บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผลหม่อนที่ใช้เป็นวัตถุดิบ

1.1 องค์ประกอบทางเคมี และสมบัติทางกายภาพ

ผลหม่อน (*Morus alba* L.)ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ในงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณวิโรจน์ แก้วเรือง เจ้าหน้าที่จากสถานีวิจัยหม่อนไหมจังหวัดอุดรธานี เป็นผู้ประสานงานในการติดต่อขอรับวัตถุดิบจากสถานีวิจัยหม่อนไหมต่างๆ โดยผลหม่อนที่ใช้จะได้จากสถานีวิจัยหม่อนไหมจังหวัดเชียงใหม่ สถานีวิจัยหม่อนไหมจังหวัดสกลนคร สถานีวิจัยหม่อนไหมจังหวัดแพร่ และสถานีวิจัยหม่อนไหมจังหวัดตาก โดยในการรวบรวมผลหม่อนเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้จะได้รับผลหม่อนหลายแหล่ง เนื่องจากต้นหม่อนในแต่ละสถานีวิจัยจะให้ผลไม่พร้อมกัน ขึ้นกับภูมิอากาศและการตัดแต่งกิ่งต้นหม่อน ในงานวิจัยได้รวบรวมผลหม่อนเพื่อให้มีเพียงพอใช้ตลอดงานวิจัย ผลหม่อนที่ได้รับมาจากต้นหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 นครราชสีมา 60 และศรีสะเกษ 33 เป็นส่วนใหญ่ พันธุ์บุรีรัมย์ 60 เป็นพันธุ์ที่ได้รับในปริมาณมากที่สุด และใช้ตลอดการวิจัยเป็นตัวแทนในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีผลหม่อนจะมีความอ่อนแก่ 4 ระยะด้วยกัน คือ ผลสีเขียว ผลสีชมพู ผลสีแดง และผลสีม่วงตามลำดับ ในงานวิจัยการผลิตไวน์หม่อนจะใช้ผลหม่อน 2 ระยะคือ ผลสีแดง และผลสีม่วง วิโรจน์และคณะ(2535)ได้ทำการวิจัยหาพันธุ์ของหม่อนที่ให้ผลผลิตสูง เพื่อศึกษาการทำน้ำผลไม้ และการทำไวน์จากหม่อน พบว่าหม่อนพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดคือ พันธุ์ศรีสะเกษ 33 ซึ่งมีน้ำหนัก 143.20 กรัม/100ผล ส่วนพันธุ์นครราชสีมา 60 และพันธุ์บุรีรัมย์ 60 มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน คือ 113.08 และ 99.80 กรัม/100ผลตามลำดับ ส่วนผลหม่อนคุณไพซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองจะมีน้ำหนักเพียง 16 กรัม/100ผล จากนั้นนำผลหม่อนพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ไปศึกษาการทำน้ำผลไม้ พบว่าอัตราส่วนผลหม่อนสีแดงต่อผลหม่อนสีม่วง 1:1 และ 1:2 จะให้น้ำผลไม้เป็นที่ยอมรับทางประสาทสัมผัสทั้งด้านสี กลิ่น และรสชาติ ในการวิจัยนี้ได้ใช้แนวทางดังกล่าวโดยผลหม่อนสีแดงต่อผลสีม่วงอัตราส่วน 1:2 ในการเตรียมน้ำหมักไวน์หม่อน

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและสมบัติทางกายภาพและเคมีของผลหม่อน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 ผลหม่อนสีแดงซึ่งเป็นผลที่เริ่มสุกจะมีความชื้น 88.66% ส่วนผลหม่อนสีม่วงซึ่งเป็นผลที่สุกจัดจะมีความชื้น 90.01% ปริมาณโปรตีน ไขมัน เส้นใย และเถ้าของผลหม่อนสีแดงจะมีค่าสูงกว่าผลหม่อนสีม่วงเล็กน้อย จากปริมาณโปรตีนที่มีในผลหม่อนระยะที่รับประทาน

ได้มีค่าอยู่ในช่วง 1.38-2.24% จะเห็นว่าผลหมอนมีคุณค่าทางอาหารพอสมควร เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของวิไรจน์ แก้วเรือง และคณะ (2535) ซึ่งวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของผลหมอนพันธุ์บุรีรัมย์60 ผลสีแดงมี %ความชื้น 89.57 %โปรตีน 2.24 %ไขมัน 1.35 %น้ำตาล 4.91 %ความเปรี้ยว(คิดในรูปกรดซิตริก) 4.71 ส่วนในผลสีม่วงมี %ความชื้น 90.15 %โปรตีน 1.26 %ไขมัน 1.31 %น้ำตาล 21.81 %ความเปรี้ยว(คิดในรูปกรดซิตริก) 1.51 ผลหมอนที่ได้รับและใช้ในงานวิจัยนี้มีคุณค่าทางอาหารใกล้เคียงกัน ซึ่งค่าที่แตกต่างกันคือ %น้ำตาล และ%ความเปรี้ยว อาจเนื่องจากเกิดการเลือกใช้ตัวอย่างที่มีช่วงอายุแตกต่างกันหรือการบอบช้ำของผลหมอนระหว่างการขนส่ง

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (°Brix) และร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์จะมีความสัมพันธ์กันซึ่งการวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้จะเป็นค่าที่แสดงถึงปริมาณของน้ำตาลโดยประมาณที่มีอยู่ในผลไม้ ในผลสีแดงจะมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ และร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าในผลสีม่วงมาก แสดงถึงผลสีม่วงนั้นมีความหวานมากกว่าผลสีแดง ค่า pH หมายถึง ความแรงในการแตกตัวให้ไฮโดรเจนอิออนในสารละลาย ซึ่งกรดแต่ละชนิดจะมีการแตกตัวให้ไฮโดรเจนอิออนไม่เหมือนกัน ส่วนค่าร้อยละความเป็นกรด หมายถึง ปริมาณกรดทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหารทั้งกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ ปริมาณกรดทั้งหมดมักรายงานในรูปของกรดที่มีอยู่มากในอาหาร เช่น แอปเปิ้ลรายงานในรูปกรดมาลิก องุ่นรายงานในรูปกรดทาร์ทาริก ผักและผลไม้ส่วนใหญ่รายงานในรูปกรดซิตริก (ลักขณา รุจนะไกรกานต์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์, 2533) ในผลหมอนจะรายงานความเป็นกรดในรูปของกรดซิตริก ซึ่งเป็นกรดที่มีอยู่มากในผลไม้ชนิดนี้ (Wills, Lim and Greenfield, 1987) ในผลสีแดงจะมีค่า pH ต่ำกว่าแต่ค่าร้อยละความเป็นกรดสูงกว่าผลหมอนสีม่วง แสดงถึงความเปรี้ยวที่มีในผลสีแดงมากกว่าผลสีม่วง องค์ประกอบทางเคมีและสมบัติทางกายภาพและเคมีที่แตกต่างกันในผลสีแดงและสีม่วงเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการสุกของผลไม้ การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญที่สุดในระหว่างการสุกคือ การเปลี่ยนแปลงของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเมื่อผลไม้สุกน้ำตาลจะมีค่าสูงขึ้น เนื่องจากการย่อยสลายของโพลีแซคคาไรด์ในผลไม้ จะเห็นได้จากค่าของของแข็งที่ละลายได้ และค่าร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีค่าสูงในผลสีม่วง ส่วนการเปลี่ยนแปลงของกรดอินทรีย์ในผลไม้นั้นจะมีค่าเพิ่มขึ้นในระยะที่ผลไม้เริ่มสุก และจะลดลงเรื่อยๆอย่างช้าๆจนกระทั่งผลไม้สุก เนื่องจากกรดอินทรีย์จะถูกใช้ในกระบวนการหายใจของผลไม้ได้คาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ทำให้กรดอินทรีย์ลดลงในผลไม้ที่สุกจัด ดังตัวอย่างสมการเคมีของการเปลี่ยนแปลงในผลไม้(รัชนี ดัณฑะพานิชกุล, 2536)

glucose : $C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \longrightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O$

fatty acid : $C_{18}H_{36}O_2 + 26\,O_2 \longrightarrow 18\,CO_2 + 18\,H_2O$

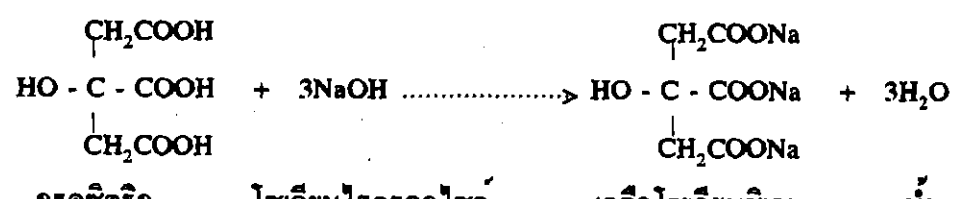
malic acid : $C_4H_6O_5 + 3\,O_2 \longrightarrow 4\,CO_2 + 3\,H_2O$

นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของเนื้อเยื่อ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารพวก pectin ซึ่งพบอยู่ในส่วน middle lamella ซึ่งจะเปลี่ยนจากรูปที่ไม่ละลายน้ำไปเป็นรูปที่ละลายน้ำ ลดความแข็งแรงของผนังเซลล์ ทำให้เนื้อเยื่อของผลไม้นิ่ม การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในผลไม้จะมีเล็กน้อย ซึ่งโปรตีนในผลไม้จะเป็นพวกเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่างการสุก ซึ่งในผลสีแดงมีโปรตีน 2.24% และผลสีม่วง 1.38% ส่วนไขมันในผลไม้จะอยู่ในรูปของกรดไขมัน ผลหมอนมีไขมันในผลสีแดง 1.17% และผลสีม่วง 1.07%(รัชนี ตัณฑะพานิชกุล, 2536)

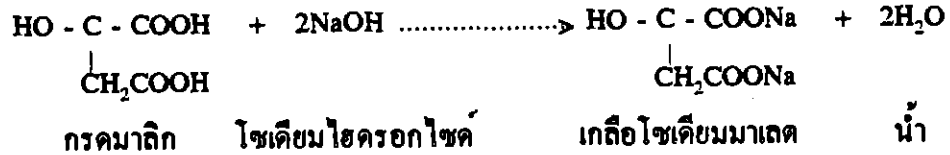
1.2 การตรวจสอบและการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์

เนื่องจากผลหมอนเป็นผลไม้ที่รสเปรี้ยวโดยเฉพาะในผลสีแดงจะมีรสเปรี้ยวกว่าในผลม่วง จากค่าpH ที่วัดได้ผลแดงมีค่าเฉลี่ยของ pH เท่ากับ 3.64 ส่วนผลม่วงมีค่าเฉลี่ยของ pH เท่ากับ 4.04 (ตารางที่ 4.1) แสดงว่าในผลหมอนมีปริมาณของกรดอินทรีย์อยู่ในปริมาณสูง จึงนำผลหมอนสีแดงและสีม่วงมาทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ การวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่มีอยู่ในพืชนั้นมีอยู่หลายวิธีเช่น การไตเตรทโดยตรงกับสารละลายด่างมาตรฐานโดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ หรือการไตเตรทแบบโพแทนซิออเมตริก ซึ่งเป็นการหาความเป็นกรดทั้งหมด (total acidity) แต่ไม่สามารถหาชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดในผลไม้ที่มีอยู่ได้ โดยทั่วไปแล้วการหาชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในผลไม้ จะใช้วิธีโครมาโทกราฟีซึ่ง ได้แก่ โครมาโทกราฟีกระดาษ (Paper Chromatography ; PC) โครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin Layer Chromatograph ; TLC) โครมาโทกราฟีกาซ (Gas Chromatography ; GC) และโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) ซึ่งปัจจุบัน HPLC เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ เพราะสะดวกและรวดเร็ว ไม่ต้องทำเป็นอนุพันธ์เพื่อให้ระเหยได้เหมือนกับวิธี GC (Horwitz, 1980; Robinson, 1975)

