อิทธิพลของวิธีการหมักและชนิดของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีของไวน์สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย *Ananas comosus* (L.) Merr ‘Smooth Cayenne’

นางสาวกนกวรรณ ทองแม้น

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
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INFLUENCE OF FERMENTATION METHODS AND TYPES OF LACTIC ACID BACTERIA STARTER ON PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF PINEAPPLE *Ananas comosus* (L.) Merr 'Smooth Cayenne' WINES

Miss Kanokwan Tongman

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	อิทธิพลของวิธีการหมักและชนิดของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีของไวน์สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย *Ananas comosus* (L.) Merr 'Smooth Cayenne'
โดย	นางสาวกนกวรรณ ทองแม้น
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาวินี ดีแท้

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรภา คงเป็นสุข)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาวินี ดีแท้)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิรัชรา เลาหประสิทธิ์)

กนกวรรณ ทองแม้น : อิทธิพลของวิธีการหมักและชนิดของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีของไวน์สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย *Ananas comosus* (L.) Merr 'Smooth Cayenne' (INFLUENCE OF FERMENTATION METHODS AND TYPES OF LACTIC ACID BACTERIA STARTER ON PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF PINEAPPLE *Ananas comosus* (L.) Merr 'Smooth Cayenne' WINES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.ภาวินี ดีแท้, หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของวิธีการหมักและชนิดของแบคทีเรียแลกติกต่อสมบัติทางกายภาพ เคมีของไวน์สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย โดยเปรียบเทียบวิธีการหมักน้ำสับปะรดแบบสองขั้นตอน (2F) และแบบขั้นตอนเดียว (1F) ในการหมักแบบ 2F ทำโดยหมักน้ำสับปะรดสดครบส่วนที่หมักด้วยออโตโคนัสยีสต์ *Hanseniaspora psuedoguilliermondii* และ *Saccharomycodes ludwigii* ที่แยกได้จากน้ำสับปะรดหมักธรรมชาติ แล้วจึงลดความเปรี้ยวของไวน์โดยการหมักด้วยแบคทีเรียแลกติก (LAB) สายพันธุ์ทางการค้าและออโตโคนัสไอโซเลทั้งในรูปแบบกล้าเชื้อเดี่ยว ได้แก่ *Oenococcus oeni* Enoferm® ALPHA, *Lactobacillus brevis* และ *L. plantarum* และกล้าเชื้อผสมระหว่าง *O. oeni* Enoferm® ALPHA กับ *L.brevis* และ *O. oeni* Enoferm® ALPHA กับ *L. plantarum* โดยไวน์มีค่าเริ่มต้น คือ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 3.68 ± 0.01, ปริมาณแอลกอฮอล์ 12.80 ± 0.22 % (v/v), ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (TTA) 0.39 ± 0.00 % (w/v) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TSS) 7.60 ± 0.00 และน้ำตาลรีดิวซ์ (RS) 13.84 ± 0.00 mg/ml มีชนิดและปริมาณกรดหลักคือ กรดซิตริก 4.03 ± 0.09 g/l กรดมาลิก 1.70 ± 0.02 g/l และกรดซัคซินิค 0.32 ± 0.01 g/l เมื่อลดความเปรี้ยวของไวน์โดยหมักด้วย LAB ที่อุณหภูมิประมาณ 25-30 °C เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ค่า pH และ TTA ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ RS ที่เหลืออยู่ในไวน์ที่หมักด้วยกล้าเชื้อผสมทั้ง *L. brevis* กับ *O. oeni* และ *L. plantarum* กับ *O. oeni* มีปริมาณสูงกว่าการหมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว ส่วนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรด พบว่า การหมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum* กรดซิตริกและกรดมาลิกจะลดลงมากที่สุด กล่าวคือ เหลือเพียง 3.0 และ 0.7 g/l ตามลำดับ และตรวจพบกรดแลกติกในไวน์นี้มากที่สุด คือ 1.8 g/l ในการหมักแบบ 1F ทำโดยหมักน้ำสับปะรดแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ทั้งสองชนิดพร้อมกับแบคทีเรียแลกติกกล้าเชื้อเดี่ยวของแต่ละชนิด โดยหมักเป็นเวลา 13 วัน ซึ่งเป็นวันที่ยีสต์สร้างแอลกอฮอล์ถึง 12 % พบว่า ไวน์ที่หมักด้วย *O. oeni* จะมีค่า pH ที่สูงที่สุด และค่า TTA ที่ต่ำที่สุด และในไวน์ตัวอย่างนี้จะมีปริมาณกรดซิตริกเหลืออยู่มากที่สุด (0.8 g/l) ส่วนกรดมาลิกมีปริมาณเหลือน้อยที่สุด (1.0 g/l) และพบกรดแลกติกประมาณ 1 g/l การหมักด้วย *L. brevis* และ *L. plantarum* มีค่า pH ลดต่ำลงถึง 3.4 ไวน์ที่ได้จะมีกรดซิตริกเหลือน้อยที่สุด คือ ประมาณ 0.5 g/l แต่มีกรดมาลิกเหลือมากที่สุด คือ อยู่ในช่วง 2 ถึง 3 g/l ตามลำดับ และมีกรดแลกติกเกิดขึ้นเพียงประมาณ 1 g/l เมื่อเปรียบเทียบคุณลักษณะของไวน์ที่ได้จากการหมักแบบแบบ 2F และแบบ 1F พบว่า ไวน์ที่ได้จากการหมักแบบ 1F มีค่า pH ต่ำกว่าและค่า TTA สูงกว่าการหมักแบบแบบ 2F อย่างมีนัยสำคัญ และปริมาณ RS ที่เหลืออยู่มีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณารูปแบบกรด พบว่า การหมักแบบ 1F ไวน์ที่มีกรดซิตริกคงเหลืออยู่ในน้ำหมักน้อยกว่าการหมักแบบแบบ 2F อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่กรดมาลิกที่คงเหลือมีแนวโน้มสูงกว่าการหมักแบบแบบ 2F กรดแลกติกที่สร้างขึ้นในระหว่างการหมักมีปริมาณสูงกว่าที่พบในการหมักแบบ 2F ยกเว้นการหมักแบบ 2F ด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum* เมื่อนำไวน์มาแยกความแตกต่างคุณสมบัติทางประสาทสัมผัส Triangle test พบว่า ไวน์ที่มีสมบัติต่างกัน คือ ไวน์ที่หมักแบบ 2F ด้วยกล้าเชื้อผสม *L. brevis* กับ *O. oeni*, กล้าเชื้อเดี่ยว *L. brevis*, กล้าเชื้อผสม *L. plantarum* กับ *O. oeni*, กล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum* และการหมักแบบ 1F ด้วย *O. oeni* และเมื่อนำมาทดสอบความชอบ Hedonic Scale 9 จุด พบว่า ไวน์สับปะรดที่ได้รับคะแนนความชอบด้านสีมากที่สุด คือ ไวน์ที่หมักแบบ 2F ด้วยกล้าเชื้อผสม *L. brevis* กับ *O. oeni* ด้วยคะแนน 6.17 คะแนน ซึ่งเป็นไวน์ที่ได้รับคะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏสูงที่สุด (6.57) ส่วนไวน์ที่รับคะแนนความชอบด้านกลิ่นมากที่สุด คือ ไวน์ที่หมักแบบ 1F ด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *O. oeni* (6.41) เมื่อพิจารณาความชอบด้านกลิ่นรสโดยรวม พบว่าไวน์ที่หมักแบบ 2F ด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. brevis* และกล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum* ได้รับการยอมรับมากที่สุดด้วยคะแนนประมาณ 5.8 และจากผลการประเมินความชอบโดยรวม พบว่า ไวน์ที่ได้รับคะแนนความชอบโดยรวมมากที่สุด เป็นชนิดเดียวกับไวน์ที่ได้รับคะแนนความชอบด้านกลิ่นรสสูงที่สุด ผลการทดสอบความพอดี พบว่า ไวน์สับปะรดที่ได้จากการหมักทุกรูปแบบไม่มีความพอดีในด้านรสหวาน รสเปรี้ยว ความฝาด รสขม และความแรงของแอลกอฮอล์

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5471904823 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY
KEYWORDS: ไวน์สับปะรด / การลดความเป็นกรด / แบคทีเรียแลกติก

KANOKWAN TONGMAN: INFLUENCE OF FERMENTATION METHODS AND TYPES OF LACTIC ACID BACTERIA STARTER ON PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF PINEAPPLE *Ananas comosus* (L.) Merr 'Smooth Cayenne' WINES. ADVISOR: ASSOC. PROF. CHEUNJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. PAWINEE DEETAE, Ph.D., pp.

The purpose of this study was to investigate the influence of fermentation methods including one-step and two-steps fermentations and types of lactic acid bacteria (LAB) on physico-chemical properties of *Ananas comosus* (L.) Merr 'smooth cayenne' pineapple wine. For two-steps fermentation (2F), the fresh whole pineapple juice was firstly fermented by both *Hanseniaspora psuedoguilliermondii* and *Saccharomycodes ludwigii*, autochthonous yeasts isolates from natural fermented pineapple juices for 20 days. The fermented wine was then de-acidified by using commercial and/or autochthonous LAB with a single (*Oenococcus oeni* Enoferm® ALPHA, *Lactobacillus brevis* and *L. plantarum*) or a mixture of starters (*O. oeni* Enoferm® ALPHA + *L. brevis,* and *O. oeni* Enoferm® ALPHA + *L. plantarum*). Our results show that the fermented wine by yeasts contained 12.80 ± 0.22 % (v/v) of alcohol, 0.39 ± 0.00 % (w/v) of total titratable acidity (TAA, as citric acid), 7.60 ± 0.00 total soluble solid (TSS) and 13.84 ± 0.00 mg/ml of reducing sugar (RS) with pH 3.68 ± 0.01. Its major acid types were citric acid 4.03 ± 0.09 g/l, malic acid 1.70 ± 0.02 g/l and succinic acid 0.32 ± 0.01 g/l, respectively. After de-acidification by various LAB types at 25-30°C for 6 weeks, the pH and TTA values of these wines were not significantly different. In contrast, the RS content of the wines de-acidified by LAB mixtures were significant higher than those of single one. Considering acid profiles in de-acidified wines studied, the sample inoculated with *L. plantarum* had the lowest citric acid and malic acid but the highest lactic acid contents amount of 3.0, 0.7 g/l and 1.8 g/l, respectively. For one step fermentation (1F), the pineapple juices were fermented with a mixture of yeasts and each LAB for 13 days or until alcohol content reached to 12 % (v/v). Our results show that the wine de-acidified by *O. oeni* had the highest pH and the lowest TTA values among the de-acidified wines studied. This sample contained the minimum content of citric acid (0.8 g/l) and the maximum content of malic acid (1.0 g/l). The wine de-acidified with *L. brevis* and *L. plantarum* had low pH value (~3.4) with citric acid 0.5 g/l , malic acid 2-3 g/l and lactic acid contents 1 g/l. Comparing properties of wines obtained from 2F and 1F step, the wines from 1F had significantly lower pH and higher TTA values than the others. Besides, RS content was significantly low. Considering acid profiles, wines obtained from 1F had lower citric acid but greater malic acid contents than that of the other. Sensory evaluation of wines with Triangle test found the discrimination between wines from 2F de-acidified with a mixture starter of *O. oeni* and *L. brevis*, with a single starter of *L. brevis*, with a mixture starter of *O. oeni* and *L. plantarum*, with a single starter of *L. plantarum*, and wine from 1F de-acidified with *O. oeni*. The liking of wine by using 9 points hedonic scale show that the most colour and appearance liking was from wine 2F de-acidified with a mixture starter of *O. oeni* and *L. brevis* (6.17 and 6.57 points, respectively). The most aroma liking was wine from 1F with single starter *O.oeni* (6.41 points). In addition, the highest aroma overall and flavor liking points were from wine from 2F with single starter *L. brevis* and *L. plantarum* (~5.8 points), respectively. Results from Just-About-Right test showed that all wine samples tended to have to low sweetness, too high sourness and bitterness, no tend astringent and wine from 1F with *O.oeni* contained too much alcohol.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Department: Food Technology	Student's Signature .....
Field of Study: Food Technology	Advisor's Signature .....
Academic Year: 2014	Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณในความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาวินี ดีแท้ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่า เพื่อให้คำปรึกษาและแนวทางแก้ไขปัญหา ตลอดจนความเอาใจใส่ดูแลและให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรภา คงเป็นสุข ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิรัชรา เลาหประสิทธิ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเสียสละเวลาเพื่อตรวจสอบ พร้อมทั้งชี้แนะแนวทางในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. อรอง จันทร์ประสาทสุข ที่ให้คำแนะนำในการทำไวน์สับปะรด

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่อำนวยความสะดวกในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแรงดันสูง

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนสนับสนุนการทำวิจัย

ขอขอบคุณรุ่นพี่ รุ่นน้อง เพื่อนนิสิตปริญญาโทและปริญญาเอก ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ที่ให้กำลังใจ คำแนะนำ และความช่วยเหลือตลอดการทำวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือเสมอตลอดการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และครอบครัวที่ให้กำลังใจ พร้อมทั้งสนับสนุนทุนทรัพย์แก่ผู้วิจัยจนสำเร็จการศึกษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป 1

บทที่ 1 บทนำ 3

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์ 5

2.1 ไวน์ 5

2.2 ไวน์ยีสต์ 7

2.4 การลดกรดโดยการหมักมาโลแลกติก 11

2.4 ไวน์ผลไม้ 12

2.5 ยีสต์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักไวน์ผลไม้ 13

2.6 ไวน์สับปะรด 14

2.6.1 สับปะรด 14

2.6.2 ยีสต์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักไวน์สับปะรด 17

2.6.3 ยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์สับปะรดในงานวิจัยนี้ 19

2.6.4 กระบวนการผลิตไวน์สับปะรด 20

2.7 การลดกรดในไวน์ผลไม้ 21

2.8 แบคทีเรียแลกติกในสับปะรด 21

2.8.1 แบคทีเรียแลกติกที่ใช้ในการหมักไวน์สับปะรดในงานวิจัยนี้ 22

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 32

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

4.1 การเตรียมไวน์สับปะรดและคุณลักษณะของไวน์สับปะรด 32
4.2 การศึกษารูปแบบการหมักไวน์สับปะรดด้วยแบคทีเรียแลกติก 36
4.2.1 การหมักไวน์สับปะรดและลดความเป็นกรดแบบ 2 ขั้นตอน 36
4.2.1.1 การหมักไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว O. oeni Enoferm® ALPHA 36
4.2.1.2 การหมักไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว L. brevis 711 38
4.2.1.3 การหมักไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว L. plantarum 621 40
4.2.1.4 การหมักด้วยกล้าเชื้อผสม O. oeni Enoferm® ALPHA และ L. brevis 711 43
4.2.1.5 การหมักด้วยกล้าเชื้อผสม O. oeni Enoferm® ALPHA และ L. plantarum 621 45
4.2.2 การหมักไวน์สับปะรดและลดความเป็นกรดแบบขั้นตอนเดียว 47
4.2.2.1 การหมักน้ำสับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม H .pseudoguilliermondii และ S'codes ludwigii และ O. oeni Enoferm® ALPHA 47
4.2.2.2 การหมักน้ำสับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม H .pseudoguilliermondii และ S'codes ludwigii และ L .brevis 711 50
4.2.2.3 การหมักน้ำสับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม H .pseudoguilliermondii และ S'codes ludwigii และ L. plantarum 621 53
4.2.3 การเปรียบเทียบคุณลักษณะของไวน์สับปะรด 56
4.2.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส 59
4.2.4.1 ผลการทดสอบความแตกต่าง (Triangle test) 59
4.2.4.2 ผลการทดสอบการยอมรับ (Acceptance test) 61
4.2.4.3 ผลการทดสอบด้านความพอดี 62
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 1
..... 4

หน้า

รายการอ้างอิง 4
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ทางเคมี 13
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ 18
ภาคผนวก ค โครมาโทแกรมของกรดอินทรีย์ 21
ภาคผนวก ง การประเมินทางประสาทสัมผัส 22
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 27
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 28

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางโภชนาการของสับปะรดสด 100 กรัม 16

ตารางที่ 4.1 คุณลักษณะของน้ำสับปะรดสดและไวน์สับปะรด 35

ตารางที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงค่า pH, TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *O. oeni* Enoferm® ALPHA เป็นเวลา 6 สัปดาห์ 37

ตารางที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงค่า pH, TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. brevis* 711 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ 39

ตารางที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงค่า pH, TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum* 621 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ 41

ตารางที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงค่า pH, TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม *O. oeni* Enoferm® ALPHA และ *L. brevis* 711 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ 44

ตารางที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงค่า pH, TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม *O. oeni* Enoferm® ALPHA และ *L. plantarum* 621 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ 46

ตารางที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงค่า pH, TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *O. oeni* Enoferm® ALPHA เป็นเวลา 13 วัน 49

ตารางที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงค่า pH, TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *L. brevis* 711 เป็นเวลา 13 วัน 51

ตารางที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงค่า pH, TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *L. plantarum* 621 เป็นเวลา 13 วัน 54

ตารางที่ 4.10 คุณลักษณะของไวน์ที่ได้จากการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์ *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และการหมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกแต่ละรูปแบบ 58

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.11 จำนวนคนที่แยกความแตกต่างด้านกลิ่นรสของไวน์สับปะรดได้..... 60
ตารางที่ 4.12 ผลคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยใช้ Hedonic Scale 9 จุด..... 62
ตารางที่ 4.13 ผลคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยใช้ Just-About-Right 5 จุด..... 63

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

รูปที่ 2.1 ขั้นตอนในกระบวนการผลิตไวน์..... 6

รูปที่ 2.2 การหมักแอลกอฮอล์ 7

รูปที่ 4.1 จำนวนประชากรยีสต์ที่มีชีวิตและการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำสับปะรด ระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสม *Hanseniaspora pseudoguilliermondii* และ *Saccharomycodes ludwigii* 33

รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงค่า pH, TTA (Titratable acidity) และ RS (Reducing sugar) ของน้ำสับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสม *Hanseniaspora pseudoguilliermondii* และ *Saccharomycodes ludwigii* 33

รูปที่ 4.3 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่มีชีวิตของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยวของ *O. oeni* Enoferm® ALPHA 37

รูปที่ 4.4 ชนิดและปริมาณกรดของไวน์ที่หมักด้วย *O.oeni* Enoferm® ALPH (g/l) 38

รูปที่ 4.5 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่มีชีวิตของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยวของ *L. brevis* 711 39

รูปที่ 4.6 ชนิดและปริมาณกรดของไวน์ที่หมักด้วย *L. brevis* 711 (g/l)..... 40

รูปที่ 4.7 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่มีชีวิตของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยวของ *L. plantarum* 621 41

รูปที่ 4.8 ชนิดและปริมาณกรดของไวน์ที่หมักด้วย *L.plantarum* 621 (g/l) 42

รูปที่ 4.9 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่มีชีวิตของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของ *O. oeni* Enoferm® ALPHA + *L. brevis* 43

รูปที่ 4.10 ชนิดและปริมาณกรดของไวน์ที่หมักด้วย *O. oeni* Enoferm® ALPH + *L. brevis* 711 (g/l)..... 44

รูปที่ 4.11 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่มีชีวิตของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของ *O. oeni* Enoferm® ALPHA + *L. plantarum* 621..... 45

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4.12 ชนิดและปริมาณกรดของไวน์ที่หมักด้วย *O. oeni* Enoferm® ALPH + *L. plantarum* 621 (g/l) 47

รูปที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์และจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์และกล้าเชื้อเดี่ยวแบคทีเรียแลกติก *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *O. oeni* Enoferm® ALPHA 48

รูปที่ 4. 14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์และกล้าเชื้อเดี่ยวแบคทีเรียกรดแลกติก *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *O. oeni* Enoferm® ALPHA 50

รูปที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์และจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์และกล้าเชื้อเดี่ยวแบคทีเรียแลกติก *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *L. brevis* 711 51

รูปที่ 4. 16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์และกล้าเชื้อเดี่ยวแบคทีเรียแลกติก *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *L. brevis* 711 53

รูปที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์และจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์และกล้าเชื้อเดี่ยวแบคทีเรียแลกติก *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *L. plantarum* 621 54

รูปที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์และกล้าเชื้อเดี่ยวแบคทีเรียแลกติก *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *L. plantarum* 621 56

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

สับปะรดเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ซึ่งสามารถปลูกได้ทั่วทุกภาคของประเทศ อีกทั้งยังมีการบริโภคอย่างแพร่หลายและให้ผลผลิตตลอดทั้งปี น้ำสับปะรดมีสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตไวน์ คือ มีปริมาณน้ำตาลสูง มีกลิ่นรสหอมหวาน รวมถึงน้ำสับปะรดยังมีกลิ่นผลไม้ที่มีเอกลักษณ์ มีสารอาหารเพียงพอสำหรับการหมักและการเจริญเติบโตของยีสต์โดยไม่ต้องเติมสารอาหาร รวมถึงให้ลักษณะไวน์ที่เป็นที่ยอมรับในรูปแบบของไวน์ขาว (Callens and De Smet, 1991; Ruengrongpanya, 1996; Ayogu, 1999) นอกจากนี้หากในกระบวนการผลิตไวน์สับปะรดสามารถคงเอนไซม์โบรมิเลนไว้จะเป็นการสร้างเอกลักษณ์ และลักษณะเฉพาะตัวที่ดีให้กับไวน์สับปะรดได้ แต่เนื่องจากน้ำสับปะรดมีความเป็นกรดสูง ทำให้ในกระบวนการผลิตไวน์สับปะรดต้องเจือจางความเข้มข้นของน้ำสับปะรดโดยการเติมน้ำเพื่อลดความเปรี้ยว ซึ่งเป็นวิธีทั่วไปในการทำไวน์ผลไม้ที่มีความเป็นกรดสูง จึงส่งผลให้ไวน์สับปะรดที่ผลิตด้วยเทคนิคดังกล่าวขาดกลิ่นรสของน้ำสับปะรดสดดังที่ควรจะเป็น ดังนั้นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาคุณภาพด้านกลิ่นรสของไวน์สับปะรดอาจทำได้โดยการหมักน้ำสับปะรดคั้นสดครบส่วนและลดความเปรี้ยว(deacidification) โดยอาศัยกระบวนการหมักของแบคทีเรียแลกติก ทำให้รสเปรี้ยวน้อยลง ไวน์ที่ได้ยังคงกลิ่นรสของสับปะรด จึงทำให้มีคุณภาพด้านกลิ่นรสที่ดีขึ้น และยังอาจคงคุณสมบัติที่สำคัญ คือ การคงกิจกรรมของเอนไซม์โบรมิเลน ทำให้มีเอกลักษณ์เป็น enzymatic wine ได้

กิจกรรมของยีสต์ทำให้เกิดการหมักแอลกอฮอล์ในกระบวนการผลิตไวน์ ซึ่งให้กลิ่นรสที่ดีแก่ไวน์ (Henschke, 1997) ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลฟรุคโตสให้เป็นแอลกอฮอล์ และมีผลพลอยได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเอทานอลที่ยีสต์ผลิตขึ้นมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ช่วยสกัดสารให้กลิ่นรสจากผลไม้ นอกจากนี้ยีสต์ยังผลิตเอนไซม์ที่เปลี่ยนสารประกอบในผลไม้ให้เป็นสารออกฤทธิ์ (active compound) ที่มีกลิ่นรสหลากหลายชนิด รวมถึงการสร้างสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) เช่น กรด แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ แอลดีไฮด์ คีโตน ที่มีผลต่อคุณภาพด้านกลิ่นรสของไวน์ (Cole and Noble, 1997; Lambrechts and Pretorius, 2000) ใน

การลดกรดที่ให้รสเปรี้ยวแหลมเพื่อพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในไวน์องุ่น นิยมลดกรดมาลิก โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบมาโลแลกติกด้วยแบคทีเรียแลกติก *Oenococcus oeni* ซึ่งเป็นการหมักที่เกิดขึ้นเป็นครั้งที่สองหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ประมาณ 2-3 สัปดาห์ แบคทีเรียแลกติกดังกล่าวเปลี่ยนกรดมาลิกไปเป็นกรดแลกติก ทำให้รสเปรี้ยวน้อยลง อีกทั้งยังช่วยปรับปรุงรสชาติ รวมถึงเพิ่มเสถียรภาพทางจุลินทรีย์ด้วย (Lonvaud-Funel, 1999; Fleet, 2001)

ในปี 2010 Chanprasartsuk และคณะวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาคุณภาพด้านกลิ่นรสของไวน์สับปะรด โดยใช้ยีสต์ non - *saccharomyces* ที่คัดแยกได้จากการหมักน้ำสับปะรดตามธรรมชาติ โดยทดสอบการยอมรับด้านกลิ่นและรสชาติของไวน์ที่เตรียมจาก multi-starter ระหว่าง *Saccharomycodes ludwigii* และ *Hanseniaspora uvarum* พบว่า ไวน์ที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ใช้ยีสต์ *S. cerevisea* สายพันธุ์ทางการค้า แต่ที่น่าสนใจ คือ *S' codes ludwigii* สามารถดำเนินการหมักแบบแอลกอฮอล์ได้ดีไม่ต่างจาก *S. cerevisea* แต่จากรูปแบบการหมัก *S' codes ludwigii* จะส่งเสริมให้ *H . uvarum* เจริญเติบโตในขั้นต้นของการหมัก *H. uvarum* สร้างสาร 2 -phenylacetate ซึ่งให้กลิ่น floral ดังนั้นยีสต์ *H . uvarum* สามารถส่งเสริมความซับซ้อนของสารประกอบกลิ่นหอมระเหยในไวน์สับปะรด และในปี 2012 Keawklin and Boonin ได้รายงานว่า ไวน์สับปะรดที่หมักด้วย *H. uvarum* และ *S' codes ludwigii* จะมีปริมาณกรดซิตริกลดลง และรายงานเพิ่มเติมว่าไวน์สับปะรดที่หมักด้วย non-*saccharomyces* จะได้รับการยอมรับด้านกลิ่นรสสูงกว่าไวน์สับปะรดที่เจือจางด้วยน้ำ แต่ไวน์ที่หมักจากน้ำสับปะรดครบส่วนยังมีคะแนนความชอบโดยรวมยังไม่สูงมาก ซึ่งอาจเกี่ยวเนื่องจากไวน์ยังมีรสเปรี้ยวมากเกินไป

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีของไวน์สับปะรดที่หมักด้วยวิธีการหมักแบบ 2 ขั้นตอน (two step fermentation) ด้วยกล้าเชื้อ 5 รูปแบบ ทำโดยหมักน้ำสับปะรดสดครบส่วนด้วยออโตโคนัสยีสต์ *Hanseniaspora psuedoguilliermondii* และ *S' codes ludwigii* ที่แยกได้จากน้ำสับปะรดหมักธรรมชาติ แล้วจึงหมักต่อด้วยแบคทีเรียแลกติก (LAB) สายพันธุ์ทางการค้าและออโตโคนัสไอโซเลทที่แยกได้จากการหมักน้ำสับปะรดแบบธรรมชาติทั้งในรูปแบบกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม เปรียบเทียบกับการหมักแบบขั้นตอนเดียว (one step fermentation) ด้วยกล้าเชื้อ 3 รูปแบบ ซึ่งเป็นการหมักด้วยออโตโคนัสยีสต์พร้อมกับการหมักด้วยแบคทีเรียแลกติกในรูปแบบกล้าเชื้อเดี่ยวและเปรียบเทียบคุณภาพของไวน์สับปะรดที่หมักด้วยกล้า-เชื้อรูปแบบต่างๆ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 ไวน์

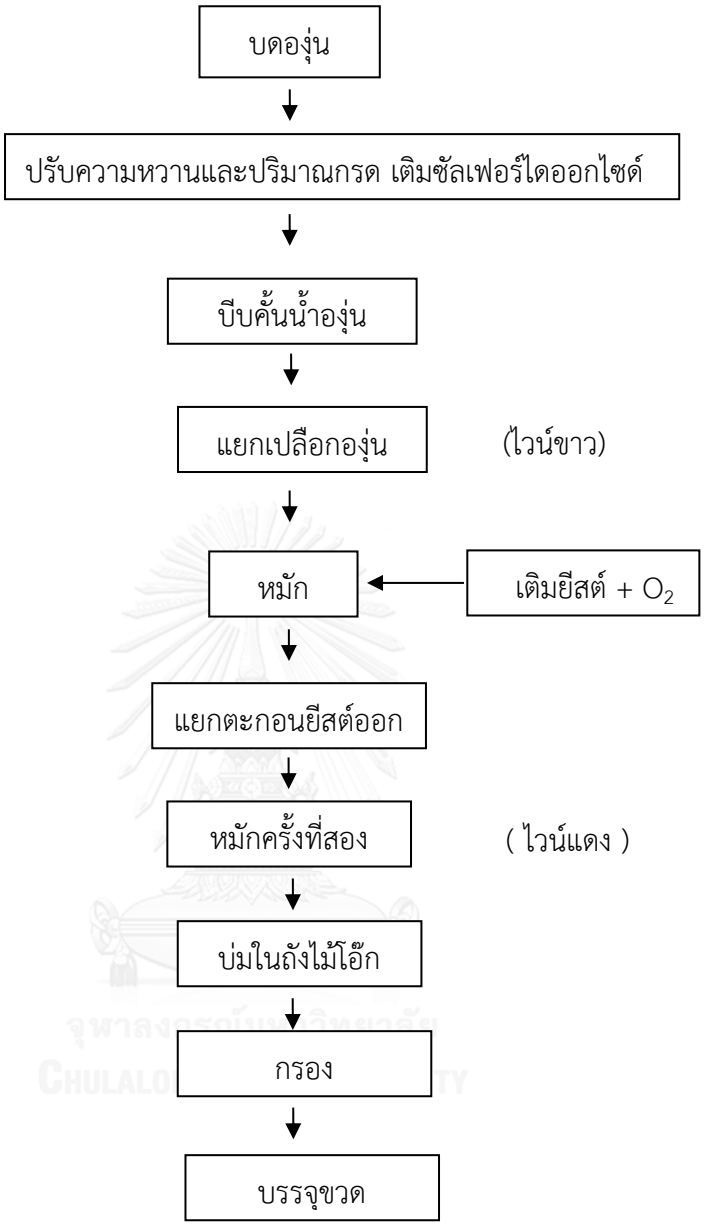
ไวน์ คือ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่เกิดจากการหมักน้ำองุ่นด้วยยีสต์ โดยมีการควบคุมกระบวนการหมักอย่างเหมาะสม ซึ่งไวน์ที่หมักด้วยผลไม้ชนิดอื่น จะเรียกว่า ไวน์ผลไม้ โดยจะเรียกตามชื่อของผลไม้ชนิดนั้นๆ เช่น ไวน์สับปะรด ไวน์กระท้อน ไวน์ลิ้นจี่ ไวน์ส้ม ฯลฯ นอกจากนี้ผักใบไม้ และดอกไม้ก็สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับใช้ในการหมักไวน์ได้เช่นกัน ผลไม้แต่ละชนิดมีกลิ่นและรสแตกต่างกัน จึงทำให้ไวน์แต่ละชนิดที่หมักได้มีความแตกต่างกัน (Lamsaengthum, 2003)

