบโตเต็มที่และมีอายุประมาณ 45 วัน มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายอยู่ที่ประมาณ 15 องศาบริกซ์ โดยเลือกใช้เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 *Saccharomycodes ludwigii* และ *Pichia guilliermondii* และดำเนินการหมักตามกระบวนการหมัก 3 แบบ คือ แบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว เชื้อผสม และเชื้อผสมลำดับส่วน เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตไวน์แก้วมังกรแดง ในการรายงานผลการทดลองนั้นจะศึกษาองค์ประกอบพื้นฐานในแก้วมังกรแดงเป็นอันดับแรก จากนั้นจะรายงานในส่วนของการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไวน์แก้วมังกรแดงเป็นอันดับต่อมา แล้วจึงตามด้วยผลการเปลี่ยนแปลงในส่วนของสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกในไวน์แก้วมังกรแดง

4.1 ศึกษาองค์ประกอบพื้นฐานของแก้วมังกรแดง

แก้วมังกรแดงที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เป็นสายพันธุ์ *Hylocereus polyrhizus* นำมาจากสวนผลไม้ที่จังหวัดปทุมธานี ช่วงเดือนมิถุนายน ปี พ.ศ. 2556 เริ่มต้นเตรียมแก้วมังกรแดงด้วยการนำแก้วมังกรแดงมาปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นขนาด 1 × 1 เซนติเมตร แล้วจึงบดด้วยมือเปล่าโดยระวังไม่ให้เมล็ดสีดำแตก จากนั้นผสมให้เข้ากัน แก้วมังกรแดงที่ได้จะมีลักษณะเหลวและหนืด นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบพื้นฐานทางเคมีและกายภาพในแก้วมังกรแดงก่อนที่จะนำไปผลิตเป็นไวน์ เพื่อเป็นการพิจารณาคุณภาพของวัตถุดิบเริ่มต้น โดยวิเคราะห์ ความชื้น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เถ้า ไฟเบอร์ พีเอช น้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย ปริมาณกรดทั้งหมด สารต้านอนุมูลอิสระ และสารประกอบฟีนอลิก ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบพื้นฐานทางเคมีและกายภาพของแก้วมังกรแดง แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 องค์ประกอบพื้นฐานทางเคมีและกายภาพของแก้วมังกรแดงสายพันธุ์ *Hylocereus polyrhizus*

องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพ	ค่าที่วิเคราะห์ได้
ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	88.20 ±0.62
เถ้า (เปอร์เซ็นต์)	0.12 ±0.10
โปรตีน (เปอร์เซ็นต์)	0.17 ±0.20
ไขมัน (เปอร์เซ็นต์)	0.40 ±0.10
คาร์โบไฮเดรต (เปอร์เซ็นต์)	2.91 ±0.20
ไฟเบอร์ (เปอร์เซ็นต์)	8.2 ±1.10
พีเอช	4.65 ±0.12
ปริมาณกรดทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	18.0 ±2.00
น้ำตาลรีดิวซ์ (เปอร์เซ็นต์)	6.20 ±0.24
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (องศาบริกซ์)	14.6 ±0.20
กรดมาลิก (กรัมต่อลิตร)	7.6 ±0.20
% DPPH radical scavenging	74.36 ±1.24
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mgGAE/ml)	155.42 ±2.12

แก้วมังกรแดงสายพันธุ์ *Hylocereus polyrhizus* มีองค์ประกอบทางเคมี คือ ความชื้น 88.20 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักเปียก) มีโปรตีน ไขมัน ไฟเบอร์ และเถ้า เท่ากับ 0.17, 0.40, 8.2 และ 0.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างจากสายพันธุ์เดียวกันที่ปลูกที่ประเทศไต้หวันเล็กน้อยคือมีความชื้นที่มากกว่าประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ แต่มีค่าใกล้เคียงกับอีกสายพันธุ์หนึ่งที่ปลูกในประเทศมาเลเซียที่มีความชื้นต่างกันเพียง 1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชของสายพันธุ์ *Hylocereus polyrhizus* มีค่ามากกว่าสายพันธุ์ *Hylocereus undatus* คือ 3.2 1.7 และ 0.45 ตามลำดับ (Khalili et al., 2006) มีค่า % DPPH radical scavenging เท่ากับ 74.36 เปอร์เซ็นต์ และสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 155.42 mgGAE/ml ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายอยู่ 14.6 องศาบริกซ์ น้ำตาลรีดิวซ์ 6.2

เปอร์เซ็นต์หรือเทียบเป็น 42.45 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมด จากรายงานของ Stintzing and Carle (2004) พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในแก้วมังกรส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส แสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในแก้วมังกรแดงอีก 57.55 เปอร์เซ็นต์ มีโอกาศเป็นน้ำตาลซูโครส ซึ่งไม่มีคุณสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing sugar) ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีนี้ กรดอินทรีย์หลักที่พบในแก้วมังกรแดงคือกรดมาลิกประมาณ 7.6 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก. 15) ซึ่งเท่ากับ 42.2 เปอร์เซ็นต์ของกรดทั้งหมดที่ตรวจวัดได้และพบกรดชนิดอื่นๆ อีกเล็กน้อย คือกรดทาร์ทาริกและกรดซิตริก ซึ่งมีมากกว่าที่พบในน้ำส้มและไวน์น้ำส้มที่มีเพียง 1.06 และ 0.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ(Kelebek et al., 2009) และเมื่อเทียบกับสัปปะรดซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นิยมใช้ในการผลิตไวน์ผลไม้นั้น พบว่ามีกรดมาลิกเพียงประมาณ 3 กรัมต่อลิตร และมีกรดซิตริกเป็นกรดอินทรีย์หลัก (Cámara et al., 1994) ซึ่งมีความแตกต่างต่างจากองุ่นที่นิยมใช้ในการทำไวน์จะมีกรดทาร์ทาริกกับกรดมาลิกเป็นกรดอินทรีย์หลักและมีกรดซิตริกอีกเล็กน้อย (Gao & Fleet, 1995; Pretorius, 2000) จากปริมาณกรดมาลิกโดยทั่วไปในการผลิตไวน์แล้วนั้น หากมีปริมาณกรดน้อยจนเกินไปจะทำให้ความเป็นกรดของไวน์ต่ำ ส่งผลให้มักเกิดการปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนการผลิตไวน์และไวน์มีลักษณะของไวน์กรดต่ำ(flat wine) แต่หากพบว่ามีในปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้เกิดรสชาติเปรี้ยว (sour) และเขียว (green) จึงนิยมควบคุมปริมาณกรดมาลิกด้วยวิธีการเปลี่ยนให้เป็นกรดแลคติก (Malo-lactic fermentation) (de Revel et al., 1999; Nielsen & Richelieu, 1999)

4.2 กระบวนการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวด้วยเชื้อยีสต์กลุ่ม Saccharomyces

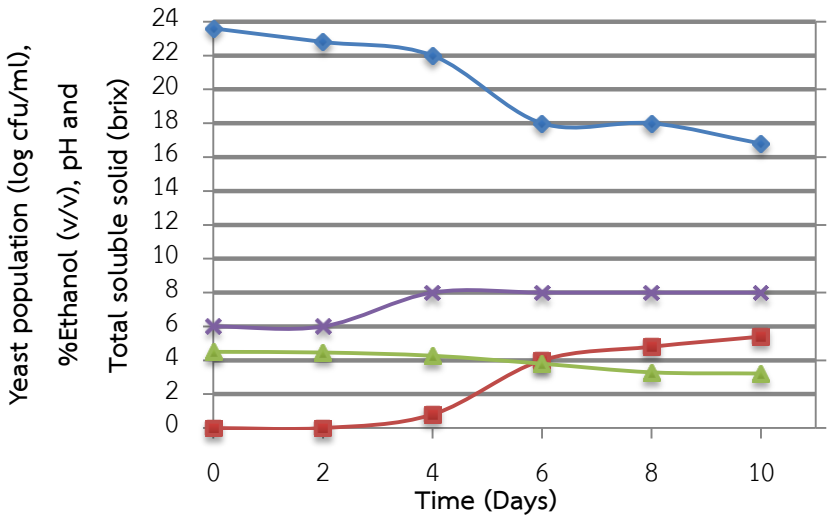
ในกระบวนการผลิตไวน์มีความซับซ้อนที่มากมาย เกิดได้จากหลายๆ ปัจจัย ทั้งสายพันธุ์ขององุ่น วิธีการปลูกองุ่น ลักษณะภูมิประเทศ ลักษณะนิเวศวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ กระบวนการหมัก รวมทั้งความชำนาญของผู้ผลิต ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในกระบวนการผลิต(Boulton et al., 1995) ยีสต์เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นจึงมีผลต่อสภาพแวดล้อมในการหมัก รวมทั้งความสามารถในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์และสารประกอบต่างๆ อีกด้วย (Moreira et al., 2005) จากรายงานของ Moreno et al. (1991) พบว่าในกระบวนการผลิตไวน์ด้วยยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyes cerevisiae* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างกันนั้น จะให้ปริมาณแอลกอฮอล์และกรดที่ระเหยได้แตกต่างกัน สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้ยีสต์สายพันธ์ *Saccharomyces cerevisiae* มีความสามารถในกระบวนการหมักสูง สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในผลไม้ได้ดี จึงนิยมใช้เป็นหัวเชื้อในการนำไปผลิตเป็นไวน์ผลไม้ *(*Martini, *1993)* โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1 4 และ 8 x 10^6 cfu/ml. ตามลำดับ ทำการหมักที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เติมโพแทสเซียมเมทาไบซัลไฟต์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บเฉพาะสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์การเปลี่ยนทางเคมีของไวน์แก้วมังกรแดง

4.2.1 กระบวนการหมักของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 x 10^6 cfu/ml.

กระบวนการหมักของไวน์แก้วมังกรแดงด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 x 10^6 cfu/ml. แสดงดังรูปที่ 9 พบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น 2 log ในวันที่ 4 และคงที่จนวันสุดท้าย กระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ในวันที่ 4 ที่ปริมาณแอลกอฮอล์ 0.8 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ 4 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 6 และเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยจนถึงวันที่ 10 ที่ 5.4 เปอร์เซ็นต์ สำหรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 4 จากนั้นจะสังเกตุเห็นการลดอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 4 – 6 และคงที่จนถึงวันที่ 10 จึงมีการลดระดับอีกครั้งหนึ่งอยู่ที่ 16.8 องศาบริกซ์

ในระยะเริ่มต้นของการหมักจำนวนเซลล์ ไม่มีการเพิ่มขึ้น เนื่องจากอยู่ในระยะการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะใหม่และอาจเกิดการแข่งขันกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น จากนั้นจำนวนเซลล์จึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งเกิดจากกระบวนการหายใจแบบใช้อากาศที่มีอยู่ในน้ำหมักเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ และเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary ส่งผลให้การเพิ่มปริมาณเซลล์คงที่ตั้งแต่วันที่ 4 ของกระบวนการหมัก จึงเปลี่ยนเข้าสู่กระบวนการหมักแบบไม่ใช้อากาศทำให้มีการผลิตแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นประมาณ 0.8 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้นถึง 4.0 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 เนื่องจากมีปริมาณเซลล์ที่เพียงพอและไม่จำเป็นต้องปรับตัวอีกต่อไป ในช่วงวันที่ 6 – 8 พบว่าปริมาณการใช้น้ำตาลคงที่ที่ 18 องศาบริกซ์ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มได้เพียง 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยอาจเกิดจากความเป็นพิษของแอลกอฮอล์ที่มีต่อเซลล์ยีสต์เองทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานภายในเซลล์ในช่วงนี้ แต่เนื่องจากเชื้อยีสต์กลุ่ม Saccharomyces มีผนังเซลล์ที่มีความแข็งแรงทำให้มีการปรับตัวและมีความสามารถในการทนต่อแอลกอฮอล์ที่สูงได้ดีจึงสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ต่อไปจนถึงวันที่ 10 ที่ 5.4 เปอร์เซ็นต์ (Larue et al., 1980) และมีแนวโน้มที่จะสามารถผลิตแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นได้อีกหากทำการหมักต่อไป เนื่องจากปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายยังลดลงอย่างต่อเนื่องและยังไม่มีการลดลงของปริมาณเซลล์ ซึ่งไม่แสดงให้เห็นการตายที่เกิดจากปริมาณแอลกอฮอล์ที่กำลังเพิ่มขึ้น



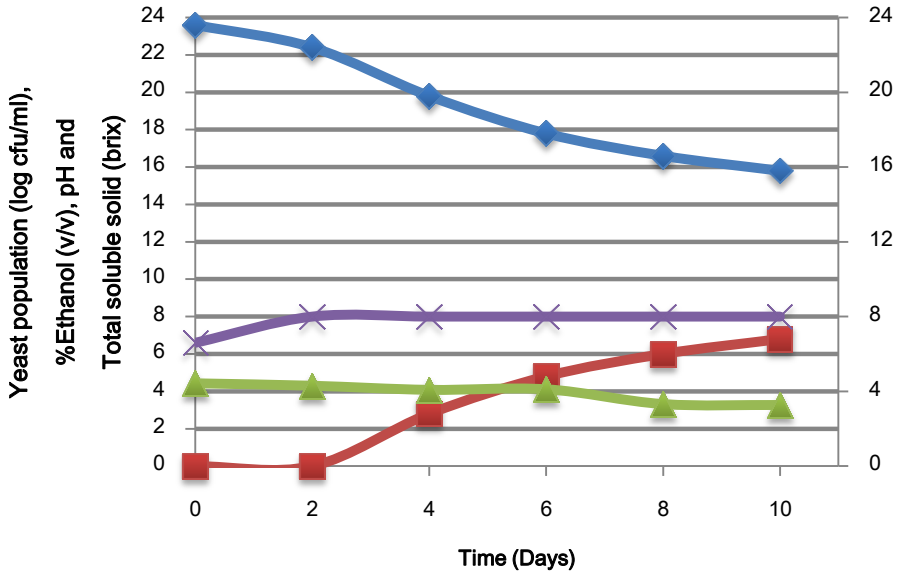
รูปที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม), ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด), ปริมาณประชากรของยีสต์ (กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 x 10^6 cfu/ml. (Max SD±1.2)

4.2.2 กระบวนการหมักของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4 x 10^6 cfu/ml.