การหาปริมาณกรดอินทรีย์รวมโดยการไตเตรทกับด่าง เนื่องจากกรดอินทรีย์มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนสามารถทำปฏิกิริยากับด่างได้เกลือกับน้ำ ดังนั้นจึงสามารถหาปริมาณโดยการไตเตรทกับด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการไตเตรทระหว่างกรดอินทรีย์ที่พบมากในผลไม้ คือ กรดซิตริก และกรดมาลิก กับโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นดังนี้ (Robinson, 1975)



กรดซิตริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ เกลือโซเดียมซิเตรต น้ำ



กรดมาลิก โซเดียมไฮดรอกไซด์ เกลือโซเดียมมาเลต น้ำ

การหาความเป็นกรดของผลหม่อนจะคิดในรูปของกรดซิตริก เนื่องจากการวิเคราะห์โดยใช้ HPLC พบว่าในผลหม่อนทั้งสีแดงและสีม่วงจะมีกรดซิตริกอยู่ในปริมาณมากกว่ากรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wills และคณะ(1987) และในการทดลองของ Ajay และคณะ(1993) ซึ่งศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของผล mulberry 10 สายพันธุ์ พบว่ากรดที่มีอยู่มากในผลหม่อนคือกรดซิตริก และรายงานความเป็นกรดในรูปของกรดซิตริกเช่นกัน จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดรวมโดยการไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล พบว่าผลหม่อนสีแดงมีปริมาณกรดรวมคิดในรูปกรดซิตริกเฉลี่ยเท่ากับ 4.71% ส่วนในผลสีม่วงมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.49%

การหาชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในผลหม่อนโดยวิธี HPLC ในงานวิจัยนี้ใช้คอลัมน์ LiChrocart® 100 RP-8 (5 μm) โดยใช้สารละลายกรด H_3PO_4 0.2% เป็นเฟสเคลื่อนที่ และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น UV 210 nm. จากโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC เวลารีเทนชั่นของกรดอินทรีย์มาตรฐานได้แก่ กรดทาร์ทาริก 2.04 นาที (รูปที่ ก.1) กรดมาลิก 2.55 นาที (รูปที่ ก.3) กรดซิตริก 4.16 นาที (รูปที่ ก.5) และกรดซัคซินิก 4.76 นาที (รูปที่ ก.7) ส่วนสารละลายที่ได้จากผลหม่อนสีแดงโครมาโทแกรมที่ได้ (รูปที่ ก.2) จะให้เส้นกราฟที่มีพื้นที่สูงที่เวลารีเทนชั่น 4.16 นาที และในผลสีม่วงที่ 4.19 นาที ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับพีคของกรดซิตริกแสดงว่ากรดที่เป็นกรดหลักในผลหม่อนสีแดงและสีม่วงคือกรดซิตริก นอกจากนี้ยังมีพีคของกรดมาลิก กรดทาร์ทาริก กรดซัคซินิกและกรดอื่นๆที่ไม่ได้ทำเป็นสารละลายมาตรฐาน แต่มีในปริมาณเล็กน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณของกรดซิตริก

จากการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ในผลหม่อนสีแดงและสีม่วง (ตารางที่ 4.2) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของ กรดมาตรฐานซิตริก (รูปที่ ก.2) กรดมาตรฐานมาลิก(รูปที่ ก. 4) กรดมาตรฐานซัคซินิก (รูปที่ ก.6) และกรดมาตรฐานทาร์ทาริก (รูปที่ ก.8) พบว่าในผลหม่อนสีแดงมีปริมาณ กรดซิตริกเฉลี่ยเท่ากับ 3.02 % กรดมาลิก 0.62 % กรดซัคซินิก 0.514 % และกรดทาร์ทาริก 0.29 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่วนผลหม่อนสีม่วงมีปริมาณเฉลี่ยของกรดซิตริก 1.20 % กรดมาลิก 0.61 % กรดซัคซินิก 0.43 % และกรดทาร์ทาริก 0.18 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณกรดรวมในผลหม่อนสีแดงเท่ากับ 4.44 % และผลหม่อนสีม่วง 2.43 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดโดยการ

ไตเตรทเทียบกับวิธี HPLC พบว่าการหาปริมาณกรดรวมโดยวิธี HPLC จะได้ค่าที่น้อยกว่าวิธีการไตเตรท ทั้งนี้เนื่องจากในการไตเตรทนั้นอาจมีสารบางตัวเช่นกรดอินทรีย์อื่นๆ ที่มีปริมาณน้อยๆ ทำปฏิกิริยากับด่างได้ จึงทำให้มีปริมาณของความเป็นกรดมากกว่า (Horwitz, 1980)

1.3 การตรวจสอบชนิดของรงควัตถุ

จากการตรวจสอบสมบัติของสีที่สกัดได้จากผลหม่อนขั้นต้น (ภาคผนวก ก.8) สมบัติของสีในสารละลาย พบว่าในภาวะที่ pH เป็นกรดสารละลายมีสีแดง ที่ pH เป็นกลางสารละลายจะมีสีม่วง และที่ pH เป็นด่างสารละลายมีสีน้ำเงิน การเปลี่ยนแปลงเช่นนี้แสดงว่าสีในผลหม่อนสุกเป็นแอนโธไซยานิน(Ikan, 1976) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Maki, Tashiro และ Inamoto (1981) ได้ทำการวิจัยศึกษาชนิดของรงควัตถุหลักในผลหม่อน (mulberry) พบว่ารงควัตถุหลักในผลหม่อนคือ พวกแอนโธไซยานิน

โดยทั่วไปแอนโธไซยานิดินที่พบในพืชจะมีอยู่ 6 ชนิดด้วยกันดังแสดงในรูปที่ 2.2 แอนโธไซยานิดินทั้ง 6 ชนิดจะมีน้ำตาลเกาะอยู่ในลักษณะต่างๆ กัน ทำให้มีแอนโธไซยานินชนิดต่างๆ เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก โดยมีความแตกต่างของน้ำตาลที่เกาะอยู่คือ ชนิดของน้ำตาล จำนวนโมเลกุลของน้ำตาล และตำแหน่งของน้ำตาลที่เกาะอยู่ (Horborne, 1973) ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบชนิดของแอนโธไซยานิน โดยวิธี HPLC ดัดแปลงจากวิธีของ Karel, Hans, Roger และ Christiaan (1983) ใช้คอลัมน์ LiChrocart RP-18 เฟสเคลื่อนที่ใช้คือ 5% formic acid (A) และ methanol (B) อัตราการเคลื่อนที่ 1.5 ml/min ตรวจวัดที่UV 280 nm (ภาคผนวก ก.10) จากโครมาโทแกรม (รูปที่ ค.4) จะเห็นว่าในผลหม่อนมีสารพวกฟีนอลิกซึ่งรวมถึงแอนโธไซยานินอยู่หลายชนิด ซึ่งพีคที่เด่นชัดแสดงค่าในตารางที่ 4.3 จากพื้นที่ใต้พีคมีอยู่ 2 พีคที่มีค่าสูงกว่าพีคอื่นๆ แสดงว่าผลหม่อนมีแอนโธไซยานินมากกว่า 1 ชนิด เนื่องจากภาวะในการวิเคราะห์แอนโธไซยานินมีความแตกต่างจากของ Karel และคณะ(1983) ซึ่งใช้เป็นต้นแบบของการทดลองเนื่องจากใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกัน แต่การทำ elution profile แตกต่างกันเนื่องจากข้อจำกัดของอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ และการขาดสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบชนิดของแอนโธไซยานิน ทำให้ไม่สามารถบอกได้ว่าแอนโธไซยานินที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ในงานวิจัยนี้คือ ชนิดใดได้ แต่จะเห็นว่าจากภาวะที่ใช้วิเคราะห์สามารถแยกแอนโธไซยานินในผลหม่อนได้อย่างเด่นชัด

ในงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์ชนิดของรงควัตถุโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบกระดาษแบบ 1 มิติ ในตัวทำละลาย 4 ระบบคือ Formic , Forestal , BAW , BuHCl ซึ่ง 2 ระบบแรก ใช้ในการตรวจสอบชนิดของแอนโธไซยานิดิน ส่วนอีก 2 ระบบหลังจะใช้ในการตรวจสอบชนิดของแอนโธไซยานิน ในระบบ Formic ค่า Rf เท่ากับ 0.50 และใน Forestal ค่า Rf เท่ากับ 0.22 (รูปที่ ค.3) ซึ่งใกล้เคียงกับค่า Rf ของ cyanidin ในระบบ BAW ค่า Rf เท่ากับ 0.37 และใน

BuHCl ค่า Rf เท่ากับ 0.26 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า Rf ของ cyanidin 3-glucoside (ตารางที่ ก.1,ก.2) (Harborne, 1967) แสดงว่าในผลหม่อนที่นำตรวจสอบนั้นมีแอนโธไซยานิดินเป็น cyanidin และมีแอนโธไซยานินเป็น cyanidin 3-glucoside จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC นั้นไม่สามารถบอกชนิดของแอนโธไซยานินในผลหม่อนได้อย่างแน่ชัด เนื่องจากไม่มีสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ แต่จากการวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบกระดาษสามารถบอกได้ว่าในผลหม่อนมี cyanidin-3-glucoside ซึ่ง Harborne, Mabry และMabry(1975) ได้แสดงชนิดของแอนโธไซยานินจากพืชที่มีสีแดง สำหรับในผลหม่อน (*Morus alba.* , วงศ์ Moraceae) แอนโธไซยานินที่พบคือ cyanidin 3-glucoside , cyanidin 3,5-glucoside และ delphinidin 3-glucoside ซึ่งชนิดและปริมาณของแอนโธไซยานินในผลหม่อนหรือผลไม้อื่นๆจะขึ้นกับสายพันธุ์ การเพาะปลูก ภูมิอากาศในการเพาะปลูก อายุ (Boyles and Wrolstad, 1993) เช่นหม่อนพันธุ์ Mavromournia (*M nigra.*) มีแอนโธไซยานินชนิดเดียวคือ cyanidin 3-grucorutinoside (Gerasopoulos and Stavroulakis, 1997) ส่วน Black mulberries (*M nigra.*) มีเพียง cyanidin 3-glucoside และ Purple mulberries (*M alba.*) มี cyanidin 3-rutonoside หรือ cyanidin 3-glucoside (Markakis, 1982) จากโครมาโทแกรมHPLC (รูปที่ ค.4) จะเห็นได้ว่ามีพีคของแอนโธไซยานิน อีกหลายชนิดในผลหม่อนนอกเหนือจาก cyanidin 3-glucoside ในผลไม้ที่มีสีของผลสดใกล้เคียงกับผลหม่อนจะมีชนิดของแอนโธไซยานินอยู่ในส่วนของผลต่างชนิดกันไป (Hendry and Hiughton, 1996) เช่น Blackberry (*Rubus fruticosus*) มีแอนโธไซยานินที่พบคือ cyanidin 3-glucoside และ cyanidin 3-rutinosides และ Red raspberry (*Rubus ideaus*) มีแอนโธไซยานินที่พบคือ cyanidin 3-sophoroside , cyanidin 3-glucosylrutinoside และ cyanidin 3-glucoside ชนิดและปริมาณของแอนโธไซยานินที่พบในพืช ผลไม้จะแตกต่างกันไป ในการศึกษาหาชนิดและปริมาณของแอนโธไซยานินในพืชหรือผลไม้ นั้นจะต้องมีการเตรียมตัวอย่าง เตรียมสารมาตรฐานเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบและวิเคราะห์ชนิดและปริมาณได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ในปัจจุบันตรวจหาแอนโธไซยานินนั้นนิยมใช้วิธี HPLC ซึ่งมีความถูกต้องและสะดวกรวดเร็วกว่า โดยหาภาวะที่เหมาะสมกับคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Rommel, Wrolstad and Heatherbell, 1992 ; Sarni-manchado, et al., 1996)