การแบ่งประเภทของไวน์ตามความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ ได้แก่

- ไวน์หวาน (sweet wine) เป็นไวน์ที่มีน้ำตาลเหลืออยู่มาก ส่วนมากเป็นไวน์ที่เพิ่งหมักใหม่ๆ มีเปอร์เซ็นแอลกอฮอล์โดยน้ำหนักไม่เกิน 10%
- ดรายไวน์ (dry wine) เป็นไวน์ที่มีน้ำตาลอยู่น้อย และมีแอลกอฮอล์สูง ซึ่งได้จากการหมักผลไม้นานๆ โดยมีเปอร์เซ็นแอลกอฮอล์ตั้งแต่ 10-17% โดยน้ำหนัก
- ไวน์ชนิดแอลกอฮอล์สูง (dessert wine) เป็นไวน์ที่มีแอลกอฮอล์สูงมาก ไม่มีน้ำตาลเหลืออยู่เลยหรือมีอยู่น้อยมาก โดยมีเปอร์เซ็นแอลกอฮอล์สูงกว่า 17-20% โดยน้ำหนัก

กระบวนการผลิตไวน์ขาวแตกต่างจากการผลิตไวน์แดง โดยในกรณีผลิตไวน์ขาวจะแยกเปลือกองุ่นออกก่อนหมัก แต่การผลิตไวน์แดง หลังจากคั้นน้ำองุ่นเสร็จแล้ว ไม่ต้องแยกเปลือกออก ดังรูปที่ 2.1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

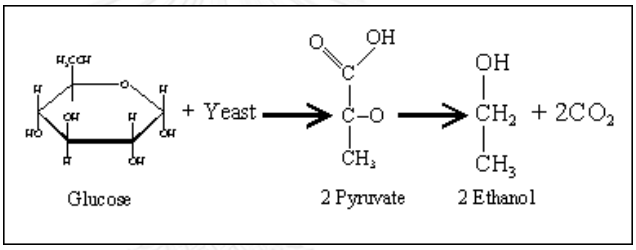


รูปที่ 2.1 ขั้นตอนในกระบวนการผลิตไวน์

ที่มา: Lee and Wall (1996)

2.2 ไวน์ยีสต์

ยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักไวน์ เรียกว่า“ ไวน์ยีสต์ ”(wine yeast) กิจกรรมของยีสต์ทำให้เกิดการหมักแอลกอฮอล์ในกระบวนการผลิตไวน์ ซึ่งให้กลิ่นรสที่ดีแก่ไวน์ (Henschke, 1997) ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลฟรุคโตสให้เป็นแอลกอฮอล์ และมีผลพลอยได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในกระบวนการหมักไวน์น้ำตาลทุกๆหนึ่งองศาบริกซ์จะถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ประมาณ 0.535% (Vine et al., 1997) โดยเอทานอลที่ยีสต์ผลิตขึ้นมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ช่วยสกัดสารให้กลิ่นรสจากผลไม้ นอกจากนี้ยีสต์ยังผลิตเอนไซม์ที่เปลี่ยนสารประกอบในผลไม้ให้เป็นสารออกฤทธิ์ (active compound) ที่มีกลิ่นรสหลากหลายชนิด รวมถึงการสร้างสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) เช่น กรด แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ แอลดีไฮด์ คีโตน ที่มีผลต่อคุณภาพด้านกลิ่นรสของไวน์ (Cole and Noble, 1997; Lambrechts and Pretorius, 2000)



รูปที่ 2.2 การหมักแอลกอฮอล์
ที่มา : Pilone and Kunkee (1976)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การหมักแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์เกิดขึ้นหลังจากการสลายกลูโคสเป็นกรดไพรูวิกในขั้นตอนไกล-โคไลซิส มีการสร้าง ATP 2 โมเลกุล จากนั้นกรดไพรูวิกจะเปลี่ยนเป็นแอซิทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ที่มีเอนไซม์ไพรูเวท ดีคาร์บอกซิเลส (pyruvate decarboxylase) เป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยา โดยในขั้นตอนนี้มี CO_2 เกิดขึ้น 2 โมเลกุล หลังจากนั้นแอซิทัลดีไฮด์จึงเปลี่ยนเป็นเอทานอล (ethanol) โดยมีตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาเป็นเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ยีสต์สาย-พันธุ์ทางการค้าที่นิยมใช้ทั่วไปในเชิงอุตสาหกรรม คือ *Saccharomyces sp.* การพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์สำหรับใช้ในการหมักไวน์ สามารถแบ่งรูปแบบการหมักได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

- การหมักแบบธรรมชาติ (natural fermentation)

เป็นการหมักโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในวัตถุดิบเป็นตัวดำเนินการหมัก ทำให้สามารถสร้างสารที่ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีและมีความหลากหลาย แต่ไม่สามารถควบคุมประสิทธิภาพของการหมักได้ ซึ่งอาจส่งผลให้การหมักไม่สมบูรณ์ (Sipiczki et al., 2001)

- การหมักโดยใช้หัวเชื้อ (starter culture fermentation)

-หัวเชื้อออโตโคนัส (autochthonous starter) เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก จึงมีความคุ้นเคยกับสภาวะของวัตถุดิบทำให้สามารถปรับตัวเข้ากับวัตถุดิบได้ดีและใช้สารอาหารที่มีอยู่ในการดำเนินการหมักได้อย่างสมบูรณ์ (Di Cagno, 2010)

- หัวเชื้ออัลโลโคนัส (allochthonous starter) เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแหล่งอื่นซึ่งไม่ใช่วัตถุดิบที่ใช้หมัก อาจเจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่ากับหัวเชื้อออโตโคนัส ซึ่งบางสายพันธุ์จัดเป็นสายพันธุ์มาตรฐานและมีการพัฒนาเป็นหัวเชื้อที่ใช้ในทางการค้าด้วย (Holzapfel et al., 1998)

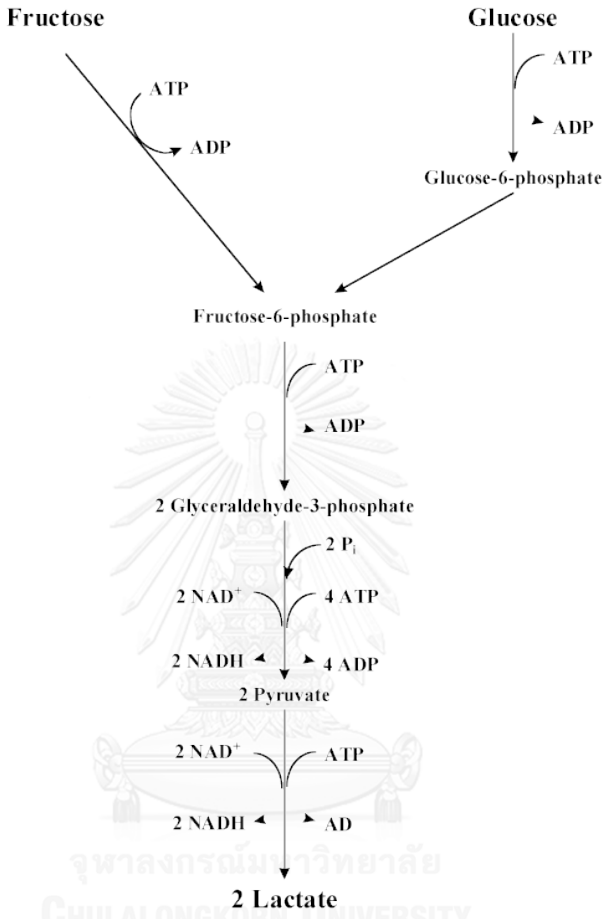
2.3 แบคทีเรียแลกติกและคุณสมบัติ

แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) มีรูปร่างกลม (bacilli) หรือเป็นท่อน (rod) เคลื่อนที่ไม่ได้ (non-motile) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) มีสมบัติในการผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักระหว่างกระบวนการหมักโดยใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงาน แบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ แต่สามารถทนต่อสภาวะที่มีอากาศได้ (aerotolerant) นอกจากนี้ยังทนต่อความเป็นกรด ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ และบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียมได้ (pseudocatalase) (Axelsson, 1998) ในปัจจุบันสกุลของแบคทีเรียกรดแลกติกมีทั้งหมด 13 สกุล ได้แก่ *Carnobacterium, Enterococcus, Globicatella, Lactobacillus, Lactococcus, Lactosphaera, Oenococcus, Paralactobacillus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus,* และ *Weissella* แบคทีเรียแลกติกแบ่งเป็น 2 ประเภทหลัก ตามการใช้สารอาหารและการสร้างผลิตภัณฑ์ ดังนี้ (Muñoz et al., 2011)

2.3.1 แบคทีเรียแลกติกกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative lactic acid bacteria)

แบคทีเรียแลกติกในกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมผ่านวิถี Embden – Meyerhof – Parnas pathway (EMP pathway) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรด

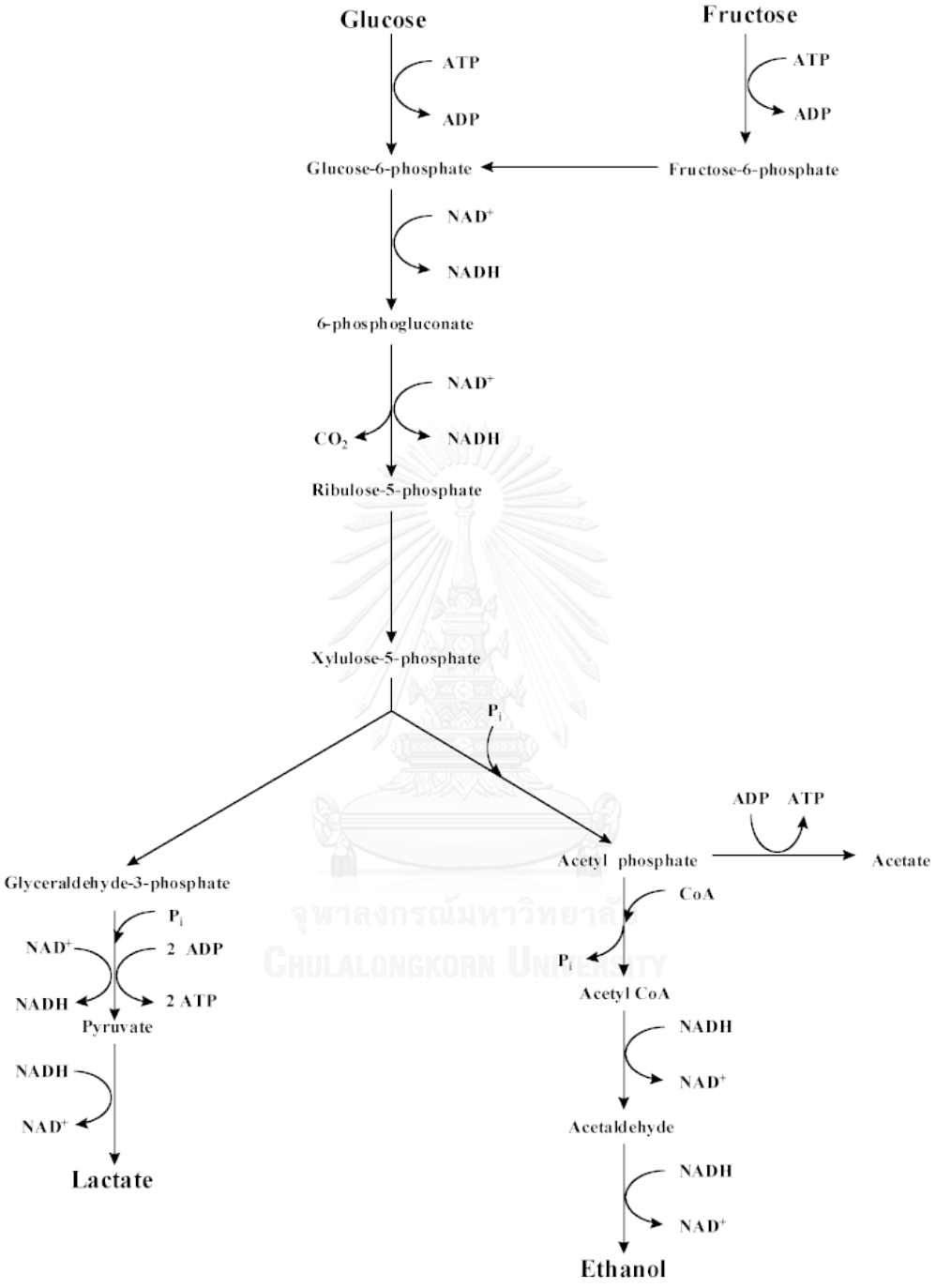
แลกติก ดังแสดงในรูปที่ 2.3 แบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus* และ *Pediococcus* เป็นต้น



รูปที่ 2.3 วิถีการหมักโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ
ที่มา : ดัดแปลงจาก McDonald et al. (1991)

2.3.2 แบคทีเรียแลกติกกลุ่มเฮทเทอร์โรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative lactic acid bacteria)

แบคทีเรียแลกติกในกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมผ่านวิถี phosphoketolase : pentose phosphate pathway (PK pathway) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลกติก เอทานอล กรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์ ดังแสดงในรูปที่ 2.4 แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Leuconostoc*, *Oenococcus* และ *Weissella* เป็นต้น



รูปที่ 2.4 วิถีการหมักเฮทเทอร์โรเฟอร์เมนเททีฟ

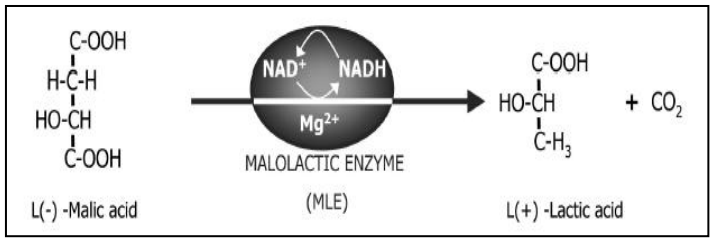
ที่มา : ดัดแปลงจาก McDonald et al. (1991)

แบคทีเรียแลกติกกลุ่มใหญ่ที่สุด คือ แบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* ซึ่งแบ่งกลุ่มตามลักษณะการหมักได้เป็น 3 กลุ่มด้วยกัน คือ กลุ่มที่ 1 obligately homofermentative lactobacilli ประกอบด้วย *L. acidophilus* และ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* เป็นต้น ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลกติกที่สามารถใช้น้ำตาลเฮกโซสผ่านวิถี Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) pathway แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนตในการหมักกรดแลกติกได้ กลุ่มที่ 2 คือ facultatively heterofermentative lactobacilli ได้แก่ *L. casei*, *L. plantarum*, *L. sakei* เป็นต้น ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลเฮกโซสเหมือนในกลุ่มที่ 1 และยังสามารถใช้น้ำตาลเพนโทสในการหมักได้ และกลุ่มที่ 3 คือ obligately heterofermentative lactobacilli ได้แก่ *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. reuteri* และ *L. sanfranciscensis* เป็นต้น โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะสามารถผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ได้ (Hammes and Vogel, 1995)

2.4 การลดกรดโดยการหมักมาโลแลกติก

การหมักมาโลแลกติกด้วยแบคทีเรียแลกติก *Oenococcus oeni* ซึ่งเป็นการหมักที่เกิดขึ้นเป็นครั้งที่สองหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ประมาณ 3-2 สัปดาห์ แบคทีเรียแลกติกเปลี่ยนกรดมาลิกไปเป็นกรดแลกติกโดยอาศัยเอนไซม์มาโลแลกติก ประโยชน์ของการหมักมาโลแลก-ติก ได้แก่

- การลดความเป็นกรด การเปลี่ยนกรดมาลิกเป็นกรดแลกติก มีผลพลอยได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งช่วยในการลดความเป็นกรดของไวน์ ส่งผลให้ค่าพีเอช(pH) เพิ่มขึ้น มักใช้กับไวน์ที่มีปริมาณกรดสูง(กรดทาร์ทาริกรวมถึงกรดมาลิก) และไวน์ที่มีค่า pH ต่ำ (Henick-Kling, 1994)



รูปที่ 2.5 การเปลี่ยน L-malic acid เป็น L-lactic acid

ที่มา : Pilone and Kunkee (1976)

- การปรับปรุงรสชาติ การหมักมาโลแลคติกด้วยแบคทีเรียแลกติกช่วยในการลดความเป็นกรด นอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงรสชาติของไวน์ด้วย ซึ่งกลิ่นรสที่เกิดขึ้นจากการหมักมาโลแลก-

ติกด้วยแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ “malolactic”, “buttery”, “lactic”, “nutty”, “oaky”, “yeasty” และ“sweaty” นอกจากนี้ยังช่วยเสริมกลิ่นรสผลไม้และความรู้สึกในปากที่เป็นลักษณะเฉพาะของไวน์ด้วย (Henick-Kling, 1994; Laurent et al., 1994)

- เสถียรภาพทางจุลินทรีย์ การหมักมาโลแลกติกด้วยแบคทีเรียแลกติกให้ความเสถียรทางจุลินทรีย์ในไวน์ โดยการกำจัดกรดมาลิกซึ่งเป็นซับสเตรทสำหรับจุลินทรีย์และน้ำตาลบางชนิด นอกจากนี้การหมักมาโลแลกติกด้วยแบคทีเรียแลกติกยังสร้างสารต้านจุลินทรีย์ เช่น กรดแลกติกและแบคทีริโอซินบางชนิดด้วย (Henick-Kling, 1994)

2.4 ไวน์ผลไม้

ไวน์ผลไม้ คือ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักผลไม้หรือน้ำผลไม้ด้วยยีสต์ ซึ่งไม่ใช่องุ่น ผลไม้ที่นำมาผลิตไวน์ประกอบด้วยสารอาหารที่เพียงพอต่อการหมักและการเจริญเติบโตของยีสต์ ซึ่งกระบวนการผลิตไวน์ผลไม้คล้ายกับไวน์องุ่น อย่างไรก็ตามการพัฒนาเทคโนโลยีในการปรับปรุงคุณภาพไวน์ผลไม้ยังอยู่ในขั้นกำลังพัฒนา (Chanprasartsuk et al., 2010b)

กระบวนการผลิตไวน์ผลไม้ ประกอบด้วย การเตรียมน้ำหมักโดยการเติมน้ำตาล เติมแหล่งไนโตรเจนในรูปของสารไดแอมโมเนียมฟอสเฟต การลดการปนเปื้อนด้วยการต้มหรือการเติมสารโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ และส่วนใหญ่มีการเติมน้ำเพื่อลดความเป็นกรด แล้วหมักด้วยกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิห้องด้วยยีสต์ ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้กล้าเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ หลังจากนั้นทำให้ใส ลดการปนเปื้อนก่อนบรรจุ แล้วนำไปจัดจำหน่าย (Amerine and Ough, 1980; Akubor, 1996)

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาไวน์ผลไม้ ได้แก่ Sun et al. (2014) ศึกษาการหมักไวน์เชอร์รีด้วยกล้าเชื้อยีสต์ผสมระหว่าง non-*saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckiin* ZYMAFLORE Alpha$^{\text{TD n. Sacch}}$ และ *Metschnikowia pulcherrima* JS22) ร่วมกับกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*) D254 และ EC1118) เปรียบเทียบกับการหมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว พบว่า การหมักด้วยกล้าเชื้อผสมระหว่าง *M. pulcherrima* JS22 และ *S. cerevisiae* ซึ่ง *S. cerevisiae* จะสร้างแอลกอฮอล์อย่างรวดเร็วตั้งแต่ช่วงแรกของการหมัก ส่งผลให้ปริมาณแอลกอฮอล์ในไวน์เชอร์รียับยั้งการเจริญของ *M. pulcherrima* JS22 ส่วนงานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการหมักไวน์ผลไม้ ส่วนใหญ่เป็นไปในทำนองเดียวกัน คือ การประเมินอันตรกิริยาของการใช้กล้าเชื้อยีสต์ผสมเพื่อปรับปรุงกลิ่นรสของไวน์

2.5 ยีสต์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักไวน์ผลไม้

โดยทั่วไปแล้ววัตถุดิบหลักที่ใช้ในการผลิตไวน์ คือ องุ่น อย่างไรก็ตามมีรายงานการวิจัยหลายฉบับบ่งชี้ว่ามีผลไม้ชนิดอื่นที่เหมาะสมในการนำมาผลิตไวน์ ผลไม้ที่ใช้ในการผลิตไวน์เป็นที่น่าสนใจเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากความหลากหลายของวัตถุดิบ มีลักษณะเฉพาะและมีประโยชน์ต่อสุขภาพ ลักษณะเฉพาะและคุณภาพของไวน์ผลไม้ส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับชนิดวัตถุดิบและเทคนิคการผลิตไวน์ ซึ่งบ่งบอกได้จากรสชาติและกลิ่นของไวน์ โดยส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก ในการหมักไวน์องุ่นมีงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง อีกทั้งยังมีเทคโนโลยีที่ก้าวหน้าในการผลิตไวน์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีอิทธิพลต่อคุณภาพและราคาไวน์ ยีสต์ทำให้เกิดการหมักแอลกอฮอล์ อีกทั้งทำให้ได้ไวน์ที่มีโครงสร้างและลักษณะเฉพาะตัวของกลิ่นรสและกลิ่น โดยเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการหมักยีสต์ และมีผลพลอยได้ คือ คาร์บอนไดออกไซด์ โดยสารประกอบหลักที่ให้กลิ่นรส ได้แก่ กรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ แอลดีไฮด์ เป็นต้น (Lambrechts and Pretorius, 2000) รูปแบบสารประกอบที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักแอลกอฮอล์มีอิทธิพลต่อสารประกอบที่ระเหยได้ในไวน์ คุณสมบัติของสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์ ได้แก่ เจริญได้เร็ว หมักน้ำตาลแล้วเปลี่ยนเป็นเอทานอล ทนต่อความเป็นกรดในน้ำผลไม้ ความเข้มข้นของน้ำตาลและแอลกอฮอล์ได้ดี (Lamsaengthum, 2003)

การหมักแอลกอฮอล์อาจเกิดขึ้นได้โดยยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในผลไม้หรือเกิดจากยีสต์สายพันธุ์เฉพาะที่เติมลงไป โดยอาจใช้กล้าเชื้อแบบเดี่ยวหรือผสมเพื่อปรับปรุงคุณภาพด้านกลิ่นรสของไวน์ กล้าเชื้อที่มักใช้ในการหมักไวน์ผลไม้ ได้แก่ *S. cerevisiae* (Akubor, 1996) มีการศึกษาเกี่ยวกับยีสต์ที่เกี่ยวข้องในการหมักไวน์ผลไม้และระบบนิเวศยีสต์ด้วยการหมักน้ำผลไม้ตามธรรมชาติ แล้วคัดเลือกและพัฒนากล้าเชื้อยีสต์สายพันธุ์เฉพาะเพื่อนำมาใช้ผลิตไวน์ให้ได้คุณภาพดี อย่างไรก็ตามนักวิจัยบางกลุ่มให้ความสนใจในการพัฒนาไวน์ผลไม้ โดยการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces* และ/หรือ non-*Saccharomyces* ที่เป็นหัวเชื้ออัลโลโคนัส อีกทั้งยังศึกษาเกี่ยวกับสภาวะของการหมักด้วย

2.6 ไวน์สับปะรด

2.6.1 สับปะรด

สับปะรดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่ปลูกมากในทุกภาคของประเทศไทย ประเทศไทยส่งออกสับปะรดและผลิตภัณฑ์สับปะรดมากที่สุดของโลก (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2553) สับปะรดเป็นผลไม้เขตร้อนที่มีความสำคัญนิยมบริโภคกันทั่วโลกในรูปแบบผลสด,แยม,เยลลี่และผลิตภัณฑ์อบแห้ง มีคุณค่าทางอาหารสูง อุดมไปด้วยวิตามิน A, B และC มีแร่ธาตุมากมาย เช่น Ca, P, และFe (Gardner et al., 2000) ในน้ำสับปะรดมีคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ ซูโครส, กลูโคส และฟรุคโตส ในผลสับปะรดสุกมีกรดหลัก คือ กรดซิตริกและกรดมาลิก (Bartolome et al., 1995) ผลสับปะรดสุกมีปริมาณกรดอะมิโนชนิดหลัก ได้แก่ ไกลซีน, อะลานีน, เมไทโอนีน, และลิวซีน กรดอะมิโนที่มีปริมาณต่ำ ได้แก่ ไลซีน, โพรลีน, ฮิสทีดีน และอาร์จีนีน (Gortner et al., 1967) สับปะรดยังมีเอนไซม์โบรมิเลน ซึ่งเป็นโพรทิโอไลติคเอนไซม์มีค่าโบรมิเลนแอกทิวิตี(bromelain activity) 4,898.7± 982.22 CDU/ml (Jintanawit et al., 2004) สามารถไฮโดรไลซ์โปรตีนที่ไม่เสถียรในไวน์ขาวได้ ช่วยทำให้โปรตีนมีความคงตัวในเครื่องดื่ม (Benucci et al., 2011) นอกจากนี้เอนไซม์โบรมิเลนยังมีสรรพคุณทางยา มีฤทธิ์ต้านการรวมกันของเกล็ดเลือด ต้านการอักเสบและมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน ป้องกันการติดเชื้อ ลดการกระจายตัวของเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลอง และควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Maurer, 2001; Bhui et al., 2009) สับปะรดสามารถใช้ในการผลิตไวน์ได้ เนื่องจากประกอบด้วยกลิ่นผลไม้ที่เป็นเอกลักษณ์ มีสารอาหารเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์และการหมักโดยไม่ต้องเติมสารอาหาร รวมถึงให้ลักษณะไวน์ที่เป็นที่ยอมรับในรูปแบบของไวน์ขาวด้วย (Callens and De Smet, 1991; Ruengrongpanya, 1996; Ayogu, 1999) จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสับปะรดที่ปลูกในประเทศไทย สามารถแบ่งพันธุ์สับปะรดได้เป็น 3 กลุ่ม (Popluechai et al., 2007) ดังนี้

- Cayenne มีลักษณะเฉพาะ คือ มีหนามเฉพาะบริเวณปลายใบ ผลเป็นรูปวงรีและมีขนาดปานกลาง เมื่อผลเริ่มสุกสีเปลือกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจากบริเวณฐาน โดยไล่ขึ้นไปยังส่วนบนของผล เนื้อมีสีเหลืองซีด นิ่มและฉ่ำน้ำ สับปะรดในกลุ่มนี้ ได้แก่ พันธุ์ปัตตาเวียและนางแล
- Queen มีลักษณะเฉพาะ คือ มีใบขนาดเล็กและมีหนามรอบใบ ผลมีขนาดเล็ก เมื่อผลเริ่มสุกสีเปลือกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งผล ผลย่อยมีขนาดเล็ก มีเนื้อสีเหลืองทองและกรอบ รสชาติหวาน สับปะรดในกลุ่มนี้ ได้แก่ พันธุ์ตราดสีทอง ภูเก็ต สวี เพชรบุรี1 และภูแล

- Spanish มีลักษณะเฉพาะ คือ ใบมีหนาม ซึ่งลักษณะใบมีหลากหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ผลมีขนาดเล็กเป็นรูปวงรีจนถึงทรงกระบอก ผลดิบมีเปลือกสีม่วงคล้ำและเปลี่ยนเป็นสีส้มทองแดงเมื่อผลสุก เนื้อสีเหลืองทอง มีปริมาณน้ำตาลและกรดต่ำ มีรสชาติอ่อน สับปะรดในกลุ่มนี้ ได้แก่ พันธุ์อินทรชิตแดง และอินทรชิตขาว

สับปะรดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ พันธุ์ปัตตาเวีย (*Anasus comosus* (L.) Merr) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Cayenne ผลเป็นวงรี และมีขนาดผลปานกลาง (2.5-1.5 kg) โดยปกติทั่วไปมีน้ำหนักประมาณ 2.5 kg เนื้อผลมีสีเหลืองอ่อน นิ่ม และชุ่มน้ำ มีปริมาณน้ำตาลอยู่ระหว่าง 19-13 °Brix และมีรสเปรี้ยว ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่ใช้ปลูกด้วย ในสภาพอากาศที่มีฝนตกและอุณหภูมิสูงจะมีปริมาณกรดแอสคอร์บิกต่ำ ถึงแม้ว่าสับปะรดพันธุ์นี้จะมีปริมาณน้ำตาลสูง แต่ยังคงมีรสชาติเปรี้ยวสำหรับผู้บริโภค จึงทำให้ภาพลักษณ์ของสับปะรดเป็นผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว ข้อด้อยของน้ำสับปะรดพันธุ์นี้ คือ สีซีด มีปริมาณน้ำตาลสูงและขุ่น (Chen et al., 2003) อีกทั้งยังไม่ทนต่อโรคราก ลำต้นเน่า และไม่ทนต่อโรคผลแคระเกร็น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางโภชนาการของสับปะรดสด 100 กรัม