กระบวนการหมักของไวน์แก้วมังกรแดงด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ที่ระดับปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4 x 10^6 cfu/ml. แสดงดังภาพที่ 10 พบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจากเชื้อเริ่มต้นประมาณ 2 log cfu/ml ในช่วงวันที่ 2 แต่ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นในวันที่ 4 ที่ระดับ 2.8 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าจนถึงวันสุดท้ายที่ระดับ 6.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายมีการลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 2 จนถึงวันสุดท้าย เหลืออยู่ที่ประมาณ 15.8 เปอร์เซ็นต์

หลังจากเติมกล้าเชื้อยีสต์ลงในน้ำหมัก พบว่ายีสต์เข้าสู่ระยะ log ทันทีในวันที่ 2 ของกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายลดลง เนื่องจากน้ำตาลได้ถูกใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 8 log cfu/ml และยังไม่พบการสร้างแอลกอฮอล์ขึ้นในระบบ แสดงให้เห็นว่ามีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ละลายอยู่ในระบบเล็กน้อย ทำให้ความสามารถในการละลายของน้ำตาลยังคงเกิดขึ้นได้ดีและยีสต์สามารถใช้ได้ต่อเนื่อง (Jones & Greenfield, 1982) เมื่อเข้าสู่ระยะ stationary ปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มมีการสร้างในวันที่ 4 ที่ระดับ 2.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสัมพันธ์กับ

ปริมาณน้ำตาลที่ลดลงและเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ในวันที่ 8 พร้อมๆ กัน แต่ยังคงพบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ถูกสร้างเล็กน้อยและปริมาณเซลล์ค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 10 ของกระบวนการหมัก



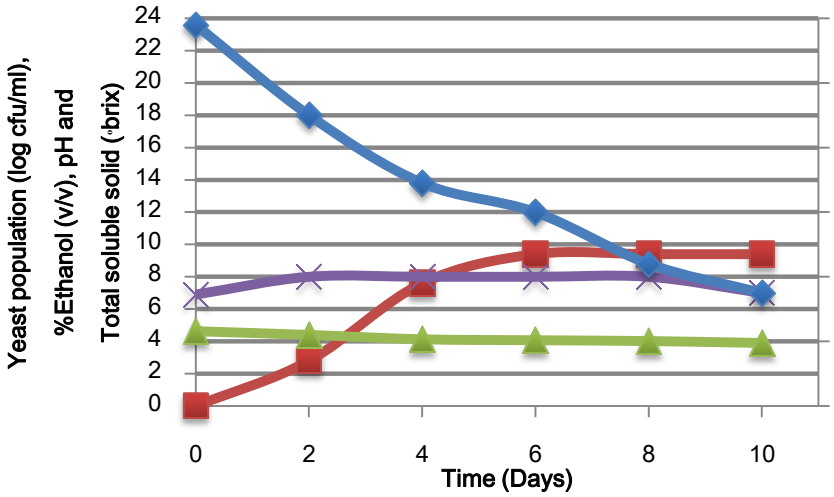
รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4×10^6 cfu/ml. (Max SD±1.2)

4.2.3 กระบวนการหมักของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8×10^6 cfu/ml.

ในกระบวนการหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ที่ระดับปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8×10^6 cfu/ml. แสดงดังรูปที่ 11 พบว่าในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการหมักนั้นปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น 1 log cfu/ml. ในวันที่ 2 และคงที่ไปจนในวันที่ 10 พบว่าปริมาณเชื้อมีการลดลงเล็กน้อยประมาณ 1 log cfu/ml. กระบวนการหมักแอลกอฮอล์เกิดขึ้นในวันที่ 2 และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 6 ที่ระดับ 9.4 เปอร์เซ็นต์และคงที่ไปจนวันสุดท้าย ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องเป็นเส้นตรงตั้งแต่วันที่ 2 จนวันสุดท้ายของการหมัก

กระบวนการหมักแอลกอฮอล์เกิดขึ้นทันทีในวันที่ 2 พบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น 1 log cfu/ml. ซึ่งเกิดขึ้นพร้อมๆ กับการสร้างแอลกอฮอล์ แสดงให้เห็นว่ายีสต์มีการปรับตัวและใช้อากาศเพื่อเพิ่ม

จำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว จากนั้นน้ำตาลส่วนใหญ่จึงถูกนำไปใช้เพื่อสร้างแอลกอออล์ และเมื่อเข้าสู่วันที่ 6 ปริมาณแอลกอฮอล์ที่สร้างได้นั้นหยุดลงที่ 9.4 เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก โดยพบว่าในวันที่ 10 นั้นปริมาณเซลล์ได้ลดลง 1 log cfu/ml. ซึ่งเข้าสู่ระยะ death แสดงให้เห็นว่าในระบบของน้ำหมักอาจเกิดสภาวะความเป็นพิษจากแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการหมักแบบไม่ใช้ใช้อากาศนั้นมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นจนส่งผลให้เซลล์บางส่วนตายลง(D'amore et al., 1989) แต่ยังคงพบการใช้น้ำตาลอยู่ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีเซลล์ยีสต์บางส่วนพยายามรักษาสภาวะของเซลล์ให้เหมาะสมเพื่อความอยู่รอดในกระบวนการหมักไวน์ต่อไป



รูปที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. (Max SD±1.2)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการหมักที่ระดับความเข้มข้นของปริมาณเชื้อเริ่มต้นนั้น พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 x 10^6 cfu/ml. จะมีระยะการปรับตัวของเซลล์ในช่วงเริ่มต้น ทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นช้ากว่าและสูญเสียน้ำตาลเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์แทนการนำไปสร้างแอลกอฮอล์ ซึ่งต่างจากการหมักด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4 และ 8 x 10^6 cfu/ml. พบว่าจะเข้าสู่ระยะ log ทันทีหลังเริ่มกระบวนการหมัก แต่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. จะเข้าสู่ระยะ stationary ก่อน ซึ่งสังเกตได้จากมีการสร้างแอลกอฮอล์ขึ้นในปริมาณที่สูงตั้งแต่วันที่ 2 ของกระบวนการหมัก ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1และ4 x 10^6 cfu/ml. นั้นมีระยะ stationary จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก อาจเนื่องจากปริมาณแอลกอฮอล์ที่สร้างได้นั้นมีปริมาณน้อยกว่าส่งผลให้เซลล์สามารถทนต่อไปได้ แต่ที่ปริมาณเชื้อ

เริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. นั้นพบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์สูง (ethanol toxicity) ตั้งแต่วันที่ 6 ของกระบวนการหมัก โดยการสร้างแอลกอฮอล์ที่รวดเร็วและมากเกินไปนั้น จะนำมาซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์และความเข้มข้นของแอลกอออล์ปริมาณสูงในน้ำหมักจึงทำให้กระบวนการสร้างแอลกอฮอล์ของยีสต์นั้นเกิดการหยุดชะงักได้ (Jones & Greenfield, 1982) ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษภายในระบบน้ำหมักส่งผลให้เซลล์ตายและนำเข้าสู่ระยะ death ของกระบวนการหมัก ซึ่งทำให้เซลล์มีการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ปลดปล่อยสารและเอนไซม์ต่างๆ สู่น้ำหมัก ส่งผลให้ไวน์ที่ได้อาจเกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี (Alexandre & Guilloux-benatier, 2006)

จะเห็นได้ว่าในกระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงข้างต้นที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน จะสังเกตเห็นถึงความสามารถในการปรับตัวของเซลล์ (lag phase) และการเพิ่มจำนวนเซลล์ (log phase) หลังจากเริ่มกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน รวมทั้งความสามารถและประสิทธิภาพในการสร้างแอลกอฮอล์หลังจากเข้าสู่ระยะ stationary ของการหมัก ซึ่งการเข้าสู่ระยะนี้ต่างกันมีผลให้สภาวะของน้ำหมักเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลต่อประสิทธิภาพของยีสต์ที่อยู่ในน้ำหมักที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Moreno et al. (1991) ที่มีการทดลองหมักไวน์ด้วยการเลือกใช้ยีสต์สายพันธุ์เดียวกัน แต่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ซึ่งพบว่าความสามารถในการสร้างปริมาณแอลกอฮอล์และสารประกอบต่างๆ ของยีสต์ในไวน์ที่ได้นั้นมีความแตกต่างกัน รวมทั้งความสามารถในการแข่งขัน ปรับตัวและเพิ่มจำนวนเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมักไวน์ยังแตกต่างกันอีกด้วย

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. เป็นปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว เนื่องจากสามารถเข้าสู่ระยะ log ทันทีเมื่อทำการหมักได้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงอยู่ที่ระดับ 9.4 เปอร์เซ็นต์อย่างรวดเร็ว แต่เมื่อนำมาทดสอบความชอบด้านกลิ่นด้วยผู้เชี่ยวชาญด้านไวน์ พบว่าผู้เชี่ยวชาญส่วนใหญ่เห็นพ้องตรงกันว่ามีกลิ่นเหม็นเขียวเกิดขึ้นในไวน์แก้วมังกรแดง นอกจากนี้ปริมาณสารให้กลิ่นรสที่ดีนั้นมีปริมาณน้อย ส่งผลให้ไวน์แก้วมังกรแดงที่ได้นั้นจะมีเพียงกลิ่นรสของแอลกอออล์ แต่ขาดกลิ่นรสที่ดีที่ควรมีในไวน์ (Zironi et al., 1993)

ซึ่งในกระบวนการหมักไวน์โดยทั่วไปนั้นยีสต์ที่ทำหน้าที่สร้างสารให้กลิ่นรสในไวน์นั้นคือยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces ซึ่งมักพบในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการหมักไวน์ และจะตายลงหลังจากการหมักผ่านไป 3 -4 วัน (Fleet, 1997) เช่น Kloeckera, Metschnikowia, Candida, Hanseniaspora, Rhodotorula, Pichia, Schizosaccaromyces, Kluyveromyces, Hansenula, Saccharomyces, Zygosaccaromyces และ Debaryomycesเป็นต้น (Fleet, 2003) ยีสต์กลุ่มนี้มีความสามารถในกระบวนการหมักต่ำ (low fermentative power) แต่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารให้กลิ่นรสต่างๆ ที่ดีให้แก่ไวน์ เช่น n-propanol isobutanol isoamyl alcohol acetaldehyde

acetoin และ acetic acid เป็นต้น (Ciani & Maccarelli, 1997; Romano et al., 2003) ในงานวิจัยต่อไปนี้เลือกใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomycodes ludwigii* ซึ่งมีความสามารถในการทนต่อซัลเฟอร์ไดออกไซด์ได้ดีกว่า *Saccharomyces cerevisiae* รวมทั้งยังมีความสามารถในการสร้างสารให้กลิ่นรสที่ดีในปริมาณที่สูง เช่น isobutyl alcohol acetoin และ ethyl acetate ซึ่งให้กลิ่นที่มีลักษณะของผลไม้ (fruity) สูง โดยกลิ่นที่ได้มีลักษณะกลิ่นที่คล้ายคลึงกับกลิ่นแอปเปิ้ลและกีวี่ (Romano et al., 1999) นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้หลากหลายชนิด เช่น ซูโครส กลูโคส เป็นต้น ทำให้มีความสามารถในการสร้างแอลกอฮอล์ในระดับที่น่าพึงพอใจอีกด้วย

4.3 กระบวนการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวด้วยเชื้อยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces

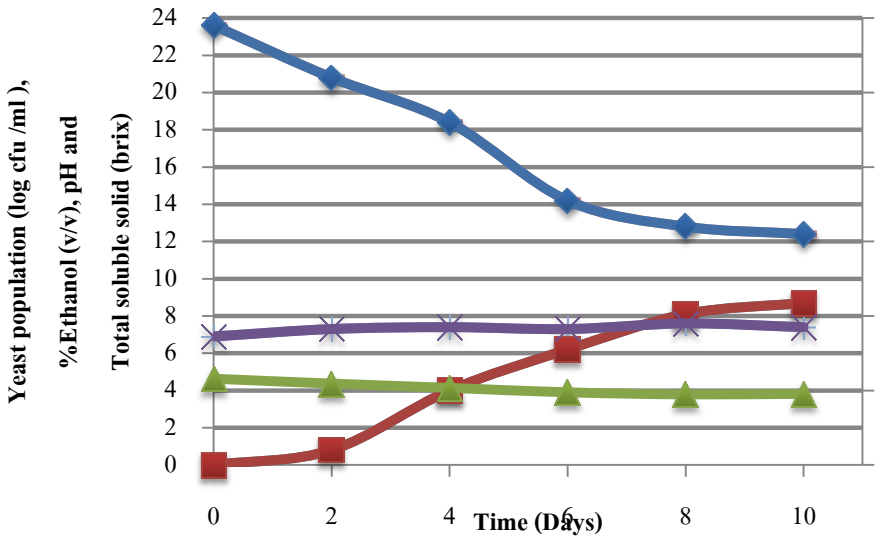
นอกจากปริมาณแอลกอฮอล์ที่เป็นตัวบ่งบอกความเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไวน์ ซึ่งเชื้อยีสต์กลุ่ม Saccharomyces มีหน้าที่ในการสร้างแอลกอฮอล์แล้วนั้น ยังมีลักษณะเฉพาะอีกอย่างหนึ่งที่เด่นชัดสำหรับไวน์ นั้นก็คือกลิ่นรสที่ดีซึ่งเกิดจากกระบวนการหมักที่ซับซ้อนของปฏิกิริยาต่างๆ โดยปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดความซับซ้อนของกลิ่นรสนี้คือยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces ซึ่งมีความสามารถในการสร้างสารให้กลิ่นรสที่ดี จึงทำให้เกิดความหลากหลายของกลิ่นรสในไวน์ (Ciani & Maccarelli, 1997) สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้เชื้อยีสต์กลุ่ม Non-saccharomyces จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Saccharomycodes ludwigii* และ *Pichia guilliermondii* ซึ่งในขั้นแรกจะศึกษากระบวนการหมักของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8×10^6 cfu/ml.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.3.1 กระบวนการหมักของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomycodes ludwigii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8×10^6 cfu/ml.