2. <u>การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการหมักไวน์หม่อน</u>

คุณภาพของไวน์ที่ผลิตได้ขึ้นกับปัจจัยสำคัญหลายประการ น้ำผลไม้ที่จะนำมาหมักเป็นไวน์จะต้องมีสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการทำไวน์หากน้ำผลไม้นั้นยังมีสมบัติที่ไม่เหมาะสมจะต้องได้รับการปรุงแต่งก่อนการหมัก การปรับแต่งน้ำผลไม้นี้มีความสำคัญกับรสชาติความอร่อยของไวน์มากพอๆกับชนิดและองค์ประกอบของน้ำผลไม้ที่นำมาใช้ทำไวน์ จุดสำคัญของการปรับแต่ง

น้ำผลไม้คือ การปรุงแต่งเพื่อให้ยีสต์ได้สารอาหารเพียงพอที่จะทำการหมักน้ำผลไม้เป็นไวน์ เช่น การเติมสารไนโตรเจน ฟอสเฟต เกลือแร่ และการปรุงแต่งเพื่อให้สามารถหมักได้ไวน์ที่มีรสกลมกล่อม เช่นการเติมน้ำตาล กรดอินทรีย์ เป็นต้น (ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, 2533)

จากการศึกษาองค์ประกอบของผลหม่อนสดในข้อ1. จะเห็นว่าผลหม่อนมีความเหมาะสมในการที่จะนำมาผลิตเป็นน้ำผลไม้หรือไวน์ โดยมีวิธีการผลิตไวน์หม่อนตามรูปที่ 3.1 (วิโรจน์ แก้วเรือง และคณะ, 2535) ผลหม่อนมีค่าความเป็นกรดในผลสีแดง 4.71% และผลสีม่วง 2.49% (คิดในรูปกรดซิตริก) ซึ่งมีค่าสูงดังนั้นการเตรียมน้ำหมักจึงต้องเติมน้ำลงไปเพื่อลดความเป็นกรดของน้ำหม่อนที่ใช้ในการหมักไวน์หม่อน(ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, 2531) จากนั้นต้มผลหม่อนให้เดือด แล้วเคี่ยวด้วยไฟอ่อน นาน 20 - 30 นาที เพื่อเป็นการสกัดสารต่างในผลหม่อนให้ออกมาอยู่ในน้ำหม่อน แล้วจึงกรองส่วนเมล็ดและก้านออก เนื่องจากผลหม่อนจะประกอบด้วยผลขนาดเล็กจำนวนมากซึ่งมีส่วนของเมล็ดมากเช่นเดียวกัน ถ้าคั้นน้ำหม่อนด้วยการบีบคั้นจะทำให้ส่วนของเมล็ดแตกและสารแทนนินซึ่งมีอยู่มาในเมล็ดออกมาในส่วนน้ำหม่อนซึ่งมีต่อรสชาติของน้ำหม่อนทำให้มีรสฝาดมาก และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์ได้โดยไปจับกับส่วนโปรตีนทำให้เอนไซม์ของเชื้อยีสต์ไม่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้การต้มสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบได้ (ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, 2533)

เมื่อได้น้ำหม่อนแล้วปรับปริมาณน้ำตาลเพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในผลสีแดงเท่ากับ 6.0°Brix ส่วนในผลสีม่วงเท่ากับ 18.80°Brix (ตารางที่ 4.1) ซึ่งจะมีปริมาณน้ำตาลที่สูงพอในการหมักไวน์ แต่จากการเจือจางน้ำหม่อนด้วยน้ำ 4 เท่าทำให้ปริมาณของน้ำตาลในน้ำหม่อนนั้นลดลง จึงเติมน้ำตาลทรายลงในน้ำหมักให้ได้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับ 20-24 °Brix ซึ่งเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการทำไวน์ทั่วไป ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 20 °Brix เพื่อให้เชื้อยีสต์ใช้น้ำตาลที่มีในน้ำหม่อนได้หมดทำให้ได้ไวน์ชนิดไม่หวาน ถ้าใช้ปริมาณที่น้อยหรือมากกว่า 20 °Brix นั้นเชื้อยีสต์มีความสามารถใช้น้ำตาลในกระบวนการหมักได้แอลกอฮอล์ ซึ่งยีสต์มีขีดจำกัดในการสร้างแอลกอฮอล์เนื่องจากปริมาณแอลกอฮอล์ที่มีมากขึ้นทำให้ยีสต์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ (ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, 2533)

การยับยั้งหรือการทำลายจุลินทรีย์ในน้ำผลไม้ อาจทำได้โดยการให้ความร้อนหรือใช้สารเคมี การใช้ความร้อนมีข้อดีคือทำให้น้ำตาลละลายได้ดีขึ้น แต่จะมีข้อเสียคือ ทำลายกลิ่นรส ดังนั้นการใช้ความร้อนทำให้ไวน์มีคุณภาพด้อยกว่าการใช้สารเคมี ซึ่งสารเคมีที่ใช้กันจะเติมในรูปของโปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ (Amerine,Ough and Singleton, 1979)

SO_2 (gas) <.....> SO_2 (aq.)

SO_2 (aq.) + H_2O <....> H_2SO_3

H_2SO_3 <.....> $H^+ + HSO_3^-$

HSO_3^- <.....> $H^+ + SO_3^{2-}$

$2HSO_3^-$ <.....> $S_2O_5^{2-} + H_2O$

โปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟท์เมื่ออยู่ในสภาพสารละลาย จะมีสภาพเป็นกรดและเปลี่ยนเป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ซึ่งจะแตกตัวออกเป็นเกลือไบซัลไฟท์ (H_2SO_3) เกลือไบซัลไฟท์แบ่งออกเป็น 2 พวก คือ Bound HSO_3^- form และ Free HSO_3^- form พวก Bound HSO_3^- form นั้นจะรวมตัวกับโปรตีน สารเพคติน อัลดีไฮด์ คีโตน เคตรินและน้ำตาล เพราะฉะนั้นจึงไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ส่วนพวก Free HSO_3^- form นั้นจะมีผลในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเกลือไบซัลไฟท์ที่ใช้ในการฆ่าเชื้อนั้นมีผลในการฆ่าเชื้อเพียงครึ่งหนึ่งเท่านั้น ซึ่งเกลือไบซัลไฟท์นี้จะแตกตัวเต็มที่ที่ pH 3.5 และมีข้อจำกัดคือต้องทิ้งไว้อย่างน้อย 6 ชั่วโมง จึงเติมกล้าเชื้อยีสต์ได้ มิฉะนั้นจะทำให้ยีสต์หยุดการเจริญเติบโตหรือตายได้ ข้อควรระวังสำหรับการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์คือ ต้องคำนวณปริมาณที่ใช้ให้ถูกต้องไม่ผิดพลาด ถ้าน้อยเกินไปไวน์อาจเสียได้ ถ้ามากเกินไปเชื้อยีสต์จะหมักได้น้อยลงหรือไม่ทำการหมักเลย และมีกลิ่นซัลเฟอร์ไดออกไซด์อย่างรุนแรงด้วย ซัลเฟอร์ไดออกไซด์นอกจากจะช่วยฆ่าเชื้อและป้องกันการเสียของไวน์แล้วยังช่วยป้องกันการเติมออกซิเจนให้กับไวน์ ไม่ให้ไวน์ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (browning) (Amerine,Ough and Singleton, 1979)

ในอดีตการทำไวน์จะอาศัยยีสต์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งการหมักจะเกิดได้ช้าและอาจมีการเจริญของจุลินทรีย์อื่นทำให้กลิ่นรสของไวน์ไม่เป็นไปตามต้องการ ปัจจุบันในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์มักใช้เชื้อบริสุทธิ์ การใช้เชื้อยีสต์ที่เหมาะสมในการทำไวน์เติมลงไปจะได้ไวน์ที่มีกลิ่นรสดีตามต้องการ เนื่องจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถใช้สารอาหารที่มีอยู่ในน้ำหมักเพื่อสร้างแอลกอฮอล์ และผลพลอยได้ที่มีผลต่อกลิ่นรสของไวน์ต่างกัน ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ที่ใช้หมักไวน์หม่อนอีกสายพันธุ์หนึ่ง คือ *S. cerevisiae* var. Montrachet ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์ของสหรัฐอเมริกา (Reed and Nagowithana, 1991) ศึกษาเปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* var. Burgundy ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตไวน์หม่อน จากงานวิจัยของสถานีวิจัยหม่อนไหมจังหวัดอุดรธานี

2.1 ศึกษาปริมาณสารอาหารที่เป็นแหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะสมในการหมักไวน์หม่อน

น้ำผลไม้ส่วนใหญ่ เช่น น้ำองุ่น มีสารอาหารสำรับยีสต์เพียงพออยู่แล้ว แต่ผลไม้บางอย่างที่มีรสเปรี้ยวจัด เช่น มะยม มะขาม และกระเจี๊ยบ เมื่อเจือจางด้วยน้ำเพื่อลดความเป็นกรดเป็น

ปริมาณมาก จะทำให้มีสารอาหารสำหรับยีสต์ไม่เพียงพอ มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ และทำให้การหมักแอลกอฮอล์หยุดชะงัก หรือไม่ได้ไวน์ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ โดยทั่วไปในการหมักไวน์นิยมเติมสารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อช่วยให้การหมักดำเนินไปโดยไม่หยุดชะงัก ประดิษฐ์ ครุวัฒนาและคณะ (2532) ได้ศึกษาชนิดและปริมาณอาหารที่เหมาะสมในการเร่งการหมักไวน์กระเจี๊ยบ พบว่า การเติมสารอาหารที่เหมาะสมจะช่วยเร่งการหมักได้ และได้ไวน์ที่มีคุณภาพทั่วไปเป็นที่ยอมรับ ปริมาณสารอาหารที่เติมจะมีผลต่อระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก ค่าใช้จ่ายในการดูแล และคุณภาพของไวน์ที่ได้ หากเติมในปริมาณที่น้อยเกินไป ก็จะไม่สามารถเร่งการหมักได้ แต่ถ้าเติมในปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้สิ้นเปลือง และมีผลต่อกลิ่นรสของไวน์ที่ได้ จากการวิเคราะห์เบื้องต้นขององค์ประกอบทางเคมีจะเห็นว่า มีปริมาณโปรตีนในผลสีแดง 2.24% ผลสีม่วง 1.38% (ตารางที่ 4.1) ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมน้ำหมักนมีการเติมน้ำเพื่อเจือจางความเป็นกรด ทำให้น้ำหมักนมีปริมาณของสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับเชื้อยีสต์ลดลง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนแก่เชื้อยีสต์ในน้ำหมักนม