Constituients	**Quantity (% fresh weight basis)**
°Brix	10.8 – 17.5
Sucrose	5.9 – 12.0
Glucose	1.0 – 3.2
Fructose	0.6 – 2.3
Cellulose	0.43 – 0.54
Pectin	0.06 – 0.16
Titratable acid (as citric acid)	0.6 – 1.62
Citric acid	0.32 – 1.22
Malic acid	0.1 – 0.47
Oxalic acid	0.005
Ash	0.30 – 0.42
Water	81.2 – 86.2
Fiber	0.30 – 0.61
Nitrogen	0.045 – 0.115
Ether extract	0.2
Pigments (ppm of carotene)	0.2 – 2.5
Carotene (mg)	0.13 – 0.29
Xanthophyll (mg)	0.03
Esters (ppm)	0.2 – 2.5
Vitamin (μg/100g) fresh weight	
Aminobenzoic acid	17 – 22
Folic acid	2.5 – 4.8
Niacin	200 – 280
Pantothenic acid	75 – 163
Thiamine	69 – 125
Riboflavin	20 – 88
Vitamin B6	10 – 140
Vitamin A	0.02 – 0.04
Ascorbic acid	10 - 25

ที่มา : (Akamine, 1976)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.6.2 ยีสต์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักไวน์สับปะรด

รายงานวิจัยที่เกี่ยวกับการปรับปรุงและพัฒนากระบวนการผลิตไวน์สับปะรดโดยการหมักด้วยหัวเชื้ออัลโลโคนัส (Chanprasartsuk and Prakitchaiwattana, 2015) ดังนี้

Ayogu (1999) ศึกษาการแยกเชื้อ *S. cerevisiae* จากผลของ Nigerian palm แล้วนำเชื้อที่ได้มาใช้ในการหมักไวน์สับปะรดเปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ทางการค้า พบว่าเชื้อที่แยกได้จากผลปาล์มให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงถึง 10.20% แต่ยีสต์สายพันธุ์ทางการค้าให้แอลกอฮอล์เพียง 7.40% ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Alain et al. (1987) ศึกษาการหมักยีสต์ *S. cerevisiae* 7 สายพันธุ์ และ *Candida utilis* CBS 5609 ในน้ำสับปะรดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วภายใต้สภาวะการหมักที่แตกต่างกัน พบว่า ความเป็นกรด-ด่าง(pH)มีค่า 3.9 และความเป็นกรดของน้ำผลไม้ไม่มีผลต่อการเจริญของยีสต์หรือการสร้างแอลกอฮอล์ และเป็นที่น่าสนใจว่า สายพันธุ์ *Saccharomyces* ที่แยกได้จากภูมิอากาศเขตร้อน (Africa) แสดงกิจกรรมการหมักที่ดีกว่าในน้ำสับปะรด ซึ่งสัมพันธ์กับสายพันธุ์ที่ได้จากเขตร้อนและเขตหนาว เช่น ฝรั่งเศส อเมริกา สายพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดในพื้นที่เขตร้อนผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อีกทั้ง *Candida utilis* CBS 5609 ก็หมักได้ดีในน้ำสับปะรดนี้ Ruengrongpanya (1996) รายงานว่า *S. cerevisiae* บางสายพันธุ์ให้แอลกอฮอล์ในการหมักน้ำสับปะรดได้สูงถึง 13.42% อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบคุณสมบัติด้านประสาทสัมผัส พบว่า ไวน์สับปะรดที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ที่ต่ำกว่าให้ผลการยอมรับทางประสาทที่ดีกว่า ซึ่งส่งผลต่อการเจริญและกิจกรรมเมตาบอลิซึมของการผลิตเอทานอลของยีสต์ โดยเอทานอลเป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิที่มีอิทธิพลต่อโครงสร้างทางเคมีพื้นฐานและลักษณะเฉพาะในด้านกลิ่น และกลิ่นรสของไวน์สับปะรด จากรายงานของ Pino and Queris (2010) พบว่าสารประกอบที่ระเหยได้ที่พบในไวน์สับปะรดสายพันธุ์ Red Spanish ที่หมักด้วย *S. cerevisiae* (bakery yeast, Fermipan Lefersa, La Habana) ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ได้แก่ ethyl octanoate, ethyl acetate, 3-methyl-1-butanol และ ethyl decanoate อีกทั้งยังพบ ethyl octanoate, ethyl acetate และ ethyl 2-methyl propanoate ด้วย

มีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการพัฒนาหัวเชื้อออโตโคนัสสำหรับใช้เป็นสตาร์ทเตอร์ โดยการสำรวจยีสต์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักน้ำสับปะรดตามธรรมชาติ พบว่า ยีสต์หลายสปีชีส์ เช่น *Pichia anomala*, *P. guilliermondii*, *P. sydowiorum*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida versatilis*, และ *C. apicola* เป็นยีสต์ทั่วไปที่พบได้ในผลไม้เขตร้อนรวมทั้งสับปะรดด้วย อย่างไรก็ตาม ในน้ำหมักสับปะรดตามธรรมชาติพบยีสต์เพียงสองสามสปีชีส์ (Rale and Vakil, 1984; Tokouka et al., 1985) จากการศึกษาของ Chanprasartsuk et al. (2010b) พบว่า ในระบบการหมักน้ำสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียจากไทยและออสเตรเลียตามธรรมชาติ จะพบยีสต์ที่ดำเนินการหมัก

เป็นหลัก คือ *P. guilliermondii* รองลงมา คือ *H. uvarum* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ (Di Cagno, 2010) รายงานว่า *P. guilliermondii* เป็นยีสต์หลักที่พบในระหว่างการหมักน้ำสับปะรดอิตาเลียนตามธรรมชาติ ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า *P. guilliermondii* ที่พบในน้ำสับปะรดไม่ได้ขึ้นอยู่กับภูมิอากาศ พื้นที่ การปลูก และพื้นที่ของสับปะรด จากรายงานของ Chanprasartsuk et al. (2010b) กล่าวว่า *P. guilliermondii* เป็นประชากรส่วนใหญ่ที่พบในช่วงเริ่มต้นของการหมัก ต่อมา คือ *H. uvarum* เพิ่มจำนวนมากขึ้นจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก โดยมีประชากรเพิ่มขึ้นจาก 5 log CFU/ml เป็น 8 log CFU/ml จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก เอทานอลที่เกิดขึ้นอยู่ในช่วง 1-4% และพบว่า กรดอินทรีย์ของน้ำสับปะรดค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก

มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาคุณภาพด้านกลิ่นรสของไวน์สับปะรด ได้แก่ (Chanprasartsuk et al., 2010a) ศึกษากระบวนการหมักไวน์ที่ใช้ยีสต์ non - *saccharomyces* ที่คัดแยกได้จากการหมักน้ำสับปะรดตามธรรมชาติ โดยทดสอบการยอมรับด้านกลิ่นและรสชาติของไวน์ที่เตรียมจาก multi-starter ระหว่าง *S'codes ludwigii* และ *H. uvarum* เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ทางการค้า พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่น่าสนใจคือ *S'codes ludwigii* สามารถดำเนินการหมักแบบแอลกอฮอล์ได้ดีไม่ต่างจาก *S. cerevisiae* แต่ทั้งนี้เนื่องจาก *S'codes ludwigii* จะสร้างแอลกอฮอล์ในช่วงต้นของการหมักได้ช้ากว่า *S. cerevisiae* ซึ่ง *S'codes ludwigii* จะส่งเสริมให้ *H. uvarum* สามารถเจริญเติบโตในขั้นต้นของการหมักได้ และ *H. uvarum* สร้างสาร 2-phenylacetate ซึ่งให้กลิ่น floral ที่ช่วยให้ไวน์สับปะรดมีกลิ่นรสดีขึ้น สารประกอบที่ระเหยได้ที่พบในไวน์สับปะรด ได้แก่ ethyl decanoate, ethyl dodecanoate, isoamyl alcohol, ethyl acetate, และ 2-phenylethyl acetate ตามลำดับ ต่อมา Chanprasartsuk et al. (2012) ศึกษาการใช้กล้าเชื้อผสมระหว่าง *S'codes ludwigii* และ *H. uvarum* ในการหมักน้ำสับปะรดพันธุ์ภูเก็ต ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกที่มีปริมาณน้ำตาลสูงกว่า แต่มีปริมาณกรดต่ำกว่าสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย จึงสามารถหมักไวน์ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงถึง 14% แต่อันตรกิริยาของกล้าเชื้อผสมนี้แตกต่างจากการหมักน้ำสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ออโตโคนัสไอโซเลทในการหมักไวน์ผลไม้ โดยเฉพาะในการนำมาหมักไวน์สับปะรด

2.6.3 ยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์สับปะรดในงานวิจัยนี้

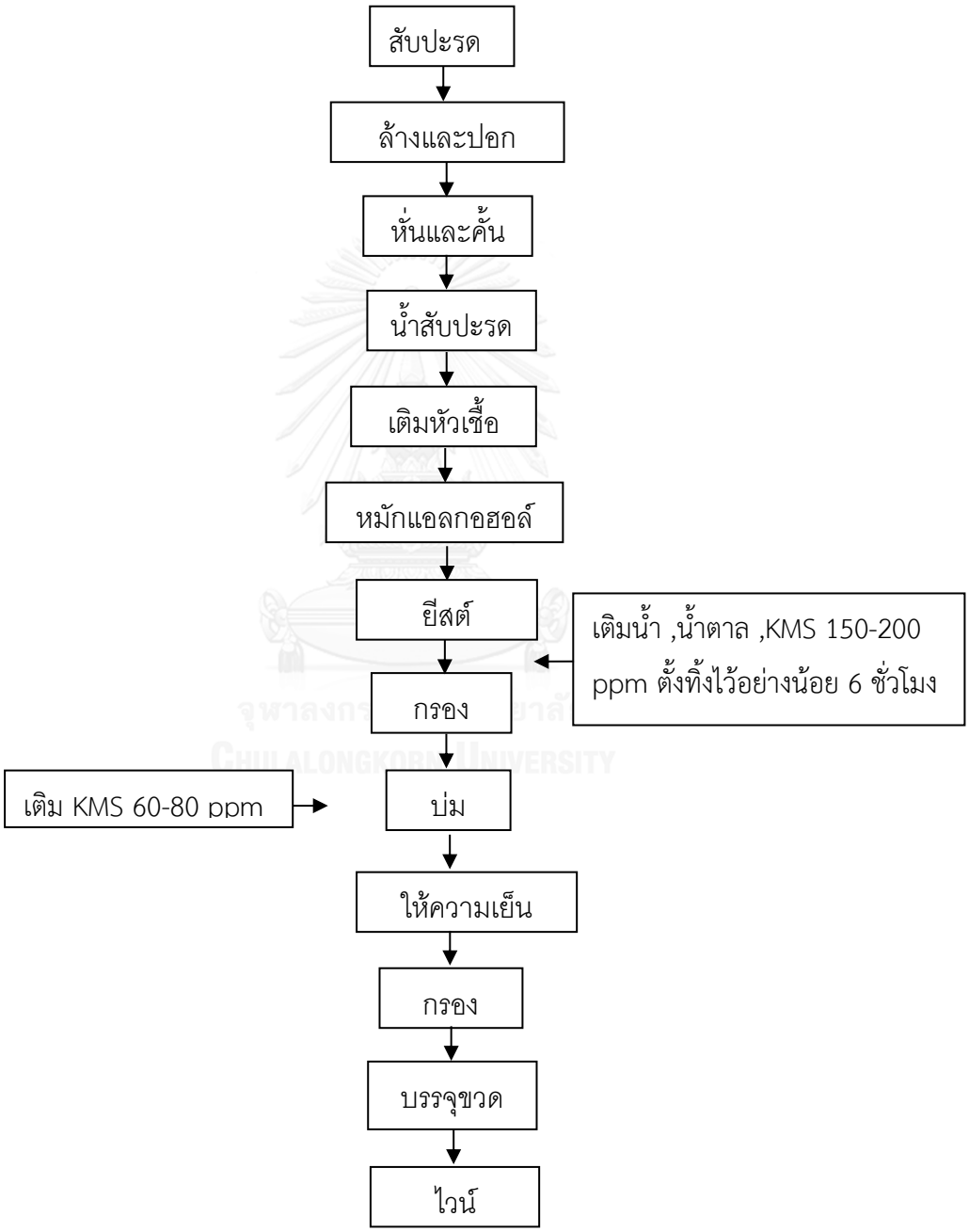
- *Saccharomycodes ludwigii* เป็นยีสต์ที่แยกได้จากน้ำหมักสับปะรดธรรมชาติ ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถสร้างเอทานอลได้มากกว่า 5%(v/v) ที่หมักโดยใช้น้ำสับปะรดเป็นสับสเตรทและมีลักษณะการหมักอื่นๆ ที่คล้ายคลึงกับ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่ใช้ทางการค้า และเมื่อนำมาหมักเป็นกล้าเชื้อผสม พบว่า มีอันตรกิริยาในทางส่งเสริมกัน โดย *S'codes ludwigii* สามารถแสดงบทบาทสำคัญในการเป็นยีสต์หลักที่สร้างเอทานอลและดำเนินการหมักจนเสร็จสมบูรณ์ (Chanprasartsuk et al., 2010b)

- *Hanseniaspora pseudoguilliermondii* เป็นยีสต์ที่แยกได้จากน้ำหมักสับปะรดธรรมชาติ (Hansawat, 2013) ซึ่งสืบพันธุ์โดยวิธี bipolar budding โดยยีสต์สายพันธุ์นี้จะผลิต ascospores และ endospores ที่มีรูปร่างคล้ายหมวก โดย endospores นั้นผลิตได้จาก Yeast extract malt-extract (YM) plate ในขณะที่ ascospores นั้นผลิตจาก cornmeal agar ของกล้าเชื้อ *H. pseudoguilliermondii* ซึ่ง endospores มีรูปร่างเป็นเซลล์แฝดที่เกิดจากเซลล์แม่และเซลล์ลูกสาว โดยไม่แยกกันหลังจากการแตกหน่อ ไม่เหมือนกับผนังเซลล์ของ endospores ที่ ascospores มีเฉพาะไคติน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆจะไม่แสดงรูปแบบเซลล์เช่นนี้ (Imanishi et al., 2010)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.6.4 กระบวนการผลิตไวน์สับปะรด

กระบวนการดั้งเดิมในการหมักไวน์สับปะรดคล้ายกับกระบวนการหมักไวน์ดังรูปที่ 2.6 แต่อย่างไรก็ตามมีการเติมน้ำลงไปในขั้นตอนการเตรียมน้ำหมัก ซึ่งอาจทำให้ขาดกลิ่นรสของน้ำสับปะรดสดดังที่ควรจะเป็น



รูปที่ 2.6 กระบวนการผลิตไวน์สับปะรดแบบดั้งเดิม

ที่มา : ประดิษฐ์ ครุวัณณา (2546)

2.7 การลดกรดในไวน์ผลไม้

ผลไม้แต่ละชนิดประกอบด้วยกรดอินทรีย์ที่แตกต่างกัน ซึ่งกระบวนการผลิตไวน์ผลไม้โดยไม่ต้องใช้วิธีเติมน้ำเพื่อลดความเป็นกรด แต่ใช้การหมักมาโลแลกติกด้วยแบคทีเรียแลกติกดังที่กล่าวไว้ข้างต้นทำให้สามารถลดความเป็นกรดในไวน์ผลไม้ได้

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการลดกรดในไวน์ผลไม้ ได้แก่ Jitjaroen et al. (2013) ศึกษาการลดกรดในไวน์เม่าโดยการหมักมาโลแลกติกด้วยแบคทีเรียมาโลแลกติกสายพันธุ์ทางการค้า Elios1 พบว่า สามารถลดกรดมาลิกจากไวน์เริ่มต้น 1.67 g/L จนหมดไป และมีกรดแลกติกเกิดขึ้นประมาณ 0.85 g/L ไวน์ที่ได้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) จาก 3.0 เพิ่มเป็น 3.2 โดยสามารถลดความเป็นกรดได้ประมาณ 1.05 g/L

2.8 แบคทีเรียแลกติกในสับปะรด

มีรายงานการใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นหัวเชื้อในการหมักผักและผลไม้ในการผลิตผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ ยืดอายุการเก็บ และลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียแลกติกในสับปะรด ได้แก่

Di Cagno (2010) ศึกษาอนุกรมวิธานของยีสต์และแบคทีเรียแลกติกในสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตผลิตภัณฑ์สับปะรดแปรรูป พบว่า ยีสต์เพียงสายพันธุ์เดียวที่คัดแยกได้จากสับปะรด คือ *Pichia guilliermondii* นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแลกติกออโตโคนัส ได้แก่ *L. plantarum* และ *L. rossiae* ซึ่ง *L. plantarum* เป็นแบคทีเรียชนิดหลัก (pre-dominant bacteria) ที่มีสัดส่วนสูงกว่าร้อยละ 75 งานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบเทคนิคการผลิต 5 รูปแบบ คือ การใช้ความร้อนที่ 72 องศาเซลเซียส 15 วินาที (HP), การหมักแบบธรรมชาติที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (FP), การหมักแบบธรรมชาติแล้วให้ความร้อนที่ 72 องศาเซลเซียส 15 วินาที (FHP), การหมักด้วยแบคทีเรียออโตโคนัสที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^7 CFU/ml 24 ชั่วโมง (SP) และการให้ความร้อนที่ 72 องศาเซลเซียส 15 วินาที ก่อนหมักด้วยแบคทีเรียออโตโคนัส 10^7 CFU/ml 24 ชั่วโมง (HSP) หลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ตัวอย่างในการผลิตด้วยเทคนิค HSP และ SP มีจำนวนแบคทีเรียแลกติกมากกว่า 1000 ถึง 1,000,000 เท่า อีกทั้งยังพบว่า มีจำนวนยีสต์ต่ำที่สุด นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ยังมีค่าต่อต้านอนุมูลอิสระ ค่าความแน่นเนื้อ สี กลิ่น และความชอบโดยรวมสูงกว่าการผลิตด้วยเทคนิครูปแบบอื่น

2.8.1 แบคทีเรียแลกติกที่ใช้ในการหมักไวน์สับปะรดในงานวิจัยนี้

- *Lactobacillus brevis* 711 เป็นไอโซเลทที่คัดแยกได้จากน้ำหมักสับปะรดธรรมชาติ แบคทีเรียแลกติกนี้สามารถใช้กรดซิตริกและกรดมาลิกในน้ำสับปะรดเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Hansawat, 2013)
- *Lactobacillus plantarum* 621 เป็นไอโซเลทที่คัดแยกได้จากน้ำหมักสับปะรดธรรมชาติ และมีคุณสมบัติคล้าย *L. brevis* 711 กล่าวคือ สามารถใช้กรดซิตริกและกรดมาลิกในน้ำสับปะรดเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Quintans et al., 2008; Muñoz et al., 2011; Hansawat, 2013)
- *Oenococcus oeni* Enoferm® ALPHA เป็นแบคทีเรียแลกติกสายพันทางการค้าที่นิยมใช้ในการหมักแบบมาโลแลกติก ซึ่งใช้เอนไซม์มาโลแลกติก เพื่อ decarboxylate L-malate เป็น L-lactate มีผลพลอยได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จึงส่งผลให้ pH ของไวน์มีค่าเพิ่มขึ้นและค่าความเป็นกรดมีค่าลดลง (Bartosky, 2005)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ เชื้อจุลินทรีย์ วัสดุ เครื่องมือ/อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย *Ananas comosus* (L.) Merr 'Smooth Cayenne' ระยะสุกทางการค้า ซื้อจากตลาดมหานาค กรุงเทพมหานคร

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

กล้าเชื้อยีสต์

- *Saccharomycodes ludwigii* S1 แยกจากน้ำหมักสับปะรดธรรมชาติ ซึ่งเป็น collection strains ของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระบุสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 26S rDNA (Chanprasartsuk et al., 2010b)

- *Hanseniaspora psuedoguilliermondii* PR1 แยกจากน้ำหมักสับปะรดธรรมชาติ ซึ่งเป็น collection strains ของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระบุสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 26S rDNA (ภาคผนวก ข.3)

กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก

- *Lactobacillus brevis* 711 แยกจากน้ำหมักสับปะรดธรรมชาติ ซึ่งเป็น collection strains ของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระบุสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 16S rDNA (Hansawat, 2013)

- *Lactobacillus plantarum* 621 แยกจากน้ำหมักสับปะรดธรรมชาติ ซึ่งเป็น collection strains ของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระบุสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 16S rDNA (Hansawat, 2013)

- *Oenococcus oeni* Enoferm® ALPHA บริษัท Lallemand MBR® ประเทศออสเตรเลีย

3.1.3 วัสดุ

- Pipetete tip 0.01 ml, Coming incorporated, USA
- Pipetete tip 0.2 ml, Coming incorporated, USA
- Pipetete tip 1 ml, Coming incorporated, USA
- 15×90 mm. plastic petri dish, Eurotubo® Deltalab, Spain

3.1.4 เครื่องมืออุปกรณ์

- Autoclave, SX 700, Tomy, USA
- Balance, AB 204 Mettler Toledo, Switzerland
- Balance, ML1602/01 Mettler Toledo, Switzerland
- Centrifuge, Micro22R Hettich, Germany
- Freezer, SF-C95, Sanyo, Japan
- Hot-air oven, Binder, Germany
- Juice Extractor HR1861, Phillips, Netherlands
- Laminar flow, BioULTRA, Telstar, Spain
- 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
- Refrigerator, MR-F33X-DS Mitsubishi, Japan
- Spectrophotometer, V-530, Jasco, USA
- Vortex mixer Lab-line Instrument Inc., USA
- Vinometer (Alla, France)
- Haemacytometer

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.1.5 สารเคมี

- Acetic acid, MERCK, Germany
- Ammonium molybdate tetrahydrate, MERCK, Germany
- Bromcresol green, Sigma-aldrich, USA
- Citric acid, MERCK, Germany
- Copper (II) sulfate pentahydrate, MERCK, Germany
- Ethanol, analytical grade, Mallinckrodt Chemicals, Netherlands
- Formic acid, MERCK, Germany
- Fumaric acid, MERCK, Germany
- Lactic acid, Sigma-aldrich, USA
- L(-)-Malic acid, Fluka, Switzerland
- Phenolphthalein, Sigma-aldrish, USA
- Potassium sodium tartrate, Sigma-aldrish, USA
- Sodium carbonate, Sigma-aldrish, USA
- Sodium hydrogen carbonate, Sigma-aldrish, USA
- Sodium hydrogen arsenate heptahydrate, Sigma-aldrich, USA
- Sodium hydroxide pellets, QREC, New Zealand
- Sodium sulphate, Sigma-aldrish, USA
- Succinic acid, MERCK, Germany
- Sulfuric acid, Sigma-aldrich, USA
- L(+)-Tartaric acid, MERCK, Germany

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.1.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- De Man, Rogosa and Sharpe agar, MRS agar, Himedia, India
- De Man, Rogosa and Sharpe broth, MRS broth, Himedia, India
- Potato Dextrose Agar, PDA agar, MERCK, Germany
- WL nutrient agar, MERCK, Germany
- Normal saline solution 0.85%(w/v)

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การเตรียมและศึกษาองค์ประกอบทางกายภาพและเคมีของน้ำสับปะรด

3.2.1.1 การเตรียมน้ำสับปะรดสด

นำสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียระยะสุกทางการค้า ที่ซึ่งน้ำสับปะรดมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ประมาณ 12-13°Brix จำนวน 100 กิโลกรัม นำมาปอกเปลือก แล้วคั้นน้ำจะได้ปริมาตรประมาณ 50 ลิตร แบ่งใส่ภาชนะบรรจุปริมาตรละ 5 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์และศึกษารูปแบบการหมัก

3.2.1.2 การเตรียมน้ำสับปะรดสำหรับการหมัก

เตรียมน้ำสับปะรดสำหรับใช้ในการศึกษารูปแบบการหมัก โดยละลายน้ำสับปะรดแช่แข็งที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1.1 วัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (total soluble solid) ของน้ำสับปะรดเริ่มต้น ปรับค่าความหวานให้ได้ 22°Brix ด้วยน้ำตาลทราย แล้วบรรจุน้ำสับปะรดปริมาตร 3,500 มิลลิลิตร ลงในขวดหมักขนาด 5,000 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ppm ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเริ่มต้นกระบวนการหมัก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.2 การศึกษารูปแบบการหมักไวน์สับปะรด

โดยศึกษารูปแบบการหมักไวน์สับปะรด 2 วิธี คือ การหมักแบบ 2 ขั้นตอนและการหมักแบบขั้นตอนเดียว

3.2.2.1 การหมักไวน์สับปะรดแบบ 2 ขั้นตอน

ได้แก่ ขั้นตอนที่ 1 การหมักน้ำสับปะรดแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ ขั้นตอนที่ 2 การหมักแบบมาโลแลกติก (malolactic fermentation)

ก.) การหมักขั้นตอนที่ 1 การหมักน้ำสับปะรดแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ ในรูปแบบ multi-starter ของยีสต์สองชนิด คือ *S'codes ludwigii* S1 และ *H. psuedoguilliermondii* PR1

ก1.) นำยีสต์ผงจากหลอด lyophilize เลี้ยงใน YM broth เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ก2.) เตรียมยีสต์บริสุทธ์ โดยเขี่ยยีสต์ 1 ลูปจากหลอด YM broth จากนั้นจึง streak คัลเจอร์ยีสต์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ก3.) เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ในน้ำสับปะรด โดยนำยีสต์ที่มีอายุ 48 ชั่วโมง จากข้อ ก2. อย่างละ 1 ลูป มาเพาะเลี้ยงในน้ำสับปะรดที่เตรียมจากข้อ 3.2.1.2 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง 25±2 องศาเซลเซียส เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือเมื่อมีจำนวนเซลล์ยีสต์ประมาณ 8 log CFU/ml ตรวจนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วย heamacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ก4.) นำกล้าเชื้อยีสต์ที่เตรียมได้จากข้อ ก3. เติมลงไปในน้ำสับปะรดที่เตรียมได้ จากข้อ 3.2.1.2 โดยใช้อัตราส่วนร้อยละ 1 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและจุลินทรีย์วันที่ 0, 1, 3, 6, 7, 10, 13, 16 และ 20 ดังต่อไปนี้

- ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้ไวโนมิเตอร์ (vinometer) (ภาคผนวก ก.1)
- วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (total soluble solid) โดยใช้ Refractometer (ภาคผนวก ก.4)
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้พีเอชมิเตอร์ (pH meter) (ภาคผนวก ก. 2)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi – Nelson((Somogyi, 1952) (ภาคผนวก ก.5)
- ปริมาณกรด โดยวิธีการไทเทรต (AOAC, 2002) (ภาคผนวก ก.3)
- จำนวนประชากรยีสต์ โดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ WL nutrient agar (Chanprasartsuk et al., 2010b)

จากนั้นนำไวน์สับปะรดที่หมักครบเวลาแล้ว ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Davis et al., 1986) ก่อนนำไปหมักมาโลแลกติก (malolactic fermentation)

ข) การหมักขั้นตอนที่ 2 การหมักแบบมาโลแลกติก(malolactic fermentation)

ข1.) เทส่วนใสของไวน์สับปะรดที่เตรียมได้จากข้อ ก4. ใส่ขวดหมักขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำมาหมักต่อด้วยแบคทีเรียแลกติก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. brevis* 711, *L. plantarum* 621 และแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ทางการค้า *O. oeni* Enoferm® ALPHA ทั้งในรูปแบบ single และ multi-starter ดังแสดงในตาราง 3.1

ตารางที่ 3.1 รูปแบบของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ใช้ในการหมักไวน์สับปะรดในขั้นตอนที่ 2

Single starter	Multi-starter
L. brevis 711	*O.oeni* + *L. brevis* 711
L. plantarum 621	*O.oeni* + *L. plantarum* 621
O. oeni Enoferm® ALPHA	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ข2.) เตรียมแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์ โดยนำหัวเชื้อผงจากหลอด lyophilize เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว de Man Rogasa and Sharpe (MRS) บ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ข3.) เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก นำเชื้อมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man Rogasa and Sharpe (MRS) บ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อ 1 ลูปมาเพาะเลี้ยงในน้ำสับปะรดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ภายใต้สภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ 7 log CFU/ml

ข4.) นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ ข3 .เติมลงในไวน์สับปะรดที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 อัตราส่วนร้อยละ 10 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6

สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี เช่นเดียวกับการหมักด้วยยีสต์ทุกสัปดาห์ และเปลี่ยนจากการตรวจประชากรยีสต์เป็น

- ตรวจจำนวนประชากรแบคทีเรียแลกติกเชื้อเดี่ยว โดยใช้วิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (ภาคผนวก ข.1)
- ตรวจจำนวนประชากรแบคทีเรียแลกติกเชื้อผสม โดยใช้วิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติม Bromcresol green 0.0125 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร (ภาคผนวก ข.2)

3.2.2.2 การหมักไวน์สับปะรดแบบขั้นตอนเดียว คือ การหมักน้ำสับปะรดแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ พร้อมกับการหมักแบบมาโลแลกติกด้วยแบคทีเรียแลกติก

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์และแบคทีเรียแลกติกเช่นเดียวกับการหมักแบบ 2 ขั้นตอน โดยหัวเชื้อยีสต์ที่ใช้ยังคงใช้ในรูปแบบ multi-starter ของยีสต์ 2 ชนิด แต่แบคทีเรียแลกติกใช้เฉพาะรูปแบบ single starter การเตรียมน้ำสับปะรดสำหรับการหมักเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 .2 แต่บรรจุน้ำสับปะรดปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร ลงในขวดหมักขนาด 2,000 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

นำกล้าเชื้อยีสต์และแบคทีเรียแลกติกที่เตรียมได้เติมลงในน้ำสับปะรดที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1 .2 อัตราส่วนร้อยละ 1 และ10 ตามลำดับโดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 13 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติต่าง ๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1 ข้อ ข.4 ทุกวันที่ 0, 1, 3, 6, 7, 10 และ 13

การศึกษาในข้อ 3.2.2.1 และ 3.2.2.2 ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

3.2.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์

เตรียมตัวอย่างน้ำสับปะรดและไวน์สับปะรด โดยกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ด้วย 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 ละลายในน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการชะเป็น 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดกรดอินทรีย์ด้วย Diode Array Detector-G1315 DAD (Agilent) และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม ChemStation การสร้างกราฟมาตรฐานของกรด โดยใช้สารละลายผสมของสารมาตรฐาน กรดซิริก กรดทาร์ทาริก กรดมาลิค กรดซักซินิก กรดแลกติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก ที่ความเข้มข้น 2 g/L และ กรดฟูมาริกที่ความเข้มข้น 0.01 g/L (Hansawat, 2013)