รูปแบบการหมักของยีสต์ *Saccharomycodes ludwigii* แสดงดังรูปที่ 12 พบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น 0.4 log cfu/ml. ในวันที่ 2 และคงที่จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 2 ที่ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ แล้วจากนั้นก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ระดับ 4 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 2 จนสิ้นสุดในวันสุดท้ายที่ 8.7 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายก็มีการลดลงเรื่อยๆ และเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าในวันที่ 6 ที่ระดับ 14.2 องศาบริกซ์ และเริ่มคงที่ในระหว่างวันที่ 10 ที่ระดับ 12.4 องศาบริกซ์

หลังจากเติมหัวเชื้อลงในน้ำหมัก พบว่าปริมาณเซลล์ยีสต์มีการเพิ่มขึ้นเข้าสู่ระยะ log และสภาวะการหมักแบบไม่ใช้อากาศในทันที โดยน้ำตาลส่วนใหญ่ถูกใช้การสร้างเซลล์ในช่วงแรกและถูกสร้างเป็นแอลกอฮอล์อีกเล็กน้อยหลังจากนั้นในวันที่ 2 และหลังจากเจริญเข้าสู่ระยะ stationary พบว่ามีการใช้น้ำตาลเพื่อสร้างแอลกอฮอล์อย่างรวดเร็วถึง 8.7 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 10 ของการหมัก



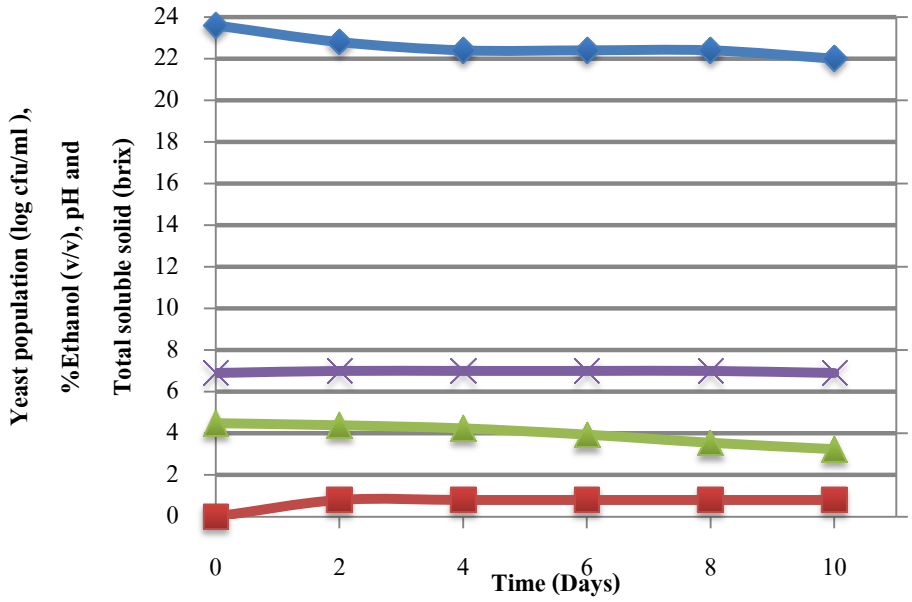
รูปที่ 12 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomycodes ludwigii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. (Max SD±1.2)

4.3.2 กระบวนการหมักของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Pichia guilliermondii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml.

จากการศึกษารูปแบบการหมักของยีสต์ *Pichia guilliermondii* แสดงดังรูปที่ 13 พบว่าปริมาณเซลล์มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงเริ่มต้นที่เพียง 0.1 log cfu/ml เท่านั้น และลดลงในวันที่ 10 เท่ากับปริมาณเริ่มต้น ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 2 และคงที่จนสิ้นสุดการหมักที่ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายในน้ำหมักมีปริมาณลดลงเล็กน้อยและคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการหมัก

ในระยะ log ปริมาณเซลล์มีการเพิ่มเพียงเล็กน้อยนั้นอาจเนื่องจากยีสต์สายพันธุ์ *Pichia guilliermondii* เนื่องจากมีความสามารถในการหมักที่ต่ำ ทำให้ไม่สามารถนำน้ำตาลซูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลหลัก มาใช้ในการหมักได้โดยตรง (Venturin et al., 1995) น้ำตาลที่ถูกใช้เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์นั้นจึงน่าจะเป็นน้ำตาลกลูโคสและหมดลงภายในวันที่ 2 ของกระบวนการหมัก เหลือแต่น้ำตาลฟรุกโตสและซูโครสเท่านั้นในระบบน้ำหมัก เมื่อเข้าสู่ระยะ stationary และสภาวะไม่มีอากาศจึงจะทำให้เกิดสภาวะการหมักหยุดชะงัก (Stuck fermentation) ส่งผลให้ไม่มีการใช้น้ำตาลเพื่อสร้างแอลกอฮอล์ ซึ่งตรงกับลักษณะการใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์กลุ่ม Non-saccharomyces ตามรายงาน

ของ Zohre and Erten (2002) ดังนั้นปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายในน้ำหมักมีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อยและไม่สามารถสร้างแอลกอฮอล์ได้ตามไปด้วย ซึ่งเมื่อนำไปเทียบกับรายงานของ Ciani et al. (2006) พบว่าการหมักไวน์จากองุ่นแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวด้วยยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces สามารถสร้างแอลกอฮอล์ได้เล็กน้อย เมื่อเทียบกับยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งสร้างได้ถึง 15.9 เปอร์เซ็นต์ และสามารถใช้น้ำตาลได้หมดในกระบวนการหมักอีกด้วย



รูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Pichia guilliermondii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. (Max SD±1.2)

ปริมาณเซลล์ในช่วงระยะ log พบว่าลักษณะการเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์ยีสต์ *Saccharomycodes ludwigii* มีคล้ายคลึงกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 แต่มีความแตกต่างในด้านปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเพียง 0.4 log เท่านั้น แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการปรับตัวและเพิ่มจำนวนของยีสต์ทั้งสองชนิดที่แตกต่างกัน (Moreira et al., 2005) และมีการใช้น้ำตาลเพื่อสร้างแอลกอฮอล์ที่ช้ากว่าอีกด้วย สังเกตได้จากปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นทันทีในวันที่ 2 ของการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักพบว่ายีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 เข้าสู่ระยะ death ทันที อาจเนื่องมาจากมีการสะสมของ

ปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงตั้งแต่วันที่ 6 ของกระบวนการหมัก ทำให้สภาวะภายในน้ำหมักเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด ซึ่งแตกต่างจากยีสต์ *Saccharomycodes ludwigii* ที่มีการสร้างแอลกอฮอล์อย่างช้าๆ รวมทั้งยังมีความสามารถในการทนแอลกอฮอล์ได้ดีอีกด้วยแต่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับยีสต์กลุ่ม Saccharomyces (Boulton et al., 1995) และด้วยเหตุผลนี้ทำให้แอลกอฮอล์ที่ได้นั้นยังไม่ส่งผลกระทบต่อการอยู่รอดของเซลล์มากนักซึ่งลดลงไปเพียงเล็กน้อยในวันสุดท้ายของการหมักไวน์แก้วมังกรแดง

จากการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในกระบวนการหมักของยีสต์ทั้งสามชนิดนั้น พบว่ายีสต์กลุ่ม Saccharomyces มีระยะ log และ stationary ที่รวดเร็วกว่ายีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces นอกจากนี้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Saccharomycodes ludwigii* นั้นสามารถใช้น้ำตาลซูโครสที่เติมลงไปในน้ำหมักเพื่อเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ได้ แตกต่างจากยีสต์สายพันธุ์ *Pichia guilliermondii* ซึ่งไม่สามารถใช้ได้ (Venturin et al., 1995) และเมื่อนำมาทดสอบความชอบด้านกลิ่นด้วยผู้เชี่ยวชาญด้านไวน์ พบว่าผู้เชี่ยวชาญส่วนใหญ่มีความเห็นตรงกันว่ายีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces ทั้งสองชนิดให้ผลการทดสอบทางด้านกลิ่นที่ดีกว่ายีสต์กลุ่ม Saccharomyces ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการสร้างสารให้กลิ่นรสที่ดีของยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces ซึ่งจะช่วยพัฒนาทำให้ไวน์มีกลิ่นรสที่ดีขึ้น ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Romano et al. (2003) ยีสต์ในกลุ่ม Non-Saccharomyces มีความสามารถในการสร้างสารให้กลิ่นรสที่ดีแก่ไวน์ เช่น n-propanol isobutanol isoamyl alcohol acetaldehyde และ acetoin เป็นต้น แต่ยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces นั้นมีความสามารถในการใช้น้ำตาลและสร้างแอลกอฮอล์ที่ต่ำ จึงนิยมนำความสามารถนี้ไปใช้ร่วมกับยีสต์กลุ่ม Saccharomyces ซึ่งมีอัตราการเจริญและผลิตแอลกอฮอล์ที่ดีกว่า ซึ่งจะช่วยพัฒนาปรับปรุงกลิ่นรสและกระบวนการหมักไวน์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Banks & Overton, 2010)

ในกระบวนการหมักแบบร่วมกัน (spontaneous fermentation) ของไวน์นั้น เป็นการหมักด้วยยีสต์หลากหลายสายพันธุ์ โดยในการหมักแบบธรรมชาตินั้น พบว่าในช่วงแรกของการหมักยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces ซึ่งมีความสามารถในการหมักที่ต่ำ แต่มีความสามารถในการสร้างสารให้กลิ่นรสที่ดีแก่ไวน์ และเมื่อกระบวนการหมักผ่านไป 2 - 3 วันก็จะตายไป เนื่องจากมีปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นในน้ำหมัก แล้วจึงเป็นหน้าที่ของยีสต์กลุ่ม Saccharomyces ซึ่งมีความสามรถในการสร้างและทนแอลกอฮอล์ที่สูงกว่า ทำการหมักไปจนสิ้นสุด (Fleet, 1993; Fleet, 1997) ในการหมักแบบร่วมกันนั้นสามารถเพิ่มสารให้กลิ่นรสที่ดีแก่ไวน์ได้ รวมทั้งสามารถช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดอะซิติก (Acetic acid bacteria) ทำให้ไวน์ไม่ถูกเปลี่ยนเป็นน้ำส้มสายชู (Zironi et al., 1993) ในปัจจุบันกระบวนการหมักแบบ

ร่วมกันถูกพัฒนาอย่างต่อเนื่อง สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 วิธี หลักๆ คือ การหมักแบบเชื้อผสมและการหมักแบบเชื้อผสมลำดับส่วน กล่าวคือ การหมักแบบเชื้อผสมนั้นจะทำการเติมยีสต์ลงไปผสมพร้อมๆกัน เริ่มต้นกระบวนการหมักทันที ซึ่งอาจทำให้ยีสต์ที่เติมลงไปนั้นเกิดสภาวะการแข่งขันกันใช้น้ำตาลและสร้างแอลกอฮอล์ออกมาได้ดี แต่วิธีนี้มักจะประสบปัญหาคือเมื่อทำการหมักไปสักระยะหนึ่งยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces จะลดจำนวนลงเนื่องจากไม่สามารถทนต่อปริมาณแอลกอฮอล์ที่ถูกสร้างขึ้นมาได้ ทำให้ไม่สามารถสร้างสารให้กลิ่นรสที่ดีแก่ไวน์ได้ จึงมีการแก้ปัญหาโดยการเติมยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces ที่มีความสามารถในการหมักที่ต่ำลงไปทำหน้าที่ในการหมักก่อนแล้วจึงเติมยีสต์กลุ่ม Saccharomyces ลงไปทำหน้าที่ต่อให้การหมักเสร็จสมบูรณ์ (Toro & Vazquez, 2002) พบว่ากระบวนการหมักทั้ง 2 วิธีให้ประสิทธิภาพในการหมักที่น่าพอใจเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว (Toro & Vazquez, 2002; Zironi et al., 1993)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษากระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงแบบร่วมกันทั้งสองวิธี คือการหมักแบบเชื้อผสมและการหมักแบบเชื้อผสมลำดับส่วน ด้วยเชื้อยีสต์กลุ่ม Saccharomyces คือ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ร่วมกับยีสต์กลุ่ม Non-saccharomyces คือ *Saccharomycodes ludwigii* และ *Pichia guilliermondii*

4.4 กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงแบบเชื้อผสม (Mixed Culture)

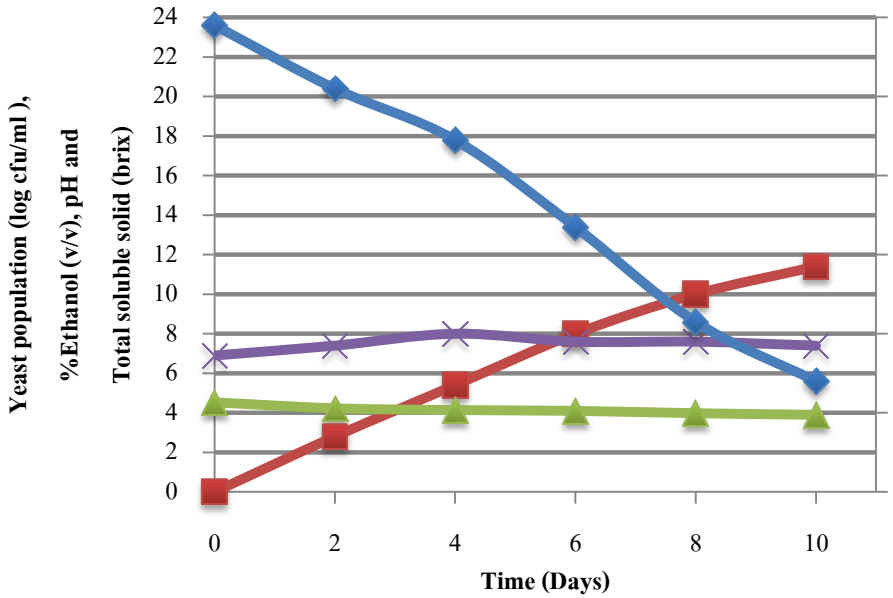
สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ร่วมกับเชื้อกลุ่ม Non-saccharomyces จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Saccharomycodes ludwigii* และ *Pichia guilliermondii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8×10^6 cfu/ml. ซึ่งจะเติมเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ลงในน้ำหมักพร้อมๆ กัน ในอัตราส่วน 1: 1

4.4.1 กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Saccharomycodes ludwigii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8×10^6 cfu/ml.

กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Saccharomycodes ludwigii* แสดงดังรูปที่ 14 พบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 1 log cfu/ml ในวันที่ 4 จากนั้นลดลงทันทีเหลือ 7.6 log cfu/ml ในวันที่ 6 และคงที่ไปจนวันสุดท้ายลดลงเล็กน้อยเหลือประมาณ 7.4 log cfu/ml ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นทุกๆวันเฉลี่ยประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ จนวันสุดท้ายที่ระดับ 11.4 เปอร์เซ็นต์ โดยเพิ่มขึ้นมากที่สุดในวันที่ 2 ที่ระดับ

2.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายลดลงอย่างต่อเนื่องวันละประมาณ 2.5 – 3.0 องศาบริกซ์ จนถึงวันสุดท้ายเท่ากับ 5.6 องศาบริกซ์

ปริมาณเซลล์มีการเพิ่มขึ้นเข้าสู่ระยะ log ใช้เวลาประมาณ 4 วัน มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 8 log cfu/ml ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายลดลง นอกจากนี้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามียีสต์ 1 สายพันธุ์มีการเข้าสู่ระยะ stationary ก่อนอีกสายพันธุ์หนึ่งที่ใช้น้ำตาลเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ จนถึงวันที่ 6 ของการหมัก หลังจากเข้าระยะ stationary ทั้งคู่น้ำตาลถูกใช้เพื่อสร้างแอลกอฮอล์อย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดในวันที่ 10 ของกระบวนการหมัก และพบว่ามีปริมาณเซลล์ลดลงเล็กน้อยในวันที่ 10 ซึ่งอาจเกิดจากการสะสมของแอลกอฮอล์ในระบบการหมักในปริมาณที่สูง (Hallsworth, 1998)



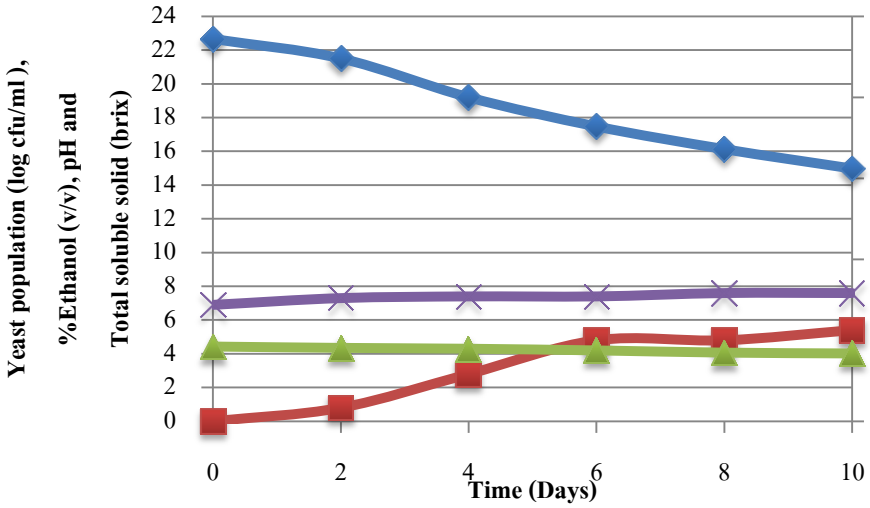
รูปที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae 4019* และ *Saccharomycodes ludwigii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. (Max SD±1.2)

4.4.2 กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Pichia guilliermondii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml.

กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Pichia guilliermondii* แสดงดังรูปที่ 15 พบว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นเพิ่มขึ้นประมาณ 0.2 log cfu/ml ในทุกๆ วัน จนสิ้นสุดที่ 7.6 log cfu/ml ในวันสุดท้ายของกระบวนการหมัก ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นที่ระดับ 2.8 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 4 จากนั้นเพิ่มขึ้นอีก 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วคงที่อีก 4 วันที่ระดับ 4.8 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงกลับมาเพิ่มอีกครั้งในวันที่ 10 ที่ระดับ 5.4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายลดลงประมาณ 1.6 องศาบริกซ์ในทุกๆ วัน และสิ้นสุดที่ระดับ 15.6 องศาบริกซ์

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายลดลงเพิ่มขึ้น 2.4 องศาบริกซ์ หลังจากเข้าสู่ระยะ stationary ในวันที่ 2 และมีการสร้างแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น 4.8 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 6 ของการหมัก ในวันที่ 8 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายลดลง 1.4 องศาบริกซ์ ซึ่งน้ำตาลในส่วนนี้ได้ถูกนำไปใช้เพื่อสร้างเซลล์แทนที่การสร้างแอลกอฮอล์ ซึ่งสังเกตได้จากปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณแอลกอฮอล์นั้นมีค่าคงที่ จึงทำให้ไม่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอลกอฮอล์ในวันที่ 8 และเมื่อเข้าสู่วันที่ 10 พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นแต่ปริมาณเซลล์คงที่ แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลถูกใช้ในการสร้างแอลกอฮอล์ จากสาเหตุที่กล่าวมาการเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์น่าจะเกิดจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้แตกตัวเป็นกลูโคสและฟรุกโตส (Sutton & Lampen, 1962) ทำให้ยีสต์ *Pichia guilliermondii* สามารถใช้ประโยชน์จากกลูโคสได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Pichia guilliermondii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. (Max SD±1.2)

4.5 กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมลำดับส่วน (Sequential Cultures)

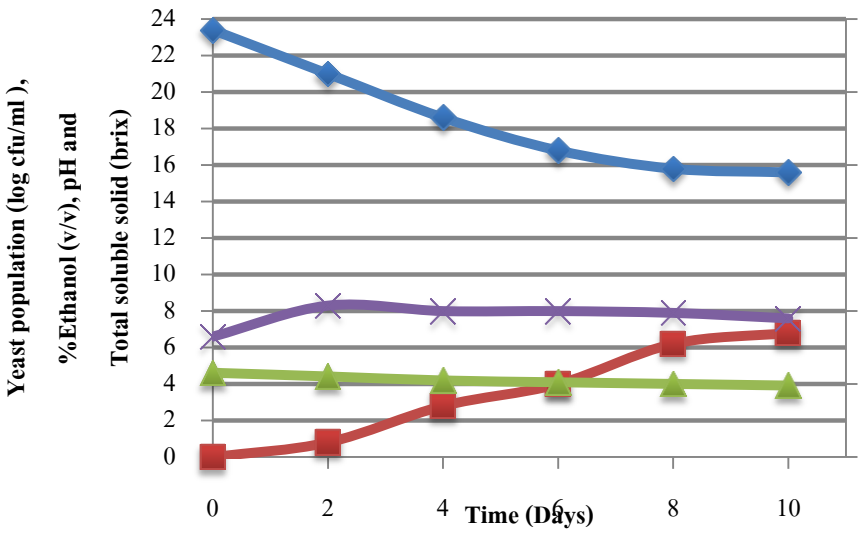
สำหรับงานวิจัยนี้จะเลือกใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ร่วมกับเชื้อกลุ่ม Non-Saccharomyces จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Saccharomycodes ludwigii* และ *Pichia guilliermondii* ที่การเติมปริมาณเชื้อชนิดละ 4 x 10^6 cfu/ml ซึ่งจะเติมยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces ลงในน้ำหมักก่อน จากนั้นจึงเติมเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ตามลงไปในวันที่ 2 ของการหมัก

4.5.1 กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมลำดับส่วนระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Saccharomycodes ludwigii* ที่การเติมปริมาณเชื้อชนิดละ 4 x 10^6 cfu/ml

กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมลำดับส่วนระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Saccharomycodes ludwigii* แสดงดังรูปที่ 16 พบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น 2.3 log cfu/ml ในวันที่ 2 และลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ระดับ7.6 log cfu/ml

ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเป็น 2.8 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 4 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ที่ระดับ 6.8 เปอร์เซ็นต์ในวันสุดท้าย ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายในแต่ละวันลดลงประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มคงที่ตั้งแต่วันที่ 8 จนสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ระดับ 15.6 องศาบริกซ์

ยีสต์ *Saccharomycodes ludwigii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4 x 10^6 cfu/ml พบว่า ระยะ log น้ำตาลได้ถูกใช้เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ ในวันที่ 2 ของการหมัก และเมื่อทำการเติมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ลงไปพบว่าปริมาณเซลล์ลดลงในวันที่ 4 ของการหมัก มีการสร้างแอลกอฮอล์ขึ้นอย่างรวดเร็ว และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักในวันที่ 10 พบว่าการสร้างแอลกอฮอล์และการใช้น้ำตาลเริ่มคงที่



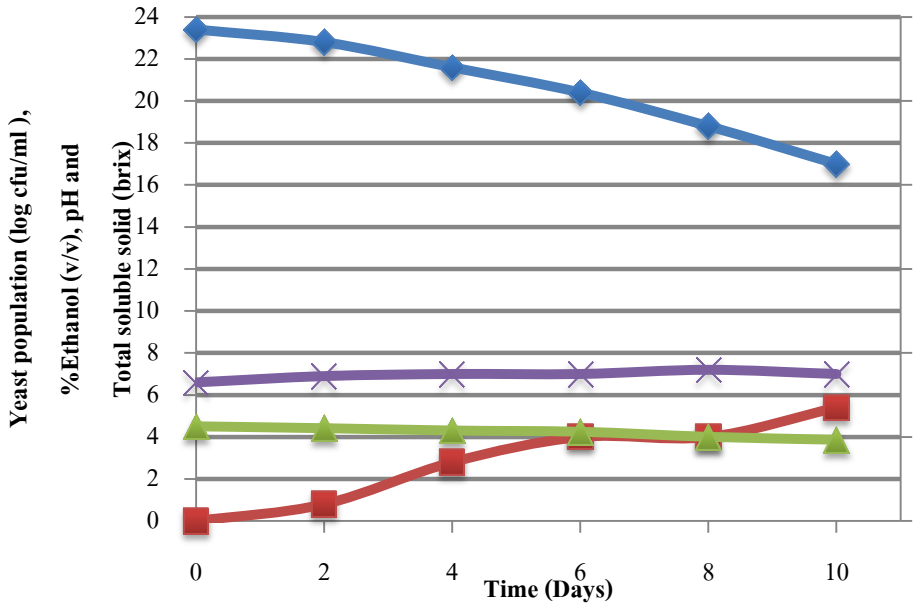
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 16 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมลำดับส่วนระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae 4019* และ *Saccharomycodes ludwigii* ที่การเติมปริมาณเชื้อชนิดละ 4 x 10^6 cfu/ml (Max SD±1.2)

4.5.2 กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมลำดับส่วนระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Pichia guilliermondii* ที่การเติมปริมาณเชื้อชนิดละ 4 x 10^6 cfu/ml

กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อแบบผสมลำดับส่วนระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Pichia guilliermondii* แสดงดังรูปที่ 17 พบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 7 log ในวันที่ 2 ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 2 และเพิ่มขึ้นถึงระดับ 4 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 6 จนสิ้นสุดการหมักวันสุดท้ายที่ระดับ 5.4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลายลดลงเฉลี่ยวันละประมาณ 1 องศาบริกซ์และลดลงเรื่อยจนวันสุดท้ายที่ระดับ 17 องศาบริกซ์

ในระยะ log นั้นมีปริมาณเซลล์และมีการสร้างแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีสต์ *Pichia guilliermondii* มีการใช้น้ำตาลกลูโคสภายในระบบ และหลังจากเติมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 น้ำตาลถูกนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์อีกเล็กน้อยและถูกนำไปสร้างเป็นแอลกอฮอล์ส่วนใหญ่จนถึงวันที่ 6 ของการหมัก



รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (สี่เหลี่ยม),ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย (สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด),ปริมาณประชากรของยีสต์(กากบาท) และค่าพีเอช (สามเหลี่ยม) ในน้ำหมักไวน์แก้วมังกรแดงของเชื้อผสมลำดับส่วนระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Pichia guilliermondii* ที่การเติมปริมาณเชื้อชนิดละ 4 x 10^6 cfu/ml (Max SD±1.2)

ในกระบวนการหมักแบบรวมกันทั้ง 2 วิธี นั้นจะเห็นว่ามีระยะ log ของเชื้อทั้งสองชนิดที่แตกต่างกัน ซึ่งเกิดจากสภาวะในการหมักที่แตกต่างกัน กล่าวคือปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่แตกต่างกันส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการสร้างแอลกอฮอล์และการเพิ่มปริมาณของเซลล์ในน้ำหมัก และยีสต์ *Saccharomycodes ludwigii* มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและสร้างแอลกอฮอล์ที่ดีกว่ายีสต์ *Pichia guilliermondii* ในกระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดง

รูปแบบของกระบวนการหมักทั้ง 2 วิธีของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Saccharomycodes ludwigii* นั้นมีความคล้ายคลึงกัน แต่ประสิทธิภาพในการหมักที่ได้นั้นแตกต่างกัน พบว่าในการหมักแบบเชื้อผสมมีการแข่งขันกันใช้น้ำตาลเพื่อสร้างแอลกอฮอล์ที่สูงกว่าวิธีเชื้อผสมลำดับส่วน ซึ่งยีสต์ *Saccharomycodes ludwigii* ใช้น้ำตาลเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ในช่วงเริ่มต้นแล้วจึงสร้างแอลกอฮอล์หลังจากเติมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ลงไปในระบบการหมัก แต่พบว่าความสามารถในการหมักนั้นไม่มากเท่ากับการหมักแบบเชื้อผสม อาจเนื่องมาจากในระหว่างการเข้าสู่ระยะ stationary ปริมาณเซลล์ของยีสต์ *Saccharomycodes ludwigii* มีการสร้างสารบางชนิดที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ก็เป็นได้ ซึ่งหากมองกระบวนการหมักของเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4 x 10^6 cfu/ml ยีสต์ใช้น้ำตาลเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ประมาณ 2 วันก่อนเข้าสู่ระยะ stationary

การหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Pichia guilliermondii* นั้นมีลักษณะการหมักที่คล้ายคลึงกันอย่างมากคือมีการใช้น้ำตาลและปริมาณแอลกอฮอล์จะถูกสร้างอย่างรวดเร็วหลังจากที่เติมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Pichia guilliermondii* มีความสามารถในการสร้างแอลกอฮอล์และรวมทั้งความสามารถในการใช้น้ำตาลค่อนข้างต่ำอีกด้วย