การเติมไนโตรเจนสำหรับการทำไวน์นิยมเติมในรูปเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต หรือเกลือแอมโมเนียมฟอสเฟต ในการทดลองนี้เลือกใช้การเติมไนโตรเจนในรูปของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เนื่องจากยังเป็นแหล่งของฟอสเฟตด้วย เมื่อยีสต์เริ่มทำการหมักน้ำตาล ยีสต์จะสร้างสารเอสเทอร์ที่มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบซึ่งจำเป็นสำหรับกระบวนการหมัก บางครั้งยีสต์อาจหยุดการหมักเนื่องจากการขาดฟอสเฟตได้เนื่องจากมีความสำคัญใน glycolytic pathway ทำให้ได้เอธิลแอลกอฮอล์และยังช่วยในการสร้างสารกลีเซอรอลซึ่งมีความสำคัญต่อทางประสาทสัมผัสของไวน์ (Amerine, Berg and Cruess, 1972 ; Boulton, Singleton, Bisson and Kunkee, 1996) นอกจากนี้ยังสามารถเติมไนโตรเจนในรูปอื่นอีกเช่นยูเรีย แต่จะทำให้เกิดยูรีเทนจากการทำงานของเชื้อยีสต์จึงควรหลีกเลี่ยง (Reed and Nagowithana, 1991) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารที่เป็นแหล่งของไนโตรเจนแก่เชื้อยีสต์คือ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

โดยทั่วไปการติดตามการหมักจะพิจารณาจาก การลดลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ และการเพิ่มขึ้นของปริมาณร้อยละแอลกอฮอล์ (Vine, 1981) ในงานวิจัยนี้ได้ติดตามการหมักโดยวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ โดยใช้ hand refractometer ซึ่งใช้หลักการการหักเหของแสงในการวัดปริมาณน้ำตาลที่มีในตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และ 4.5 (ตารางที่ 4.4,4.8) ซึ่งพบว่าเมื่อสิ้นสุดการหมักค่าของแข็งที่ละลายได้มีค่าประมาณ 7.0 เนื่องจากการใช้ hand refractometer ในการวัดน้ำผลไม้ค่าที่ได้จะเป็นค่าของน้ำตาลที่มีในน้ำผลไม้นั้นๆ แต่ในการนำมาใช้วัดไวน์ ปริมาณของแอลกอฮอล์ที่เกิดจากกระบวนการหมักไวน์โดยเชื้อยีสต์ จะมีผลต่อการหักเหของแสงในการวัด

ด้วย hand refractometer ทำให้ค่าที่อ่านได้ไม่ใช่ค่าของน้ำตาลที่มีเหลือหลังจากการใช้โดยเชื้อยีสต์ในการสร้างแอลกอฮอล์ (Amerine and Ough, 1974)

กระบวนการหมักไวน์เป็นการเจริญของยีสต์ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนโดยยีสต์จะใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำหมักเพื่อสร้างแอลกอฮอล์ น้ำตาลที่มีในผลไม้ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปน้ำตาลฟรุคโตส หรือกลูโคสซึ่งยีสต์จะนำไปใช้ได้โดยตรง ในการเตรียมน้ำหมักจะปรับปริมาณน้ำตาลโดยการเติมน้ำตาลซูโครสลงไป ซึ่งยีสต์จะใช้น้ำตาลซูโครสโดยเอนไซม์ invertase ในการเปลี่ยนซูโครสเป็น D-fructose และ D-glucose ก่อนที่จะนำเข้าไปใช้ในเซลล์ผ่านกระบวนการไกลโคไลซีส เพื่อเกิดพลังงานให้เซลล์ใช้ (Sols, Gancedo and Delafuente, 1971)

การวัดน้ำตาลรีดิวซ์เป็นการวัดน้ำตาลที่เชื้อยีสต์นำไปใช้ในการเจริญและการหมักโดยตรง น้ำตาลกลูโคส และ ฟรุคโตสจะรีดิวซ์ cupric copper ของ copper salts ในภาวะที่ให้ความร้อนในสารละลายด่าง ได้ cuprous oxide จะแยกออกมาในรูปของ cuprous oxide ซึ่งเป็นตะกอนสีแดง แต่ในการเตรียมน้ำหมักจะเติมน้ำตาลซูโครสลงไปซึ่งไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์ ในการวิเคราะห์วันเริ่มต้นการหมักน้ำตาลที่มีอยู่ในไวน์จึงเป็นรูปของน้ำตาลซูโครสที่เติมลงไปและน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในผลหมอนเอง จากวิธีการวิเคราะห์การต้มบน hot plate ให้เดือดความร้อนสามารถทำให้น้ำตาลซูโครสแตกเป็นน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุคโตสได้ทำให้วัดออกมาในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ (Amerine, Ough and Singleton, 1979; Zoecklein, Fugelsang, Gump and Nury, 1995)

การวัดปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้ Ebulliometer จะอาศัยหลักความแตกต่างของจุดเดือดของน้ำ กับสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณแอลกอฮอล์ ค่าที่ได้จะถูกต้องเมื่อสารละลายตัวอย่างมีร้อยละแอลกอฮอล์โดยปริมาตรไม่เกิน 14 และไม่ควรมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้มากกว่า 0°Brix หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง (Vine, 1981) ในงานวิจัยนี้จึงเริ่มต้นการวัดปริมาณแอลกอฮอล์เมื่อการหมักไวน์หมอนดำเนินไปเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ และวัดปริมาณแอลกอฮอล์ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักทุกสัปดาห์

จากรูป 4.1-4.3 , 4.5 4.7 จะเห็นว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำหมัก(ตารางที่ 4.4,4.8) และร้อยละปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ตารางที่ 4.5,4.9) มีค่าลดลง ในขณะที่ปริมาณแอลกอฮอล์(ตารางที่ 4.6,4.10) มีค่าเพิ่มขึ้น โดยในช่วงสัปดาห์แรกของการหมักค่าของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้โดยเชื้อยีสต์จะมีความสัมพันธ์เป็นปฏิภาคกับปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น เนื่องจากเริ่มต้นในน้ำหมักมีสารอาหารต่างๆอย่างเพียงพอ มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม หลังจากนั้นเมื่อเกิดการหมักสภาพแวดล้อมจะเริ่มเป็นกรดมากขึ้น สารอาหารต่างๆ ลดลงและปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจากเชื้อยีสต์จะทำให้การหมักโดยเชื้อยีสต์ลดลง ทำให้การเพิ่มของปริมาณแอลกอฮอล์เกิดช้าลงและคงที่ในที่สุด (Reed and Nagodawithana, 1991)

การไม่เติมสารอาหารและการเติมสารอาหารในระดับต่างกัน จะมีผลต่อกระบวนการหมักไวน์โดยเชื้อยีสต์ เมื่อไม่เติมสารอาหาร และเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าการหมักเกิดได้ต่ำกว่าเกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณา คือเมื่อถึงวันที่ 21 ของการหมัก มีน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ประมาณ 5 g /100 ml และเมื่อพิจารณาในชุดที่เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.07% และ 0.09%โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าการหมักเกิดสูงกว่าเกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณา คือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงเท่ากับ 0 เมื่อวันที่ 14 ของการหมัก การหมักที่เกิดขึ้นเร็วเกินไป จะทำให้เชื้อยีสต์สร้างสารที่มีผลต่อกลิ่นรสของไวน์ ออกมาได้ในปริมาณที่น้อย สารอาหารที่เหลืออยู่จะทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดีต่อไวน์ ทั้งเป็นการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย ส่วนการหมักที่เกิดขึ้นช้าไปอาจเกิดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ เป็นการสิ้นเปลืองพลังงาน (Vine, 1981) ในชุดที่เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03% และ 0.05%โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในช่วงวันที่ 16 - 21 วันของการหมักปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ค่อนข้างจะคงที่ แสดงถึงการสิ้นสุดกระบวนการหมัก แต่ยังคงมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ เนื่องจากการหมักเกิดที่อุณหภูมิ 30 ± 5 องศาเซลเซียส ทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์น้อยลง อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักโดยไวน์ยีสต์ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 22 - 27 องศาเซลเซียส (Reed and Nagowithana, 1991) เมื่อพิจารณาจากปริมาณแอลกอฮอล์ของชุดการทดลองที่เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03% และ 0.05%โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะมีค่าสูงกว่าในชุดที่ไม่เติมและเติม 0.01% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดในน้ำหนักที่เติม ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03% และ 0.05% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เท่ากับ 10.5 และ 10.6 โดยปริมาตร จากการคำนวณทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ซึ่งผลการทดลองการหมักไวน์หม่อนโดยเชื้อยีสต์ทั้งสายพันธุ์ Burgundy และ Montrachet ให้ผลในทำนองเดียวกัน จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ และปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นเมื่อสิ้นสุดการหมักจะแสดงให้เห็นว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Montrachet มีประสิทธิภาพในการหมักไวน์หม่อนได้ดีว่า เชื้อยีสต์สายพันธุ์ Burgundy คือมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่น้อยกว่า และมีปริมาณแอลกอฮอล์สูงกว่า ในชุดการทดลองที่เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อสิ้นสุดการหมัก(21 วัน) ไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Burgundy มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ 2.0 g/100ml ปริมาณแอลกอฮอล์ 9.9%โดยปริมาตร ไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Montrachet มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ 1.0 g/100ml ปริมาณแอลกอฮอล์ 10.5%โดยปริมาตร

การศึกษาขั้นต่อไปจึงเลือกเติมสารอาหารที่เป็นแหล่งของไนโตรเจนคือไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ในปริมาณ 0.03% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ

ประดิษฐ์ ครุวัฒนา และคณะ (2530) การหมักไวน์กระเจี๊ยบจะมีการเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03%โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือการผลิตไวน์น้ำผึ้งนั้นต้องมีการเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05%โดยน้ำหนักต่อปริมาตรก่อนการหมัก เนื่องจากน้ำผึ้งมีปริมาณโปรตีนอยู่น้อยคือ อยู่ในช่วง 0.065-0.106% ไม่เพียงพอจึงต้องเติมสารประกอบไนโตรเจนลงไปในน้ำหมัก เมื่อเปรียบเทียบตัววัดดุดิบคือน้ำผึ้งนั้นมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าพวกผลไม้ ทำให้เชื้อยีสต์ต้องการไนโตรเจนปริมาณสูงกว่า (สมบูรณ์ เดชัญญวรากูล, 2536)

เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์แต่ละการทดลองนั้น มีการควบคุมปริมาณของเชื้อโดยการใช้เชื้อยีสต์ที่ activate ในอาหาร YM broth ปริมาณที่เท่ากันและใช้เวลาในการเขย่าเท่ากัน ยืนยันผลของปริมาณเชื้อยีสต์ที่มีในกล้าเชื้อโดยการทำ total plate count พบว่ามีปริมาณของเชื้อยีสต์เริ่มต้นใกล้เคียงกันในแต่ละชุดการทดลอง คือประมาณ 10000 cells per ml จากการพิจารณาการเจริญของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Burgundy และสายพันธุ์ Montrachet ตามลำดับ ในระหว่างการหมักเมื่อเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณต่างกัน พบว่าการเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจะช่วงเร่งการเจริญของเชื้อยีสต์ในช่วงต้นของการหมักทำให้มีจำนวนของเชื้อยีสต์มากกว่าชุดที่ไม่มีการเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต การเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตสามารถเร่งการเจริญของเชื้อยีสต์ได้ จะเห็นว่าในช่วงสัปดาห์แรกของการหมักจะมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์อย่างมากในชุดที่เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.09% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยจะมีน้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้ไปประมาณ 15 g/100ml เปรียบเทียบกับในชุดที่ไม่เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต มีน้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้ไปประมาณ 6.75 g/100ml และมีปริมาณของแอลกอฮอล์เกิดขึ้น 9.5% และ 4.75% โดยปริมาตรตามลำดับ ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดและสารอาหารที่ลดลงจะมีผลต่อทำให้เชื้อยีสต์มีการเจริญน้อยลง เมื่อยีสต์ตายจะเกิดการ autolysis ขึ้นทำให้กรดอะมิโนในเชื้อยีสต์ถูกปลดปล่อยออกสู่น้ำหมัก ซึ่งมีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์และจุลินทรีย์อื่นๆ ในระหว่างการหมัก และระหว่างการบ่มไวน์ (Amerine, Ough and Singleton, 1979) ดังนั้นเมื่อสิ้นสุดการหมักปริมาณของไนโตรเจนในไวน์ยังคงมีปริมาณหลงเหลืออยู่

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้โดยเชื้อยีสต์ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักบางชุดการทดลอง ค่าที่ได้ไม่ลดลงเป็นศูนย์ เนื่องจากการหมักไวน์ในการทดลองนี้ได้ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง ที่มีอุณหภูมิประมาณ 27-32 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สูงสำหรับการเจริญของเชื้อยีสต์ ทำให้ประสิทธิภาพการหมักของเชื้อยีสต์ลดลงเพราะการหมักเป็นปฏิกิริยาคายความร้อน (exothermic process) เมื่อความร้อนที่เกิดสูงขึ้นทำให้การเจริญของเชื้อยีสต์ลดลงความสามารถในการใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์จึงลดลง ซึ่งการหมักที่สมบูรณ์ควรหมักที่อุณหภูมิ 15 - 25 องศาเซลเซียส (Vine, 1981) นอกจากนี้การหมักที่อุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดการสูญเสียเอธิลแอลกอฮอล์ และสารพวก

volatile compounds จากการระเหย การใช้น้ำตาลในการสร้างแอลกอฮอล์ของเชื้อยีสต์จะเป็นตามสมการเคมีดังนี้

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

ตามทฤษฎี น้ำตาล 1 โมเลกุลจะได้ เอธิลแอลกอฮอล์ 2 โมเลกุล และคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล คิดเป็น 51.1% และ 48.9 % โดยน้ำหนัก แต่ในทางปฏิบัติปริมาณของแอลกอฮอล์ที่ได้จะน้อยกว่าทางทฤษฎี ในงานวิจัยนี้จากปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไปโดยเชื้อยีสต์ ในการสร้างแอลกอฮอล์จะน้อยกว่าทางทฤษฎี ในชุดการทดลองที่ไม่เหลือน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักจะมีปริมาณแอลกอฮอล์ตามทฤษฎีเท่ากับ 12.88 %โดยปริมาตร จากการทดลองได้ปริมาณแอลกอออล์สูงสุด 11.5 %โดยปริมาตร คิดเป็น 46.35 %โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.10) เนื่องจากการระเหยของแอลกอฮอล์ การเปลี่ยนรูปของแอลกอฮอล์ไปอยู่ในรูปสารระเหย และเชื้อยีสต์ยังใช้น้ำตาลในการเจริญนอกเหนือจากการเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ (Kunkee and Amerine, 1970)

2.2 ศึกษาระดับ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมของน้ำหมักในการหมักไวน์หม่อน

ในการเตรียมน้ำหมักเพื่อใช้ในการหมักไวน์นั้น จะต้องทำการปรับ pH ของน้ำหมักให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อยีสต์ และเป็นการป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้ยังมีผลต่อรสชาติของไวน์ที่ได้ โดยทั่วไปจะปรับให้อยู่ในช่วง 3.0-4.5 (Vine, 1981) ในการเตรียมน้ำหมักเพื่อทำการหมักไวน์หม่อนโดยใช้ผลสีแดง 1ส่วน ต่อ ผลสีม่วง 2 ส่วน เติมน้ำ 4 เท่า จะได้ค่า pH ประมาณ 3.8 เพื่อให้เชื้อยีสต์เจริญเติบโตดี และป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ จึงศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของน้ำหมักที่เหมาะสมต่อการหมักไวน์หม่อน โดยการเตรียมน้ำหม่อนให้มีอัตราส่วนของผลสีแดงลดลงเป็นผลสีแดง 1 ส่วน ต่อ ผลสีม่วง 4 ส่วน ซึ่งได้ pH เท่ากับ 4.4 จากนั้นปรับ pH ของน้ำหมักให้ลดลง โดยการเติมกรดซิตริกลงไป เนื่องจากเป็นกรดที่มีปริมาณมากในผลหม่อน ซึ่งได้ค่า pH 4.0 3.5 และ 3.0 ในระหว่างการหมัก ติดตามผลเช่นเดียวกับในข้อ 2.1 และวัดค่า pH และ ความเป็นกรด ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมัก และเกณฑ์การตัดสินเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ดังผลแสดงในรูปที่ 4.9 - 4.16 (ตารางที่ 4.12 - 4.19)

ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้โดยเชื้อยีสต์ จะมีค่าลดลงอย่างมากในช่วงสัปดาห์แรกของการหมัก ต่อมาค่าจะลดลงอย่างช้าๆ และไม่เปลี่ยนแปลงมากในช่วงสัปดาห์สุดท้ายของการหมัก ซึ่งมีความสัมพันธ์ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น ในช่วงสัปดาห์แรกจะมีการสร้างแอลกอฮอล์ในปริมาณที่สูง ซึ่งเกิดจากการใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์ในช่วงแรกที่มีน้ำตาลอยู่มาก และไม่มีการสร้างสารที่เป็นผล

ให้ยีสต์หยุดการเจริญได้ เชื้อยีสต์จึงใช้สารอาหารต่างๆได้อย่างเต็มที่ ในการสร้างเอทิลแอลกอฮอล์ กาซคาร์บอนไดออกไซด์ และสารให้กลิ่นรสต่างๆ ที่ต้องการ

น้ำหมักที่มีการปรับ pH เริ่มต้น เป็น 4.4 จะให้ผลในการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่เมื่อสิ้นสุดการหมักเท่ากับ 3.2 g/100ml ในไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Burgundy และ Montrachet ซึ่งมีค่ามากกว่าในชุดที่ปรับ pH 3.0 3.5 และ4.0 (ตารางที่ 4.12,4.16) ปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักที่ปรับ pH เป็น 4.4 จะให้ค่าแอลกอฮอล์ 9.82 %โดยปริมาตรในทั้ง 2 สายพันธุ์ ไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Burgundy ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นในที่ pH 3.0 3.5 และ 4.0 ให้ค่าเท่ากับ 11.1% , 11.1% และ 11.0%โดยปริมาตร ตามลำดับ ส่วนไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Montrachet มีปริมาณแอลกอฮอล์ 11.7% , 11.9% และ 11.7 %โดยปริมาตร ตามลำดับ ปริมาณแอลกอฮอล์ในไวน์ชุดที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 4.4 จะมีความแตกต่างจากไวน์ที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 3.0 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่วนน้ำหมักที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 3.0 3.5 และ 4.0 ไม่มีความแตกต่างของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ระดับนัยสำคัญ $p > 0.05$ (ตารางที่ 4.13,4.17) ในน้ำหมักที่มีการเติมซัลไฟต์และมี pH 3.0-4.0 จะมีช่วงของ lag phase ที่ยาวนานขึ้น มีผลต่อการเจริญของยีสต์ และมีผลต่ออัตราการหมัก โดยที่ pH 3.5 จะให้อัตราการเจริญดีกว่า pH 4.0 และ 3.5 ตามลำดับ (Kunkee and Amerine, 1970) มีงานวิจัยได้ศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์ผลไม้ โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* var. Burgundy และ Montrachet จะมี pH ที่เหมาะสมคือ 3.5 (ประดิษฐ์ กรุวัฒนา และคณะ, 2530 ; พิทยา อดุลยธรรม, 2521) ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้น้ำหมักที่มี pH เริ่มต้นอยู่ในช่วง 3.0 - 4.0 ซึ่ง pH ของน้ำหม่อนจะมีค่าประมาณ 3.8 ซึ่งไม่จำเป็นต้องปรับpH และเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีมีการผลิตปริมาณแอลกอฮอล์สูง

ในระหว่างการหมัก pH ของน้ำหมักจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเริ่มต้นการหมัก จากนั้นจะค่อนข้างคงที่ เพราะในช่วงแรกของการหมักเชื้อยีสต์ใช้น้ำตาลในการสร้าง เอทิลแอลกอฮอล์ จะเกิดกาซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งส่วนหนึ่งจะละลายน้ำให้กรดคาร์บอนิก (Kunkee and Amerine, 1970) นอกจากนี้ในการหายใจแบบใช้ออกซิเจนเชื้อยีสต์ยังสร้าง และปลดปล่อยกรดต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายใน Krebs cycle ออกสู่น้ำหมัก เช่น succinic acid , fumalic acid , malic acid และ α-ketoglutaric acid เป็นต้น แต่กรดมาลิกจะถูกนำกลับไปใช้โดยเชื้อยีสต์ได้อีก (Amerine and Singleton, 1972) กรดต่างๆ เหล่านี้ทำให้ pH ของน้ำหมักลดลง เมื่อน้ำหมักมี pH เริ่มต้นต่ำ pH ในระหว่างการหมัก และ pH สุดท้ายของน้ำหมักก็จะต่ำด้วย ในระหว่างการหมักจะพยายามปรับให้น้ำหมักมี pH ที่เหมาะสม ให้ pH อยู่ในช่วงแคบๆ เพื่อให้การหมักมีประสิทธิภาพ ในช่วง pH 3.0 - 4.0 กรดทาร์ทาริกและกรดมาลิกจะทำให้น้ำหมักมีความเป็นบัฟเฟอร์ที่ดี มีการเปลี่ยนแปลง

pH ไม่มาก เมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่า pH ของไวน์มีค่าใกล้เคียงกัน (ประมาณ 3.0-3.5) เนื่องจากเกิด buffer capacity ขึ้นในระหว่างการหมัก (Amerine, Ough and Singleton, 1979) ปริมาณร้อยละความเป็นกรดจะมีความสำคัญต่อรสชาติของไวน์ที่ได้ ในระหว่างการหมักจะมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเพิ่มขึ้น และเมื่อร้อยละความเป็นกรดเริ่มต้นสูงหลังการหมักก็จะสูงด้วยเนื่องในระหว่างการหมักเชื้อยีสต์ปลดปล่อยกรดต่างๆ จาก Krebs cycle ออกสู่น้ำหมัก