3.2.4 การเตรียมไวน์หลังการหมัก

เมื่อหมักไวน์สับปะรดด้วยแบคทีเรียแลกติกครบเวลาแล้ว เติม KMS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ppm (Navarattara, 2008) ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเทส่วนใสลงในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทดสอบทางประสาทสัมผัส 200 ppm

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.5 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน เสิร์ฟตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในแก้ว classic Liqueur ขนาดปริมาตร 60 มิลลิลิตร และเสิร์ฟในขณะที่ไวน์เย็น กำหนดรหัสตัวเลข 3 ตัว ในการทดสอบความแตกต่าง เสริ์ฟพร้อมกันทุกตัวอย่าง แต่การทดสอบความชอบ เสริ์ฟทีละตัวอย่าง

3.2.5.1 การทดสอบความแตกต่าง (Triangle test)

เพื่อประเมินความแตกต่างด้านกลิ่นรสของไวน์สับปะรด จะดำเนินการทดสอบ 3 ชุด ดังต่อไปนี้

- ชุดที่ 1 เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างกลิ่นรสของไวน์ที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วย multi-starter ของ *L. brevis* กับ *O. oeni* เปรียบเทียบกับกลิ่นรสของไวน์ที่หมักด้วย *L. brevis*
- ชุดที่ 2 เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างกลิ่นรสของไวน์ที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วย multi-starter ของ *L. plantarum* กับ *O. oeni* เปรียบเทียบกับกลิ่นรสของไวน์ที่หมักด้วย *L. plantarum*
- ชุดที่ 3 เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างกลิ่นรสของไวน์ที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วย *O. oeni* เปรียบเทียบกับกลิ่นรสของไวน์ที่หมักแบบขั้นตอนเดียวด้วย *O. oeni*

3.2.5.2 การทดสอบการยอมรับ (Acceptance test)

การทดสอบเพื่อแยกความแตกต่างด้านกลิ่นรสของไวน์ทั้งสามครั้งจากข้อ 3.2.5.1 ในกรณีแยกความแตกต่างได้ จะนำสูตรเดียวไปทดสอบด้านความชอบ แต่หากผลการทดลองพบว่าแยกความแตกต่างไม่ได้ จะนำทุกสูตรไปทดสอบความชอบ การทดสอบการยอมรับจะวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ hedonic scale โดยผู้ชิมจะต้องบันทึกระดับความชอบและไม่ชอบในด้านต่างๆของตัวอย่างออกมาเป็นคะแนน ซึ่งจะใช้ hedonic scale 9 จุด เพื่อทดสอบความชอบด้านสี ความใส กลิ่น ความชอบโดยรวม และกลิ่นรสโดยรวม และ Just About Right 5 จุด เพื่อทดสอบความพอดีด้านรสหวาน รสเปรี้ยว ความฝาด รสขม และความแรงของแอลกอฮอล์ ข้อมูลที่ได้นำมาประมวลผลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

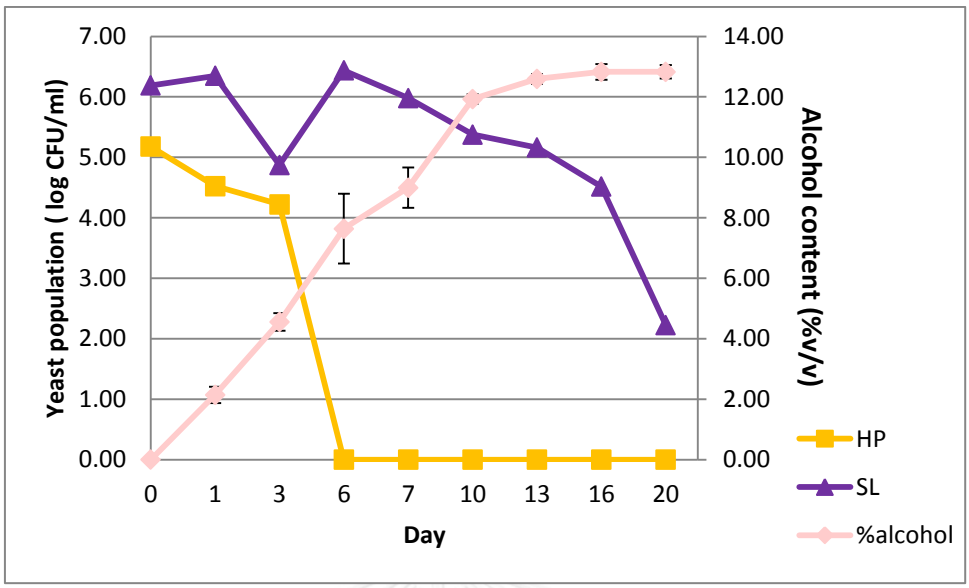
ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง และทำการตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมีกายภาพ และจุลินทรีย์ 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS (PASW Statistics 18, USA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of variance (ANOVA) และคำนวณหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan Multiple Range Test (DMRT)

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

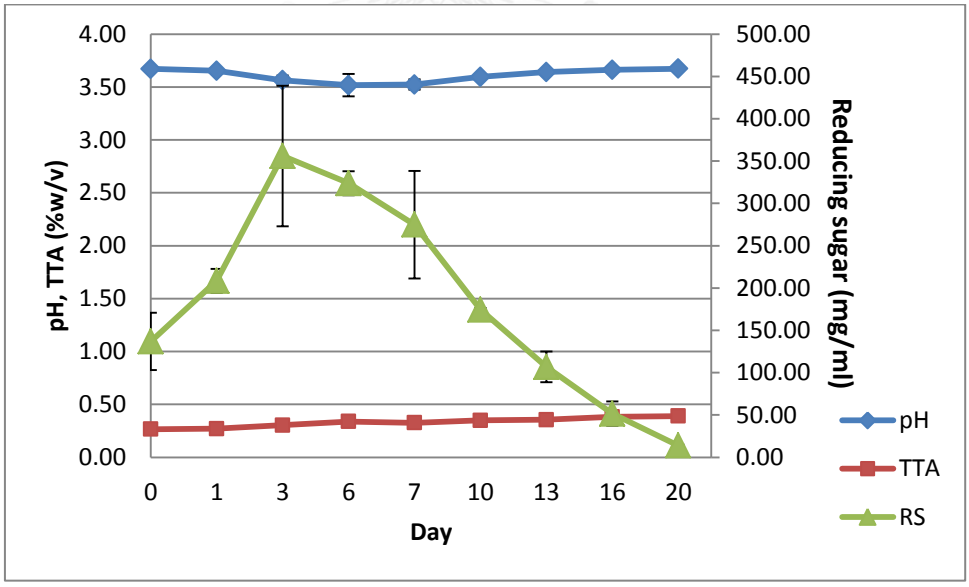
4.1 การเตรียมไวน์สับปะรดและคุณลักษณะของไวน์สับปะรด

รูปที่ 4.1 แสดงรูปแบบการหมักน้ำสับปะรดที่หมักด้วยกล้าเชื้อผสมระหว่างยีสต์ *Hanseniaspora pseudoguilliermondii* และ *Saccharomycodes ludwigii* พบว่า ในวันที่ 1 ของการหมัก *S'codes ludwigii* ที่ซึ่งมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นจำนวน 6 log CFU/ml มีจำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แล้วจึงลดลงในวันที่ 3 ก่อนจะเพิ่มขึ้นจนถึง 6 log CFU/ml ในวันที่ 6 หลังจากนั้นจึงลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึง 2 log CFU/ml ในวันสุดท้ายของการหมัก ในขณะที่จำนวนประชากรของ *H. pseudoguilliermondii* จากจำนวนเริ่มต้นประมาณ 5 log CFU/ml นั้นมีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่องในระหว่างการหมักจนในวันที่ 6 ไม่สามารถตรวจพบเชื้อดังกล่าว เมื่อตรวจวัดปริมาณแอลกอฮอล์พบว่า มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 10 หลังจากนั้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการหมัก ซึ่งมีปริมาณ 12.8%(v/v) ซึ่งรูปแบบการหมักนี้สอดคล้องกับรายงานของ Chanprasartsuk et al. (2010b) ที่หมักด้วยกล้าเชื้อผสมระหว่าง *H. uvarum* และ *S'codes ludwigii* พบว่า *S'codes ludwigii* เป็นยีสต์หลักที่มีบทบาทในการสร้างแอลกอฮอล์ ส่วน *H. uvarum* จะทำหน้าที่สร้างสารให้กลิ่นรส แต่อย่างไรก็ตามอัตราการสร้างแอลกอฮอล์ของยีสต์ในการศึกษานี้จะต่ำกว่าการศึกษาของ Chanprasartsuk ทั้งนี้อาจเนื่องจากงานวิจัยของ Chanprasartsuk นี้ใช้น้ำสับปะรดพาสเจอไรส์และพบว่า ยีสต์สร้างแอลกอฮอล์ได้เร็วถึง 12%(v/v) ในเวลา 7 วัน ในขณะที่การศึกษานี้พบว่า ยีสต์สร้างแอลกอฮอล์ใน 7 วันได้เพียง 9%(v/v) และจะสร้างได้ถึง 12%(v/v) จะต้องใช้เวลาถึง 10 วัน ทั้งนี้อาจเกี่ยวเนื่องจากวิธีการลดการปนเปื้อนซึ่งทำโดยการใช้สาร KMS แทนการให้ความร้อน จึงทำให้น้ำสับปะรดยังคงกิจกรรมโปรตีเอส ซึ่งอยู่ในรูปของเอนไซม์โบรมิเลนอยู่ (Bartolome et al., 2003) และเอนไซม์โบรมิเลนน่าจะมีผลในการยับยั้งกิจกรรมของยีสต์ จึงส่งผลให้อัตราการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ช้าลง ซึ่งการอภิปรายนี้ยืนยันได้จากงานวิจัยของ Keawklin and Boonin (2012)

เมื่อพิจารณาถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (TTA) (รูปที่ 4.2) พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้นระหว่าง 3 วันแรกของการหมัก หลังจากนั้นก็มีค่าลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก ในขณะที่ค่า pH และปริมาณกรดที่ไทเทรตได้มีค่าคงที่ตลอดการหมัก



รูปที่ 4.1 จำนวนประชากรยีสต์ที่มีชีวิตและการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำสับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสม *Hanseniaspora pseudoguilliermondii* และ *Saccharomycodes ludwigii*



รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงค่า pH, TTA (Titratable acidity) และ RS (Reducing sugar) ของน้ำสับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสม *Hanseniaspora pseudoguilliermondii* และ *Saccharomycodes ludwigii*

คุณลักษณะของน้ำสับปะรดสดและไวน์สับปะรดแสดงผลดังตารางที่ 4.1 พบว่า น้ำสับปะรดสดเริ่มต้นมีค่า pH, ปริมาณของแข็งที่ละลายได้(TSS) และปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (TTA) เท่ากับ 3.73, 13.2°Brix และ 0.27%(w/v) ตามลำดับ ไวน์ที่ได้จากการหมักเป็นเวลา 20 วัน มีปริมาณแอลกอฮอล์ 12.80%(v/v) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 13.84 mg/ml ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 7.6 °Brix ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ 0.39%(w/v) และค่า pH 3.68 จะเห็นได้ว่า ค่า pH ของไวน์มีค่าแตกต่างจากน้ำสับปะรดก่อนการหมักอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และค่า TTA มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งรูปแบบหรือชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในน้ำสับปะรดน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมัก

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของกรดอินทรีย์ด้วยเทคนิค HPLC (High performance liquid chromatography) พบว่า น้ำสับปะรดหลังหมักด้วยยีสต์ทั้งสองชนิดจะมีปริมาณกรดซิตริกลดลง 15.16% กรดมาลิกลดลง 61.19% ตามลำดับ

จากการหมักไวน์สามารถลดกรดมาลิกได้ปริมาณมากถึง 61.19% ถือได้ว่ากระบวนการหมักแบบ alcoholic fermentation ด้วยยีสต์ *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* สามารถลดความเป็นกรด (de-acidification) ไปได้ส่วนหนึ่งแต่ก็มีกรดที่ยังเหลืออยู่ โดยที่กรดซิตริกเป็นกรดอินทรีย์หลักที่มีในน้ำสับปะรด รองลงมาคือกรดมาลิก (Akamine, 1976) กรดซิตริกมีอิทธิพลต่อค่า pH และคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของไวน์สับปะรด โดยทั่วไปในการหมักไวน์องุ่น กรดซิตริกถูกผลิตขึ้นโดยยีสต์ในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์มีค่าประมาณ 0.1-0.4 g/l และแตกตัวโดยแบคทีเรียแลกติกระหว่างการหมักมาโลแลกติก ซึ่งเป็นกระบวนการลดความเป็นกรดของไวน์องุ่นโดยการหมักครั้งที่สองด้วยแบคทีเรียแลกติกชนิด *Oenococcus oeni* (Ribereau-Gayon et al., 2000) แต่ในงานวิจัยนี้น้ำสับปะรดมีกรดลดลงเมื่อหมักด้วยยีสต์ทั้งสองชนิด อาจอธิบายได้ว่า ยีสต์อาจเป็นจุดเริ่มต้นในกระบวนการลดความเป็นกรดในน้ำสับปะรด โดยที่การหมักแบบแอลกอฮอล์ในน้ำผลไม้ที่มีกรดซิตริกปริมาณสูงนั้นอาจช่วยลดความเปรี้ยวแหลมในไวน์สับปะรด ทั้งนี้ในประเด็นการลดลงของกรดซิตริกมีรายงานว่า ยีสต์หลายสปีชีส์รวมทั้ง baker yeast ใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตและการหายใจด้วยวัฏจักร tricarboxylic acid อีกทั้งกรดอินทรีย์ยังสามารถแพร่ผ่านเข้าผนังเซลล์ของยีสต์ได้ อย่างไรก็ตามความแตกต่างระหว่างยีสต์ที่ใช้ซิเตรทและไม่ใช้ซิเตรทไม่ได้เกิดจากการมีกลไกในการเมตาบอลิซึมด้วย pathway หลักที่ต่างกัน แต่แตกต่างที่คุณสมบัติในการดูดซึมหรือรับการซึมผ่านของซิตริกเข้าสู่เซลล์ (Barnett and Kornberg, 1960; Cole and Keenan, 1986; Peter et al., 2001; Mira et al., 2010) ซึ่งเมตาบอลิก pathway ของซิเตรทในยีสต์รวมถึงมาเลทยังไม่มีรายงานการศึกษาเชิงลึกถึงกลไกของกระบวนการเมตาบอลิซึมเหมือนในแบคทีเรียแลกติกอย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามการลดลงของกรดมาลิกและกรดซิตริกในไวน์สับปะรดที่ได้ อาจเกิดจาก

โมเลกุลของกรดหลักเหล่านี้ถูกดูดซับไว้ที่ผนังเซลล์ของยีสต์ โดยไม่มีกลไกการย่อยสลายดังที่กล่าวไว้ข้างต้น (Jayaprakashvel et al., 2014) และจากคุณสมบัติดังกล่าวมีการประยุกต์ใช้วิธีการเติมผนังเซลล์ของยีสต์เพื่อใช้ดูดซับกรดมาลิกในการลดความเป็นกรดในไวน์องุ่น (Gao and Fleet, 1995)

ตารางที่ 4.1 คุณลักษณะของน้ำสับปะรดสดและไวน์สับปะรด

	Pineapple fresh	**Pineapple wine**
pH	3.73 [a] ± 0.01	3.68 [b] ± 0.01
°Brix	13.2 [a] ± 0.01	7.6 [b] ± 0.00
TTA %(w/v)	0.27 [b] ± 0.01	0.39 [a] ± 0.00
Alcohol %(v/v)	ND	12.80 ± 0.22
RS (mg/ml)	NA	13.84 ± 2.00
Organic acid (g/l)		
Citric	4.75 [a] ± 0.05	4.03 [b] ± 0.09
Malic	4.38 [a] ± 0.03	1.70 [b] ± 0.02
Tartaric	0.64 ± 0.06	ND
Succinic	0.00 [b] ± 0.03	0.32 [a] ± 0.01
Lactic	ND	ND
Fumaric	ND	ND
Formic	0.11 ± 0.04	ND
Acetic	0.02 ± 0.05	ND

NA=ไม่วิเคราะห์

ND=ตรวจไม่พบ

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบวกลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันระหว่างคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

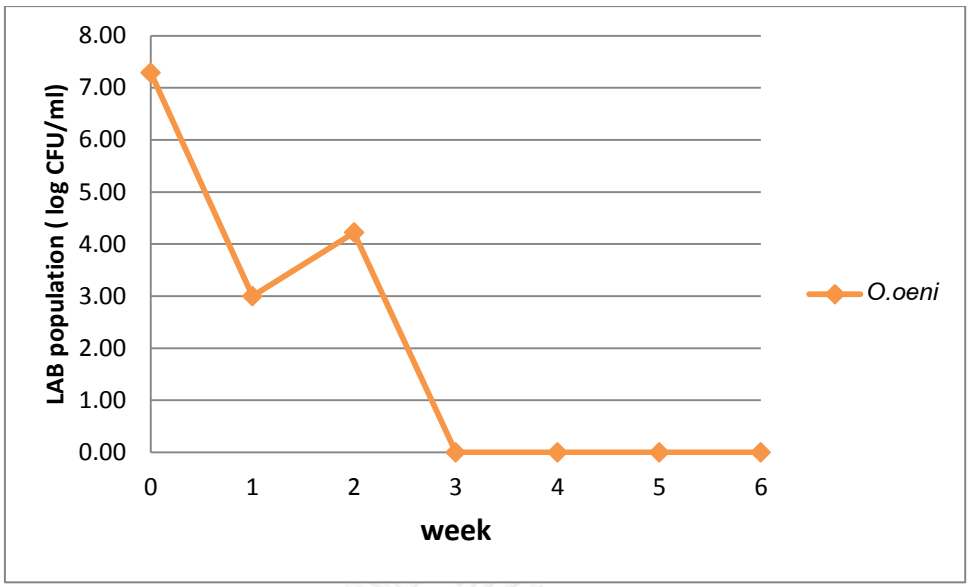
4.2 การศึกษารูปแบบการหมักไวน์สับปะรดด้วยแบคทีเรียแลกติก

4.2.1 การหมักไวน์สับปะรดและลดความเป็นกรดแบบ 2 ขั้นตอน

ประกอบด้วยขั้นตอนที่ 1 คือ การหมักน้ำสับปะรดแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ ในรูปแบบ multi-starter ระหว่างยีสต์สองชนิด คือ *S'codes ludwigii* S1 และ *H. psuedoguilliermondii* PR1 และขั้นตอนที่ 2 คือ การหมักด้วยแบคทีเรียแลกติก ในรูปแบบ single และ multi-starter ของแบคทีเรียแลกติกสามชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแลกติก *L. brevis* 711 และ *L. plantarum* 621 ที่คัดแยกจากน้ำสับปะรดหมักธรรมชาติและแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ทางการค้า *O. oeni* Enoferm® ALPHA ทั้งนี้ในระหว่างกระบวนการหมักติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าต่างๆ ดังนี้

4.2.1.1 การหมักไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว O. oeni Enoferm® ALPHA

ผลดังแสดงในรูปที่ 4.3 เมื่อหมักไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *O. oeni* Enoferm® ALPHA เมื่อพิจารณาถึงการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรของ *O. oeni* พบว่า จำนวนจำนวนประชากรแบคทีเรียแลกติกมีจำนวนลดลงจาก 8 log CFU/ml เหลือ 3 log CFU/ml ในระยะเวลา 2 สัปดาห์แรก และมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 4 log CFU/ml ในสัปดาห์ที่ 2 ของการหมัก หลังจากนั้นประชากรจะลดลงจนกระทั่งตรวจไม่พบเซลล์ที่มีชีวิตจนถึงสัปดาห์สุดท้ายของการหมัก ซึ่งเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพของไวน์สับปะรดจากตารางที่ 4.2 พบว่า pH และ TTA มีค่าลดลง อาจเนื่องมาจาก *O. oeni* เป็นแบคทีเรียแลกติกที่สามารถใช้กรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Fleet, 2003) จึงเปลี่ยนกรดมาลิกซึ่งแตกตัวให้คาร์บอกซิลสองกลุ่มให้เป็นกรดแลก-ติกซึ่งแตกตัวให้คาร์บอกซิลิกกลุ่มเดียว จึงทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลง (Fugelsang and Edwards, 1997) สำหรับค่า TSS และ RS ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอด 6 สัปดาห์ของการหมัก จึงบ่งชี้ได้ว่าการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ไม่น่าจะเกิดจากการสร้างกรดแลกติกของ *O. oeni* จากการใช้น้ำตาล



รูปที่ 4.3 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่มีชีวิตของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยวของ *O. oeni* Enoferm® ALPHA

ตารางที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ,TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *O. oeni* Enoferm® ALPHA เป็นเวลา 6 สัปดาห์

week	pH	TTA %(w/v)	TSS (°Brix)	RS (mg/ml)^{ns}
0	3.66 ^{ab} ±0.00	0.39 ^{a} ±0.01	7.80 ^{a} ±0.00	28.58 ± 3.30
1	3.68 ^{a} ±0.01	0.39 ^{ab} ±0.01	7.67 ^{b} ±0.00	36.29 ± 1.94
2	3.66 ^{ab} ±0.01	0.30 ^{d} ±0.01	7.67 ^{b} ±0.00	32.25 ± 3.18
3	3.63 ^{c} ±0.00	0.33 ^{c} ±0.04	7.67 ^{b} ±0.00	30.71 ± 4.18
4	3.64 ^{bc} ±0.01	0.38 ^{ab} ±0.01	7.64 ^{b} ±0.05	36.38 ± 5.72
5	3.63 ^{c} ±0.00	0.37 ^{ab} ±0.02	7.65 ^{b} ±0.02	28.79 ± 6.78
6	3.63 ^{c} ±0.00	0.36 ^{b} ±0.02	7.63 ^{b} ±0.00	35.33 ± 3.65

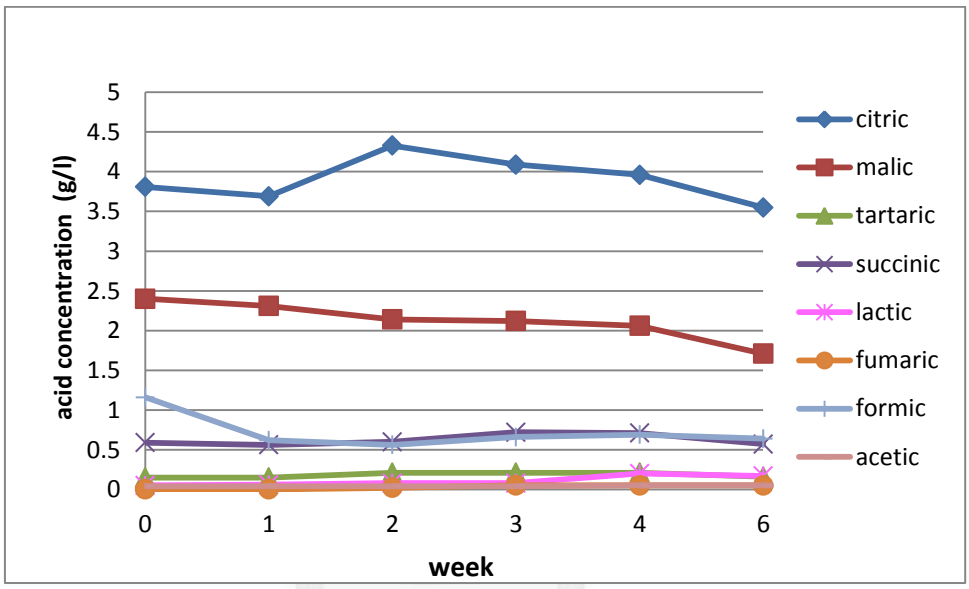
ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบวกลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันระหว่างแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

^{ns} ข้อมูลในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$)

ผลการเปลี่ยนแปลงรูปแบบกรดในไวน์สับปะรดที่หมักด้วย *O. oeni* Enoferm® ALPHA แสดงดังรูปที่ 4.4 พบว่า กรดซิตริกซึ่งเป็นกรดที่มีปริมาณมากที่สุดในไวน์

สับปะรดมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ชัดเจน ในขณะที่กรดมาลิกมีแนวโน้มลดลงและมีค่าลดลงจากสัปดาห์ที่ 0 จาก 2.5 (g/l) เหลือ 1.5 (g/l) ในสัปดาห์ที่ 6 ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจพบกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 โดยสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงค่า TTA และ pH ดังที่กล่าวในข้างต้น ซึ่งจากผล HPLC บ่งชี้ได้ว่า การเปลี่ยนแปลงเกิดจาก *O. oeni* สามารถใช้กรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกในไวน์สับปะรดได้ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของ *O. oeni* ที่อาจสามารถใช้ในการลดกรดในไวน์สับปะรดได้



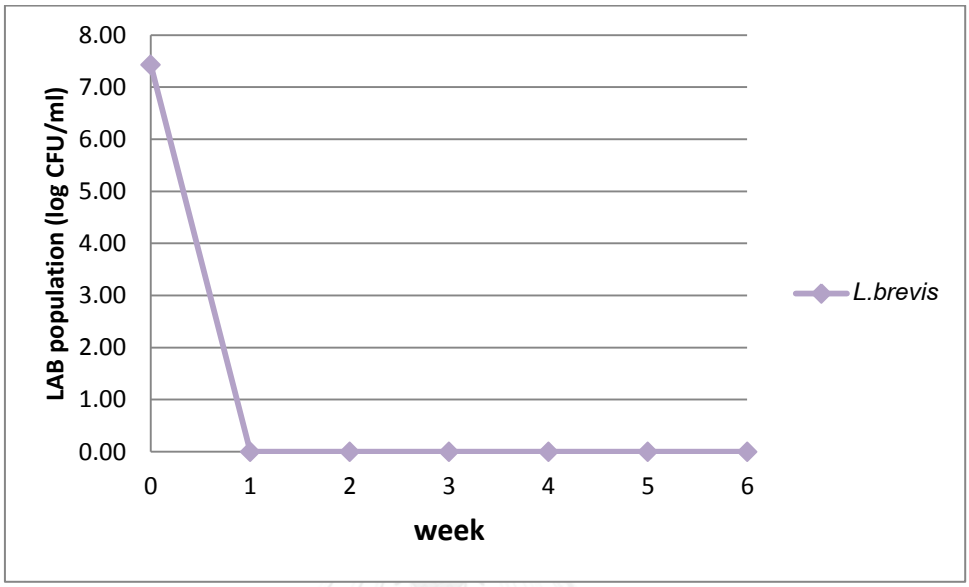
รูปที่ 4.4 ชนิดและปริมาณกรดของไวน์ที่หมักด้วย *O.oeni* Enoferm® ALPH (g/l)

Chulalongkorn University

4.2.1.2 การหมักไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว L. brevis 711

เมื่อหมักไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. brevis* 711 จากรูปที่ 4.5 พบว่า จำนวนประชากรแบคทีเรียแลกติกมีค่าลดลงใน จนตรวจไม่พบเซลล์ที่มีชีวิตตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงตลอดการหมัก แต่กลับพบการเปลี่ยนแปลงสมบัติอื่นๆในระหว่างการหมัก ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า กิจกรรมการหมักยังดำเนินอยู่ โดยพบว่าค่า TTA มีค่าลดลงในสัปดาห์ที่ 1 สำหรับค่า TSS และ RS ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญตลอดการหมัก จึงแสดงให้เห็นว่า ถึงแม้ว่าในกระบวนการหมักไม่มีกิจกรรมที่เกิดจากการเจริญของ *L. brevis* แต่การลดลงของค่า TTA ในสัปดาห์ที่ 1 นั้น อาจเกิดขึ้นเนื่องจากเซลล์ของ *L. brevis* พยายามปรับตัวเข้ากับสภาวะเครียดที่เกิดจากความเป็นพิษของแอลกอฮอล์ในไวน์ จึงมีการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการใช้แหล่งคาร์บอนจากโมเลกุลของกรดอินทรีย์สำหรับสร้างพลังงาน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอินทรีย์ (Srisuvor et al., 2013) ซึ่ง

มีรายงานว่า *L. brevis* เป็นแบคทีเรียแลกติกที่สร้างเอนไซม์ชนิด malolactic enzyme (decarboxylase) และ citrate lyase ดังกล่าวได้ (Muñoz et al., 2011)



รูปที่ 4.5 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่มีชีวิตของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยวของ *L. brevis* 711

ตารางที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ,TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. brevis* 711 เป็นเวลา 6 สัปดาห์

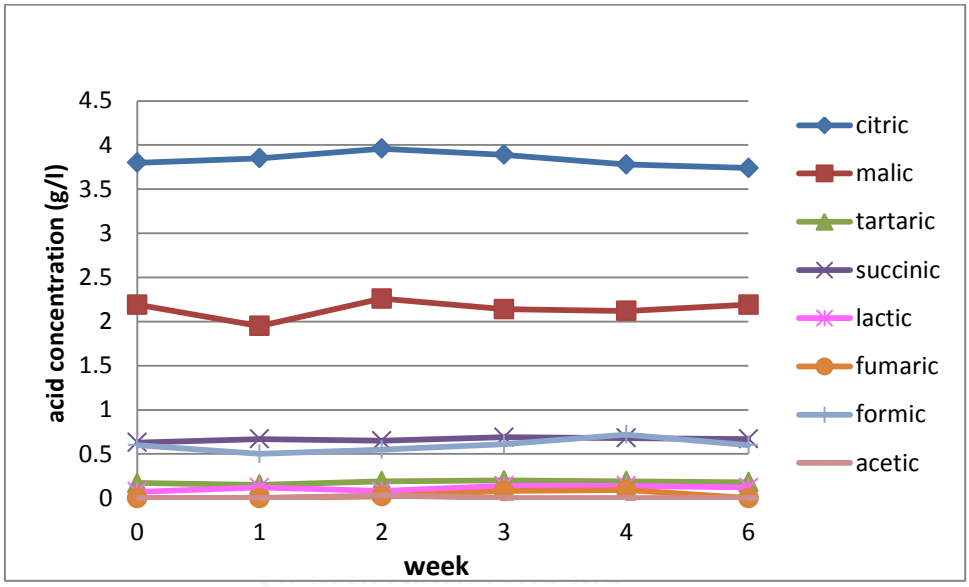
week	pH[ns]	TTA %(w/v)	TSS (°Brix)[ns]	RS (mg/ml)[ns]
0	3.69 ± 0.02	0.36[ab] ±0.01	7.63 ± 0.14	37.96 ± 8.31
1	3.71 ± 0.01	0.34[b] ±0.01	7.72 ± 0.12	46.58 ± 13.20
2	3.72 ± 0.03	0.35[ab] ±0.01	7.70 ± 0.14	31.42 ± 5.77
3	3.71 ± 0.02	0.36[ab] ±0.01	7.64 ± 0.05	29.63 ± 13.49
4	3.72 ± 0.03	0.36[ab] ±0.02	7.45 ± 0.31	28.79 ± 4.89
5	3.67 ± 0.01	0.36[a] ±0.02	7.34 ± 0.38	28.83 ± 3.18
6	3.68 ± 0.02	0.36[a] ±0.01	7.39 ± 0.40	26.79 ± 3.83