การทดสอบความชอบด้านกลิ่นด้วยผู้เชี่ยวชาญด้านไวน์ พบว่าผู้เชี่ยวชาญส่วนใหญ่เห็นว่าการหมักแบบเชื้อสองชนิดรวมกันให้กลิ่นที่ดีกว่าการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว จากงานวิจัยข้างต้นนั้น จึงสรุปได้ว่า กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงที่เหมาะสมคือ กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงด้วยวิธีเชื้อแบบผสมระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 และ *Saccharomycodes ludwigii* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. เนื่องจากมีการใช้น้ำตาลเพื่อสร้างแอลกอฮอล์ที่ได้สูง รวมทั้งยังเป็นวิธีที่ง่ายต่อการผลิตไวน์อีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ

4.6 การเปลี่ยนแปลงการเปลี่ยนแปลงของสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบโพลีฟอลในไวน์แก้วมังกรแดง

ในงานวิจัยนี้จะใช้วิธี DPPH เพื่อทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของไวน์แก้วมังกรแดง โดยวิธี DPPH เป็นวิธีทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยอาศัยกลไลการเกิดปฏิกิยาของอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวจากสารต้านอนุมูลอิสระถูกจับโดยอนุมูลของ DPPH• ซึ่งเป็นสีม่วง เมื่อตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาทีอนุมูลของ DPPH• เกิดการรีดิวซ์เปลี่ยนเป็น DPPHn ที่มีสีเหลือง แล้วติดตามการลดลงของสีโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

การเปลี่ยนแปลงของสารต้านอนุมูลอิสระของไวน์แก้วมังกรแดงแสดงดังตารางที่ 5 นั้นมีปริมาณค่า % DPPH radical scavenging เริ่มต้นประมาณ 74 เปอร์เซ็นต์และเมื่อผ่านการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวด้วยยีสต์กลุ่ม Saccharomyces จะมีค่าลดลง เมื่อผ่านการหมักในวันที่ 2 ซึ่งแตกต่างกับการหมักที่มียีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces นั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของค่า % DPPH radical scavenging ที่ลดลงประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น จากการศึกษายีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* เมื่อมีกระบวนการหมักที่ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกันจะทำให้ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระลดลงที่เหมือนกันอย่างมีนัยสำคัญ (Malbaša et al., 2011) จากผลการทดลองในน้ำหมักของไวน์ที่มียีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces จะมีการเปลี่ยนแปลงของสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างกันในวันที่ 2 ของกระบวนการหมักเมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้น ยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces จึงน่าจะเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อค่า % DPPH radical scavenging เริ่มต้นในกระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดง พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ความเข้มข้นเริ่มต้น 4 x 10^6 cfu/ml. สามารถเพิ่ม % DPPH radical scavenging มากขึ้นเมื่อก่อนสิ้นสุดกระบวนการหมักเท่ากับ 79.1 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของสารต้านอนุมูลอิสระของไวน์แก้วมังกรแดง

วันที่	% DPPH radical scavenging								
	P_SC3	P_SC5	P_SC10	P_SL10	P_PG10	M_SC+SL10	M_PG+SC10	Sq_SL+SC10	Sq_PG+SC10
0	72.97	74.26	74.06	74.82	73.71	74.82	75.02	74.28	73.98
2	64.77	70.31	67.67	73.01	73.30	70.35	74.8	72.32	73.20
4	60.18	78.24	73.55	68.08	70.41	68.27	74.21	71.89	72.54
6	58.81	78.39	74.05	69.54	65.76	64.32	72.82	69.72	70.12
8	58.10	79.10	73.81	69.01	65.55	62.81	70.18	66.55	70.02
10	58.44	74.48	71.96	68.26	64.20	63.38	69.02	65.22	68.78

(Max. SD±2.45)

P = Pure Culture, M=Mixed Cultures และ Sq = Sequential Cultures

SC = *Saccharomyces cerevisiae* 4019 , SL = *Saccharomycodes ludwigii* และ PG = *Pichia guilliermondii*

3 =1 x 10^6 cfu/ml. , 5= 4 x 10^6 cfu/ml.และ 10 =8 x 10^6 cfu/ml.

Wu et al. (2006) และติดตามสารประกอบฟีนอลิกรวมใช้วิธี Folin-Ciocalteu's reagent ซึ่งอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของโมลิบโดทังสเตตไอออน (Molybdotungstate-ion) ประกอบด้วยโซเดียมทังสเตต (Sodium tungstate) โซเดียมโมลิบเดต (Sodium bolybdate) กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) และ โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) ซึ่งจะพบการเปลี่ยนแปลงของไอออน Mo(VI) ซึ่งมีสีเหลือง และเมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Mo(V) ซึ่งมีสีน้ำเงิน ติดตามโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และรายงานค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในรูปของ มิลลิกรัมของกรดแกลลิค (Gallic acidequivalent,mg/gGAE) (Tsai et al., 2005)

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกของไวน์แก้วมังกรแดง

วันที่	สารประกอบฟีนอลิก (mgGAE/ml)								
	P_SC3	P_SC5	P_SC10	P_SL10	P_PG10	M_SC+SL10	M_PG+SC10	Sq_SL+SC10	Sq_PG+SC10
0	162.28	154.09	150.81	159.01	153.6	155.2	153.14	156.49	154.12
2	167.37	135.89	147.53	108.84	103.27	120.42	118.2	111.51	125.06
4	216.88	153.92	235.89	104.25	118.52	162.69	120.89	118.21	118.42
6	214.74	216.22	263.93	100.81	101.3	185.21	125.91	127.83	125.53
8	291.96	213.92	239.17	92.12	102.94	187.71	132.22	145.23	130.62
10	281.79	213.11	215.89	106.71	108.68	197.53	128.74	182.35	132.47

(Max. SD±2.45)

P = Pure Culture, M=Mixed Cultures และ Sq = Sequential Cultures

SC = *Saccharomyces cerevisiae* 4019 , SL = *Saccharomycodes ludwigii* และ PG = *Pichia guilliermondii*

3 =1 x 10^6 cfu/ml. , 5= 4 x 10^6 cfu/ml.และ 10 =8 x 10^6 cfu/ml.

โดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลิกในผลไม้นั้นสามารถถูกสกัดได้ด้วยแอลกอฮอล์ (Cai et al., 2003) จากตารางที่ 6 กลับพบว่าการหมักโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 x 10^6 cfu/ml.ที่สร้างแอลกอฮอล์ได้เพียง 5.4 เปอร์เซ็นต์ นั้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดในวันที่ 8 ได้เท่ากับ 291.96 mgGAE/ml เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ที่สร้างแอลกอฮอล์ได้มากกว่า และการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวด้วยยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces นั้นมีสารประกอบฟีนอลิกลดลงจนสิ้นสุดกระบวนการหมักอยู่ที่ประมาณ 107 mgGAE/ml เมื่อนำไปเทียบกับการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวด้วยยีสต์กลุ่ม Saccharomyces นั้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ที่ประมาณ 210 mgGAE/ml ในกระบวนการหมักแบบเชื้อผสมและเชื้อผสมลำดับส่วนนั้น พบว่าการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ร่วมกับ

Saccharomycodes ludwigii จะสามารถพบสารประกอบฟีนอลิกที่สูงกว่าการหมักร่วมกับ *Pichia guilliermondii* ประมาณ 50 mgGAE/ml นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกที่เกิดขึ้นอาจไม่ได้ถูกสกัดจากแอลกอฮอล์ ในการหมักแต่เป็นสารอื่นๆ ที่ยีสต์สร้างขึ้นเช่น กรด หรือ เอนไซม์ต่างๆ ก็เป็นได้ (Heresztyn, 1986)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในไวน์แก้วมังกรแดงที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดคือไวน์ที่หมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ด้วยวิธีหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวความเข้มข้น 1 x 10^6 cfu/ml. เท่ากับ 281.79$\pm$ 2.12 mg/gGAE มากกว่าวิธีการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวอื่นๆ ($P \leq 0.05$) กระบวนการหมักแบบร่วมกัน พบว่าการหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ร่วมกับเชื้อ *Saccharomycodes ludwigii* นั้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าการหมักร่วมกับเชื้อ *Pichia guilliermondii* อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) สารประกอบฟีนอลิกที่เกิดขึ้นในการหมักไวน์แก้วมังกรแดงนั้นแสดงถึงโอกาสและความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของไวน์แก้วมังกรแดง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาองค์ประกอบพื้นฐานของแก้วมังกรแดงสายพันธุ์ *Hylocereus polyrhizus* ที่มาจากที่ได้จากสวนเกษตรแก้วมังกร รังสิต คลอง 10 จังหวัดปทุมธานี เก็บเกี่ยวผลผลิตในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2556 พบว่ามีลักษณะองค์ประกอบพื้นฐานทางเคมีคือ ความชื้น 88.20 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักเปียก) มีโปรตีน ไขมัน ไฟเบอร์ คาร์โบไฮเดรต และเถ้า เท่ากับ 0.17, 0.40, 8.2, 2.91และ 0.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และกรดมาลิกเป็นกรดอินทรีย์หลักอยู่ 7.6 กรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย 14.6 องศาบริกซ์ มีค่า % DPPH radical scavenging เท่ากับ 74.36 เปอร์เซ็นต์ และสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 155.42 mgGAE/ml

การผลิตไวน์แก้วมังกรแดงโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่ปริมาตร ชนิด และวิธีการหมักที่แตกต่างกันส่งผลให้ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณเซลล์สารประกอบให้กลิ่นรสต่างๆ และสารประกอบฟีนอลิก นั้นมีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไวน์แก้วมังกรแดงได้โดยพิจารณาดังนี้ พบว่าการใช้ยีสต์ชนิดเดียวกัน แต่ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกันนั้นมีผลต่อประสิทธิภาพในการหมักของไวน์ โดยการหมักด้วยความเข้มข้น 8 x 10^6 cfu/ml.เมื่อนำไปเทียบกับความเข้มข้นของปริมาณเซลล์ที่น้อยกว่านั้นมีความสามารถในการแข่งขัน ปรับตัว เพิ่มจำนวนเซลล์ และสร้างแอลกอฮอล์ที่สูง ได้ดีที่สุด คือ 8 log cfu/ml และ 9.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบความชอบด้านกลิ่นด้วยผู้เชี่ยวชาญด้านไวน์ พบว่าผู้เชี่ยวชาญส่วนใหญ่เห็นพ้องตรงกันว่าการหมักด้วยเชื้อยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces นั้นให้ปริมาณสารประกอบที่ให้กลิ่นรสที่มากกว่ายีสต์กลุ่ม Saccharomyces

การหมักแบบร่วมกันนั้นการหมักแบบเชื้อผสมให้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงกว่าการหมักแบบเชื้อผสมลำดับส่วนด้วยเชื้อชนิดเดียวกัน รวมทั้งให้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงกว่าการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว ซึ่งเกิดจากปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมทำให้ไม่เกิดการสร้างแอลกอฮอล์ที่รวดเร็วจนเกินไปจนเกิดสภาวะการหมักหยุดชะงัก และอัตราการตายของเซลล์ก็ลดลงไม่มากในวันที่ 10 นอกจากนี้เมื่อนำมาทดสอบความชอบด้านกลิ่นด้วยผู้เชี่ยวชาญด้านไวน์ พบว่าผู้เชี่ยวชาญส่วนใหญ่เห็นพ้องตรงกันว่าการหมักแบบเชื้อผสมทั้งสองวิธีมีกลิ่นรสที่ดีกว่ากระบวนการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว

กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงที่เหมาะสมคือ กระบวนการหมักไวน์แก้วมังกรแดงด้วยวิธีเชื้อแบบผสมระหว่างเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae 4019* และ *Saccharomycodes ludwigii*

ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 x 10^6 cfu/ml. เนื่องจากมีการใช้น้ำตาลเพื่อสร้างแอลกอฮอล์ที่ได้สูง รวมทั้งยังเป็นวิธีที่ง่ายต่อการผลิตไวน์อีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ

การเปลี่ยนแปลงของสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกของไวน์แก้วมังกรแดง พบว่าการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวโดยยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae 4019* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4 x 10^6 cfu/ml. ได้ไวน์แก้วมังกรแดงที่มีค่า % DPPH radlical scavenging ดีที่สุดเท่ากับ 74.48 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในไวน์แก้วมังกรแดง ไวน์ที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดคือ ไวน์ที่หมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ด้วยวิธีหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวความเข้มข้น 1 x 10^6 cfu/ml. เท่ากับ 281.79$\pm$ 2.12 mg/gGAE มากกว่าวิธีการหมักแบบเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยวอื่นๆ กระบวนการหมักแบบร่วมกัน พบว่าการหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 4019 ร่วมกับเชื้อ *Saccharomycodes ludwigii* นั้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าการหมักร่วมกับเชื้อ *Pichia guilliermondii* สารประกอบฟีนอลิกที่เกิดขึ้นในการหมักไวน์แก้วมังกรแดงนั้นแสดงถึงโอกาสและความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของไวน์แก้วมังกรแดง

ข้อเสนอแนะ

ในกระบวนการผลิตไวน์แก้วมังกรแดงการติดตามปริมาณการเปลี่ยนแปลงของยีสต์ควรแยกการติดตามทั้งยีสต์กลุ่ม Saccharomyces และ ยีสต์กลุ่ม Non-Saccharomyces เนื่องจากการนับเป็น total yeast count นั้น ไม่สามารถแสดงให้เห็นถึงปฏิสัมพันธ์ของยีสต์ทั้งสองชนิดในระหว่างกระบวนการหมักไวน์ได้ รวมทั้งการเพิ่มระยะเวลาในการหมักให้มากขึ้นเพื่อให้การหมักไวน์นั้นเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และปรับสัดส่วนการหมักให้เหมาะสมกับการหมักไวน์แก้วมังกรแดง

การศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระควรเลือกใช้หลายๆวิธี เพื่อให้ครอบคลุมกลไกของการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้การหาชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ น้ำตาล และสารประกอบทุติยภูมิในไวน์มังกรแดงจะสามารถบ่งชี้ถึงพฤติกรรมของยีสต์แต่ละสายพันธุ์และการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมักได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Alcalde Eon, C., Escribano Bailón, M. T., Santos Buelga, C., & Rivas Gonzalo, J. C. (2006). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: a comprehensive study. *Analytica Chimica Acta, 563*(1), 238-254.

Alexandre, H., & Guilloux‐benatier, M. (2006). Yeast autolysis in sparkling wine–a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research, 12*(2), 119-127.

AOAC. (1984). Officials methods of analysis. *(14th ed.)Association of Official Analytical Chemist, Arlington, VA, USA (1984).*

Arnink, K., & Henick-Kling, T. (2005). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains on successful malolactic conversion in wine. *American journal of enology and viticulture, 56*(3), 228-237.

Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M., & Butler, J. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine, 6*(6), 593-597.

Ascherio, A., Rimm, E. B., Hernán, M. A., Giovannucci, E., Kawachi, I., Stampfer, M. J., et al. (1999). Relation of consumption of vitamin E, vitamin C, and carotenoids to risk for stroke among men in the United States. *Annals of Internal Medicine, 130*(12), 963-970.

Bakoyianis, V., Kanellaki, M., Kaliafas, A., & Koutinas, A. A. (1992). Low-temperature wine making by immobilized cells on mineral kissiris. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40*(7), 1293-1296.

Banks, G., & Overton, J. (2010). Old World, New World, Third world? Reconceptualising the worlds of wine. *Journal of Wine Research, 21*(1), 57-75.

Berlanga, M. (2010). Food microbiology. Fundamentals and frontiers. *International Microbiology, 10*(1), 75.

Bernfeld, P. (2006). Enzymes of starch degradation and synthesis *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (pp. 379-428): John Wiley & Sons, Inc.

Bisson, L. F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture, 50*(1), 107-119.

Boddy, L., & Wimpenny, J. W. T. (1992). Ecological concepts in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology, 73*(21), 23-38.

Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (1995). *Principles and practices of winemaking*: Champman & Hall.

Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (1996). Yeast and biochemistry of ethanol fermentation *Principles and Practices of Winemaking* (pp. 102-192): Springer.

Bowers, J. E., & Meredith, C. P. (1997). The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nature genetics, 16*(1), 84-87.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology, 28*(1), 25-30.

Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A. M., et al. (2002). Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(23), 6895-6901.

Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences, 74*(17), 2157-2184.

Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003). Antioxidant activity of betalains from plants of the amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(8), 2288-2294.

Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2005). Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends in Food Science & Technology, 16*(9), 370-376.

Cámara, M. M., Díez, C., Torija, M. E., & Cano, M. P. (1994). HPLC determination of organic acids in pineapple juices and nectars. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 198*(1), 52-56.

Cerdán, T. G., Goñi, D. T., & Azpilicueta, C. A. (2004). Accumulation of volatile compounds during ageing of two red wines with different composition. *Journal of Food Engineering, 65*(3), 349-356.

Charoenchai, C., Fleet, G. H., & Henschke, P. A. (1998). Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture, 49*(3), 283-288.

Ciani, M., Beco, L., & Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology, 108*(2), 239-245.

Ciani, M., & Maccarelli, F. (1997). Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14*(2), 199-203.

Cole, V. C., & Noble, A. C. (1995). Flavor chemistry and assessment *Fermented Beverage Production* (pp. 361-385): Springer.

Cutzach, I., Chatonnet, P., & Dubourdieu, D. (1999). Study of the formation mechanisms of some volatile compounds during the aging of sweet fortified wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*(7), 2837-2846.

D'amore, T., Panchal, C. J., Russell, I., & Stewart, G. (1989). A study of ethanol tolerance in yeast. *Critical Reviews in Biotechnology, 9*(4), 287-304.

de Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A., & Bertrand, A. (1999). Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*(10), 4003-4008.

Di Maro, E., Ercolini, D., & Coppola, S. (2007). Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *International Journal of Food Microbiology, 117*(2), 201-210.

Diaz, M. N., Frei, B., Vita, J. A., & Keaney, J. F. (1997). Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *New England Journal of Medicine, 337*(6), 408-416.

Doba, T., Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1985). Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of

aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 835*(2), 298-303.

Ducasse, M.-A., Canal-Llauberes, R.-M., de Lumley, M., Williams, P., Souquet, J.-M., Fulcrand, H., et al. (2010). Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chemistry, 118*(2), 369-376.

Erten, H. (2002). Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18*(4), 377-382.

Escobar, J. A., Rubio, M. A., & Lissi, E. A. (1996). SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxyl radicals. *Free Radical Biology and Medicine, 20*(3), 285-290.

Fleet, G. (1997). The microbiology of alcoholic beverages *Microbiology of fermented foods* (pp. 217-262): Springer.

Fleet, G. H. (1993). *Wine Microbiology and Biotechnology*: CRC Press.

Fleet, G. H. (1997). The microbiology of alcoholic beverages *Microbiology of Fermented Foods* (pp. 217-262): Springer.

Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology, 86*(1–2), 11-22.

Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S., & Ribéreau-Gayon, P. (1984). Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Applied and Environmental Microbiology, 48*(5), 1034-1038.

Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis, 24*(7), 1043-1048.

Freeman, B. A., & Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology, 47*(5), 412-426.

French, S. A., Harnack, L., & Jeffery, R. W. (2000). Fast food restaurant use among women in the pound of prevention study: dietary, behavioral and

demographic correlates. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders, 24*(10), 1353.

Gao, C., & Fleet, G. H. (1988). The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Applied Bacteriology, 65*(5), 405-409.

Gao, C., & Fleet, G. H. (1995). Degradation of malic and tartaric acids by high density cell suspensions of wine yeasts. *Food Microbiology, 12*, 65-71.

Garcia-Martos, P. (1998). Isolation of *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*) in humans. *Mycopathologia, 144*(2), 73-75.

Girod, P.-A., & Zryd, J.-P. (1991). Secondary metabolism in cultured red beet (Beta vulgaris L.) cells: differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant cell, tissue and organ culture, 25*(1), 1-12.

Gökmen, V., Artık, N., Acar, J., Kahraman, N., & Poyrazoğlu, E. (2001). Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. *European Food Research and Technology, 213*(3), 194-199.

Greenshields, R. N. (1974). Volatiles in home-brewed beers and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 25*(10), 1307-1312.

Guymon, J., & Nakagiri, J. (1957). Effect of acetaldehyde, acetal, and ethyl acetate upon alcoholic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture, 8*(1), 1-10.

Hallsworth, J. E. (1998). Ethanol-induced water stress in yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering, 85*(2), 125-137.

Hazelwood, L. A., Daran, J.-M., van Maris, A. J., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology, 74*(8), 2259-2266.

Henick, K., Edinger, Daniel, & Monk. (1998). Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology, 84*(5), 865-876.

Herbach, K. M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Betalain stability and degradation—structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science, 71*(4), R41-R50.

Heresztyn, T. (1986). Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by Brettanomyces yeast. *Archives of Microbiology, 146*(1), 96-98.

Hininger, I., Waters, R., Osman, M., Garrel, C., Fernholz, K., Roussel, A. M., et al. (2005). Acute prooxidant effects of vitamin C in EDTA chelation therapy and long-term antioxidant benefits of therapy. *Free Radical Biology and Medicine, 38*(12), 1565-1570.

Homocysteine Studies, C. (2002). Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: A meta-analysis. *JAMA, 288*(16), 2015-2022.

Hu, F. B., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Ascherio, A., Spiegelman, D., & Willett, W. C. (2000). Prospective study of major dietary patterns and risk of coronary heart disease in men. *The American Journal of Clinical Nutrition, 72*(4), 912-921.

Iglesias, I., Echeverria, G., & Soria, Y. (2008). Differences in fruit colour development, anthocyanin content, fruit quality and consumer acceptability of eight 'Gala'apple strains. *Scientia Horticulturae, 119*(1), 32-40.

Islam, M., Khan, M., Hoque, M., & Rahman, M. (2012). Studies on the processing and preservation of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) jelly. *The Agriculturists, 10*(2), 29-35.

Jaafar, R. A., Bin Abdul Rahman, A. R., Mahmod, N. Z. C., & Vasudevan, R. (2009). Proximate analysis of dragon fruit (*Hylecereus polyhizus*). *American Journal of Applied Sciences, 6*(7), 1341-1346.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., et al. (2006). Cancer Statistics, 2006. *CA: A Cancer Journal for Clinicians, 56*(2), 106-130.

Jolly, N., Augustyn, O., & Pretorius, I. (2003). The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. *South african Journal for Enology and Viticulture, 24*(2), 63-69.

Jones, R. P., & Greenfield, P. F. (1982). Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme and Microbial Technology, 4*(4), 210-223.

Chulalongkorn University

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., et al. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*(10), 3954-3962.

Kalt, W., Forney, C. F., Martin, A., & Prior, R. L. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*(11), 4638-4644.

Kanner, J., Harel, S., & Granit, R. (2001). Betalains a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49*(11), 5178-5185.

Kelebek, H., & Selli, S. (2011). Determination of volatile, phenolic, organic acid and sugar components in a Turkish cv. Dortyol (*Citrus sinensis L. Osbeck)* orange juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 91*(10), 1855-1862.

Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., & Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a *Turkish cv. Kozan*. *Microchemical Journal, 91*(2), 187-192.

Khalili, R. M. A., Norhayati, A., Rokiah, M., Asmah, R., Nasir, M. M., & Muskinah, M. S. (2006). Proximate composition and selected mineral determination in organically grown red pitaya (*Hylocereus sp.*). *Journal of Tropical Agriculture and Food Science, 34*(2), 269.

Kujala, T. S., Vienola, M. S., Klika, K. D., Loponen, J. M., & Pihlaja, K. (2002). Betalain and phenolic compositions of four beetroot (Beta vulgaris) cultivars. *European Food Research and Technology, 214*(6), 505-510.

Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma.

Larue, F., Lafon-Lafourcade, S., & Ribereau-Gayon, P. (1980). Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Applied and Environmental Microbiology, 39*(4), 808-811.

Le Bellec, F., Vaillant, F., & Imbert, E. (2006). Pitahaya (*Hylocereus spp.*): a new fruit crop, a market with a future. *Fruits, 61*(04), 237-250.

Liebler, D. C. (1993). The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Critical Reviews in Toxicology, 23*(2), 147-169.

MacDonald, R. C., & Fall, R. (1993). Detection of substantial emissions of methanol from plants to the atmosphere. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics, 27*(11), 1709-1713.

Machlin, L. J., & Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal, 1*(6), 441-445.

Mahattanatawee, K., Manthey, J. A., Luzio, G., Talcott, S. T., Goodner, K., & Baldwin, E. A. (2006). Total antioxidant activity and fiber content of select florida-grown tropical fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*(19), 7355-7363.

Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Čanadanović-Brunet, J. M. (2011). Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry, 127*(4), 1727-1731.

Mar, M.-H., & Zeisel, S. (1999). Betaine in wine: answer to the French paradox? *Medical Hypotheses, 53*(5), 383-385.

Margalith, P. Z. (1981). *Flavor Microbiology*: Charles C. Thomas Publisher.

Martini, A. (1993). Origin and domestication of the wine yeast Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Wine research, 4*(3), 165-176.

MatÉs, J. M., Pérez-Gómez, C., & De Castro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry, 32*(8), 595-603.

Mihucz, V. G., Done, C. J., Tatár, E., Virág, I., Záray, G., & Baiulescu, E. G. (2006). Influence of different bentonites on the rare earth element concentrations of clarified Romanian wines. *Talanta, 70*(5), 984-990.

Mizrahi, Y., & Nerd, A. (1999). Climbing and columnar cacti: new arid land fruit crops. *Perspectives on New Crops and New Uses*, 358-366.

Mok, C., Song, K. T., Park, Y. S., Lim, S., Ruan, R., & Chen, P. (2006). High hydrostatic pressure pasteurization of red wine. *Journal of Food Science, 71*(8), M265-M269.

Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2005). Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology, 103*(3), 285-294.

Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J. A., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2011). Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and

Hanseniaspora uvarum during red wine vinifications. *Food Control, 22*(5), 662-667.

Moreno, J. J., Millán, C., Ortega, J. M., & Medina, M. (1991). Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *Journal of Industrial Microbiology, 7*(3), 181-189.

Morgenstern, L. B., Escobar, J. D., Sánchez, B. N., Hughes, R., Zuniga, B. G., Garcia, N., et al. (2009). Fast food and neighborhood stroke risk. *Annals of Neurology, 66*(2), 165-170.

Muller, C. J., Kepner, R. E., & Webb, A. D. (1964). Some volatile constituents of passion fruit wine. *Journal of Food Science, 29*(5), 569-575.

Nerd, A., Gutman, F., & Mizrahi, Y. (1999). Ripening and postharvest behaviour of fruits of two *Hylocereus* species (Cactaceae). *Postharvest Biology and Technology, 17*(1), 39-45.

Nielsen, J. C., & Richelieu, M. (1999). Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by Oenococcus oeni. *Applied and Environmental Microbiology, 65*(2), 740-745.

Nissen, P., & Arneborg, N. (2003). Characterization of early deaths of non-Saccharomyces yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology, 180*(4), 257-263.

Normala, H., & Mardhiah Hayati Abdul, H. (2010). Determination and evaluation of antioxidative activity in red dragon fruit (*Hylocereus undatus*) and green kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). *American Journal of Applied Sciences, 7*(11), 1432-1438.

Oczkowski, E. (1994). A hedonic price function for australian premium table wine. *Australian Journal of Agricultural and Resource Economics, 38*(1), 93-110.

Osho, A. (2005). Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice. *African Journal of Biotechnology, 4*(7), 660-662.

Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., et al. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition, 22*(1), 18-35.

Paolini, M., Pozzetti, L., Pedulli, G. F., Marchesi, E., & Cantelli-Forti, G. (1999). The nature of prooxidant activity of vitamin C. *Life Sciences, 64*(23), PL273-PL278.

Pardo, I., García, M. J., Zúñiga, M., & Uruburu, F. (1989). Dynamics of microbial populations during fermentation of wines from the Utiel-Requena region of Spain. *Applied and Environmental Microbiology, 55*(2), 539-541.

Parkin, D. M., Pisani, P., & Ferlay, J. (1993). Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *International Journal of Cancer, 54*(4), 594-606.

Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R., & Marcheselli, F. (1994). Melatonin: A peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sciences, 55*(15), PL271-PL276.

Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast, 16*(8), 675-729.

Rankine, B. C. (1967). Formation of higher alcohols by wine yeasts, and relationship to taste thresholds. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 18*(12), 583-589.

Reddy, L. V. A., & Reddy, O. V. S. (2005). Production and Characterization of Wine from Mango Fruit (Mangifera indica L). *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21*(8-9), 1345-1350.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology, The microbiology of wine and vinifications* (Vol. 1): John Wiley & Sons.

Riu-Aumatell, M., Bosch-Fusté, J., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2006). Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. *Food Chemistry, 95*(2), 237-242.

Robak, J., & Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology, 37*(5), 837-841.

Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry, 66*(4), 401-436.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology, 86*(1–2), 169-180.