3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของไวน์หม่อนระหว่างการหมักและการบ่ม

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการหมักไวน์หม่อน พบว่าปริมาณของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตซึ่งเป็นสารอาหารที่เป็นแหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ในการหมักไวน์หม่อน คือ 0.03 % โดยปริมาตร และระดับ pH เริ่มต้นของน้ำหมักที่เหมาะสมคือ อยู่ในช่วง 3.0-4.0 ปริมาณของสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนและระดับ pH เริ่มต้นของน้ำหมักที่เหมาะสมนี้ได้ถูกคัดเลือกเพื่อเป็นภาวะในการหมักไวน์และศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและกายภาพบางประการระหว่างการบ่ม และการยอมรับทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบ

3.1 การเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักไวน์หม่อน

ในระหว่างการหมักไวน์ได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมัก โดยวัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอลกอฮอล์ pH และความเป็นกรด (คิดในรูปกรดซิตริก) ดังแสดงในรูปที่ 4.17 และ 4.18 (ตารางที่ 4.20 และ 4.21) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงเหมือนกับการการทดลองในข้อที่ 2 คือระหว่างการหมัก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงในขณะที่ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อสิ้นสุดการหมักนั้นมีค่าสูงกว่า และปริมาณแอลกอฮอล์มีค่าต่ำกว่าในการทดลองที่ 2.2 เนื่องจากค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (°Brix) ของน้ำหมักซึ่งเตรียมทั้งหมดมีปริมาตรประมาณ 55 ลิตร มีค่าเท่ากับ 19.0 ซึ่งในการทดลองที่ 2.2 มีค่าเท่ากับ 20.0 เนื่องจากการเตรียมไวน์เพื่อการหมักในปริมาณมากได้วัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในขณะที่ร้อนแล้วจึงเติม KMS เพื่อการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีในน้ำหมักทิ้งไว้ประมาณ 15 ชั่วโมง ก่อนเติมกล้าเชื้อวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้อีกครั้งค่าที่ได้เป็น 19.0

3.2 การเปลี่ยนแปลงระหว่างการบ่มไวน์หม่อน

เมื่อสิ้นสุดการหมักโดยเชื้อยีสต์จะได้ไวน์ใหม่ซึ่งมีรสชาติจะยิ่งไม่กลมกล่อม ดังนั้นจึงมีการนำไวน์ใหม่มาผ่านกระบวนการต่อๆไป โดยการแยกเอากากออกจากไวน์ใหม่ เพราะในกากนี้จะมียีสต์ที่ตายแล้วเป็นจำนวนมาก ซึ่งยีสต์จะย่อยสลายตัวเองทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ต้องการและยังเป็นอาหารอย่างดีของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอีกด้วย ดังนั้นจึง siphon แยกไวน์ออกจากตะกอน

แล้วทำการบ่มในภาชนะที่ปิดสนิทภายใต้อุณหภูมิที่ควบคุม ขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์ให้ไวน์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงด้านเคมี เพิ่มความหอม เพื่อให้สารแขวนลอยบางชนิดตกตะกอนและเพื่อลดความฝาดของไวน์ (Amerine, Ough and Singleton. 1979)

ในกระบวนการหมักจะมี by-product ต่างๆ ถูกผลิตออกมามาก ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญในด้านกลิ่น รส และบอดี้ของไวน์ ยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการทำให้เกิดสารประกอบเหล่านี้ในปริมาณต่างๆ ทำให้ไวน์มีคุณภาพต่างกันไป ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบ ที่มีความสำคัญบางชนิดในไวน์คือ กรดทั้งหมด กรดระเหย กรดไม่ระเหย กลีเซอรอล อะเซทาลดีไฮด์ เอทธิลอะซีเดท ซึ่งเกิดจากการใช้น้ำตาลในการหมักโดยเชื้อยีสต์ นอกจากนี้ยังศึกษา ปริมาณฟีนอล ซึ่งจะขึ้นกับชนิดของผลไม้ที่ใช้ และมีผลต่อคุณภาพกลิ่น รสและสีของไวน์ (Reed and Nagowithana, 1991 , Amerine and Ough, 1974)

จากการทดลองในข้อ 2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักไวน์หม่อน พบว่าการเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเพื่อเป็นแหล่งของสารไนโตรเจนแก่เชื้อยีสต์ในปริมาณ 0.03% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และการปรับระดับ pH เริ่มต้นของน้ำหมักอยู่ในช่วง 3.0 - 4.0 จะให้ประสิทธิภาพที่ดีในการหมักโดยเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ดี เมื่อสิ้นสุดการหมักถ่ายไวน์ที่ได้ใส่ขวดใหม่เป็นการแยกเอาเซลล์ที่ตายแล้วของเชื้อยีสต์ออกจากไวน์ แล้วนำไปเก็บบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 15 ± 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ สุ่มตัวอย่างไวน์มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ และค่าสี L* a* b* ก่อนการหมัก สิ้นสุดการหมักและระหว่างการบ่มทุก 2 สัปดาห์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.19 - 4.28 (ตารางที่ 4.22 - 4.24)

การเปลี่ยนแปลงของกรดทั้งหมด กรดระเหย และกรดไม่ระเหยตามลำดับ ก่อนการหมัก หลังการหมัก และระหว่างการบ่ม การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดทั้งหมด(คิดในรูปกรดซิตริก) ก่อนการหมักมีค่าเท่ากับ 0.38 g/100ml แสดงในรูปที่ 4.19 - 4.21 จะมีค่าเพิ่มขึ้นหลังจากการหมักเป็น 0.44 g/100ml ในไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์พันธุ์ Burgundy และ 0.49 g/100ml ในไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Montrachet และเมื่อสิ้นสุดการบ่มมีค่าความเป็นกรดทั้งหมดเท่ากับ 0.65 g/100ml ในไวน์ที่ได้จากการหมักโดยยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งมีความแตกต่างจากก่อนการบ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$ และเชื้อยีสต์จะมีความแตกต่างกันในการสร้างปริมาณกรดทั้งหมด และกรดไม่ระเหยอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$ เนื่องจากในการเจริญของเชื้อยีสต์จะสร้างกรดต่างๆ ออกมาเป็นจำนวนมาก และเมื่อสิ้นสุดการหมัก citric acid จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาโดยตรงของยีสต์ที่มีต่อน้ำตาล (Amerine , Berg and Cruess, 1972) กรดระเหยเป็นกลุ่มของกรดไขมันที่มีความยาวสายสั้น และระเหยได้ด้วยไอน้ำ ซึ่งไม่นับพวก กรดแลคติก กรดซัคซินิก carbonic acid และ sulfurous กรดในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่คือ กรดแอซีติก และส่วนน้อยเป็น

propionic acid และ butyric acid ปริมาณของกรดแอซีติกที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักจะมีเล็กน้อย ปกติจะไม่เกิน 0.03 g/ 100 ml ถ้ามีปริมาณมากจะเป็นการบ่งชี้ถึงการเสื่อมเสียของไวน์จากพวก acetic acid bacteria โดยเฉพาะ *Acetobacter aceti* ในก่อน ระหว่าง และหลังการหมักกรดระเหยจะเพิ่มขึ้น โดยเกิดจากการทำงานของแบคทีเรีย หรือการออกซิเดชั่นของแอลกอฮอล์ (Amerine, Ough and Singleton, 1979)

$$C_2H_5OH + 1/2\ O_2 \longrightarrow CH_3CHO + H_2O$$

$$CH_3CHO + 1/2\ O_2 \longrightarrow CH_3COOH \text{ (acetic acid)} \quad \text{(Vine, 1981)}$$

ในไวน์ที่มีอายุมากค่าของกรดระเหยจะสูงกว่าในไวน์ที่มีอายุน้อย US Federal กำหนดค่าของกรดระเหยในไวน์แดงไม่เกิน 0.140 g/100 ml (Amerine and Ough, 1974)

กรดที่มีมากในไวน์คือกรดไม่ระเหยซึ่งคำนวณได้จากการนำค่ากรดทั้งหมดลบด้วยปริมาณกรดระเหย ซึ่งมีความสำคัญต่อไวน์คือ ให้รสชาติกรด(เปรี้ยว) ผลต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย สีของไวน์ และเป็นแหล่ง hydrogen ion-catalysis เนื่องจากไวน์ที่มีปริมาณกรดไม่ระเหยสูงจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ยาก และในไวน์แดงสารที่ให้สีแก่ไวน์แดงคือสารแอนโธไซยานิน ซึ่งจะมีรูปแบบที่มีสีแดงเมื่ออยู่ในสารละลายที่มี pH เป็นกรด กรดหลักในกลุ่มนี้คือกรดทาร์ทาริก กรดซิตริก และ กรดมาลิก โดยเฉพาะกรดทาร์ทาริกและกรดมาลิก จะเป็นบัฟเฟอร์ของไวน์ที่ระดับ pH 3 - 4 (Amerine, Ough and Singleton, 1979) ในระหว่างการหมักจะมีการใช้กรดมาลิก และกรดซิตริกโดยเชื้อยีสต์ซึ่งการเจริญของยีสต์จะสร้างและปลดปล่อยกรดต่างๆออกมาในปริมาณมาก ส่วนกรดมาลิก และกรดซิตริก จะถูกดึงกลับไปใช้ในกระบวนการเมทาโบลิซึมภายในเซลล์ได้อีก ส่วนกรดทาร์ทาริกจะตกตะกอนในรูปของกรดเกลือโดย potassium bitartrate (cream of tartar) ทำให้ความด่วงจำเพาะของน้ำหมักลดลงในระหว่างการหมัก และเกิดการตกตะกอนเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่ำ (Vine, 1981) หลังการหมักกรดไม่ระเหยจะมีประโยชน์ ในการจำกัดปฏิกิริยาการทำลายกรดโดยจุลินทรีย์ และการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างกรดระเหย (Amerine and Ough, 1974) จากผลการทดลองไวน์หมอนหลังการหมักจะมีค่ากรดระเหย(คิดในรูปกรดอะซีติก) 0.03 g/ 100 ml (รูปที่ 4.20) และหลังการบ่มค่าของกรดทั้งหมด กรดระเหย และกรดไม่ระเหยมีค่าสูงขึ้น หลังการบ่มมีค่ากรดระเหยเท่ากับ 0.05 g/100ml และกรดไม่ระเหยเท่ากับ 0.65 g/100ml (รูปที่ 4.21) แสดงว่าไวน์หมอนที่ได้ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างกรดอะซีติก

เอสเทอร์เป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสที่สำคัญในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เกิดจากกิจกรรมของเชื้อยีสต์หรือแบคทีเรีย โดยการทำงานของเอนไซม์ esterase ในไวน์ใหม่จะเกิดปฏิกิริยา hydrogen ion catalyzed esterification และ transesterification อย่างช้าๆ (Amerine, Ough and