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบวกลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันระหว่างแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

[ns] ข้อมูลในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$)

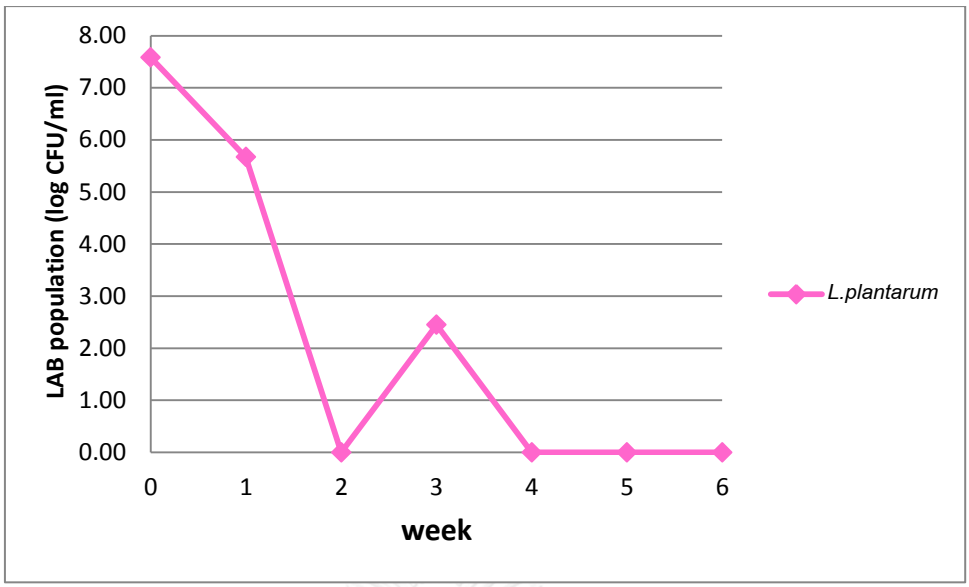
เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงรูปแบบกรดของไวน์สับปะรดที่หมักด้วย *L. brevis* แสดงดังรูปที่ 4.6 พบว่า กรดชนิดต่างๆมีแนวโน้มคงที่ตลอดการหมัก ยกเว้นกรดมาลิกที่มีค่าลดลงในสัปดาห์ที่ 1 (ซึ่งสอดคล้องกับค่า TTA ที่ลดลงในสัปดาห์ที่ 1) จากรายงานของ (Muñoz et al., 2011) พบว่า *L. brevis* มีสมบัติในการใช้กรดเป็นแหล่งคาร์บอน โดยสามารถใช้กรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอนได้ เช่นเดียวกับ *O. oeni* แต่การลดลงแค่เพียงสัปดาห์แรกนั้นอาจเนื่องจากเซลล์ไม่สามารถเจริญในไวน์สับปะรดได้ อาจเนื่องจากพิษของแอลกอฮอล์หรือสภาวะอื่นๆทำให้ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมใดๆในระหว่างการหมักอย่างชัดเจนได้



รูปที่ 4.6 ชนิดและปริมาณกรดของไวน์ที่หมักด้วย *L. brevis* 711 (g/l)

4.2.1.3 การหมักไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว L. plantarum *621*

เมื่อหมักไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum* 621 จากรูปที่ 4.7 พบว่า จำนวนประชากรแบคทีเรียแลกติกลดลง 2 log CFU/ml ในสัปดาห์แรก และตรวจไม่พบเซลล์ที่มีชีวิตในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 2.5 log CFU/ml ในสัปดาห์ที่ 3 ก่อนที่จะตรวจไม่พบในสัปดาห์ที่ 4 ถึง 6 ค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 5 และ 6 ในขณะที่ค่า TTA มีความแปรปรวนในช่วงสัปดาห์ที่ 1 ถึง 4 และในสัปดาห์ที่ 5 และ 6 มีค่าไม่แตกต่างจากไวน์เริ่มต้น ส่วนค่า RS พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังตารางที่ 4.4



รูปที่ 4.7 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่มีชีวิตของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยวของ *L. plantarum* 621

ตารางที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ,TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum* 621 เป็นเวลา 6 สัปดาห์

week	pH	TTA %(w/v)	TSS (°Brix)^{ns}	RS (mg/ml)^{ns}
0	3.68^{a} ± 0.01	0.36^{abc} ±0.00	7.70 ± 0.05	30.08 ± 6.60
1	3.68^{a} ±0.02	0.34^{c} ±0.02	7.74 ± 0.09	34.96 ± 11.49
2	3.69^{a} ±0.02	0.35^{bc} ±0.01	7.68 ± 0.14	36.63 ± 9.72
3	3.69^{a} ±0.01	0.36^{ab} ±0.01	7.57 ± 0.14	32.42 ± 10.61
4	3.68^{a} ±0.01	0.36^{abc} ±0.02	7.48 ± 0.21	26.08 ± 4.83
5	3.65^{b} ±0.01	0.37^{a} ±0.02	7.44 ± 0.24	24.21 ± 1.24
6	3.66^{ab} ±0.01	0.37^{a} ±0.01	7.47 ± 0.19	27.63 ± 2.65

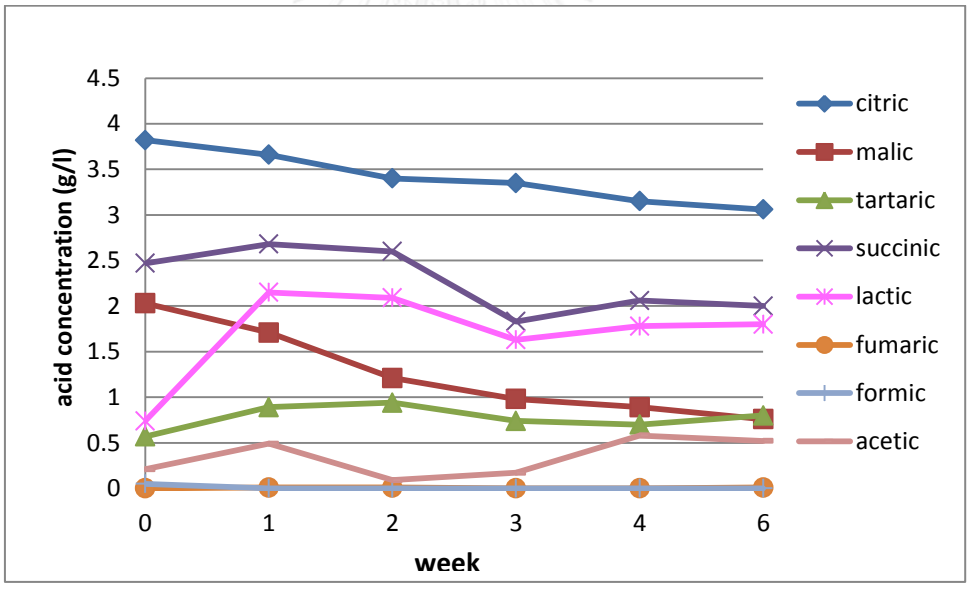
ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบวกลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันระหว่างแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

^{ns} ข้อมูลในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$)

การเปลี่ยนแปลงรูปแบบกรดของไวน์สับปะรดที่หมักด้วย *L. plantarum* 621 พบว่า *L. plantarum* เป็นแบคทีเรียที่อยู่รอดในไวน์สับปะรดได้ดีกว่า เมื่อเทียบ *O. oeni* โดย

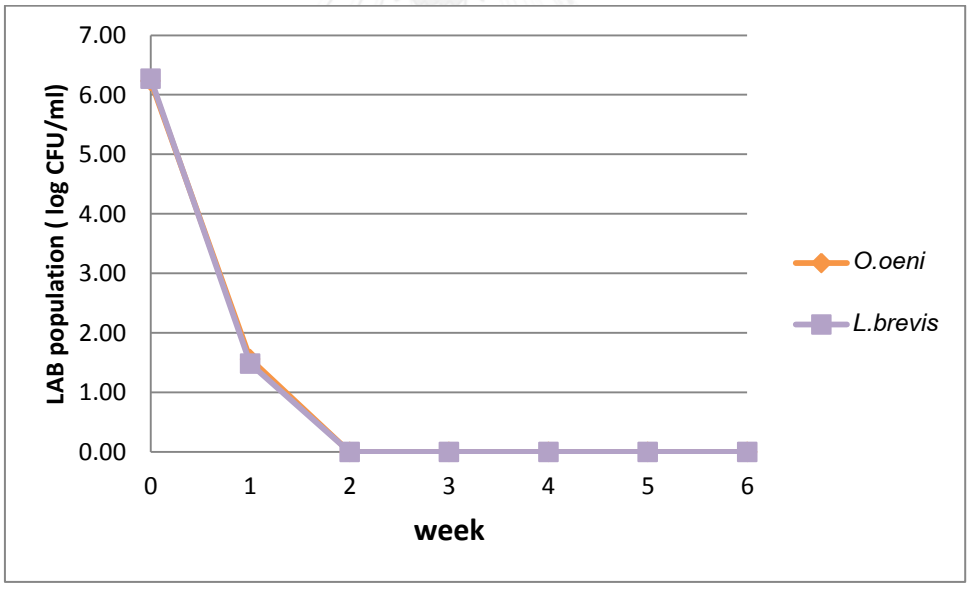
ในการหมักด้วยแบคทีเรียแลกติกชนิดนี้ จะพบแนวโน้มการลดลงของกรดซิตริกและกรดมาลิก และการเพิ่มขึ้นของกรดแลกติกได้อย่างชัดเจนดังรูปที่ 4.8 ซึ่งมีรายงานว่า *L. plantarum* มีสมบัติในการหมัก malolactic fermentation ที่ซึ่งสามารถใช้กรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอนได้เช่นเดียวกับ *O. oeni* และ *L. brevis* และยังมีรายงานอีกว่า *L. plantarum* มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ย่อยกรด ซิตริกได้ ซึ่งก็คือ citrate lyase (Muñoz et al., 2011) เมตาบอไลท์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะกลายเป็นสารระเหยที่ให้กลิ่นที่ดีได้ (Lerm et al., 2011) และแบคทีเรียชนิดดังกล่าวบางสายพันธุ์ได้ถูกพัฒนาให้เป็น LAB สายพันธุ์ทางการค้าสำหรับใช้ในการลดความเป็นกรดของไวน์องุ่นเพื่อใช้ในการลดกรดอินทรีย์อื่นๆนอกเหนือจากกรดมาลิกได้ (Quintans et al., 2008) นอกจากนี้ *L. plantarum* ยังเป็นจุลินทรีย์ที่เป็น normal flora ที่มีอยู่ในน้ำสับปะรดที่หมักธรรมชาติได้ จึงสามารถเจริญในน้ำสับปะรดและใช้สารต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลและกรดอินทรีย์ในน้ำสับปะรดได้ดี ซึ่งเป็นคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็น autochtonous (Degre, 1993; Di Cagno, 2010; Hansawat and Prakitchaiwattana, 2013)



รูปที่ 4.8 ชนิดและปริมาณกรดของไวน์ที่หมักด้วย *L.plantarum* 621 (g/l)

4.2.1.4 การหมักด้วยกล้าเชื้อผสม O. oeni Enoferm® ALPHA และ L. brevis 711

เมื่อหมักไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม *O. oeni* Enoferm® ALPHA และ *L. brevis* 711 พบว่า แบคทีเรียแลกติกทั้ง *O. oeni* และ *L. brevis* มีจำนวนลดลงประมาณ 5 log CFU/ml ระหว่างการหมักในช่วงสัปดาห์ที่ 0 ถึง 1 หลังจากนั้นตรวจไม่พบจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่มีชีวิตดังรูปที่ 4.9 และจากตารางที่ 4.5 พบว่า ค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 6 ($p \leq 0.05$) และค่า TTA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 3 และ 6 ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ค่า TSS มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย แต่ค่า RS มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเพิ่มจากค่า TSS ในไวน์เริ่มต้นมีปริมาณมากกว่าการหมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว จึงมีความเป็นไปได้ที่การหมักไวน์สับปะรดด้วยแบคทีเรียแลกติกที่มีปริมาณน้ำตาลที่เข้มข้นขึ้นทั้งสองชนิดจะเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียแลกติกพยายามสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ในขณะเดียวกันหลังจากการพยายามสร้างเอนไซม์ดังกล่าวเซลล์ก็ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมการหมักต่อไปได้



รูปที่ 4.9 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่มีชีวิตของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของ *O. oeni* Enoferm® ALPHA + *L. brevis* 711

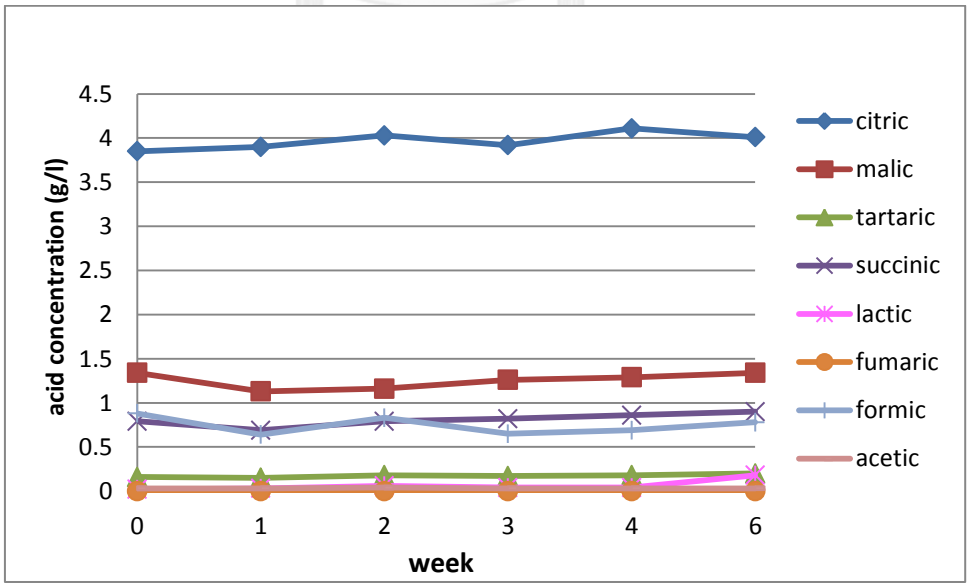
ตารางที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ,TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม *O. oeni* Enoferm® ALPHA และ *L. brevis* 711 เป็นเวลา 6 สัปดาห์

week	pH	TTA %(w/v)	TSS (°Brix)	RS (mg/ml)
0	3.68 ^{ab} ±0.00	0.35 ^{c} ±0.01	8.40 ^{de} ±0.19	36.96 ^{c} ±6.66
1	3.66 ^{bcd} ±0.01	0.36 ^{ab} ±0.00	8.34 ^{e} ±0.05	42.71 ^{bc} ±1.47
2	3.66 ^{cd} ±0.00	0.35 ^{bc} ±0.00	8.87 ^{a} ±0.00	55.58 ^{ab} ±1.41
3	3.69 ^{a} ±0.01	0.31 ^{e} ±0.01	8.85 ^{a} ±0.02	55.92 ^{ab} ±10.02
4	3.67 ^{bc} ±0.02	0.36 ^{a} ±0.00	8.77 ^{ab} ±0.05	59.96 ^{a} ±0.29
5	3.67 ^{bc} ±0.00	0.35 ^{b} ±0.00	8.57 ^{cd} ±0.00	41.63 ^{c} ±3.24
6	3.65 ^{d} ±0.00	0.34 ^{d} ±0.01	8.64 ^{bc} ±0.05	60.21 ^{a} ±6.89

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบวกลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันระหว่างแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

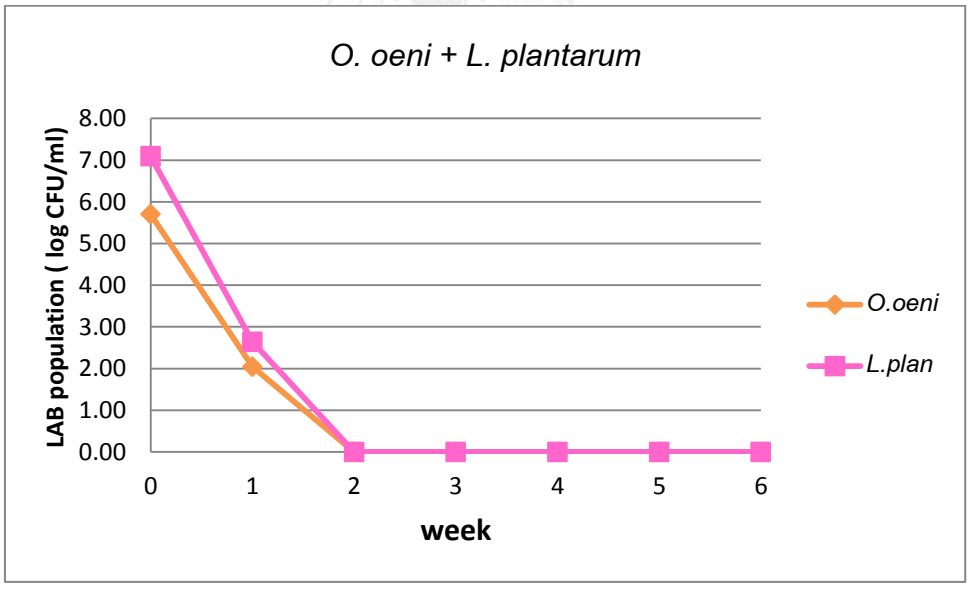
การเปลี่ยนแปลงรูปแบบกรดของไวน์สับปะรดที่หมักด้วยกล้าเชื้อผสม *O. oeni* และ *L. brevis* พบว่า กรดซิตริก กรดมาลิกและกรดแลกติก รวมถึงกรดชนิดอื่นๆมีแนวโน้มคงที่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เซลล์ไม่ดำเนินกิจกรรมใดๆ ทั้งในเรื่องของการใช้น้ำตาล รวมถึงกรดอินทรีย์ต่างๆ



รูปที่ 4.10 ชนิดและปริมาณกรดของไวน์ที่หมักด้วย *O. oeni* Enoferm® ALPH + *L. brevis* 711 (g/l)

4.2.1.5 การหมักด้วยกล้าเชื้อผสม O. oeni Enoferm® ALPHA และ L. plantarum 621

เมื่อหมักไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม *O. oeni* Enoferm® ALPHA และ *L. plantarum* 621 นั้น *O. oeni* มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นน้อยกว่า *L. plantarum* ประมาณ 1 log CFU/ml แต่พบว่า กล้าเชื้อทั้งสองชนิดมีอัตราการลดลงคล้ายกัน คือ มีจำนวนลดลง 4 log CFU/ml ในสัปดาห์ที่ 1 ของการหมัก และตรวจไม่พบเซลล์ที่มีชีวิตตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นไปดังรูปที่ 4.11 จากตารางที่ 4.6 พบว่า ค่า pH มีค่าลดลงจากสัปดาห์ที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ค่า TTA มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 3 และ 6 ($p \leq 0.05$) สำหรับค่า TSS และค่า RS มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งการที่ค่า TSS มีค่าเพิ่มขึ้นอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณของกรดอินทรีย์ที่ละลายในไวน์สับปะรด ส่งผลให้ค่า refractive index ของไวน์เปลี่ยนไป ส่วนการเพิ่มขึ้นของค่า RS อาจเกิดจากการที่เซลล์พยายามปรับตัวโดยการแข่งขันเพื่อที่จะอยู่รอดและสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว



รูปที่ 4.11 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่มีชีวิตของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของ *O. oeni* Enoferm® ALPHA + *L. plantarum* 621

ตารางที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ,TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม *O. oeni* Enoferm® ALPHA และ *L. plantarum* 621 เป็นเวลา 6 สัปดาห์

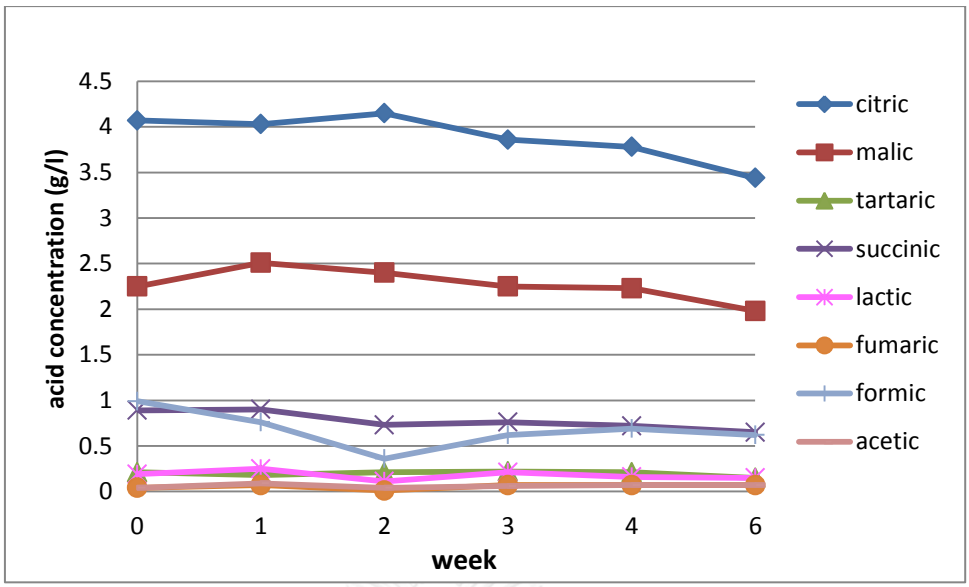
week	pH	TTA %(w/v)	TSS(°Brix)	RS (mg/ml)
0	3.67 ^{ab} ±0.00	0.35 ^{bc} ±0.01	8.15 ^{b} ±0.21	33.04 ^{b} ±5.60
1	3.66 ^{b} ±0.01	0.35 ^{ab} ±0.00	8.12 ^{b} ±0.16	43.54 ^{b} ±3.24
2	3.65 ^{b} ±0.00	0.35 ^{ab} ±0.00	8.77 ^{a} ±0.14	58.17 ^{a} ±1.30
3	3.68 ^{a} ±0.01	0.32 ^{d} ±0.01	8.80 ^{a} ±0.05	56.88 ^{a} ±7.01
4	3.67 ^{ab} ±0.01	0.36 ^{a} ±0.00	8.54 ^{a} ±0.05	54.75 ^{a} ±7.78
5	3.66 ^{b} ±0.00	0.35 ^{ab} ±0.00	8.53 ^{a} ±0.00	40.42 ^{b} ±0.82
6	3.65 ^{b} ±0.00	0.34 ^{c} ±0.00	8.53 ^{a} ±0.00	57.54 ^{a} ±1.59

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบวกลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันระหว่างแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

การเปลี่ยนแปลงรูปแบบกรดของไวน์สับปะรดที่หมักด้วยกล้าเชื้อผสม *O. oeni* และ *L. plantarum* พบว่า กรดซิตริกมีค่าลดลงจากค่าเริ่มต้นอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่กรดมาลิกและกรดแลกติกมีค่าค่อนข้างคงที่จากค่าเริ่มต้น ทั้งนี้อาจเกิดจาก *L. plantarum* ใช้กรดซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อสร้างสารประกอบทุติยภูมิ เช่นเดียวกับที่พบในการหมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยวของ *L. plantarum* (Muñoz et al., 2011) ส่วน *O. oeni* ไม่สามารถใช้กรดมาลิกเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมได้เหมือนกับการหมักแบบกล้าเชื้อเดี่ยว

เนื่องจากการหมักแบบสองขั้นตอนนั้นพบว่า แบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่ยกเว้น *L. plantarum* ไม่สามารถปรับตัวเพื่อเจริญและดำเนินกิจกรรมการหมักในไวน์สับปะรดได้ดีนัก ประกอบกับการหมักรูปแบบนี้ใช้เวลานาน ดังนั้นการศึกษาต่อไปจึงประเมินวิธีการหมักเพื่อลดความเป็นกรดด้วยการหมักแบบขั้นตอนเดียว



รูปที่ 4.12 ชนิดและปริมาณกรดของไวน์ที่หมักด้วย *O. oeni* Enoferm® ALPHA + *L. plantarum* 621(g/l)

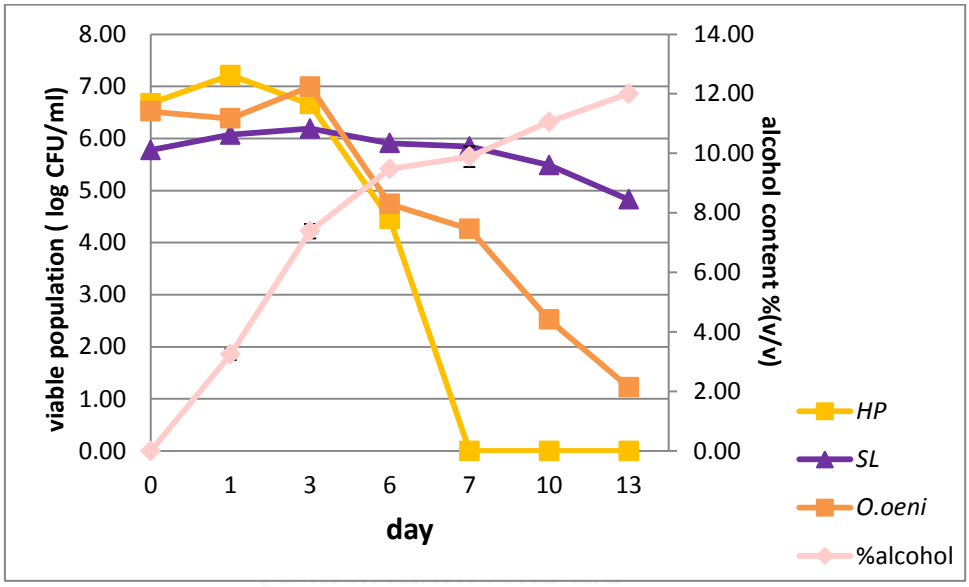
.4.22 การหมักไวน์สับปะรดและลดความเป็นกรดแบบขั้นตอนเดียว

การหมักน้ำสับปะรดแบบขั้นตอนเดียว เป็นการหมักน้ำสับปะรดแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ ในรูปแบบ multi-starter ของยีสต์สองชนิดพร้อมกับแบคทีเรียแลกติกกล้าเชื้อเดี่ยวทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวข้างต้น โดยหมักเป็นเวลา 13 วัน ซึ่งเป็นวันที่ยีสต์สร้างแอลกอฮอล์ได้ถึง 12%(v/v) และติดตามการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรของกล้าเชื้อแต่ละชนิด, ค่า pH, TTA, TSS, RS และปริมาณแอลกอฮอล์ทุกวันที่ 0, 1, 3, 6, 7, 10 และ 13 ของการหมัก

4.2.2.1 การหมักน้ำสับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม H .pseudoguilliermondii และ S'codes ludwigii และ O. oeni Enoferm® ALPHA

เมื่อหมักน้ำสับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *O. oeni* Enoferm® ALPHA ดังรูปที่ 4.13 พบว่า ยีสต์ทั้งสองชนิดมีการเจริญคล้ายกับการหมักไวน์สับปะรดแบบสร้างแอลกอฮอล์ปกติ กล่าวคือ *H. Pseudoguilliermondii* มีจำนวนประชากรค่อนข้างคงที่ในการหมัก 6 วันแรก หลังจากนั้นไม่พบเซลล์ที่มีชีวิตตลอดการหมัก ในขณะที่ประชากรยีสต์ *S'codes ludwigii* มีแนวโน้มคงที่ตลอดการหมักใน 10 วัน สำหรับประชากรแบคทีเรียแลกติก *O. oeni* มีจำนวนเพิ่มขึ้น 0.5 log CFU/ml ในวันที่ 3 ของการหมัก หลังจากนั้นจึงลดลงตลอดระยะเวลาจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก จากตารางที่ 4.7 ค่า pH มีค่าลดลง

อย่างมีนัยสำคัญโดยสัมพันธ์กับค่า TTA ที่มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากไวน์เริ่มต้น ($p \leq 0.05$) ค่า TSS และค่า RS มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากไวน์เริ่มต้น ($p \leq 0.05$) ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณแอลกอฮอล์ที่มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการหมักดังรูปที่ 4.13 ซึ่งค่า TSS และ RS นั้นมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับการหมักไวน์แบบปกติ เนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลเพื่อสร้างแอลกอฮอล์และ *O. oeni* อาจใช้น้ำตาลเพื่อเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก ค่า TTA จึงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และการที่กรดแลกติกเพิ่มมากขึ้นนั้น อาจมีผลทำให้ค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์และจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์และกล้าเชื้อเดี่ยวแบคทีเรียแลกติก *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *O. oeni* Enoferm® ALPHA