Romano, P., Marchese, R., Laurita, C., Saleano, G., & Turbanti, L. (1999). Biotechnological suitability of *Saccharomycodes ludwigii* for fermented beverages. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 15*(4), 451-454.

Sablayrolles, J.-M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.-L., & Barre, P. (1996). Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *Journal of Fermentation and Bioengineering, 82*(4), 377-381.

Salazar, F. N., & Achaerandio, I. (2006). Comparative Study of Protein Stabilization in White Wine Using Zirconia and Bentonite: Physicochemical and Wine Sensory Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*(26), 9955-9958.

Santos, C. X. C., Anjos, E. I., & Augusto, O. (1999). Uric acid oxidation by peroxynitrite: Multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 372*(2), 285-294.

Seddon, J. M., Ajani, U. A., Sperduto, R. D., & et al. (1994). DIetary carotenoids, vitamins a, c, and e, and advanced age-related macular degeneration. *JAMA, 272*(18), 1413-1420.

Sengkhamparn, N., Chanshotikul, N., Assawajitpukdee, C., & Khamjae, T. (2013). Effects of blanching and drying on fiber rich powder from pitaya (*Hylocereus undatus*) peel. *International Food Research Journal, 20*(4), 1595-1600.

Sepúlveda-Jiménez, G., Rueda-Benítez, P., Porta, H., & Rocha-Sosa, M. (2004). Betacyanin synthesis in red beet (Beta vulgaris) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst. *Physiological and Molecular Plant Pathology, 64*(3), 125-133.

Shoseyov, O., Bravdo, B. A., Siegel, D., Goldman, A., Cohen, S., Shoseyov, L., et al. (1990). Immobilized endo-beta-glucosidase enriches flavor of wine and passion fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38*(6), 1387-1390.

Singal, P., Dhalla, A., Hill, M., & Thomas, T. (1993). Endogenous antioxidant changes in the myocardium in response to acute and chronic stress conditions. *Molecular and Cellular Biochemistry, 129*(2), 179-186.

Soyer, Y., Koca, N., & Karadeniz, F. (2003). Organic acid profile of Turkish white grapes and grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis, 16*(5), 629-636.

Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology, 15*(1), 19-38.

Sutton, D., & Lampen, J. (1962). Localization of sucrose and maltose fermenting systems in< i> Saccharomyces cerevisiae</i>. *Biochimica et biophysica Acta, 56*, 303-312.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis, 19*(6–7), 669-675.

Thorngate, J. H. (1997). The physiology of human sensory response to wine: A review. *American Journal of Enology and Viticulture, 48*(3), 271-279.

Thornton, R. J. (1982). Selective hybridisation of pure culture wine yeasts. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 14*(3), 159-164.

Thudichum, J. L. W., & Dupre, A. (1872). *A treatise on the origin, nature and varieties of wine : being a complete manual of viticulture and oenology*. London: [s.n.].

Toro, M. E., & Vazquez, F. (2002). Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18*(4), 351-358.

Tsai, T. H., Tsai, P. J., & Ho, S. C. (2005). Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used spices. *Journal of Food Science, 70*(1), C93-C97.

Venturin, C., Boze, H., Moulin, G., & Galzy, P. (1995). Glucose metabolism, enzymic analysis and product formation in chemostat culture of *Hanseniaspora uvarum*. *Yeast, 11*(4), 327-336.

Vijaya Kumar Reddy, C., Sreeramulu, D., & Raghunath, M. (2010). Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Research International, 43*(1), 285-288.

Walker, S. L., Camarena, M., & Freeman, G. (2007). Alternatives to isinglass for beer clarification. *Journal of the Institute of Brewing, 113*(4), 347-354.

Ward, P., Cunningham, T., McCulloch, K., Phan, S., Powell, J., & Johnson, K. (1988). Platelet enhancement of O2-. responses in stimulated human neutrophils. Identification of platelet factor as adenine nucleotide. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology, 58*(1), 37-47.

Webb, A. D., & Noble, A. C. (1976). Aroma of sherry wines. *Biotechnology and Bioengineering, 18*(7), 939-952.

Weber, P., Kratzin, H., Brockow, K., Ring, J., Steinhart, H., & Paschke, A. (2009). Lysozyme in wine: A risk evaluation for consumers allergic to hen's egg. *Molecular Nutrition & Food Research, 53*(11), 1469-1477.

Wolfe, K., Wu, X., & Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(3), 609-614.

Wu, J. J., Ma, Y. K., Zhang, F. F., & Chen, F. S. (2012). Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of “Shanxi aged vinegar”, a traditional Chinese vinegar. *Food Microbiology, 30*(1), 289-297.

Wu, L. c., Hsu, H. W., Chen, Y. C., Chiu, C. C., Lin, Y. I., & Ho, J. a. A. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chemistry, 95*(2), 319-327.

Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2003). Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(2), 255-260.

Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J. A., & Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research, 51*(6), 675-683.

Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49*(11), 5165-5170.

Zhuge, X., Liu, L., Shin, H.-d., Chen, R. R., Li, J., Du, G., et al. (2013). Development of a Propionibacterium-Escherichia coli shuttle vector for metabolic engineering of Propionibacterium jensenii, an efficient producer of propionic acid. *Applied and environmental microbiology, 79*(15), 4595-4602.

Zimmermann, F. K., & Entian, K. D. (1997). *Yeast Sugar Metabolism*: CRC Press.

Zironi, R., Romano, P., Suzzi, G., Battistutta, F., & Comi, G. (1993). Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters, 15*(3), 235-238.

Zohre, D. E., & Erten, H. (2002). The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochemistry, 38*(3), 319-324.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก.
สมบัติทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis)

ก 1.การหาปริมาณร้อยละของความชื้น (%Moisture)

วิธีวิเคราะห์

1. นำ Aluminium dish ไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่ 100±5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่าง 2 - 5 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียม
3. นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100±5°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. นำถ้วยอะลูมิเนียมกับตัวอย่างที่ผ่านการอบไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่ง แล้วนำไปอบจนได้น้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Moisture} = \frac{(\text{Wt. sample} - \text{Wt. sample หลังอบ})}{\text{Wt. sample}} \times 100$$

ก.2 การหาปริมาณร้อยละของไขมัน (%Fat)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่แห้ง 2 – 3 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในกระดาษกรอง แล้วนำไปใส่ใน Thimble ใน Extraction tube ของ Soxhlet apparatus
2. เติม Petroleum ether ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

3. นำไป Reflux บน Heating mantle (โดยใช้ Water bath แทน) ใช้อุณหภูมิปานกลาง โดยให้อัตราการกลั่นตัวของ Petroleum ether 2 – 3 หยดต่อวินาที ใช้เวลาในการ Reflux ประมาณ 10 ชั่วโมง
4. ระเหยเอา Petroleum ether ออกจากขวดก้นกลม (Round bottom flask) ที่สกัดไขมัน
5. จากนั้นนำไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่ 100$\pm$5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Fat} = \frac{(\text{Wt. ขวดก้นกลมกับไขมัน} - \text{Wt. ขวดก้นกลม})}{\text{Wt. ตัวอย่าง}} \times 100$$

ก.3 การหาปริมาณร้อยละของโปรตีน (%Protein)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.5 - 2 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask
2. เติม Catalyst 7 กรัม (95 กรัม K_2SO_4 : 5 กรัม $CuSO_4.5H_2O$)
3. เติม 15 มิลลิลิตร กรดซัลฟูริกเข้มข้น
4. นำไปย่อยบนเตาไฟจนได้ของเหลวสามเหลี่ยมใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
5. เติม 50 มิลลิลิตร DI water
6. เติม 32% NaOH ลงใน Kjeldahl flask
7. นำ Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุ 50 มิลลิลิตร 4% Boric acid และหยด 2 – 3 หยด Mixed indicator ต่อเข้ากับชุดกลั่นโดยให้ปลายล่างของ Condenser อยู่ใต้ระดับของเหลวใน Erlenmeyer flask

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

8. กลั่นจนได้ของเหลวประมาณ 150 มิลลิลิตร นำ Erlenmeyer flask ออก ล้างปลาย Condenser ด้วย DI water
9. นำมาทำการ titrate สารที่กลั่นได้กับ 0.1 N HCl ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

วิธีการคำนวณ

$$N = (\text{Vol. HCl}_{\text{titrate}} - \text{Vol. HCl}_{\text{blank}}) \times N_{HCl} \times 0.014007$$

$$\%\ N = \frac{N \times 100}{\text{Wt. sample}}$$

$$\%\ \text{Protein} = \%N \times \text{factor}$$

<u>หมายเหตุ</u> factor ที่ใช้คำนวณ = 6.25

ก.4 การหาปริมาณร้อยละของเส้นใยหยาบ (%Fiber)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างแห้งที่สกัดไขมันออกแล้ว (ยกเว้นกรณีที่ไขมันน้อยกว่า 1%) 2 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask 500 มิลลิลิตร
2. เติม 50 มิลลิลิตร 5% H_2SO_4 และเติม 200 มิลลิลิตร DI Water
3. ต้มให้เดือดนาน 30 นาที บน Hot plate (ขณะต้มให้หมุน Erlenmeyer flask เป็นครั้งคราวเพื่อไม่ให้มีส่วนแข็งติด)
4. นำมากรองในชุดกรองผ่านกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) โดยใช้ Suction pump ล้าง Erlenmeyer flask ด้วยน้ำร้อน 50 – 70 มิลลิลิตร แล้วเทลงผ่านกระดาษกรอง
5. ใช้น้ำร้อน 50 มิลลิลิตร ล้างซ้ำอีก 2 – 3 ครั้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

6. นำกากที่ได้ใส่ใน Erlenmeyer flask เติม 50 มิลลิลิตร 5% NaOH เติม 200 มิลลิลิตร DI Water
7. ต้มให้เดือดนาน 30 นาที บน Hot plate (ขณะต้มให้หมุน Erlenmeyer flask เป็นครั้งคราวเพื่อไม่ให้มีส่วนแข็งติด)
8. กรองโดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 4 และ 5
9. ล้างด้วย 25 มิลลิลิตร 1.25% H_2SO_4 ล้างตามด้วยน้ำร้อน 50 มิลลิลิตร และ 25 มิลลิลิตร Alcohol ตามลำดับ นำกระดาษกรองพร้อมกากเส้นใยใส่ใน Crucible ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)
10. นำไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่ 100$\pm$5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก
11 นำไปเผาที่อุณหภูมิ 600$\pm$5°C เป็นเวลานาน 30 นาที ทำให้เย็นใน Desiccator ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง และนำไปเผาจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Fiber} = \frac{\text{(Wt. ตัวอย่างหลังอบ – Wt.กระดาษกรอง) – Wt. ตัวอย่างหลังเผา}}{\text{Wt. ตัวอย่าง}} \times 100$$

ก.5 การหาปริมาณร้อยละของเถ้า (%Ash)

วิธีวิเคราะห์

1. นำ Crucible ไปเผาที่เตาเผา ที่ 550$\pm$5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ใน Crucible
3. นำไปเผาบน Hot plate ในตู้ดูดควัน (Hood) จนหมดควันสีดำ
4. นำไปเผาในเตาเผาที่ 550$\pm$5°C แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก และนำไปเผาจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Ash} \quad \frac{\text{Wt. sample หลังเผา}}{\text{Wt. sample}} \quad \text{X } 100$$

ก 6 .การหาปริมาณร้อยละของคาร์โบไฮเดรต (%Carbohydrate)

% Carbohydrate = 100 – %Protein – %Fat – %Fiber - %Ash

ก.7 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารละลาย

วิธีวิเคราะห์

1. ปรับค่าเริ่มต้นของรีเฟรคโทมิเตอร์ช่วง 0 – 32 องศาบริกซ์ ให้เท่ากับศูนย์ ด้วยน้ำกลั่น แล้วเช็ดให้แห้ง
2. นำตัวอย่างไวน์แก้วมังกรแดงหยดลงบนรีเฟคโทมิเตอร์ปิดกระจก อ่านค่าตรงระดับเส้นรอยต่อที่ตัดกับพื้นสีฟ้า โดยค่าที่อ่านได้มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์ ซึ่งเทียบเท่ากับเปอร์เซ็นต์น้ำตาล (จำนวนกรัมของน้ำตาลต่อ 100 กรัมของสารตัวอย่าง) อ่านค่าและบันทึกผลการทดลอง

ก.8 ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดซิตริก) โดยวิธี titratable acidity (%)

วิธีวิเคราะห์

1. เติมตัวอย่างไวน์แก้วมังกรแดงและน้ำกลั่นประมาณ 5 และ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงไปในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. ปรับเทียบมาตรฐานเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 4, 7 และ 11

3. หยดฟีนอฟทาลีน 2 – 3 หยด

3. ไทเทรตจนได้ค่าพีเอชเท่ากับ 8.2 บันทึกค่าที่ใช้ แล้วไทเทรตต่ออีก 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปคำนวณหาค่า titratable acidity (%)

titratable acidity (%) = ((ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ x นอร์มอลิตี้ของด่าง x 0.075)/ปริมาณตัวอย่างที่ใช้) x 100

หมายเหตุ = น้ำหนักโมเลกุลของกรดทาทาร์ริกเท่ากับ 75

ก.9 ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยเครื่องวัดพีเอช

วิธีวิเคราะห์

1. ปรับเทียบมาตรฐานเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 4, 7 และ 11
2. เติมตัวอย่างไวน์แก้วมังกรแดงปริมาณ 50 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้ว
4. ล้างอิเล็กโทรดด้วยน้ำปราศจากไอออน และซับด้วยกระดาษทิชชู
3. จุ่มอิเล็กโทรดลงไป อย่าถึงก้นแก้ว ทิ้งไว้สักครู่ อ่านค่าและบันทึกผลการทดลอง

ก.10 ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยไฮโดรมิเตอร์

วิธีวิเคราะห์

1. นำไฮโดรมิเตอร์และกระบอกตวงมาล้างด้วยน้ำกลั่นและเช็ดให้แห้ง
2. เติมตัวอย่างไวน์แก้วมังกรแดงประมาณ 60 – 80 มิลลิลิตร ลงในกรบอกตวง
3. หยอนไฮโดรมิเตอร์ลงไปช้าๆ ระวังอย่างให้กระทบกระบอกตวง ทิ้งไว้สักครู่จนนิ่ง อ่านค่าบริเวณท้องน้ำของตัวอย่างที่ได้ บันทึกผลการทดลอง

ก.11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS (Bernfeld, 2006)

วิธีวิเคราะห์

1. เติมตัวอย่างไวน์แก้วมังกรแดงปริมาณ 1 มิลลิลิตรและสารละลาย DNS ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ปิดปากหลอดด้วยลูกแก้ว
2. นำไปต้มที่น้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที
3. แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้ให้เย็น
4. เติมน้ำกลั่นปริมาณ 10 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex
5. ดูดตัวอย่างที่ได้ลงใน 96 well plate นำไปวัดที่ค่าดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร
6. นำค่าที่ได้ไปเปรียนเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส โดยให้ค่าอยู่ในช่วง 0.1 – 0.8 แล้วคำนวณเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ก.12 ปริมาณเชื้อยีสต์ทั้งหมด โดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง YPD

วิธีวิเคราะห์

1. ทำการเก็บตัวอย่างไวน์แก้วมังกรแดงลงใน Eppendorf
2. นำไปทำการเจือจางลำดับขั้น (serial dilution) เป็น 10^{1-7} เท่าของตั้งต้น
3. ดูดตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ใส่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD สแปรทให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งสักครู่
4. นำไปบ่มที่ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
5. ตั้งทิ้ง 24 – 72 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโต บันทึกผลการทดลอง

ก.13 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยวิธี Folin-Ciocalteu's (Wolfe et al., 2003)

วิธีวิเคราะห์

1. เติมตัวอย่างไวน์แก้วมังกรแดงและสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาณ 40 และ 80 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน ตั้งที่ไว้ 6 นาที
2. เติมสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. นำไปวัดที่ค่าดูกลืนแสง 765 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลอง
4. นำค่าที่ได้ไปเปรียนเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid โดยให้ค่าอยู่ในช่วง 0.1 – 0.8 แล้วคำนวณเป็นปริมาณสารประกอบฟีนอลิก mgGAE/mL

ก.14 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH (Wu et al., 2006)

วิธีวิเคราะห์

1. เติมตัวอย่างไวน์แก้วมังกรแดงและสารละลายDPPH ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาณ 40 และ 160 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน
2. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด นาน 30 นาที
3. นำไปวัดที่ค่าดูกลืนแสง 517 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลอง
4. นำค่าที่ได้ไปเปรียนเทียบกับกราฟมาตรฐานของวิตามินซี โดยให้ค่าอยู่ในช่วง 0.1 – 0.8 แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระของ DPPH จากสมการ

เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระของ DPPH = ((A-B)-(C-D) / (A-B)) x 100

A = ค่าดูดกลืนแสงของน้ำกลั่นและ DPPH

B = ค่าดูดกลืนแสงของน้ำกลั่นและแอลกอฮอล์

C = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง และ DPPH

D = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างและน้ำกลั่น

ก. 15 ชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์

1. กรองตัวอย่างน้ำแก้วมังกรแดงด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน
2. นำไปวิเคราะห์กรดอินทรีย์ด้วย HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies, Inc., USA) โดยใช้คอลัมน์ Rezex RHM-Monosaccharide H+ (8%), 300 × 7.8 mm ion exclusion column (Phenomenex Inc., California, USA) ที่ 55 องศาเซลเซียส ใช้ orthophosphoric acid 0.06 เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่อัตราการชะเป็น 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

3. ตรวจวัดกรดอินทรีย์ด้วย Diode Array Detector-G1315 DAD (Agilent) และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม ChemStation
4. สร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายผสมของสารมาตรฐาน กรดซิริก กรดทาร์ทาริก กรดมาลิค กรดซักซินิก กรดแลกติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก ที่ความเข้มข้น 2 g l^{-1} และ กรดฟูมาริกที่ความเข้มข้น 0.01 g l^{-1}

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข.
การประเมินทางประสาทสัมผัส

แบบทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส
ไวน์แก้วมังกรแดง

ชื่อผู้ทดสอบ..... **วันที่ทดสอบ**...../...../.....

คำแนะนำ : กรุณาทดสอบผลิตภัณฑ์จากซ้ายไปขวา
และให้คะแนนความชอบตามที่ท่านรู้สึกให้ตรงกับรหัสตัวอย่าง
(กรุณาบ้วนปากก่อนทดสอบตัวอย่างทุกครั้ง)

1 = ไม่ชอบมากที่สุด **2** = ไม่ชอบมาก **3** = ไม่ชอบ **4** = เฉยๆ
5 = ชอบ **6** = ชอบมาก **7** = ชอบมากที่สุด

	รหัส	รหัส	รหัส	รหัส	รหัส .....
สี					
กลิ่น					
รส					
บอดี้					
ความรู้สึกหลังชิม					
ความชอบโดยรวม					

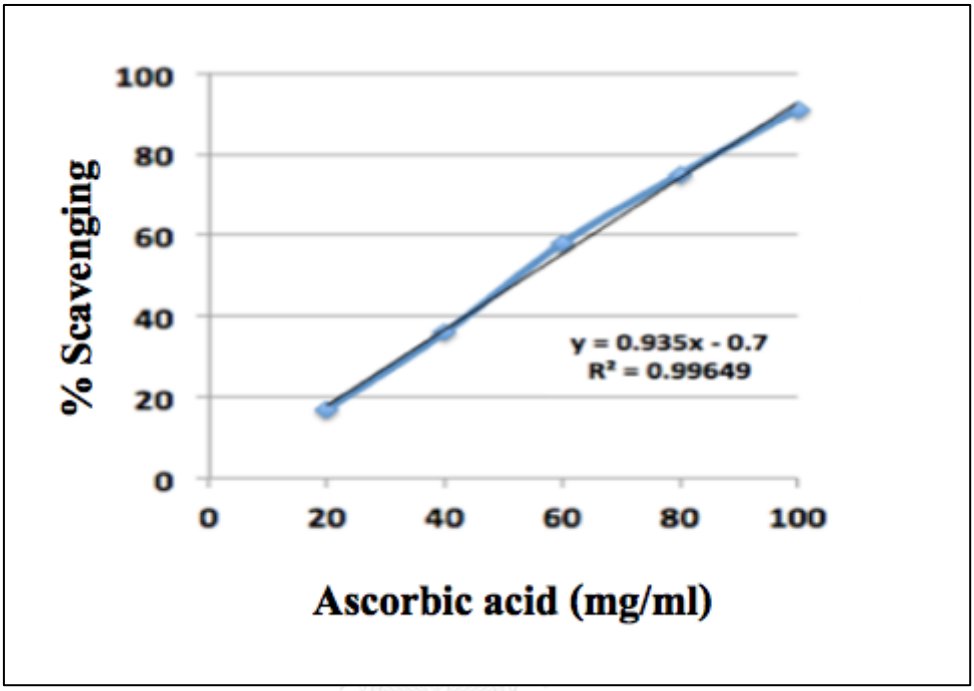
ข้อเสนอแนะ.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

ขอขอบพระคุณอย่างยิ่ง

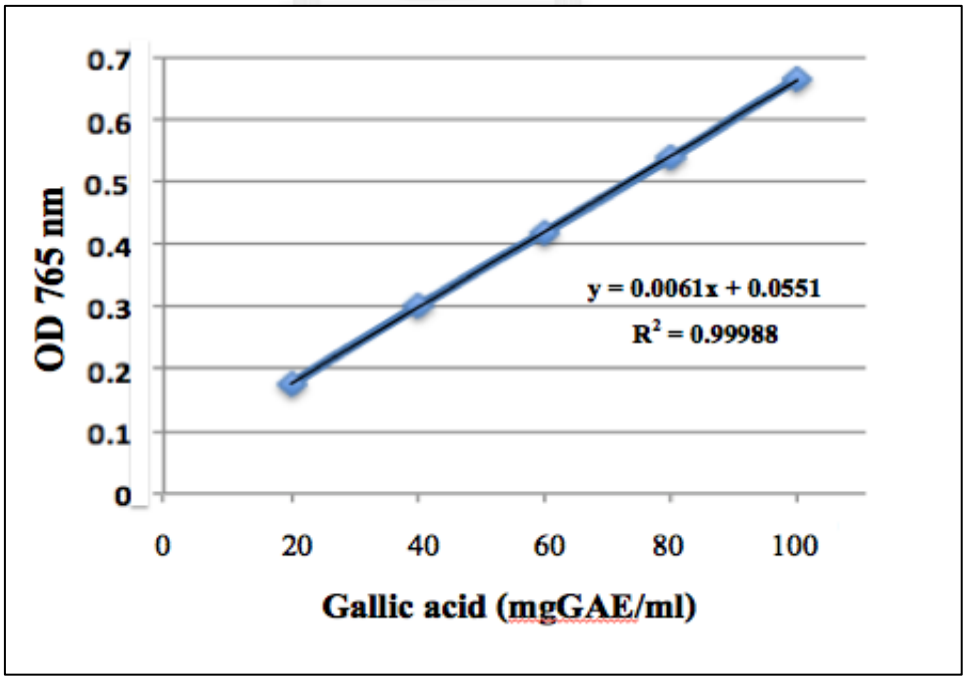
รูปภาคผนวกที่ ข. 1 แบบทดสอบที่ใช้ในการประเมินทางประสาทสัมผัสไวน์แก้วมังกรแดง

ภาคผนวก ค.

กราฟมาตรฐาน

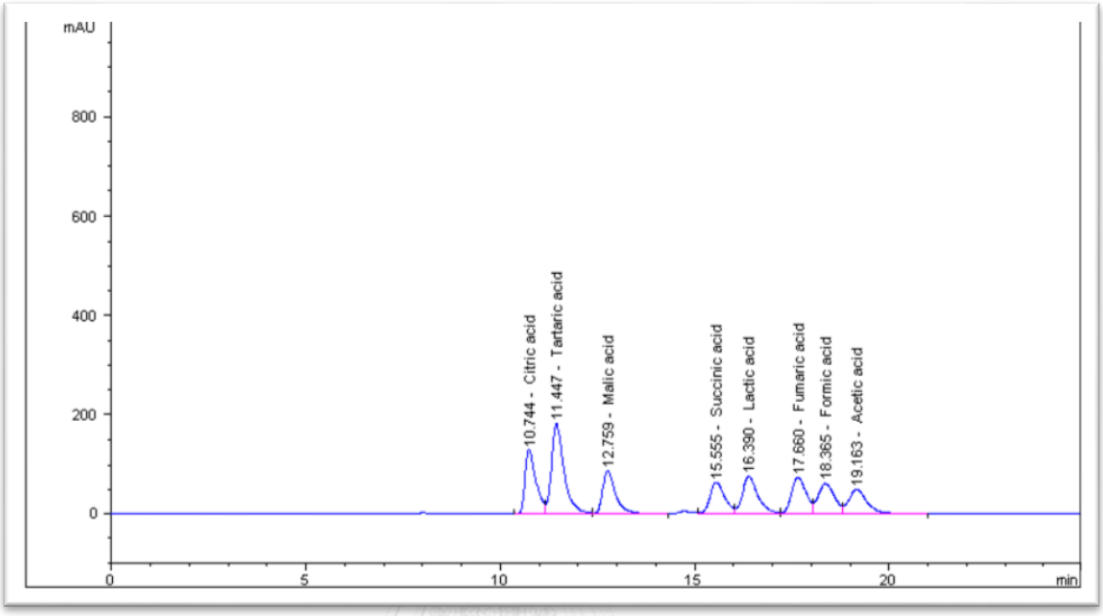


รูปภาคผนวกที่ ค. 1 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ % DPPH radical scavenging

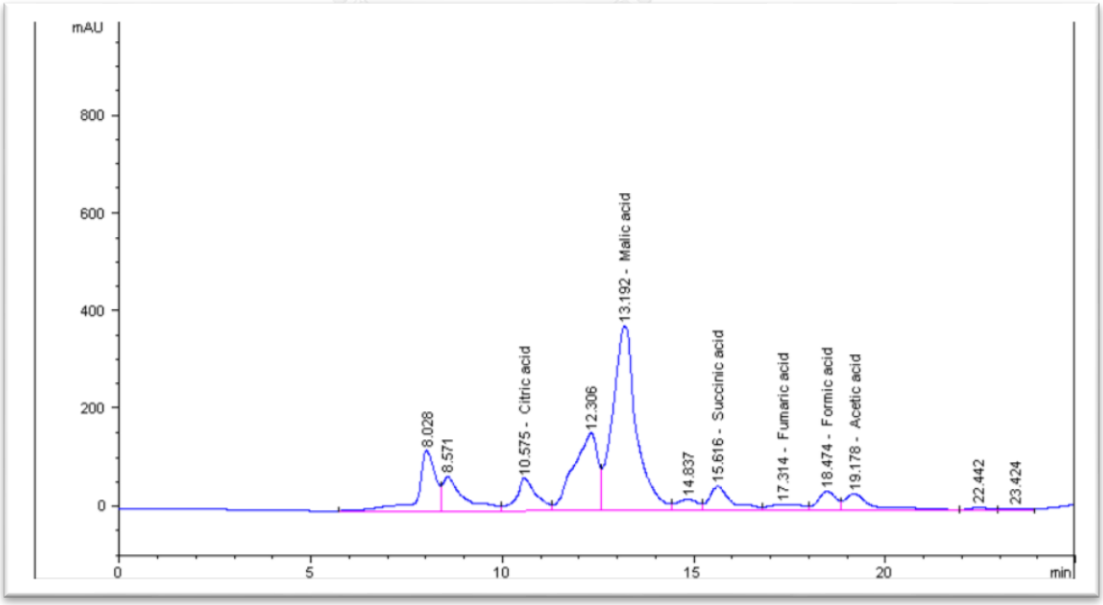


รูปภาคผนวกที่ ค. 2 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ภาคผนวก ง.
โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์กรดอินทรีย์



รูปภาคผนวกที่ ง. 1 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์มาตรฐาน



รูปภาคผนวกที่ ง. 2 โครมาโตแกรมแสดงชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์ของแก้วมังกรแดง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายวิทวัส ขวัญเมือง เกิดวันที่ 21 เมษายน พ.ศ. 2531 ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมัก จากคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังเมื่อปีการศึกษา 2552 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2553

การนำเสนองานทางวิชาการ

ICSAF 2014 International Conference on Sustainable Global Agriculture and Food Security 2014 at The Emerald Hotel, Bangkok, Thailand 16 – 18 July 2014 in the topic of Determinations of antioxidative activity and total phenolic compounds in red dragon fruit (Hylocereus polyhizus) wine.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University