Singleton, 1979) ปริมาณของเอสเทอร์จะขึ้นกับ ชนิดของยีสต์ การเจริญของยีสต์ ภาวะในการหมัก และปริมาณแอลกอฮอล์ สารที่สำคัญในกลุ่มเอสเทอร์คือ เอทธิลอะซิเตท (Berry, 1995) ปริมาณของเอทธิลอะซิเตทที่ต่ำกว่า 200 mg/L จะให้กลิ่นที่น่าพอใจ ถ้ามีในปริมาณที่สูงกว่านี้และในภาวะที่มีกรดระเหยสูงจะให้กลิ่นที่ไม่ดีแก่ไวน์ (spoiled character) ปริมาณที่พบในไวน์ธรรมดาอยู่ระหว่าง 200 - 400 mg/L (Amerine , Berg and Cruess, 1972) ในระหว่างการบ่มปริมาณของเอสเทอร์จะเพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาesterificationของกรดและแอลกอฮอล์ การวิเคราะห์ปริมาณเอธิลอะซีเตทจะใช้การไฮโดรไลซ์เอสเทอร์ด้วยด่างและไตเตรทด่างส่วนที่เหลือด้วยกรด (Amerine and Ough. 1974) ในการหมักไวน์หม่อน ปริมาณของเอทธิลอะซิเตท (รูปที่ 4.23)จะเพิ่มขึ้นมีค่าประมาณ 36 mg/L เมื่อผ่านการบ่มนาน 8 สัปดาห์ในไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Burgundy จะมีปริมาณของเอธิลอะซีเตท 292 mg/L ส่วนไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Montrachet จะมีค่าเท่ากับ 378.4 mg/L ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ค่าที่ได้ยังอยู่ในเกณฑ์ของปริมาณเอธิลอะซีเตทที่พบได้ในไวน์ธรรมดาทั่วไปคือ 200-400 mg/L (Amerine and Ough, 1974)

อัลดีไฮด์เป็นสารพวก carbonyl compounds เป็นผลพลอยได้จากการหมักแอลกอฮอล์ มีผลต่อทางประสาทสัมผัสเล็กน้อยเป็นสารที่ให้กลิ่น แต่มีความสำคัญต่อการพัฒนากลิ่นรสของไวน์ เนื่องจากเป็น intermediates ในการสร้างสารพวก higher alcohol (Berry, 1995) ปริมาณของอะเซทาลดีไฮด์จะขึ้นกับอุณหภูมิในการหมัก ถ้ามีอุณหภูมิสูงและมีการให้อากาศจะมีค่าสูงขึ้นเนื่องจากเอธิลแอลกอฮอล์ ทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับออกซิเจนในอากาศ หรือเกิดจากactivity ของ film yeast ดังนั้นจึงเป็นตัวบ่งชี้การเกิดออกซิเดชั่นของไวน์ ทำให้เกิด off-flavor (Vine, 1981)

$$C_2H_5OH + 1/2\ O_2 \text{ .....} > CH_3CHO \text{ (acetaldehyde)} + H_2O$$

การหาปริมาณของอะเซทาลดีไฮด์ ทำโดยการไตเตรทกับไอโอดีน โดยนำตัวอย่างไวน์ไปกลั่นในสารละลายไบซัลไฟท์ที่เป็นกลาง ส่วนของไบซัลไฟท์ที่มีมากเกินไปจะถูกไตเตรทที่ pH 2.0 ซึ่งส่วนของ acetaldehyde-bisulfite complex จะไม่ทำปฏิกิริยาที่ pH นี้ จากนั้นปรับ pH เป็น 9.0 ส่วนของไบซัลไฟท์จะถูกปลดปล่อยออกมา และหาปริมาณโดยการไตเตรทกับไอโอดีน ในไวน์ไหม่ควรมีปริมาณอัลดีไฮด์ต่ำกว่า 75 mg/ 100 ml และไวน์ทั่วไปจะมีค่าเฉลี่ยอยู่ประมาณ 30 - 544 mg/ 100 ml (Amerine and Ough. 1974) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณอะเซทาลดีไฮด์แสดงในรูปที่ 4.24 ไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์เมื่อสิ้นสุดการหมักมีอะเซทาลดีไฮด์เท่ากับ 30.5 mg/Lในไวน์หม่อนจากเชื้อ Burgundy และในไวน์หม่อนจากเชื้อ Montrachet เท่ากับ

25.5 mg/L ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และระยะเวลาในการบ่มทำให้ปริมาณของอะเซทาลดีไฮด์มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($p \leq 0.05$) โดยไวน์หมอนที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Burgundy เมื่อบ่มนาน 8 สัปดาห์ จะมีค่าของอะเซทาลดีไฮด์ 135.4 mg/L ซึ่งสูงกว่าไวน์หมอนที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Montrachet ซึ่งมีปริมาณอะเซทาลดีไฮด์ เท่ากับ 95.30 mg/L

กลีเซอรอลเป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม polyalcohol เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของคาร์โบไฮเดรต โดยเชื้อยีสต์ ซึ่งปริมาณของกลีเซอรอลที่เกิดจะขึ้นกับ ความเข้มข้นของน้ำตาล pH อุณหภูมิในการหมัก สายพันธุ์ของยีสต์ และปริมาณออกซิเจน กลีเซอรอลเป็นสารที่ให้รสหวาน มีความรู้สึกคล้ายน้ำมัน (oiliness) มีผลต่อบอดี้ของไวน์ ไวน์ที่มีปริมาณกลีเซอรอลสูงจะแสดงว่ามีคุณภาพดี การทดลองนี้ได้ใช้วิธีการระเหยและชั่งหาน้ำหนักโดยตรงในการวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล ค่าเฉลี่ยส่วนใหญ่ในไวน์จะอยู่ในช่วง 0.11 - 2.60 g/ 100 ml (ตารางที่ ก.4) ในระหว่างการหมักกลีเซอรอลเกิดจากการ reduction ของ dihydroxyacetone phosphate และปล่อย NAD^+ ออกมาเพื่อให้ acetaldehyde อย่างเพียงพอ กลีเซอรอลจะเกิดขึ้นมากในระยะของการหมัก และเพิ่มมากขึ้นถ้าอยู่ในสภาวะที่มี osmotic strengthสูง อุณหภูมิต่ำ ปริมาณกรดทาร์ทาริกสูง และมีการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ส่วนการเพิ่มปริมาณน้ำตาลจะลดการสร้างกลีเซอรอล จากการหมักและบ่มไวน์หมอน ไวน์หมอนที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อสายพันธุ์ Montrachet จะให้ปริมาณของกลีเซอรอลที่สูงกว่าไวน์หมอนที่ได้จากหมักด้วยเชื้อ Burgundy อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และระยะเวลาในการหมักและการบ่มทำให้ปริมาณของกลีเซอรอลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เช่นกัน เมื่อสิ้นสุดการบ่ม 8 สัปดาห์ไวน์หมอนที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อสายพันธุ์ Montrachet มีปริมาณกลีเซอรอล 0.69 g/100ml ไวน์หมอนที่ได้จากหมักด้วยเชื้อ Burgundy มีปริมาณกลีเซอรอล 0.54 g/100ml (รูปที่ 4.22) (Amerine and Ough, 1974) เมื่อเทียบกับไวน์ทั่วไปแล้วไวน์หมอนที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีปริมาณของกลีเซอรอลอยู่ในช่วงเดียวกัน

ในระหว่างการบ่ม ปริมาณของกรดทั้งหมด กรดระเหย กรดไม่ระเหย กลีเซอรอล เอทธิลอะซิเตท และอะเซทาลดีไฮด์ควรมีค่าลดลงระหว่างการบ่มแต่กลับมีค่าเพิ่มขึ้น (Amerine, Ough and Singleton, 1979) เนื่องจากการ siphon ไวน์ใส่ขวดใหม่ยังคงมีเชื้อยีสต์อยู่ในไวน์เมื่อทำการเก็บที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เชื้อยีสต์ยังสามารถเจริญเติบโตได้แต่เป็นไปอย่างช้าๆ เชื้อยีสต์จะตกตะกอนลงมาที่ก้นขวดเนื่องจากการเก็บบ่มที่อุณหภูมิเย็น และเกิดการ autolysis ของเซลล์ยีสต์ ทำให้สารภายในเซลยีสต์ถูกปลดปล่อยออกสู่ในไวน์ ที่สำคัญคือการปลดปล่อยพวกกรดอะมิโน ซึ่งมีรายงานว่าในระหว่างการบ่ม sparkling wine จะมีการปลดปล่อยกรดอะมิโนบางชนิดสู่ไวน์ และมีกรดอะมิโนถึง 17 ชนิดในการบ่ม sparkling wine ที่ทำการหมักในขวดและที่ทำ

การหมักในถังหมัก กรดอะมิโนตัวที่พบในปริมาณมากที่สุดคือ Lysine ซึ่งสารเหล่านี้จะมีผลต่อกลิ่นรสของไวน์ และอาจเป็นทำให้เกิดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆที่ไม่ต้องการในไวน์ (Kunkee and Amerine, 1970) แต่เมื่อเทียบกับเกณฑ์ที่นัก enologist กำหนดและตรวจตัวอย่างไวน์ พบว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในไวน์หมอนระหว่างการบ่ม อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของไวน์ทั่วไปที่ผลิตในอเมริกาและแถบทวีปยุโรป

ผลไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมน้ำหมักจะมีสารฟีนอล ซึ่งไม่ได้เกิดจากการทำงานของเชื้อยีสต์ สารฟีนอลจะรวมพวก flavanoid , tannin และรงควัตถุ ในการตรวจหาจะคำนวณในรูปของ gallic acid ค่าที่ตรวจวัดได้จะน้อยกว่าค่าจริงที่มีในผลไม้ เนื่องจากการสกัดที่ไม่สมบูรณ์ในการนำมาผลิตเป็นไวน์ ความสำคัญของฟีนอลคือ ให้สีแก่ไวน์ รสชาติ (astringent) กลิ่น (pungent odors) เป็นแหล่งของ oxygen reduction และเป็นแหล่งของสารตั้งต้นของการเกิดสีน้ำตาลโดยเอนไซม์ phenol oxidase ซึ่งจะถูกยับยั้งการทำงานโดยการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ลงไปในน้ำหมัก การบ่มจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของฟีนอล โดยการเกิด oxidation , polymerization , precipitation การตกตะกอนของ tannin บางตัวโดยโปรตีน การดูดซับสารฟีนอลของเซลยีสต์ นอกจากนี้แอนโธไซยานินซึ่งเป็นสารที่มาความสำคัญต่อสีในไวน์แดงยังสามารถถูกออกซิไดส์ได้ด้วยเอนไซม์ laccase จากเชื้อยีสต์ ซึ่งซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์นี้ได้ และเอนไซม์ laccase มี activity ต่อสารตั้งต้นมากกว่าเอนไซม์ phenol oxidase ทำให้สูญเสียแอนโธไซยานินไปในระหว่างการหมักไวน์ (Amerine and Ough, 1984) จากรูปที่ 4.25 ปริมาณของฟีนอลจะลดลงอย่างมากในระหว่างการหมัก และจะมีค่าลดลงอย่างช้าๆ ระหว่างการบ่ม ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในการบ่มไวน์โดยทั่วไปปริมาณของฟีนอลจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากผู้ผลิตมักหมักไวน์ในถังไม้โอ๊คหรือปิดจุกขวดด้วยไม้คอร์ก ซึ่งไวน์จะสัมผัสกับเนื้อไม้โดยตรงทำให้สารพวกฟีนอลเช่น แทนนิน ในไวน์มีปริมาณเพิ่มขึ้น (Kunkee and Amerine, 1970) การเปลี่ยนแปลงของฟีนอลจะมีผลต่อค่าสีของไวน์ (Skrede, 1985) ซึ่งแสดงออกมาในค่า L* แสดงค่า ความสว่าง (lightness) a* แสดงค่าสีแดง (redness) และ b* แสดงค่าสีเหลือง (yellowness) การเปลี่ยนแปลงของค่า L* a* และb* แสดงในรูปที่ 4.26-4.28 (ตารางที่ 4.23 และ 4.24) จากการวิเคราะห์ทางสถิติของค่า L* a* และ b* จะมีความแตกต่างกันในช่วงก่อนการหมักน้ำหมักมีค่า L* เท่ากับ 1.95 a* เท่ากับ +23.69 และ b* เท่ากับ +2.86 เมื่อสิ้นสุดการหมักไวน์หมอนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Burgundy มีค่า L* เท่ากับ 12.41 a* เท่ากับ +43.90 และ b* เท่ากับ +20.13 ส่วนไวน์หมอนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Montrachet มีค่า L* เท่ากับ 18.73 a* เท่ากับ +53.81 และ b* เท่ากับ +30.69 และในระหว่างการบ่มมีค่าสูงขึ้น ซึ่งการบ่มในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 จะไม่ความแตกต่างของค่าสี L* a* และb* เมื่อผ่านการหมัก ค่า L* มีค่าเพิ่มขึ้นแสดงถึงความสว่างของไวน์