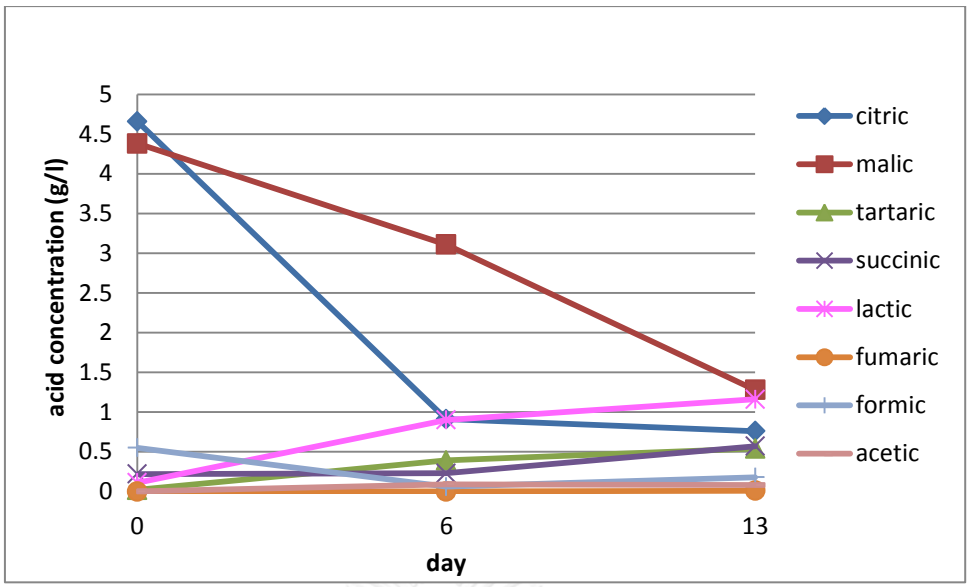
ตารางที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ,TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *O. oeni* Enoferm® ALPHA เป็นเวลา 13 วัน

Day	pH	TTA %(w/v)	TSS (°Brix)	RS (mg/ml)
0	3.69 ^{a} ± 0.01	0.27 ^{e} ± 0.00	21.71 ^{a} ±0.10	128.00 ^{c} ±12.91
1	3.59 ^{c} ±0.01	0.30 ^{d} ±0.00	19.04 ^{b} ±0.15	173.63 ^{b} ±9.90
3	3.58 ^{c} ±0.01	0.30 ^{d} ±0.00	15.72 ^{c} ±0.09	270.88 ^{a} ±15.98
6	3.58 ^{c} ±0.01	0.35 ^{b} ±0.00	11.33 ^{d} ±0.60	169.06 ^{b} ±6.09
7	3.62 ^{b} ±0.01	0.32 ^{c} ±0.01	11.68 ^{d} ±0.18	118.81 ^{c} ±8.11
10	3.62 ^{b} ± 0.00	0.35 ^{b} ± 0.01	8.86 ^{e} ±0.23	57.00 ^{d} ± 5.52
13	3.64 ^{b} ±0.01	0.36 ^{a} ±0.01	7.67 ^{f} ±0.15	21.25 ^{e} ±8.76

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบวกลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันระหว่างแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

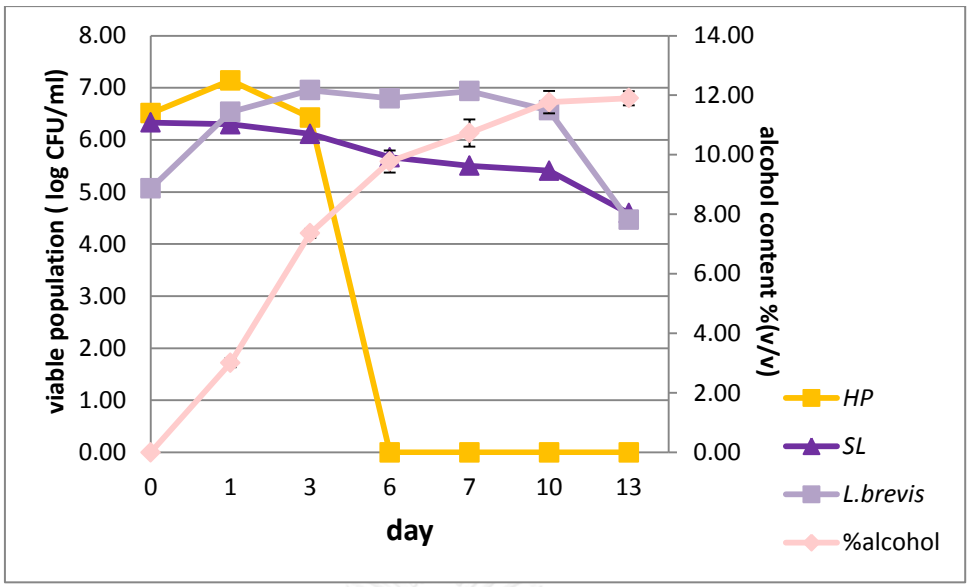
จากรูปที่ 4.14 การหมักไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์และกล้าเชื้อเดี่ยวแบคทีเรียกรดแลกติก *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *O. oeni* Enoferm® ALPHA พบว่า กรดซิตริกและกรดมาลิกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยกรดซิตริกมีค่าลดลงจาก 4.7 g/L เหลือประมาณ 1 g/l ใน 6 วันแรกของการหมัก หลังจากนั้นจึงมีค่าคงที่ แต่กรดมาลิกลดลงอย่างต่อเนื่องจาก 4.4 g/L เหลือประมาณ 1.3 g/l ในวันที่ 13 ของการหมัก อาจอธิบายได้ว่า ยีสต์ทั้งสองชนิดใช้น้ำตาลในการสร้างแอลกอฮอล์และดูดซับกรดซิตริกไว้ที่ผนังเซลล์(Fleet, 1995) เป็นแหล่งคาร์บอนอีกด้วย และการที่กรดซิตริกลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับการหมักไวน์แบบไม่เติมแบคทีเรียแลกติก อาจเกิดจากจุลินทรีย์มีจำนวนหลายชนิด จึงหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์ทั้งสามชนิดเร่งหรือแข่งขันกันใช้แหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณมาก (ที่เซลล์แต่ละชนิดสามารถใช้ได้) เพื่อดำเนินกิจกรรมการหมัก (Costantini et al., 2009) ในขณะที่ *O. oeni* สามารถใช้กรดมาลิกได้ จึงทำให้กรดมาลิกลดลงอย่างรวดเร็วและมีการสร้างกรดแลกติกเพิ่มขึ้น ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่า การหมักไวน์เพื่อลดความเป็นกรดแบบขั้นตอนเดียวในการทดลองนี้สามารถหมักแบบสร้างแอลกอฮอล์และหมักแบบมาโลแลกติกตลอดจนลดกรดซิตริกไปพร้อมกัน



รูปที่ 4. 14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์และกล้าเชื้อเดี่ยวแบคทีเรียกรดแลกติก *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *O. oeni* Enoferm® ALPHA

4.2.2.2 การหมักน้ำสับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม H .pseudoguilliermondii และ S'codes ludwigii และ L .brevis 711

เมื่อหมักน้ำสับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *L. brevis* 711 จากรูปที่ 4.15 พบว่า กล้าเชื้อยีสต์มีการเปลี่ยนแปลงเหมือนกับการหมักไวน์แบบไม่เติมแบคทีเรียแลกติกและแบบหมักพร้อมกับ *O. oeni* แต่พบว่า *L. brevis* มีจำนวนประชากรเพิ่มขึ้นถึง 2 log CFU/ml ใน 3 วันแรก หลังจากนั้นมีจำนวนคงที่จนถึงวันที่ 10 และเริ่มลดลงในวันที่ 13 เมื่อเปรียบเทียบกับ *O. oeni* จะเห็นได้ว่า *L. brevis* เจริญในน้ำหมักได้ดีกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจาก *L. brevis* เป็น autochtonous แบคทีเรีย จึงมีความคุ้นเคยกับน้ำสับปะรด ทำให้สามารถปรับตัวได้ดีกว่า ใช้สารอาหารเพื่อเพิ่มจำนวนและดำเนินกิจกรรมการหมักได้ดี ซึ่ง *L. brevis* เหมาะกับการหมักในสภาวะนี้ สามารถเจริญและมีชีวิตอยู่ได้ (Degre, 1993; Di Cagno, 2010; Hansawat and Prakitchaiwattana, 2013) แต่ไม่เจริญในการหมักแบบสองขั้นตอน จากตารางที่ 4.8 พบว่า การเปลี่ยนแปลงค่า pH, TTA ,TSS และ RS คล้ายคลึงกับการหมักด้วยกล้าเชื้อผสม *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *O. oeni* Enoferm® ALPHA กล่าวคือ ค่า pH มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยสัมพันธ์กับค่า TTA ที่มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากไวน์เริ่มต้น ($p \leq 0.05$) ส่วนค่า TSS และค่า RS มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากไวน์เริ่มต้น ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์และจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์และกล้าเชื้อเดี่ยวแบคทีเรียแลกติก *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *L. brevis* 711

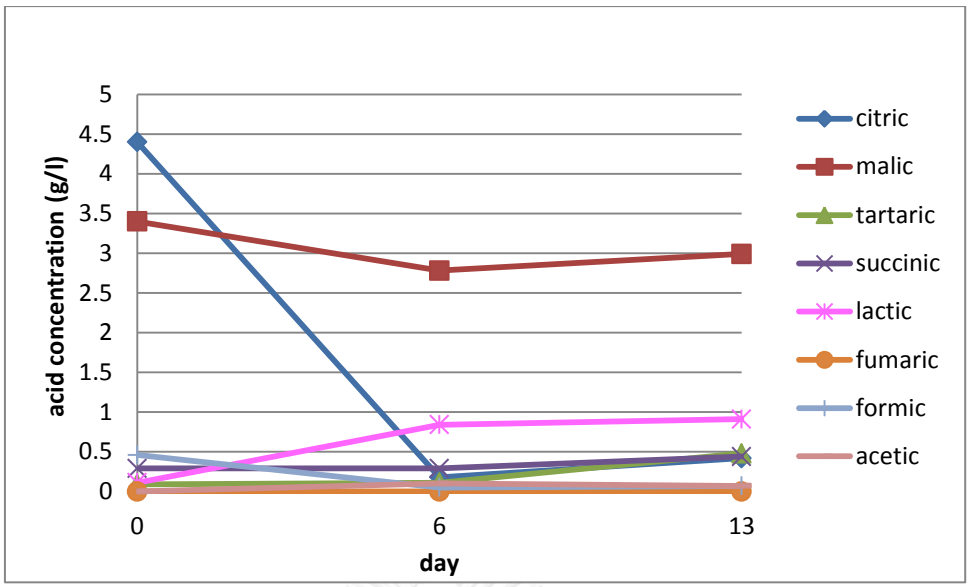
ตารางที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ,TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *L. brevis* 711 เป็นเวลา 13 วัน

Day	pH	TTA %(w/v)	TSS (°Brix)	RS (mg/ml)
0	3.67 ^{a} ±0.01	0.27 ^{d} ±0.00	21.64 ^{a} ±0.10	128.75 ^{bc} ±14.37
1	3.59 ^{ab} ±0.01	0.27 ^{d} ±0.00	18.25 ^{b} ±0.65	198.50 ^{ab} ±10.38
3	3.59 ^{ab} ±0.00	0.28 ^{cd} ±0.00	15.88 ^{b} ±1.39	232.50 ^{a} ±13.57
6	3.54 ^{abc} ±0.02	0.36 ^{bc} ±0.00	9.55 ^{cd} ±0.76	119.44 ^{cd} ±5.85
7	3.46 ^{bc} ±0.00	0.38 ^{b} ±0.00	11.00 ^{c} ±0.37	114.81 ^{cd} ±6.25
10	3.43 ^{c} ±0.06	0.47 ^{a} ±0.04	8.93 ^{cd} ±0.90	80.38 ^{de} ±22.68
13	3.44 ^{c} ±0.07	0.47 ^{a} ±0.04	7.94 ^{d} ±0.67	31.00 ^{e} ±11.95

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบวกลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันระหว่างแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

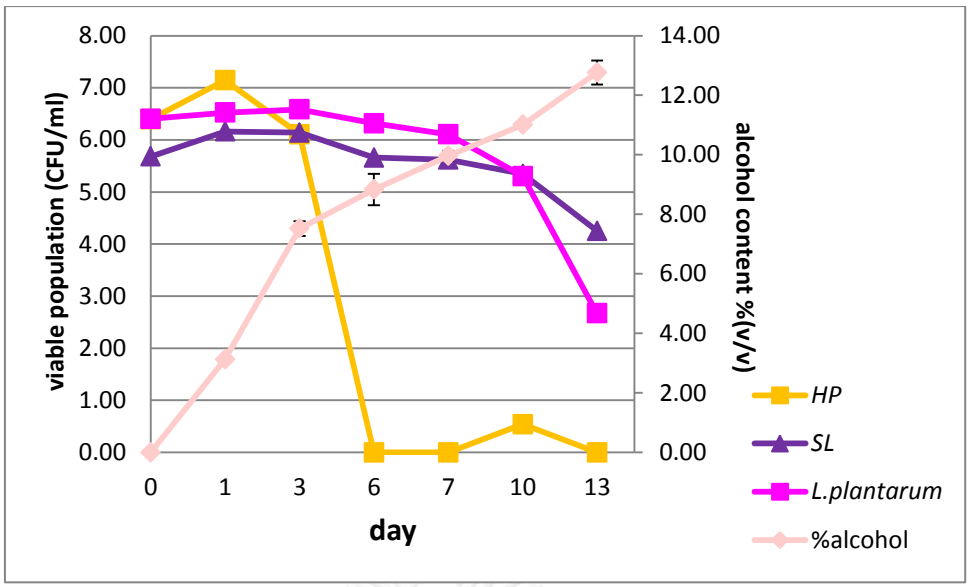
จากรูปที่ 4.16 การหมักไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์และกล้าเชื้อเดี่ยวแบคทีเรียแลกติก *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *L. brevis* 711 พบว่า กรดซิตริกมีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างจากการหมักด้วย *O. oeni* โดยพบว่า กรดซิตริกมีปริมาณลดลงมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กล่าวคือ ลดอย่างรวดเร็วเหลือเพียงประมาณ 0.2 g/l ใน 6 วันแรก ในขณะที่กรดมาลิกมีปริมาณลดลงเหลือประมาณ 3 g/l ใน 6 วันแรกและคงที่ไปจนถึงการหมักวันสุดท้าย ในขณะที่การหมักด้วย *O. oeni* กรดมาลิกจะลดลงอย่างต่อเนื่องไปจนถึงการหมักวันสุดท้ายเหลือเพียงประมาณ 1 g/l ส่วนการเปลี่ยนแปลงของกรดแลกติกพบว่า มีอัตราการเพิ่มที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งในการหมักนี้กล่าวได้ว่า ยีสต์น่าจะดำเนินการหมักแอลกอฮอล์พร้อมกับดูดซับกรดซิตริกไว้ที่ผนังเซลล์เช่นเดียวกับการหมักร่วมกับ *O. oeni* แต่ในการทดลองหมักร่วมกับ *L. brevis* นี้พบว่า มีอัตราการลดลงสูงกว่าการหมักแบบแรก ในขณะที่กรดมาลิกมีปริมาณลดลงไม่มากนักและกรดแลกติกก็ถูกสร้างไม่มากเท่ากับแบบแรก ทั้งนี้ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วว่า *L. brevis* สามารถสร้างเอนไซม์ citrate lyase ได้ดี จึงอาจใช้กรดซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อสร้างเมตาบอไลท์อื่นๆ ในขณะเดียวกันก็สามารถใช้กรดมาลิกได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการสร้าง malolactic enzyme (Muñoz et al., 2011) จึงสามารถใช้กรดมาลิกเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกได้ด้วย ในขณะเดียวกัน *L. brevis* นี้ยังอาจใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วสร้างกรดแลกติก จึงทำให้พบการเพิ่มของกรดแลกติกอย่างต่อเนื่อง ทั้งที่กรดมาลิกมีค่าคงที่หลังวันที่ 6 ของการหมัก ซึ่งการทดลองนี้บ่งชี้ให้เห็นว่าการหมักไวน์สับปะรดเพื่อลดความเปรี้ยวแบบขั้นตอนเดียวโดยหมักร่วมกับ *L. brevis* สามารถหมักแบบแอลกฮอล์ได้พร้อมกับการหมักแบบมาโลแลกติกแล้วยังสามารถลดกรดหลักคือ กรดซิตริกได้ดีกว่าการหมักร่วมกับ *O. oeni* ทั้งนี้อาจเนื่องจาก *L. brevis* เป็นแบคทีเรีย autochtonous จึงสามารถใช้กรดซิตริกในน้ำสับปะรดได้ดี (Hansawat, 2013) ซึ่งต่างจากการหมักแบบ 2 ขั้นตอนที่ *L. brevis* แสดงการลดกรดซิตริกได้น้อยกว่า เนื่องจากมีภาวะเครียดจากแอลกอฮอล์ในไวน์ที่สูงเกือบ 12% ทำให้ *L. brevis* ดำเนินกิจกรรมต่างๆได้น้อยลง



รูปที่ 4. 16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์และกล้าเชื้อเดี่ยวแบคทีเรียแลกติก *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *L. brevis* 711

4.2.2.3 การหมักน้ำสับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม H .pseudoguilliermondii และ S'codes ludwigii และ L. plantarum 621

เมื่อหมักน้ำสับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *L. plantarum* 621 ดังรูปที่ 4.17 พบว่า ประชากรของยีสต์ทั้งสองชนิดมีการเปลี่ยนแปลงเหมือนกับการหมักไวน์แบบไม่เติมแบคทีเรียแลกติกและแบบหมักพร้อมกับ *L. brevis* แต่พบว่า จำนวนประชากรของ *L. plantarum* คงที่จากค่าเริ่มต้นไปจนถึงการหมักวันที่ 7 และเริ่มลดลงในวันที่ 10 เป็นต้นไป ส่วนอัตราการสร้างแอลกอฮอล์นั้นเหมือนกับการหมักขั้นตอนเดียวของทั้งสองแบบแรก จากตารางที่ 4.9 พบว่า การเปลี่ยนแปลงค่า pH, TTA ,TSS และ RS คล้ายคลึงกับการหมักด้วย *O. oeni* Enoferm® ALPHA และ *L. brevis* โดยค่า pH มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยสัมพันธ์กับค่า TTA ที่มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากไวน์เริ่มต้น ($p \leq 0.05$) ส่วนค่า TSS และค่า RS มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากไวน์เริ่มต้น ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์และจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์และกล้าเชื้อเดี่ยวแบคทีเรียแลกติก *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *L. plantarum* 621

ตารางที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ,TTA, TSS และ RS ของไวน์สับปะรดด้วยกล้าเชื้อผสม *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *L. plantarum* 621 เป็นเวลา 13 วัน

Day	pH	TTA %(w/v)	TSS (°Brix)	RS (mg/ml)
0	3.68^{a} ±0.01	0.27^{e} ±0.01	21.41^{a} ±0.03	130.38^{bc} ±5.78
1	3.63^{a} ±0.01	0.27^{e} ±0.00	17.11^{b} ±0.86	184.88^{ab} ±17.41
3	3.51^{b} ±0.03	0.33^{d} ±0.01	14.72^{bc} ±1.00	262.75^{a} ±25.57
6	3.51^{b} ±0.04	0.38^{bc} ±0.02	12.06^{cd} ±1.37	141.00^{bc} ±5.96
7	3.51^{b} ±0.01	0.37^{c} ±0.01	9.24^{de} ±0.69	109.38^{bc} ±10.74
10	3.49^{b} ±0.02	0.41^{ab} ±0.01	9.55^{de} ±1.33	55.56^{cd} ±15.59
13	3.49^{b} ±0.02	0.42^{a} ±0.01	7.92^{e} ±0.47	17.06^{d} ±7.58

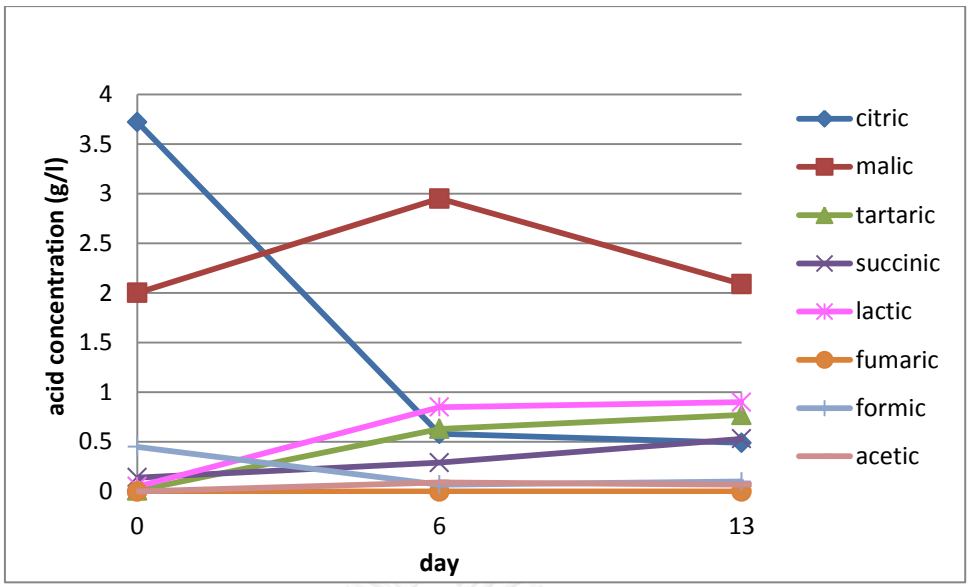
ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบวกลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันระหว่างแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาถึงการเปลี่ยนแปลงรูปแบบกรด พบว่า มีความคล้ายคลึงกับการหมักด้วย *L. brevis* โดยกรดซิตริกจะลดลงจากค่าเริ่มต้นเหลือประมาณ 0.5 g/l ในวันที่ 6 ของ

การหมัก หลังจากนั้นจึงมีค่าคงที่ แต่การลดลงของกรดมาลิกกลับมีความแตกต่าง โดยพบว่า ในการหมักด้วย *L. brevis* นั้น กรดมาลิกไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้น ซึ่งการลดลงของกรดทั้งสองชนิดน่าจะเกิดจากคุณสมบัติของ *L. plantarum* ที่สามารถสร้าง citrate lyase และ malolactic enzyme (Muñoz et al., 2011) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของกรดแลกติก พบว่า อัตราการเพิ่มขึ้นมีความใกล้เคียงกับการหมักด้วย *L. brevis* ดังนั้นเมื่อพิจารณาการลดลงของกรดมาลิก การเพิ่มขึ้นของกรดแลกติกน่าจะเกิดจากกิจกรรมของ malolactic enzyme มากกว่าการใช้โมเลกุลของน้ำตาลในการสร้างกรดแลกติก ซึ่งบ่งชี้ได้จาก ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น จะเห็นได้ว่า การหมักด้วย *L. plantarum* แอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นมีอัตราการสร้างที่เร็วกว่าและปริมาณแอลกอฮอล์สุดท้ายสูงกว่าการหมักด้วย *L. brevis* ดังรูปที่ 4.15 และ 4.17 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก *L. brevis* อาจแย่งใช้น้ำตาลเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกไปพร้อมกับการใช้กรดซิตริกเพื่อสร้างเมตาบอไลท์อื่นๆ ในขณะที่ *L. plantarum* อาจไม่แย่งใช้น้ำตาลกับยีสต์ แต่อาจใช้แหล่งคาร์บอนจากกรดซิตริกเพื่อสร้างเมตาบอไลท์และจากกรดมาลิกเพื่อสร้างเป็นกรดแลกติก จึงทำให้พบการเปลี่ยนแปลงของแอลกอฮอล์และการลดของกรดมาลิกและการเพิ่มของกรดแลกติกดังที่ปรากฏ ซึ่งจากการทดลองนี้บ่งชี้ว่า *L. plantarum* สามารถหมักแบบแอลกฮอล์ได้พร้อมกับการหมักแบบมาโลแลกติกได้คล้ายกับ *L. brevis* แต่ *L. plantarum* น่าจะรบกวนการหมักแบบแอลกอฮอล์ของยีสต์น้อยกว่า *L. brevis*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดของไวน์สับปะรดระหว่างการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์และกล้าเชื้อเดี่ยวแบคทีเรียแลกติก *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และ *L. plantarum* 621

4.2.3 การเปรียบเทียบคุณลักษณะของไวน์สับปะรด

เมื่อเปรียบเทียบคุณลัษณะของไวน์สับปะรดที่ได้จากการหมักรูปแบบที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.10 เมื่อเปรียบเทียบคุณลักษณะของไวน์สับปะรดที่ได้จากการหมักแบบสองขั้นตอนและขั้นตอนเดียว พบว่า ไวน์สับปะรดที่ได้จากการหมักแบบขั้นตอนเดียวมีค่า pH ที่ต่ำกว่าและค่า TTA ที่สูงกว่าการหมักแบบสองขั้นตอนอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และปริมาณ RS ที่เหลืออยู่ในไวน์มีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณารูปแบบกรด พบว่า กรดซิตริกคงเหลืออยู่ในน้ำหมักน้อยกว่าการหมักแบบสองขั้นตอนอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยเหลืออยู่เพียงประมาณ 0.5 - 0.8 g/l ซึ่งกรดซิตริกในไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนจะคงอยู่มากกว่า 3 g/l ในขณะที่กรดมาลิกที่คงเหลืออยู่ในไวน์ที่หมักแบบหมักแบบขั้นตอนเดียวมีแนวโน้มสูงกว่าการหมักแบบสองขั้นตอน โดยกรดแลกติกที่สร้างขึ้นในระหว่างการหมักมีปริมาณสูงกว่าที่พบในการหมักแบบสองขั้นตอน ยกเว้นการหมักแบบสองขั้นตอนด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum*

เมื่อเปรียบเทียบคุณลักษณะของไวน์สับปะรดที่หมักด้วยวิธีการหมักแบบเดียวกันแต่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แตกต่างกันในการหมักแบบสองขั้นตอน พบว่า ค่า pH, TTA ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เหลืออยู่ในไวน์สับปะรดที่หมักด้วยกล้าเชื้อผสมทั้ง *L. brevis* กับ *O. oeni* และ *L. plantarum* กับ *O. oeni* มีปริมาณสูงกว่าการหมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว

ส่วนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรด พบว่า การหมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum* กรดซิตริกและกรดมาลิกจะลดลงมากที่สุด กล่าวคือ มีปริมาณเหลือในน้ำหมักเพียง 3.0 และ 0.7 g/l และพบกรดแลกติกในไวน์สับปะรดมากที่สุด คือ 1.8 g/l

เมื่อเปรียบเทียบไวน์สับปะรดที่หมักแบบขั้นตอนเดียว แต่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แตกต่างกัน พบว่า ไวน์ที่หมักด้วย *O.oeni* จะมีค่า pH ที่สูงที่สุด และค่า TTA ที่ต่ำที่สุด และในไวน์สับปะรดตัวอย่างนี้จะมีปริมาณกรดซิตริกเหลืออยู่มากที่สุด (0.8 g/l) ส่วนกรดมาลิกมีปริมาณเหลือน้อยที่สุด(1.0 g/l) และไวน์สับปะรดนี้มีกรดแลกติกในปริมาณสูงที่สุด ส่วนไวน์สับปะรดที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. brevis* และ *L. plantarum* ที่ซึ่งมีค่า pH ลดต่ำลงถึง 3.4 ไวน์สับปะรดที่ได้จะมีกรดซิตริกเหลือน้อยที่สุด คือ 0.5 g/l แต่มีกรดมาลิกเหลือมากที่สุด คือ อยู่ในช่วง 2-3 g/l และตรวจพบกรดแลกติกประมาณ 1 g/l

ผลจากการทดลองนี้บ่งชี้ให้เห็นว่า ไวน์สับปะรดที่ได้จากวิธีการหมักและชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่ใช้ในการหมักที่แตกต่างกัน จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะในเรื่องของการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของกรดอินทรีย์ในไวน์สับปะรดทั้งชนิดและปริมาณ รวมถึงเมตาบอไลท์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักก็อาจจะมีความแตกต่างกัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับคุณภาพด้านกลิ่นรสซึ่งน่าจะมีผลต่อคุณสมบัติด้านประสาทสัมผัสของไวน์สับปะรด ซึ่งจะศึกษาในขั้นตอนต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.10 คุณลักษณะของไวน์ที่ได้จากการหมักด้วยกล้าเชื้อผสมของยีสต์ *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* และการหมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกแต่ละรูปแบบ

Fermentation	LAB Starter	Alcohol %(v/v)	pH	TTA%(w/v)	TSS (°Brix)	RS (mg/ml)	Organic acid (g/l)		
							citric	malic	lactic
Pineappple Wine (20 day)	-	12.80^{a} ±0.22	3.68^{a} ± 0.01	0.39^{bc} ±0.00	7.60^{abc} ±0.00	13.84^{b} ±2.00	4.03^{a} ±0.09	1.70^{bc} ±0.02	-
Two step (20 day + 6 week)	O	12.30^{abc} ±0.25	3.63^{a} ±0.00	0.36^{bc} ±0.02	7.63^{abc} ±0.00	35.33^{ab} ±3.65	3.55^{abc} ±0.01	1.73^{bc} ±0.01	0.19^{c} ±0.01
	B	12.00^{bc} ±0.10	3.68^{a} ±0.02	0.36^{bc} ±0.01	7.39^{c} ±0.40	26.79^{ab} ±3.83	3.76^{ab} ±0.01	2.30^{b} ±0.14	0.15^{c} ±0.02
	P	12.10^{bc} ±0.29	3.66^{a} ±0.01	0.37^{bc} ±0.01	7.47^{bc} ±0.19	27.63^{ab} ±2.65	3.10^{c} ±0.03	0.70^{d} ±0.56	1.85^{a} ±0.21
	O+B	12.00^{bc} ±0.35	3.65^{a} ±0.00	0.34^{c} ±0.01	8.64^{a} ±0.05	60.21^{a} ±6.89	4.00^{a} ±0.14	1.35^{cd} ±0.04	0.18^{c} ±0.01
	O+P	12.10^{bc} ±0.12	3.65^{a} ±0.00	0.34^{c} ±0.00	8.53^{ab} ±0.00	57.54^{a} ±1.59	3.45^{bc} ±0.06	2.00^{b} ±0.07	0.16^{c} ±0.13
One step (13 day)	O	12.00^{bc} ±0.08	3.64^{a} ±0.01	0.36^{bc} ±0.01	7.67^{abc} ±0.15	21.25^{b} ±8.76	0.76^{d} ±0.29	1.28^{cd} ±0.15	1.16^{b} ±0.11
	B	11.90^{c} ±0.23	3.44^{b} ±0.07	0.47^{a} ±0.04	7.94^{abc} ±0.67	31.00^{ab} ±11.95	0.42^{d} ±0.42	2.99^{a} ±0.28	0.91^{b} ±0.19
	P	12.80^{a} ±0.40	3.49^{b} ±0.02	0.42^{ab} ±0.01	7.92^{abc} ±0.47	17.06^{b} ±7.58	0.49^{d} ±0.28	2.09^{b} ±0.47	0.89^{b} ±0.01

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบวกลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันระหว่างแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.2.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

จากผลการทดลองในข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 ทำให้ทราบว่า รูปแบบการหมักและชนิดของแบคทีเรียแลกติกจะส่งผลให้กระบวนการหมักมีความแตกต่างกัน จึงส่งผลให้ไวน์สับปะรดมีองค์ประกอบแตกต่างกัน แสดงว่า ไวน์สับปะรดที่ได้อาจมีคุณภาพด้านกลิ่นรสที่แตกต่างกัน โดยผู้ทดลองต้องการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความชอบเพื่อประเมินว่าไวน์สับปะรดที่ได้จากรูปแบบการหมักและชนิดของแบคทีเรียแลกติกแบบใดที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากที่สุด ทั้งนี้เพื่อลดจำนวนตัวอย่างในการชิม จึงทำการประเมินเบื้องต้นโดยการทดสอบด้วยวิธี Triangle test ซึ่งใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน เพื่อคัดเลือกให้เหลือเฉพาะไวน์สับปะรดที่มีคุณภาพด้านประสาทสัมผัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญก่อน แล้วจึงนำตัวอย่างเหล่านั้นมาทดสอบด้านความชอบต่อไป

4.2.4.1 ผลการทดสอบความแตกต่าง (Triangle test)

ในการเลือกตัวอย่างสำหรับนำมาทดสอบไม่ใช้ตัวอย่างไวน์สับปะรดที่ได้จากการหมักแบบขั้นตอนเดียวด้วย *L. brevis* และ *L. plantarum* เนื่องจากค่า pH มีค่าต่ำเกินไป ซึ่งประเมินจากรายงานของ (Chanprasartsuk et al., 2010b) ที่พบว่า ไวน์สับปะรดที่มี pH ต่ำกว่า 3.4 จะไม่ได้รับการยอมรับทางประสาทสัมผัส เนื่องจากรสเปรี้ยวเกินไป ดังนั้นตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ จึงนำมาจัดกลุ่มในการทดสอบโดยเลือกจากชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่หมักแบบกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม โดยการทดสอบเพื่อแยกความแตกต่างด้านกลิ่นรสของไวน์สับปะรดแบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ชุด ดังต่อไปนี้

- ชุดที่ 1 เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างกลิ่นรสของไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วย multi-starter ของ *L. brevis* กับ *O. oeni* เปรียบเทียบกับกลิ่นรสของไวน์สับปะรดที่หมักด้วย *L. brevis*
- ชุดที่ 2 เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างกลิ่นรสของไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วย multi-starter ของ *L. plantarum* กับ *O. oeni* เปรียบเทียบกับกลิ่นรสของไวน์สับปะรดที่หมักด้วย *L. plantarum*
- ชุดที่ 3 เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างกลิ่นรสของไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วย *O. oeni* เปรียบเทียบกับกลิ่นรสของไวน์สับปะรดที่หมักแบบขั้นตอนเดียวด้วย *O. oeni*

การทดสอบเพื่อแยกความแตกต่างด้านกลิ่นรสของไวน์จำนวน 30 คน โดยจำนวนขั้นต่ำของผู้ทดสอบที่แยกความแตกต่างได้ ต้องไม่น้อยกว่า 15 คน จาก 30 คน เพื่อให้เกิด

นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ผลจากตารางที่ 4.11 พบว่า ผลการแยกความแตกต่างของตัวอย่างชุดที่ 1 ผู้ทดสอบสามารถแยกความแตกต่างกลิ่นรสของไวน์ได้ถึง 16 คน จึงสรุปได้ว่า ไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วย multi-starter ของ *L. brevis* กับ *O. oeni* และกล้าเชื้อเดี่ยว *L. brevis* นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ไวน์สับปะรดจากทั้งสองตัวอย่างจึงถูกนำไปทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความชอบต่อไป

ในตัวอย่างชุดที่ 2 ผู้ทดสอบสามารถแยกความแตกต่างกลิ่นรสของไวน์สับปะรดได้ถึง 17 คน จึงสรุปได้ว่า ไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วย multi-starter ของ *L. plantarum* กับ *O. oeni* และกล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum* นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ไวน์สับปะรดจากทั้งสองตัวอย่างจึงถูกนำไปทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความชอบต่อไป

ในตัวอย่างชุดที่ 3 ผู้ทดสอบสามารถแยกความแตกต่างกลิ่นรสของไวน์สับปะรดได้ 13 คน จึงสรุปได้ว่า ไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วย *O. oeni* (2F) และ *O. oeni* (1F) มีคุณภาพด้านกลิ่นรสไม่แตกต่างกัน ดังนั้น จึงเลือกไวน์สับปะรดที่ได้จากการหมักด้วย *O. oeni* (1F) เป็นตัวแทนสำหรับการทดสอบด้านความชอบ ทั้งนี้เนื่องจากไวน์สับปะรดที่ได้จากการหมัก *O. oeni* (1F) มีค่า pH และ TTA ใกล้เคียงกับตัวอย่างชุดที่ 1 และ 2 แต่กรดซิตริก กรดมาลิก และกรดแลกติกมีปริมาณแตกต่างจากการหมักแบบสองขั้นตอนทุกรูปแบบอย่างเห็นได้ชัด

ตารางที่ 4.11 จำนวนคนที่แยกความแตกต่างด้านกลิ่นรสของไวน์สับปะรดได้

ชุดที่	รูปแบบ	จำนวนคนที่แยกได้
1	*L. brevis* + *O. oeni* (2F) และ *L. brevis* (2F)	16
2	*L. plantarum* + *O. oeni* (2F) และ *L. plantarum* (2F)	17
3	*O. oeni* (2F) และ *O. oeni* (1F)	13

จากผลการทดสอบด้วยวิธี Triangel test ตัวอย่างที่เลือกไปทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความชอบ ได้แก่ ไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วยกล้าเชื้อผสม *L. brevis* กับ *O. oeni* ,กล้า

เชื้อเดี่ยว *L. brevis* , กล้าเชื้อผสม *L. plantarum* กับ *O. oeni* , กล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum* และการหมักขั้นตอนเดียวด้วย *O. oeni*

4.2.4.2 ผลการทดสอบการยอมรับ (Acceptance test)

เมื่อนำตัวอย่างไวน์สับปะรดจากข้อ 4.2.4.1 มาทดสอบความชอบทางประสาทสัมผัสด้านสี ความใส กลิ่น กลิ่นรส และความชอบโดยรวม โดยใช้ Hedonic Scale 9 จุด โดยคะแนน 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด ไม่ชอบมาก ไม่ชอบปานกลาง ไม่ชอบเล็กน้อย เฉยๆ ชอบเล็กน้อย ชอบปานกลาง ชอบมาก และชอบมากที่สุด ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.12

จากผลคะแนนการทดสอบความชอบ พบว่า ไวน์สับปะรด 3 ตัวอย่างที่ได้รับคะแนนความชอบด้านสีมากที่สุดอย่างไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วยกล้าเชื้อผสม *L. brevis* กับ *O. oeni* ,ไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วยกล้าเชื้อผสม *L. plantarum* กับ *O. oeni* และไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum* ด้วยคะแนน 6.17 ,6.04 และ 5.95 คะแนน ตามลำดับ ซึ่งไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วยกล้าเชื้อผสม *L. brevis* กับ *O. oeni* นี้ก็ได้รับคะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏสูงที่สุดเช่นเดียวกันด้วยคะแนน 6.57 ส่วนไวน์ที่รับคะแนนความชอบด้านกลิ่นมากที่สุด คือ ไวน์ที่หมักแบบขั้นตอนเดียวด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *O. oeni* ด้วยคะแนน 6.41 เมื่อพิจารณาความชอบด้านกลิ่นรสโดยรวม พบว่า ไวน์ที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. brevis* และกล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum* ได้รับการยอมรับมากที่สุดด้วยคะแนนประมาณ 5.8 อย่างไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับไวน์สับปะรดที่หมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *O. oeni* แบบขั้นตอนเดียวและไวน์สับปะรดที่หมักด้วยกล้าเชื้อผสม *L. brevis* กับ *O. oeni* แต่จากผลการประเมินความชอบโดยรวม พบว่า ไวน์ที่ได้รับคะแนนความชอบโดยรวมมากที่สุด เป็นชนิดเดียวกับไวน์ที่ได้รับคะแนนความชอบด้านกลิ่นรสสูงที่สุด คือ ไวน์ที่หมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยวของ *L. brevis* และ *L. plantarum* ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ไวน์สับปะรดที่ได้รับการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านความชอบโดยรวมมีความสัมพันธ์กับความชอบด้านกลิ่นรสโดยรวมมากที่สุด ซึ่งเมื่อพิจารณาจากไวน์ที่ได้รับการยอมรับด้านกลิ่นมากที่สุด คือ ไวน์ที่หมักแบบขั้นตอนเดียวด้วย *O. oeni* กลับไม่ได้รับคะแนนความชอบโดยรวมสูงที่สุด ซึ่งบ่งชี้ว่า ความชอบด้านกลิ่นรสโดยรวมน่าจะเกิดจากปัจจัยด้านรสชาติ (taste) มากกว่าปัจจัยด้านกลิ่น (aroma) ซึ่งรสชาติดังกล่าวอาจจะเกี่ยวข้องกับเรื่องของความเปรี้ยว ดังนั้นเพื่อประเมินหาความสัมพันธ์ดังกล่าวจึงวิเคราะห์ด้วยผลการทดสอบแบบ Just About Right

ตารางที่ 4.12 ผลคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยใช้ Hedonic Scale 9 จุด

รูปแบบ	สี	ลักษณะปรากฏ	กลิ่น	ความชอบโดยรวม	ความชอบกลิ่นรสโดยรวม
O (1F)	5.27 ^{c} ±0.77	5.91 ^{ab} ±1.06	6.41 ^{a} ±1.22	5.36 ^{b} ±1.18	5.45 ^{ab} ±1.26
B (2F)	5.44 ^{bc} ±1.12	6.48 ^{ab} ±0.96	5.56 ^{b} ±1.08	5.60 ^{a} ±1.41	5.80 ^{a} ±1.26
P (2F)	5.95 ^{abc} ±1.17	6.36 ^{ab} ±1.40	5.82 ^{ab} ±1.40	5.59 ^{a} ±1.30	5.82 ^{a} ±1.33
O+B (2F)	6.17 ^{a} ±1.07	6.57 ^{a} ±1.08	5.04 ^{b} ±1.19	5.13 ^{c} ±1.06	5.35 ^{ab} ±0.98
O+P (2F)	6.04 ^{ab} ±1.40	5.71 ^{b} ±1.52	5.13 ^{b} ±1.57	5.12 ^{c} ±1.15	4.79 ^{b} ±1.02

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบวกลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันระหว่างแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.2.4.3 ผลการทดสอบด้านความพอดี

การทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ Just-About-Right 5 จุด ทำโดยใช้การทดสอบความพอดีของรสหวาน รสเปรี้ยว ความฝาด รสขม และความแรงของแอลกอฮอล์ในไวน์สับปะรด ใช้ผู้ทดสอบทั้งหมด 30 คน

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.13 ผลการทดสอบความพอดีของรสหวาน รสเปรี้ยว ความฝาด รสขม และความแรงของแอลกอฮอล์ในไวน์สับปะรด พบว่า ไวน์สับปะรดทุกตัวอย่างมีคะแนนการยอมรับต่ำกว่า 70% ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า ไวน์สับปะรดทุกตัวอย่างไม่มีความพอดีของรสหวาน รสเปรี้ยว ความฝาด รสขม และความแรงของแอลกอฮอล์ แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลดังกล่าวสามารถบ่งบอกแนวโน้มรสชาติของไวน์สับปะรดได้ว่า ไวน์สับปะรดทุกตัวอย่างมีแนวโน้มมีรสหวานน้อยเกินไป รสเปรี้ยวมากเกินไป รสขมมากเกินไป ส่วนความฝาดไม่พบแนวโน้มที่บ่งชี้ได้ และความแรงของแอลกอฮอล์ พบว่า ไวน์สับปะรดที่หมักด้วย *O. oeni* แบบขั้นตอนเดียวมีแนวโน้มที่มีความแรงของแอลกอฮอล์มากเกินไป

ตารางที่ 4.13 ผลคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยใช้ Just-About-Right 5 จุด

ตัวแปรที่สอบ	ชนิดของ starter	คะแนน				
		1	2	3	4	5
รสหวาน	O (1F)	33.33%	13.33%	40%	6.67%	6.67%
	B (2F)	23.33%	16.67%	53.33%	6.67%	0%
	P (2F)	13.33%	20%	40%	6.67%	3.33%
	O+B (2F)	13.33%	20%	53.33%	10%	3.33%
	O+P (2F)	20%	20%	43.33%	16.66%	0%
รสเปรี้ยว	O (1F)	3.33%	16.67%	33.33%	26.67%	20%
	B (2F)	6.67%	16.67%	50%	23.33%	3.33%
	P (2F)	6.67%	16.67%	46.67%	6.67%	23.33%
	O+B (2F)	16.67%	16.67%	43.33%	20%	3.33%
	O+P (2F)	3.33%	13.33%	50%	26.67%	6.67%
ความฝาด	O (1F)	6.67%	16.66%	46.67%	13.33%	16.67%
	B (2F)	3.33%	26.67%	40%	16.67%	13.33%
	P (2F)	13.33%	10%	60%	10%	6.67%
	O+B (2F)	6.67%	20%	43.33%	26.67%	3.33%
	O+P (2F)	6.67%	20%	50%	16.66%	6.67%
รสขม	O (1F)	6.67%	6.67%	43.33%	26.67%	16.67%
	B (2F)	10%	0%	53.33%	26.67%	10%
	P (2F)	6.67%	3.33%	66.67%	20%	3.33%
	O+B (2F)	13.33%	13.33%	50%	20%	3.33%
	O+P (2F)	6.67%	13.33%	50%	20%	10%
ความแรงแอลกอฮอล์	O (1F)	3.33%	10%	26.67%	36.67%	23.33%
	B (2F)	3.33%	13.33%	60%	13.33%	10%
	P (2F)	6.67%	16.67%	43.33%	26.67%	6.67%
	O+B (2F)	6.67%	16.67%	43.33%	26.67%	6.67%
	O+P (2F)	6.67%	26.67%	43.33%	13.33%	10%

ค่าในตารางแสดงค่าร้อยละ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการหมักแอลกอฮอล์ของน้ำสับปะรดด้วยกล้าเชื้อยีสต์ผสมระหว่าง *H. pseudoguilliermondii* และ *S'codes ludwigii* ที่อุณหภูมิประมาณ 25-30°C เป็นเวลา 20 วัน พบว่า ไวน์ที่ได้มีสมบัติ คือค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 3.68 ± 0.01, ปริมาณแอลกอฮอล์ 12.80 ± 0.22%(v/v), ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (TTA) 0.39 ± 0.00%(w/v) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TSS) 7.60 ± 0.00°Brix และน้ำตาลรีดิวซ์ (RS) 13.84 ± 0.00 mg/ml ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบคุณลักษณะของไวน์สับปะรดที่ได้จากการหมักแบบสองขั้นตอนและขั้นตอนเดียว พบว่า ไวน์ที่ได้จากการหมักแบบขั้นตอนเดียวมีค่า pH ที่ต่ำกว่าและค่า TTA ที่สูงกว่าการหมักแบบสองขั้นตอนอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และปริมาณ RS ที่เหลืออยู่ในไวน์สับปะรดมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณารูปแบบกรด พบว่า กรดซิตริกคงเหลืออยู่ในน้ำหมักที่หมักแบบขั้นตอนเดียว (0.5 - 0.8 g/l) น้อยกว่าการหมักแบบสองขั้นตอน (3 g/l) ในขณะที่กรดมาลิกที่คงเหลืออยู่ในไวน์สับปะรดที่หมักแบบหมักแบบขั้นตอนเดียวมีแนวโน้มสูงกว่าการหมักแบบสองขั้นตอน และกรดแลกติกที่สร้างขึ้นในระหว่างการหมักมีปริมาณสูงกว่าในการหมักแบบสองขั้นตอน ยกเว้นการหมักแบบสองขั้นตอนด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum*

เมื่อเปรียบเทียบคุณลักษณะของไวน์สับปะรดที่หมักด้วยวิธีการหมักแบบเดียวกัน แต่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แตกต่างกัน ในการหมักแบบสองขั้นตอน พบว่า การหมักด้วยแบคทีเรียแลกติกทุกรูปแบบค่า pH, TTA ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เหลืออยู่ในไวน์สับปะรดที่หมักด้วยกล้าเชื้อผสมทั้ง *L. brevis* กับ *O. oeni* และ *L. plantarum* กับ *O. oeni* มีปริมาณสูงกว่าการหมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว ส่วนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรด พบว่า การหมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum* กรดซิตริกและกรดมาลิกจะลดลงมากที่สุด กล่าวคือ มีปริมาณเหลือในน้ำหมักเพียง 3.0 และ 0.7 g/l และพบกรดแลกติกในไวน์มากที่สุด คือ 1.8 g/l

เมื่อเปรียบเทียบไวน์สับปะรดที่หมักแบบขั้นตอนเดียว แต่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แตกต่างกัน พบว่า ไวน์สับปะรดที่หมักด้วย *O.oeni* จะมีค่า pH ที่สูงที่สุด และค่า TTA ที่ต่ำที่สุด และในไวน์สับปะรดตัวอย่างนี้จะมีปริมาณกรดซิตริกเหลืออยู่น้อยที่สุด (0.8 g/l) ส่วนกรดมาลิกและกรดแลกติกมีปริมาณเหลือมากที่สุด(1.0 g/l) ส่วนไวน์สับปะรดที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. brevis* และ

L. plantarum ทั้งสองตัวอย่างมีค่า pH ลดต่ำลงถึงประมาณ 3.4 มีกรดซิตริกเหลือน้อยที่สุด คือ 0.5 g/l แต่มีกรดมาลิกเหลือมากที่สุด คือ อยู่ในช่วง 2-3 g/l ตรวจพบกรดแลกติกประมาณ 1 g/l

การทดสอบความชอบ พบว่า ไวน์สับปะรด 3 ตัวอย่างที่ได้รับคะแนนความชอบด้านสีมากที่สุดอย่างไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วยกล้าเชื้อผสม *L. brevis* กับ *O. oeni* ,ไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วยกล้าเชื้อผสม *L. plantarum* กับ *O. oeni* และไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum* ด้วยคะแนน 6.17 ,6.04 และ 5.95 คะแนน ตามลำดับ ซึ่งไวน์สับปะรดที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วยกล้าเชื้อผสม *L. brevis* กับ *O. oeni* นี้ก็ได้รับคะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏสูงที่สุดเช่นเดียวกันด้วยคะแนน 6.57 ส่วนไวน์ที่รับคะแนนความชอบด้านกลิ่นมากที่สุด คือ ไวน์สับปะรดที่หมักแบบขั้นตอนเดียวด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *O. oeni* ด้วยคะแนน 6.41 เมื่อพิจารณาความชอบด้านกลิ่นรสโดยรวม พบว่าไวน์ที่หมักแบบสองขั้นตอนด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *L. brevis* และกล้าเชื้อเดี่ยว *L. plantarum* ได้รับการยอมรับมากที่สุดด้วยคะแนนประมาณ 5.8 อย่างไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับไวน์สับปะรดที่หมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยว *O. oeni* แบบขั้นตอนเดียวและไวน์สับปะรดที่หมักด้วยกล้าเชื้อผสม *L. brevis* กับ *O. oeni* ทั้งนี้จากผลการประเมินความชอบโดยรวม พบว่า ไวน์สับปะรดที่ได้รับคะแนนความชอบโดยรวมมากที่สุด เป็นชนิดเดียวกับไวน์สับปะรดที่ได้รับคะแนนความชอบด้านกลิ่นรสสูงที่สุด คือ ไวน์ที่หมักด้วยกล้าเชื้อเดี่ยวของ *L. brevis* และ *L. plantarum* ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ไวน์สับปะรดที่ได้รับการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านความชอบโดยรวมมีความสัมพันธ์กับความชอบด้านกลิ่นรสโดยรวมมากที่สุด ซึ่งบ่งชี้ว่า ความชอบด้านกลิ่นรสโดยรวมน่าจะเกิดจากปัจจัยด้านรสชาติ(taste) มากกว่าปัจจัยด้านกลิ่น (aroma) ซึ่งรสชาติดังกล่าวอาจจะเกี่ยวข้องกับเรื่องของความเปรี้ยว

ผลการทดสอบความพอดี พบว่า ไวน์สับปะรดทุกตัวอย่างไม่มีความพอดีของรสหวาน รสเปรี้ยว ความฝาด รสขม และความแรงของแอลกอฮอล์ แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลดังกล่าวสามารถบ่งบอกแนวโน้มรสชาติของไวน์สับปะรดได้ว่า ไวน์สับปะรดทุกตัวอย่างมีแนวโน้มมีรสหวานน้อยเกินไป รสเปรี้ยวมากเกินไป รสขมมากเกินไป ส่วนความฝาดไม่พบแนวโน้มที่บ่งชี้ได้ และความแรงของแอลกอฮอล์ พบว่า ไวน์สับปะรดที่หมักด้วย *O. oeni* แบบขั้นตอนเดียวมีแนวโน้มที่มีความแรงของแอลกอฮอล์มากเกินไป

Chulalongkorn University

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการยอมรับทางประสาทสัมผัสในตัวอย่างไวน์กลุ่มที่หมักแบบสองขั้นตอน อาจเกิดจากปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น ความแตกต่างของเรื่องกลิ่น (aroma) ที่แบคทีเรียแลกติกอาจจะสร้างได้แตกต่างกัน จึงอาจต้องมีการศึกษาชนิดและปริมาณสารระเหยได้ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟฟีแมสสเปกโตรเมทรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) รวมถึงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ใช้ในการหมักกับชนิดและปริมาณของสารระเหยกับกรดอินทรีย์หลัก วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Akamine, E. K. 1976. Postharvest handling of tropical ornamental cut crops in Hawaii. Hortscience 11: 125-126.

Akubor, P. I. 1996. The suitability of African bush mango juice for wine production. Plant Foods for Human Nutrition 49: 213-219.

Alain, K., Agbo N'zi Georges, and Y. Aka. 1987. Ethanol production from pineapple juice in Côted'Ivoire with preselected yeast strains. Journal of Fermentation Technology 65: 475-481.

Amerine, M. A., and C. S. Ough. 1980. Method of Analysis of Musts and Wine. John Wiley and sons, New York.

AOAC. 2002. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemists International, Seventeenth Edition, Gaithersburg, MD.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S. & von Wright, A. (eds). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects 2nd Edition. , New York: Marcel Dekker Inc.

Ayogu, T. E. 1999. Evaluation of the performance of a yeast isolate from Nigerian palm wine in wine production from pineapple fruits. Bioresource technology 69: 189-190.

Barnett, J. A., and H. L. Kornberg. 1960. The utilisation by yeast of acids of the tricarboxylic acid cycle. Journal General Microbiology 23: 65-82.

Bartolome, A. P., R. E. Paull, and K. G. Rohrbach. 2003. The pineapple botany, production and uses. CABI publishing, Wallingford, UK.

Bartolome, A. P., P. Rupbrez, and F. Carmen. 1995. Pineapple fruit: morphological characteristics, chemical composition and sensory analysis of Red Spanish and Smooth Cayenne cultivars. Food Chemistry 53: 75–79.

Bartosky, E. J. 2005. *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. Australian Journal of Grape and Wine Research 11: 174-184.

Benucci, I., K. Liburdi, A. M. V. Garzillo, and M. Esti. 2011. Bromelain from pineapple stem in alcoholic–acidic buffers for wine application. Food Chemistry 124: 1349–1353.

Bhui, K., S. Prasad, J. George, and Y. Shukla. 2009. Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against

skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway. Cancer letters 282: 167-176.

Callens, K., and T. De Smet. 1991. Pineapple liqueur wine: a fermentation technique. Special Journal for Graduated Ceremony fifth, Rajamangala Institute of Technology. 9: 103-109.

Chanprasartsuk, O.-o., K. Pheanudomkitlert, and D. Toonwai. 2012. Pineapple wine fermentation with yeasts isolated from fruit as single and mixed starter cultures. Asian Journal of Food and Agro-Industry 5: 104-111

Chanprasartsuk, O.-O., and C. Prakitchaiwattana. 2015. Impact of Allochthonous and Autochthonous Yeast Starters: Case Studies in Fruit Wine Fermentations. In : Food Microbiology: Fundamentals, Challenges and Health Implications. (Elain Perkins (Ed.). Nova Publisher, Inc., Hauppauge, New York. In press.

Chanprasartsuk, O.-O., C. Prakitchaiwattana, and Sanguandeekul.R. 2010a. Alternative model for pineapple wine fermentation and its flavor quality development. In: Food Innovation Asia Conference 2010: Indigenous Food Research and Development to Global Market, BITEC, Bangkok, Thailand. p 1010-1019.

Chanprasartsuk, O. O., C. Prakitchaiwattana, R. Sanguandeekul, and G. H. Fleet. 2010b. Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation. Bioresource technology 101: 7500-7509.

Cole, M. B., and M. H. J. Keenan. 1986. Synergistic effects of weak-acid preservatives and pH on the growth of Zygosaccharomyces bailii. . Yeast 2: 93-100.

Cole, V. C., and A. C. Noble. 1997. Flavour chemistry and assessment. In: A. G. H. Law and J. R. Piggott (eds.) Fermented Beverage Production. p 361–385. Blackie Academic & Professional, London, UK.

Costantini, A., Emilia Garc´ıa-Moruno, and M. V. Moreno-Arribas. 2009. Biochemical Transformations Produced by Malolactic Fermentation. In: M.V. Moreno-Arribas and M. C. Polo (eds.) Wine Chemistry and Biochemistry. Springer Science+Business Media, LLC.

Davis, C. R., D. Wibowo, Fleet, G.H., and T. H. Lee. 1986. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. Applied and Environmental Microbiology 51: 539–545.

Degre, R. 1993. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. In: F. G.H. (ed.) Wine Microbiology and Biotechnology. p 421–448. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.

Di Cagno, R. e. a. 2010. Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. Food microbiology 27: 381-389.

Fleet, G. H. 2001. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. In: M. P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville (eds.) Wine No. 2. p 747-772. ASM press, Washington, DC, USA.

Fleet, G. H. 2003. Wine microbiology and biotechnology. Poststrasse: Harwood Acedemic.

Fugelsang, K. C., and C. G. Edwards. 1997. Wine microbiology. Springer.

Gao, C., and G. H. Fleet. 1995. Degradation of malic and tartaric acids by high density cell suspensions of wine yeasts. Food microbiology 12: 65-71.

Gardner, P. T., T. A. C. White, D. B. McPhail, and G. G. Duthie. 2000. The relative contribution of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential offruit juices. Food Chemistry 68: 471-474.

Gortner, W. A., G. G. Dull, and B. H. Krauss. 1967. Fruit development, maturation, ripening, and sensescence : a biochemical basis for horticultural terminology. Hortcultural science 2: 141-144.

Hammes, W. P., and R. F. Vogel. 1995. The genus Lactobacillus. In: The Genera of Lactic Acid Bacteria. Edited by B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel. Blackie Academic & Professional (UK) 2: 19-54.

Hansawat, K. 2013. Isolation of autochthonous lactic acid bacteria from pineapple *Ananas comosus* (L.) Merr ‘Smooth Cayenne’ for deacidifying and desugaring of fermented fresh pineapple juice, Chulalongkorn University.

Hansawat, K., and C. Prakitchaiwattana. 2013. Autochthonous lactic acid bacteria for deacidifying and desugaring of fresh pineapple juice. In: The 5th International conference on fermentation technology for value added agricultural products, Centara Hotel & Convention Centra, Khon Kaen, Thailand

Henick-Kling, T. 1994. Malolactic fermentation. In: G. H. Fleet (ed.) Wine microbiology and biotechnology. p 289-326. Poststrasse: Harwood Acedemic.

Henschke, P. A. 1997. Wine yeast. In: F. K. Zimmermann and K. D. Entian (eds.) Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications. p 527– 560. Technomic, Lancaster, PA.

Holzapfel, W. H., P. Haberer, U. S. J. Snel, and J. H. H. i. t. Veld. 1998. Overview of gut flora and probiotics. International journal of food microbiology 41: 85-101.

Imanishi, Y., S. Jindamorakot, S. Limtong, and T. Nakase. 2010. Endospore formation in *Hanseniaspora pseudoguilliermondii* : a key characteristics of the species. Mycoscience 51: 373–378.

Jayaprakashvel, M. et al. 2014. Production of Bioethanol from Papaya and PineappleWastes using Marine Associated Microorganisms. Biosciences Biotechnology Reserch Asia 11: 193-199.

Jintanawit, W., U. Kanto, S. Juttupornpong, and P. Harinasut. 2004. A study on chemical and bromelain activity analysis of pineapple juice and utilization for protein digestion in soybean meal. In: KU conference, Kasetsart university, Bangkok

Jitjaroen, W., T. Bouphun, and L. Panjai. 2013. The Potential of Malolactic Fermentation on Organic Acids Degradation in Mao (*Antidesma Thwaitesanum* Müell.) Wine Production. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics 3: 368-371.

Keawklin, P., and K. Boonin. 2012. Alcoholic Fermentation and Malolactic fermentation profiles of fresh crushed pineapple juice, Science Project, Chulalongkorn University.

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

Lamsaengthum, S. 2003. Improvement of quality, flavour and aroma of pineapple wine by using pectinase enzyme, Prince of songkla university.

Laurent, M. H., T. Henick-Kling, and T. E. Acree. 1994. Changes in the aroma and odor of Chardonnay due to malolactic fermentation. Wein Wissensch 49: 3-10.

Lee, T. H., and P. J. Wall. 1996. International legislative issues. In: C. S. Stockley, A. N. Sas, R. S. Johnstone and T. H. Lee (eds.) Maintaining the competitive edge: proceedings of the ninth Australian wine industry technical conference. p 3–5, Adelaide, SA.

Lerm, E., L. Engelbrecht, and M. d. Toit. 2011. Selection and Characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African Wine Isolates for Use as Malolactic Fermentation Starter Cultures. South African Journal for Enology and Viticulture 32: 280-295.

Lonvaud-Funel, A. 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. Antonie Van Leeuwenhoek 76: 317-331.

Maurer, H. R. 2001. Bromelain: Biochemistry, pharmacology and medical use. . Cellular and Molecular Life Sciences 58: 1231-1245.

McDonald, P., A. R. Henderson, and S. J. E. Heron. 1991. Biochemistry of Silage 2nd edn. Chalcombe Publications, Marlow, UK.

Mira, N. P., J. Becker, and I. Sá-Correia. 2010. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid. Microbial Cell Factories 9: 79.

Muñoz, R., Moreno-Arribas M. V. , and R. B. d. l. 2011. Chapter 8-Lactic Acid Bacteria. In: A. V. C. Santiago, R. Munoz and R. G. Garcia (eds.) Molecular Wine Microbiology. p 191-226. Academic Press, San Diego.

Navarattara, V. 2008. Fermentation profiles and formulation of orange wine from sai num phueng tangerine juice, Chulalongkorn university.

Peter, P., O. C. Claudia, H. Kostas, and M. Mehdi. 2001. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. Microbiology 147: 2635-2642.

Pilone, G. J., and R. E. Kunkee. 1976. Stimulatory effect of malolactic fermentation on the growth rate of *Leuconostoc oenos*. Appl environ microbiol 32: 405-408.

Pino, J. A., and O. Queris. 2010. Analysis of volatile compounds of pineapple wine using solid-phase microextraction techniques. Food Chemistry 122: 1241-1246.

Popluechai, S., S. Onto, and P. D. Eungwanichayapant. 2007. Relationships between some Thai cultivars of pineapple (*Ananas comosus*) revealed by RAPD analysis. Songklanakarin Journal Science and Technology 29: 1491-1497.

Quintans, N. G., B. V., G. Repizo, C. Magni, and P. Lopez. 2008. Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. Research Signpost 37: 65-88.

Rale, V. B., and J. R. Vakil. 1984. A note on an improved molybdate agar for the selective isolation of yeasts from tropical fruits. Journal Applied Bacteriology 56: 409-413.

Ribereau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Doneche, and A. Lonvaud. 2000. Handbook of enology volume 1 the microbiology of wine and vinifications. Chicheter: John Wiley & Sons.

Roessler, E. B., R. M. Pangborn, J. L. Sidel, and H. Stone. 1978. Expanded statistical tables for estimating significance in paired-preference, paired difference, duo-trio and triangle tests. Journal of Food Science 43: 940-943.

Ruengrongpanya, T. 1996. A Comparison of Yeasts in Pineapple-Wine Fermentation, Science Project, Chulalongkorn University.

Sipiczki, M., P. Romano, G. Lipani, I. Miklos, and Z. Antunovics. 2001. Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery. Antonie van Leeuwenhoek 79: 97-105.

Somogyi, M. 1952. Note on Sugar Determination. Journal of Biological Chemistry 195: 19-23.

Srisuvor, N., C. Prakitchaiwattana, N. Chinprahast, and S. Subhimaros. 2013. Use of banana puree from three indigenous Thai cultivars as food matrices for probiotics and application in bio-set-type yoghurt production International Journal of Food Science and Technology 48: 1640–1648

Sun, S. Y., H. S. Gong, X. M. Jiang, and Y. P. Zhao. 2014. Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces

cerevisiae on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines. Food microbiology 44: 15-23.

Tokouka, K., T. Ishitani, S. Goto, and K. Komagata. 1985. Identification of yeasts isolated from high-sugar foods. Journal General Applied Microbiology 37: 111-119.

Vine, R. P., E. M. Harkness, T. Browning, and C. Wagner. 1997. Winemaking. Chapman & Hall, New York.

ประดิษฐ์ ครุวัณณา. 2546. ไวน์: ศาสตร์และศิลป์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. 2553. ยุทธศาสตร์สับปะรดปี '53-57 มุ่งรักษาความเป็นผู้นำอันดับ 1 ของโลก.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์ทางเคมี

ก. 1การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์

เครื่องมือ

Vinometer

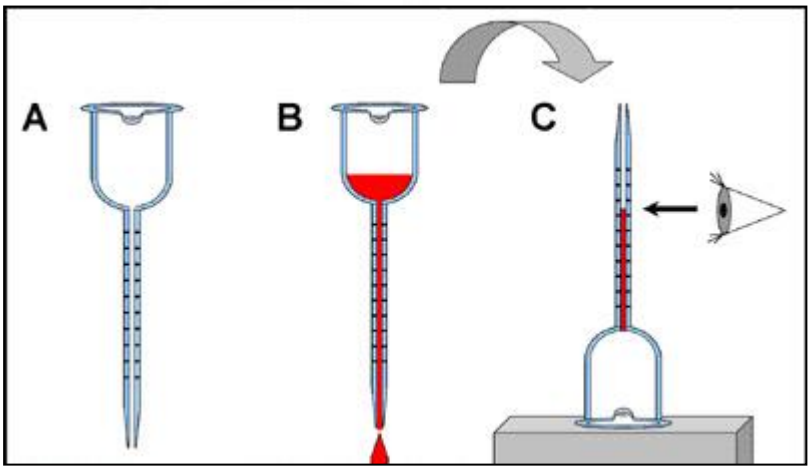
รูปที่ ก 1vinometer

วิธีการ

1ใส่ตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน Vinometer และรอจนกระทั่งตัวอย่างหยดลงที่ปลายอีกด้านของหลอด (B)

2คว่ำหลอดและรอจนกระทั่งระดับสเกลคงที่ (C)

3อ่านค่าปริมาณแอลกอฮอล์ (C)



รูปที่ ก 2วิธีการใช้vinometer

ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโดยการวัดค่าพีเอช (pH)

วิธีการ

น้าตัวอย่างใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นจุ่ม pH electrode ลงไปในตัวอย่างอ่านค่าความเป็นกรดด่างจากเครื่องบันทึกผล โดยก่อนวัดค่าทุกครั้งต้องมีการ caribration เครื่อง pH meter ก่อน

ก.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโดยการไทเทรต (A.O.A.C.,2002)

วิธีการ

ปิเปตตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาลีน 3-5 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ แล้วไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N เมื่อถึงจุดยุติจะได้ สีชมพูอ่อน จากนั้นนำปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต มาคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมด

$$\% \text{ กรดทั้งหมด (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)} = \frac{V \times N \times EW \times 100}{1000 \times U}$$

โดย V = ปริมาณสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตจนถึงจุดยุติ (มิลลิลิตร)

N = นอร์มัลของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

U = ปริมาณของตัวอย่างที่นำมาไทเทรต (มิลลิลิตร)

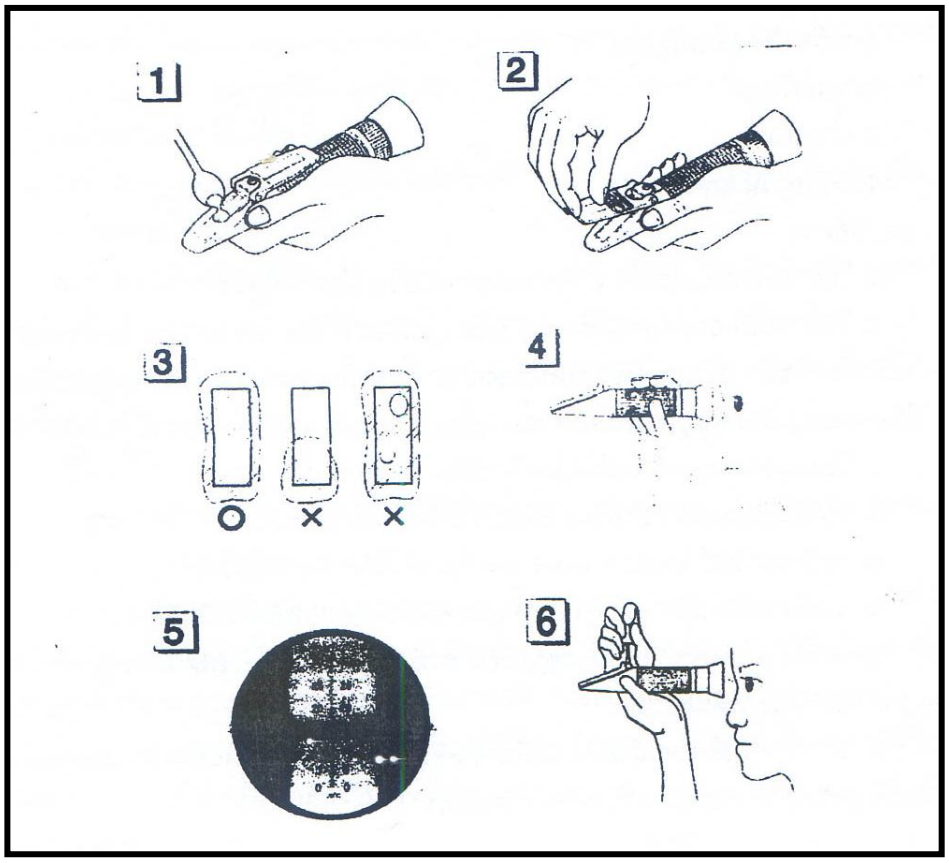
EW = น้ำหนักสมมูลของกรดที่ต้องการจะหา (น้ำหนักโมเลกุลของกรดซิตริก 192.12 g/mol เมื่อนำมาคำนวณต้องหารด้วย 2 เนื่องจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมล จะทำปฏิกิริยาพอดีกับ 1 โมลของกรดซิตริก)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ก.4 การวัดปริมาณน้ำตาลโดยใช้รีแฟรคโตมิเตอร์

วิธีการ

ใช้หลอดหยดดูดน้ำผลไม้ใส่ลงในปริซึม 1-2 หยด ปิดแผ่นครอบโดยให้น้ำผลไม้กระจายทั่วพื้นผิวของปริซึม ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นมองผ่านเลนส์ตา และอ่านค่าตรงระดับเส้นรอยต่อที่ตัดกับพื้นสีฟ้า โดยค่าที่อ่านได้มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์ ซึ่งเทียบเท่ากับเปอร์เซ็นต์น้ำตาล (จำนวนกรัมของน้ำตาลต่อ 100 กรัมของสารตัวอย่าง)



รูปที่ ก .3 วิธีการใช้เครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์

ก.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธีของ Somogyi–Nelson

กลูโคสหรือฟรุคโตสในสารตัวอย่าง (น้ำผลไม้) จะรีดิวซ์คอปเปอร์ในสารละลายด่างได้คิวปรัสคอปเปอร์ (cuprous copper) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารละลายของอาซิโนโมลิบเดท (arsinomolypdate) ทำให้เกิดสีเขียวแกมน้ำเงิน จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

การเตรียมสารเคมี

1. Somogyi

Somogyi 1 : ละลายโซเดียมซัลเฟต 288 กรัม โปตัสเซียมโซเดียมทาร์เทรต 24 กรัม โซเดียมคาร์บอเนต 48 กรัม และโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 32 กรัม ในน้ำกลั่น 1600 มิลลิลิตร

Somogyi 2 : ละลายโซเดียมซัลเฟต 72 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ผสม Somogyi 1 และ Somogyi 2 ในอัตราส่วน 4 : 1 โดยปริมาตรในการใช้งานแต่ละครั้ง

2. Nelson

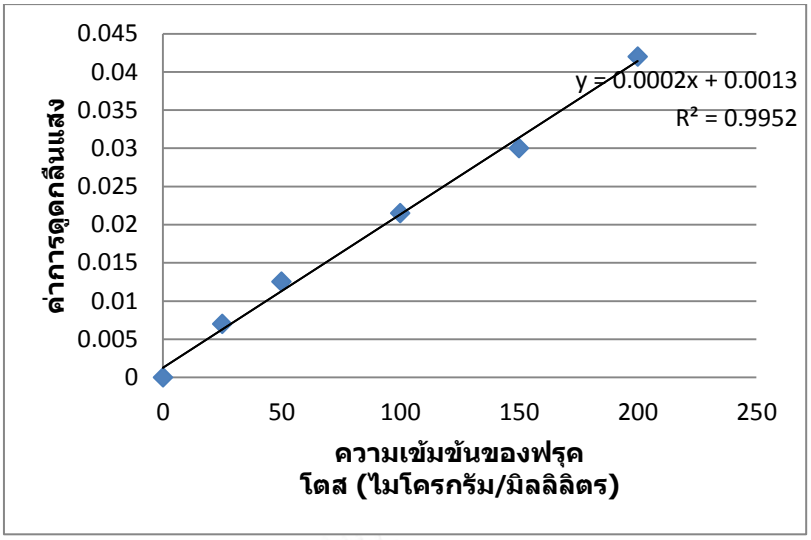
ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท 100 กรัม ในน้ำกลั่น 1800 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 84 มิลลิลิตรลงไป จากนั้นเติมสารละลายของโซเดียมไฮโดรเจนอาซิเนท (โซเดียมไฮโดรเจนอาซิเนทความเข้มข้น 12 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

วิธีการ

1. ดูดสารตัวอย่าง (น้ำผลไม้) 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายผสม Somogyi 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที

2. นำสารละลายในข้อ 1 ไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง เติมสารละลาย Nelson ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยวัดเทียบกับแบลงค์ ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง

3. อ่านค่าความเข้มข้นของกลูโคสหรือฟรุคโตสจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งได้จากวิธีเดียวกันโดยใช้สารละลายกลูโคสหรือฟรุคโตสความเข้มข้น 25, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แทนสารตัวอย่างน้ำผลไม้



รูปที่ ก. 4 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสหรือฟรุคโตสความเข้มข้น 25, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

ข.1 การตรวจหาจำนวนแบคทีเรียแลกติก(ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 2002)

1. การเตรียมตัวอยาง ทำโดยปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร โดยวีธีปราศจากเชื้อ (aseptic technicque) แล่วเติมลงสารละลาย normal saline (เกลือร่อยละ 0.85) ที่ฆาเชื้อแล่วปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะไดสารละลายตัวอยางที่มีระดับความเจือจาง 1:10

2. ใช spread plate technique โดยการปิเปตตัวอยางที่ระดับความเจือจางตาง ๆ กัน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าจนแห้ง ทำ 3 ซ้ำ แล้วนำไปบมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

3. คัดเลือกจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยูระหวาง 30-300 โคโลนี นับจำนวนโคโลนีด้วยเครื่องนับโคโลนี

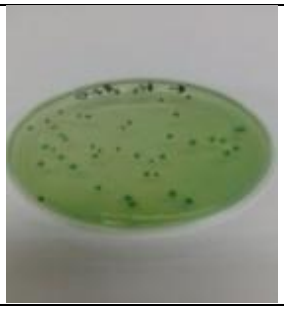
4. หาคาเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้ในแต่ละระดับความเจือจางคูณด้วยค่า dilution factor ของระดับความเจือจางที่นับไดคำนวณเป็นจำนวนโคโลนีตอตัวอยาง 1 มิลลิลิตร (CFU/ml)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ข.2 วิธีแยกความแตกต่างของกล้าเชื้อผสมแบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียกรดแลคติกที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่เติม agent ทีแตกต่างกันแสดงดังตารางที่ ข.1 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ HHD และ MRS ที่เติมน้ำมะเขือเทศ มีโคโลนีเหมือนกัน แต่โคโลนีของ MRS ที่เติม bromcresol green มีสีเขียวและมีวงแหวนล้อมรอบ ในขณะที่ *Lactobacillus* ไม่พบวงแหวนล้อมรอบ ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่เติม bromcresol green ใช้ในการบ่งชี้จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในรูปแบบกล้าเชื้อผสม

ตารางที่ ข.1 รูปแบบอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและความแตกต่างของกล้าเชื้อผสมแบคทีเรียแลกติก

LAB	HHD	MRS+Tomato juice	MRS+Bromcresol green
O.oeni	-	-	Green Transparent ring
Different *Lactobacillus*	-	-	Green
O.oeni + *Lactobacillus*	-	-	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ข.3 ผลการจำแนกจุลินทรีย์

BIOTEC Culture Collection (BCC)
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
113 Thailand Science Park, Paholyothin Road,
Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand
Tel: +66-2-564-6700 ext 3336 Fax: +66-2-564-6707

BIOTEC
a member of NSTDA

รายงานผลการจำแนกจุลินทรีย์

IDENTIFICATION'S REPORT

ชื่อผู้ขอรับบริการ / Customer's name: ผศ.ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา	เลขที่ / No. : Y2013/4
หน่วยงานและที่อยู่ / Institute and addre ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร	วันที่ได้รับตัวอย่าง / Sample receive date : 22-11-55
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330	วันที่รายงานผล/ Report date: 26-12-55
☑ ผู้ขอรับบริการส่งตัวอย่างเป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อจำแนกชนิด/The customer sent pure isolate for identification	
☐ ผู้ขอรับบริการส่งเป็นตัวอย่างเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ และได้คัดเลือกมาจำแนกชนิด/The customer sent specimen for isolation and chose isolate(s) identification	

ลำดับที่ No.	รหัสตัวอย่าง Sample Code	วิธีการจำแนกชนิด Method of identification	ผลการจำแนกชนิด Identity as	% ความเหมือน % similarity	หมายเหตุ Note
1	022-11	D1-D2 region sequencing	*Hanseniaspora pseudoguilliermondii*	100%	เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของยีสต์รหัส 022-11 (579 nucleotides) กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank พบว่าเหมือนกับ Type strain ของ *Hanseniaspora pseudoguilliermondii* CBS 8772T (AJ512455) 100% จึงจำแนกยีสต์รหัส 022-11เป็น *Hanseniaspora pseudoguilliermondii*

เอกสารแนบ / Attachme ① วิธีการวิเคราะห์ / Analytical method ② ลำดับนิวคลีโอไทด์ / nucleotide sequence (s)
③ ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ / Sequence similarity

จัดทำรายงานโดย สมจิต อำอินทร์
(นางสาวสมจิต อำอินทร์)

ตรวจรายงานโดย
(ดร.ศศิธร จินดามรกฎ)

Disclaimer:
ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้น ไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆ ที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯ ไม่ใช่หน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้น ตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆ เว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน
The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

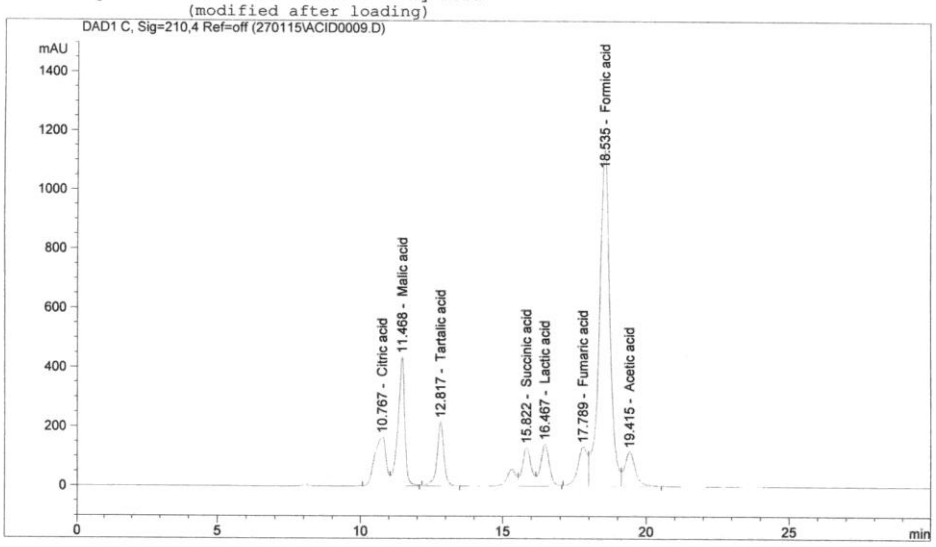
ภาคผนวก ค

โครมาโทแกรมของกรดอินทรีย์

ค.1 โครมาโทแกรมของกรดอินทรีย์มาตรฐาน (2 g/l)

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\270115\ACID0009.D Sample Name: mix acid 2.0g/l

```
Injection Date  : 27/1/2015 18:03:14 PM          Seq. Line :   4
Sample Name     : mix acid 2.0g/l                 Location : Vial 34
Acq. Operator   : acid                               Inj :   1
Acq. Instrument : Instrument 1                  Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\ORGANIC.M\27-01-15.M
Last changed    : 27/1/2015 17:15:22 PM by acid
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ORGANIC.M\28-01-15.M
Last changed    : 28/1/2015 10:05:47 PM by acid
                  (modified after loading)
```



External Standard Report

```
Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      28 January 2015 10:04:26 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 C, Sig=210,4 Ref=off
```

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [g/L]	Grp	Name
10.767	VV	4647.77441	4.31026e-4	2.00331		Citric acid
11.468	VB	7280.52734	2.82246e-4	2.05490		Malic acid
12.817	BB	3670.89429	5.43611e-4	1.99554		Tartalic acid
15.822	VV	2742.32129	7.29820e-4	2.00140		Succinic acid
16.467	VB	3051.72534	6.51961e-4	1.98961		Lactic acid
17.789	BV	3153.37671	3.16657e-5	9.98540e-2		Fumaric acid
18.535	VV	2.92295e4	3.90062e-5	1.14013		Formic acid
19.415	VB	3062.75806	6.45737e-4	1.97774		Acetic acid
Totals :				13.26247		

```
 Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
```

ภาคผนวก ง
การประเมินทางประสาทสัมผัส

ง. 1 แบบสอบถามการแยกความแตกต่าง (triangle test)

แบบสอบถาม

วันที่ _____

ชื่อ _____

ชุดที่ _____

ท่านจะได้รับตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง สองตัวอย่างมีความเหมือนกันและอีกหนึ่งตัวอย่างมีความแตกต่าง ให้ทำการทดสอบตัวอย่างโดยการชิม โดยทดสอบเรียงตามลำดับที่นำเสนอจากซ้ายไปขวา วงกลมคำตอบที่ท่านคิดว่าแตกต่าง

_____ _____ _____

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ง .2 แบบสอบถามการยอมรับของผู้บริโภค

แบบสอบถาม

เรื่อง การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคในการบริโภคไวน์สับปะรด

เรียน ท่านผู้ตอบแบบสอบถาม

คำชี้แจง แบบสอบถามชุดนี้เป็นแบบสอบถามการยอมรับของผู้บริโภค ในการบริโภคไวน์สับปะรด เพื่อประกอบวิทยานิพนธ์ของนางสาวกนกวรรณ ทองแม้น นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบาย ไวน์สับปะรดในการวิจัยนี้ทำมาจากน้ำสับปะรดคั้นสดที่ได้ปรับปรุงกลิ่นรสเพื่อนำมาประเมินการยอมรับจากผู้บริโภค เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบไวน์สับปะรด จึงใคร่ขอความกรุณาจากท่านตอบแบบสอบถามให้สมบูรณ์ ข้อมูลทั้งหมดที่ท่านตอบจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับงานวิจัยนี้ และจะไม่มีผลกระทบใดๆต่อท่านทั้งสิ้น ขอขอบพระคุณอย่างสูงที่ให้ความกรุณาในการตอบแบบสอบถามค่ะ

ขอบพระคุณค่ะ

นางสาวกนกวรรณ ทองแม้น

ผู้วิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คำแนะนำ : กรุณาใส่เครื่องหมาย ✓ ลงใน ☐ หน้าคำตอบที่ต้องการเลือก

ส่วนที่ 1 : ข้อมูลส่วนบุคคล

1. เพศ

   ☐ ชาย ☐ หญิง

2. อายุ

   ☐ 22-30 ปี ☐ 31-40 ปี ☐ 41-50 ปี ☐ 50 ปีขึ้นไป

3. อาชีพ

   ☐ รับราชการ/พนักงานรัฐวิสาหกิจ ☐ พนักงานบริษัทเอกชน

   ☐ค้าขาย/ ธุรกิจส่วนตัว ☐ นิสิต/นักศึกษา

   ☐ อื่นๆ โปรดระบุ.....

4. ท่านเคยบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไวน์ผลไม้หรือไม่ และเป็นชนิดใด ตอบได้มากกว่า 1 ข้อ

   ☐ เคยดื่ม ☐ ไม่เคยดื่ม

   ☐ ไวน์ลิ้นจี่ ☐ ไวน์ส้ม

   ☐ ไวน์สับปะรด ☐ ไวน์มังคุด

   ☐ อื่นๆ โปรดระบุ.....

5. ท่านบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไวน์ผลไม้บ่อยมากแค่ไหน

   ☐ ไม่ดื่มเลย ☐ 1-2 ครั้งต่อสัปดาห์

   ☐ 3-5 ครั้งต่อสัปดาห์ ☐ 1-2 ครั้งต่อเดือน

   ☐ น้อยกว่า 1 ครั้งต่อเดือน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ส่วนที่ 2 : การทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของไวน์สับปะรด

คำแนะนำ กรุณาประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัสของตัวอย่าง โดยใส่เครื่องหมายถูก (✓)ลงในช่องว่าง

รหัสตัวอย่างทดสอบ.....

กรุณาตอบคำถามข้อ 1-3 ก่อนดื่มตัวอย่าง

1. เมื่อพิจารณาตัวอย่างแล้ว คุณมีความชอบด้านสีของผลิตภัณฑ์ในระดับใด

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
ไม่ชอบมาก	ไม่ชอบมาก	ไม่ชอบปานกลาง	ไม่ชอบเล็กน้อย	เฉยๆ	ชอบเล็กน้อย	ชอบปานกลาง	ชอบมาก	ชอ บมากที่สุด

2. เมื่อพิจารณาตัวอย่างแล้ว คุณมีความชอบต่อลักษณะปรากฏ(ที่ไม่ใช่สี)ของผลิตภัณฑ์ในระดับใด

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
ไม่ชอบมากที่สุด	ไม่ชอบมาก	ไม่ชอบปานกลาง	ไม่ชอบเล็กน้อย	เฉยๆ	ชอบเล็กน้อย	ชอบปานกลาง	ชอบมาก	ชอบมากที่สุด

3. เมื่อดมกลิ่นของตัวอย่างแล้ว คุณมีความชอบในกลิ่นของผลิตภัณฑ์(aroma)ในระดับใด

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
ไม่ชอบมากที่สุด	ไม่ชอบมาก	ไม่ชอบปานกลาง	ไม่ชอบเล็กน้อย	เฉยๆ	ชอบเล็กน้อย	ชอบปานกลาง	ชอบมาก	ชอบมากที่สุด

กรุณาตอบคำถามข้อ 4-5 หลังดื่มตัวอย่าง

4. เมื่อดื่มผลิตภัณฑ์แล้ว คุณมีความชอบโดยรวมของผลิตภัณฑ์นี้ในระดับใด

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
ไม่ชอบมากที่สุด	ไม่ชอบมาก	ไม่ชอบปานกลาง	ไม่ชอบเล็กน้อย	เฉยๆ	ชอบเล็กน้อย	ชอบปานกลาง	ชอบมาก	ชอบมากที่สุด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5. เมื่อดื่มผลิตภัณฑ์แล้ว คุณมีความชอบในกลิ่นรสโดยรวม (flavor)ของผลิตภัณฑ์ในระดับใด

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
ไม่ชอบมากที่สุด	ไม่ชอบมาก	ไม่ชอบปานกลาง	ไม่ชอบเล็กน้อย	เฉยๆ	ชอบเล็กน้อย	ชอบปานกลาง	ชอบมาก	ชอบมากที่สุด

6. เมื่อดื่มผลิตภัณฑ์แล้ว คุณเห็นว่ารสหวาน (sweetness) ของผลิตภัณฑ์นี้เป็นอย่างไร

☐	☐	☐	☐	☐
น้อยไป		พอดี		มากไป

7. เมื่อดื่มผลิตภัณฑ์แล้ว คุณเห็นว่ารสเปรี้ยว (sourness) ของผลิตภัณฑ์นี้เป็นอย่างไร

☐	☐	☐	☐	☐
น้อยไป		พอดี		มากไป

8. เมื่อดื่มผลิตภัณฑ์แล้ว คุณเห็นว่ารสฝาด (astringency) ของผลิตภัณฑ์นี้เป็นอย่างไร

☐	☐	☐	☐	☐
น้อยไป		พอดี		มากไป

9. เมื่อดื่มผลิตภัณฑ์แล้ว คุณเห็นว่ารสขม (bitterness) ของผลิตภัณฑ์นี้เป็นอย่างไร

☐	☐	☐	☐	☐
น้อยไป		พอดี		มากไป

10. เมื่อดื่มผลิตภัณฑ์แล้ว คุณเห็นว่าความแรงแอลกอฮอล์ ของผลิตภัณฑ์นี้เป็นอย่างไร

☐	☐	☐	☐	☐
น้อยไป		พอดี		มากไป

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

“ ขอขอบพระคุณค่ะ ”

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ จ1 จำนวนผู้ทดสอบขั้นต่ำที่ต้องตอบถูกเพื่อให้เกิดนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ในการทดสอบแบบ triangle test (one-tailed, p=1/3)

Triangle test		
จำนวนการทดสอบ	ระดับความเชื่อมั่น	
	95%	99%
5	4	5
6	5	6
7	5	6
8	6	7
9	6	7
10	7	8
11	7	8
12	8	9
13	8	9
14	9	10
15	9	10
16	9	11
17	10	11
18	10	12
19	11	12
20	11	13
21	12	13
22	12	14
23	12	14
24	13	15
25	13	15
26	14	15
27	14	16
28	15	16
29	15	17
30	15	17

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Roessler et al., 1978)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกนกวรรณ ทองแม้น เกิดเมื่อวันที่ 22 มีนาคม พ.ศ.2532 ที่จังหวัดสุรินทร์ สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เมื่อปีการศึกษา 2553 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554

การนำเสนอผลงานทางวิชาการพืชเขตร้อนและกึ่งร้อนครั้งที่ 8 ณ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 21-22 กรกฎาคม พ.ศ. 2557

Tongman, K., Prakitchaiwattana, C. and Deetae, P. 2014. Deacidification of pineapple wine with commercial strains and autochthonous isolates of lactic acid bacteria. Agricultural Science Journal Vol.45 No.2 (Suppl.) p 21-24.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University