ซึ่งสัมพันธ์ค่าของฟีนอลที่ลดลงในระหว่างการหมัก เนื่องจากการตกตะกอนของพวกสารประกอบฟีนอลิก ส่วนค่า a* มีค่าเพิ่มขึ้นเช่นกันเนื่องจากรงควัตถุที่สำคัญในไวน์แดงคือ anthocyanin จะมีอยู่ในรูปสีแดงเมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นกรด ซึ่งจากการหมักทำให้มีปริมาณกรดเพิ่มขึ้น ส่วนค่า b*ที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงการเกิดสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นในไวน์จากสารในพวกฟีนอล ซึ่งควรจะหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และทำการกรองไวน์เพื่อเอาเซลล์ยีสต์ออก (Cole and Noble, 1995 ; Amerine and Ough, 1974)

ระหว่างช่วงการ maturation ของไวน์แดง ตั้งแต่สิ้นสุดการทำไวน์จนกระทั่งบรรจุขวด ออกซิเจนจะกระตุ้นการเปลี่ยนรูปทางเคมีของรงควัตถุที่สำคัญต่อการบ่ม การเกิด autoxidation ของ ethanol จะทำให้เกิดacetaldehyde เล็กน้อย และมี phenolic compound อยู่ ซึ่ง acetaldehyde จะกระตุ้นการเกิด copolymerization ของ anthocyanin และ tannin ในรูป condensed form ทำให้ anthocyanin จะมีสีแดงมากขึ้นกว่าในรูปอิสระ และเมื่อเกิดการ condensationถึงระดับหนึ่ง จะเกิดการตกตะกอนของพวกที่มีโมเลกุลใหญ่ และทำให้สีลดลง เป็นการอธิบายได้ว่าในระหว่างการบ่มนั้นจะมีค่าสีของไวน์เพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณของแอนโธไซยานินลดลง (Pascal, Paul and Yves, 1983)

นอกจากนี้ค่าสีของไวน์ยังขึ้นกับความเป็นกรดในไวน์อีกด้วย Jackson,Timberlake,Bridle and Vallis (1978) ได้เสนอการเปลี่ยนแปลง anthocyanin equilibria ในภาวะความเป็นกรดของไวน์ ในระหว่างการบ่มจะเกิด polymeric pigment มีสีและทนต่อ bisulphite ถ้า pH เพิ่มขึ้นจะได้ polymeric pigment ซึ่งไม่สี แสดงว่าไวน์ที่ pH ต่ำจะมีการ polymerization ทำให้สูญเสีย anthocyanin อิสระ ไวน์ที่ pH ต่ำจะเกิดการ polymerization ทำให้มี anthocyanin อิสระน้อยลง แต่เกิด polymeric pigment ที่มีสีและทนต่อการฟอกสีของ bisulfite จึงควรใช้ SO_2 กับไวน์ที่ pH ต่ำ ซึ่ง SO_2 จะทำให้เกิดการฟอกสีอย่างรุนแรง และเกิด browning น้อยลงในไวน์ที่ pH สูง การเก็บไวน์ที่อุณหภูมิต่ำจะเกิด browning น้อยลงในไวน์ที่ pH สูง การเก็บไวน์ที่อุณหภูมิสูงจะเกิด browning อย่างมากและสูญเสีย anthocyanin ระหว่างการเก็บ ไวน์ที่เก็บ 20°C จะเป็นที่ยอมรับหลังการเก็บ 9 เดือน สำหรับการใช้ SO_2 ใน การเก็บไวน์จะต้องอยู่ภายใต้การควบคุมในระดับที่ป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ ถ้าใช้มากเกินไปจะมีผลทางประสาทสัมผัสในการชิมไวน์

การบ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบที่ให้กลิ่นรสแก่ไวน์มากขึ้นเนื่องจากการทำงานของเชื้อยีสต์ที่ยังมีอยู่ในไวน์และสามารถสร้างสารต่างๆ เช่น อะเซทาลดีไฮด์ กลีเซอรอล และเอธิลอะซีเตทได้ เมื่อสิ้นสุดการหมักไวน์หม่อนด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Montrachet จะมีปริมาณสารที่ให้กลิ่นรสแก่ไวน์สูงกว่าไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Burgundy อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่วนอะเซทาลดีไฮด์จะสร้างมากในไวน์

หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Burgundy การเกิดสารประกอบเหล่านี้ขึ้นกับการทำงานของเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์ และจากผลทางประสาทสัมผัสทำให้เชื้อยีสต์สายพันธุ์ Montrachet มีความเหมาะสมในการหมักไวน์หม่อน การบ่มไวน์หม่อนนาน 8 สัปดาห์มีการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบที่มีผลต่อกลิ่นรส และลักษณะทางกายภาพของไวน์หม่อน (ค่า L* a* b*) ในแนวโน้มที่มีค่าสูงขึ้น ถ้าทำการบ่มต่อไปจะทำให้เกิดการสูญเสียกลิ่นรสที่เป็นลักษณะเฉพาะของผลหม่อนไป และเกิดการปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการ เช่นการเกิด off-flavor หรือการเกิดสีน้ำตาลขึ้นในไวน์ ดังนั้นการบ่มไวน์หม่อนจึงสิ้นสุดที่สัปดาห์ที่ 8 (Rose, 1977) ถ้าบ่มนานมากกว่านี้จะทำให้เสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น และอาจทำให้สารที่มีกลิ่นรสไม่ดีเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้ไวน์ที่ได้ด้อยคุณภาพลงไป

3.3 การประเมินผลทางประสาทสัมผัส

เมื่อเปรียบเทียบการเกิดองค์ประกอบทางเคมีที่มีผลต่อกลิ่นรสของไวน์หม่อนของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ เชื้อ Montrachet จะมีการสร้างสารประกอบที่ให้กลิ่นรสในปริมาณที่มากกว่าเชื้อ Burgundy ทำให้ไวน์หม่อนที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อ Montrachet มีคุณภาพที่ดีกว่าจากการวิเคราะห์ทางเคมี ดังนั้นจึงได้นำไวน์หม่อนที่บ่มนาน 8 สัปดาห์ มาทำการแยกตะกอนออก และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยการเติม KMS 100 ppm แล้วนำไปให้ผู้ทดสอบที่มีความคุ้นเคยกับผลิตภัณฑ์ทดสอบผลิตภัณฑ์ ซึ่งผู้ทดสอบเป็นชายและหญิงอายุประมาณ 20-40 ปี จำนวน 10 คน ผู้ทดสอบที่ได้นี้มาจากการสัมภาษณ์โดยตรง จะต้องเป็นผู้ที่ดื่มไวน์ไม่ต่ำกว่า 2 ปี และนิยมบริโภคไวน์อย่างน้อยเดือนละ 1 ครั้ง ผู้ทดสอบทุกคนจะได้รับคำแนะนำเกี่ยวกับการชิมไวน์ก่อนการประเมินผลไวน์หม่อนที่ได้ผ่านการบ่ม 8 สัปดาห์

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัส (ตารางที่ 4.25) ผู้ทดสอบให้ความยอมรับไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Montrachet ในทางด้านรส และคะแนนรวม โดยมีคะแนนรส 19.0 คะแนนรวม 68.1 สูงกว่าไวน์หม่อนที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Burgundy อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Burgundy ซึ่งมีคะแนนรส 14.6 และความชอบรวม 61.0 ส่วนลักษณะความใส สี กลิ่น และบอดี้ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เนื่องจากรสของไวน์หม่อนที่ได้จากเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Burgundy จะมีปริมาณของแอลกอฮอล์น้อยกว่า มีปริมาณของน้ำตาลเหลืออยู่สูงกว่าทำให้ไวน์ที่ได้มีความหวานกว่าไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Montrachet แต่การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไวน์หม่อนที่ผ่านการบ่มนาน 8 สัปดาห์จะมีปริมาณของอะเซทาลดีไฮด์ในไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์ Burgundy สูงกว่าไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อ Montrachet และมีปริมาณของเอสเทอร์ต่ำกว่า อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งสารทั้ง 2 ตัวนี้เป็นที่มีความสำคัญต่อกลิ่นของไวน์แต่ผู้ทดสอบไม่สามารถแยกได้ เนื่องจากผลหม่อนจะมีกลิ่นเฉพาะซึ่งมีความแรงมากทำให้ผู้

ทดสอบไม่สามารถได้กลิ่นของเอสเทอร์ หรืออะเซทาลดีไฮด์ที่มีในไวน์หม่อนได้ ค่าสี L* a* และ b* ในไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อ Montrachet มีค่าสูงกว่าไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อ Burgundy อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ซึ่งผู้ทดสอบให้คะแนนไม่แตกต่างกันแสดงว่าผู้ทดสอบไม่สามารถแยกความแตกต่างทางด้านสีของไวน์หม่อนได้ เนื่องจากผู้ทดสอบเป็นกลุ่มของผู้บริโภคไม่ได้ผ่านการฝึกฝน แต่คะแนนทางด้านสีผู้ทดสอบให้คะแนนการยอมรับที่ดี จากคะแนนรวมที่ผู้ทดสอบให้คะแนนแก่ไวน์หม่อน และการประเมินไวน์หม่อนโดยใช้คะแนนเต็ม 20คะแนน ควบคู่กับการใช้คะแนนเต็ม 100คะแนน ไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Burgundy มีคะแนนรวม 11.7 จัดเป็นไวน์ที่ยอมรับโดยผู้บริโภค มีdefectบ้างเล็กน้อย และไวน์หม่อนที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Montrachet มีคะแนนรวม 13.8 จัดเป็นไวน์มาตรฐาน และไม่มี defectใดๆ (Amerine, Ough and Singleton, 1979 ; Vine, 1970)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย