ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 และแลคติก *Lactobacillus plantarum* ระหว่างกระบวนการหมักไวน์สับปะรด

INTERACTION BETWEEN *Saccharomyces cerevisiae* M30 AND *Lactobacillus plantarum* DURING PINEAPPLE WINE FERMENTATION

อธิพงษ์ พุทยาภรณ์

ATIPONG PUTIYAPORN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2555

KMITL-2012-AI-M-053-139

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 และแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* ระหว่างกระบวนการหมักไวน์สับปะรด

INTERACTION BETWEEN *Saccharomyces cerevisiae* M30 AND *Lactobacillus plantarum* DURING PINEAPPLE WINE FERMENTATION

อธิพงษ์ ทุติยาภรณ์

ATIPONG TUTIYAPORN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2555

KMITL-2012-AI-M-053-139

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

INTERACTION BETWEEN *Saccharomyces cerevisiae* M30 AND *Lactobacillus plantarum* DURING PINEAPPLE WINE FERMENTATION

ATIPONG TUTIYAPORN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2012

KMITL-2012-AI-M-053-139

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2012

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 และแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* ระหว่างกระบวนการหมักไวน์สับปะรด

Interaction between *Saccharomyces cerevisiae* M30 and *Lactobacillus plantarum* during pineapple wine fermentation

ชื่อนักศึกษา นายอธิพงษ์ ทุติยาภรณ์

รหัสประจำตัว 52680308

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง	
ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
ดร.ประมวล ศรีกาหลง	
รศ.ดร.สุเมธ ตันตระเธียร	

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 22 พฤษภาคม 2555 เวลา 13.30 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ตั้งเจริญชัย)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 30 **เดือน** พ.ค. **พ.ศ.** 55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 และแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* ระหว่างกระบวนการหมักไวน์สับปะรด
นักศึกษา	นายอธิพงษ์ ทุติยาภรณ์
รหัสประจำตัว	52680308
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การอาหาร
พ.ศ.	2555
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. วราวุฒิ ครูส่ง

บทคัดย่อ

ในระหว่างกระบวนการหมักไวน์ แบคทีเรียแลคติกเป็นปัญหาสำคัญที่มักทำให้เกิดการปนเปื้อน ไม่เพียงแต่ทำให้กลิ่นและรสของไวน์ผิดเพี้ยนไปเท่านั้น แบคทีเรียแลคติกยังทำให้กระบวนการหมักไวน์หยุดชะงักได้ด้วย งานวิจัยนี้ได้ศึกษาได้ศึกษาผลกระทบจากการปนเปื้อนแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักไวน์สับปะรด แบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการวิจัยคัดแยกจากไวน์ที่ปนเปื้อนและพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยลำดับเบส 16S rDNA ระบุเป็น *Lactobacillus plantarum* จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาณ 7 log cfu /ml ลงในไวน์ที่หมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 ในช่วงเวลาต่างๆ คือ 0 24 48 72 และ 96 ชั่วโมงภายหลังเริ่มต้นการหมัก พบว่ามีเพียงสภาวะการหมักที่เติม *L. plantarum* ในชั่วโมงที่ 0 เท่านั้นที่ทำให้การหมักแอลกอฮอล์หยุดชะงัก ที่ 7.2 ± 0.4% โดยปริมาตรของน้ำหมัก และมีปริมาณกรดแลคติกเท่ากับ 0.656 ± 0.027% โดยปริมาตรน้ำหมัก ในขณะที่การหมักแอลกอฮอล์โดยสมบูรณ์ของยีสต์ในสภาวะเดียวกันได้ 10% และปริมาณกรดเท่ากับ 0.35% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 6 วัน และการศึกษาผลกระทบของปริมาณ *L. plantarum* เริ่มต้น ระหว่าง 4 ถึง 8 log cfu/ml แสดงให้เห็นว่า ยิ่งปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกมากเท่าใด ปริมาณกรดที่ถูกสร้างจะยิ่งมากขึ้น และส่งผลต่อประสิทธิภาพการหมักและการเจริญของยีสต์ และจากผลการศึกษาสภาพเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียแลคติกที่เจริญร่วมกันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องทะลุพบว่า ที่สภาวะทั้งการหมักไวน์ของยีสต์ที่เติม *L. plantarum* ปริมาณ 7 และ 8 log cfu/ml ถึงแม้จุลินทรีย์ทั้งสองจะสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะดังกล่าว แต่ทั้งเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียก็ได้รับผลกระทบจากความเข้มข้นของกรดและแอลกอฮอล์ในไวน์เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Interaction between *Saccharomyces cerevisiae* M30 and *Lactobacillus plantarum* during pineapple wine fermentation.
Student	Mr. Atipong Tutiyaporn
Student ID.	52680308
Degree	Master of Science
Programe	Food Science
Year	2012
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Warawut Krusong

ABSTRACT

During wine fermentation, lactic acid bacteria (LAB) are the predominant contaminated microorganism, not only causing off odors and flavors but also leading to stuck fermentation. This study evaluated the impact of LAB contamination during pineapple wine fermentation for ready to drink alcoholic beverages. The predominant strain of LAB in contaminated pineapple wine was isolated and identified by 16S rDNA sequencing as *Lactobacillus plantarum*. It was re-inoculated to pineapple mash fermenting by *Saccharomyces cerevisiae* M30 at different period from 0 24 48 72 and 96 h. Results revealed that only LAB re-inoculation at 0 h lead to stuck yeast fermentation causing in reduction of alcohol (7.2 ± 0.4% v/v) and more lactic acid production (0.656 ± 0.027% v/v). While 10% alcohol and 0.35% lactic acid were found in normal pineapple wine fermentation at 30°C for 6 d. Evaluation of the impact of LAB population among 4 to 8 log cfu/ml showed that more lactic acid was produced when more population of LAB was re-inoculated in fermenting mash. Simultaneously, the decline of alcohol production was consequently observed. Evaluation of physical condition of yeast and LAB cell by transmission electron microscope in wine fermented by yeasts and LAB re-inoculation at start of fermentation. Result obtained from both of the 7 and 8 log cfu/ml LAB re-inoculation showed that both yeast and LAB' cells had damage from stress condition in wine.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ และ ดร.ประมวล ศรีกาหลง กรรมการสอบหัวข้อและโครงร่างวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะจนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. สุเมธ ตันตระเธียร ที่กรุณาสละเวลาเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่าน และเพื่อนๆ ในสาขาทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาการใช้เครื่องมือ และวิธีการวิเคราะห์ต่างๆ

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดามารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

อธิพงษ์ ทุติยาภรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VI

สารบัญภาพ.....VII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....1

1.3 ขอบเขตการวิจัย.....1

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 กระบวนการหมักเอทานอลในไวน์.....3

2.2 ปัจจัยในกระบวนการหมักไวน์.....7

2.3 ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30.....10

2.4 แบคทีเรียแลคติกที่พบในไวน์.....11

2.5 แบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum*.....13

2.6 แหล่งที่พบแบคทีเรียแลคติก.....13

2.7 ลักษณะการเน่าเสียของไวน์ที่เกิดจากแบคทีเรียแลคติก.....14

2.8 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในไวน์.....15

2.9 การหมักมาโล-แลคติค.....17

2.10 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีสต์และแบคทีเรียแลคติกในไวน์.....18

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงาน.....22

3.1 อุปกรณ์.....22

3.2 แผนการทดลอง.....23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....27

4.1 การศึกษาความสามารถในการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ในน้ำสับปะรด.....27

4.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการเจริญและการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในน้ำสับปะรด.....28

4.3 การศึกษาผลกระทบของปริมาณเชื้อแลคติก *L. plantarum* เริ่มต้นต่อกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* M30.....29

4.4 ศึกษาผลกระทบของการเติมแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ที่ช่วงเวลาต่างๆ ระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* M30.....33

4.5 ศึกษาสภาวะการอยู่ร่วมกันระหว่างยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ในถังหมัก Stirred Tank Reactor.....36

4.6 ศึกษาผลของกรดแลคติกต่อการเจริญและผนังเซลล์ของยีสต์ M30.....39

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....44

5.1 สรุปผลการทดลอง.....44

5.2 ข้อเสนอแนะ.....44

บรรณานุกรม.....45

ภาคผนวก ก รายงานผลการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียแลคติก.....52

ภาคผนวก ข ตารางผลการติดตามผลกระทบของแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ต่อการหมักไวน์สับปะรดด้วย *S. cerevisiae* M30.....52

ภาคผนวก ค การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....54

ภาคผนวก ง วิธีวิเคราะห์.....61

ประวัติผู้เขียน.....70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 อัตราการผลิตแอลกอฮอล์และ generation time ของ *L. plantarum* ในน้ำสับปะรด ที่อุณหภูมิ 32 ± 1 องศาเซลเซียส.....28

4.2 อัตราการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในน้ำสับปะรด ที่อุณหภูมิ 32 ± 1 องศาเซลเซียส.....29

4.3 ผลของปริมาณแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* เริ่มต้นที่มีต่ออัตราการผลิตกรด ในน้ำหมักสับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิ 32 ± 1 องศาเซลเซียส.....32

4.4 ผลของปริมาณแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* เริ่มต้นที่มีต่ออัตราการผลิตแอลกอฮอล์ ในน้ำหมักสับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิ 32 ± 1 องศาเซลเซียส.....32

4.5 ผลของปริมาณแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* เริ่มต้น ที่มีต่ออัตราการผลิตแอลกอฮอล์ในน้ำหมักสับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในถังหมัก Stirred Tank Reactor ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส.....37

4.6 ผลของปริมาณแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* เริ่มต้น ที่มีต่ออัตราการผลิตกรดในน้ำหมักสับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในถังหมัก Stirred Tank Reactor ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส.....39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ข้อมูลโดยรวมของกระบวนการหมักน้ำองุ่น	4
2.2	glycolytic หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) parthway	5
2.3	เมตาบอลิซึมที่แตกต่างกันของ *S. cerevisiae* ต่างสายพันธุ์	8
2.4	วิถีเมตาบอไรซ์ชนิด heterofermentative ของน้ำตาลกลูโคส แสดงผลิตภัณฑ์	12
4.1	ผลการเจริญของแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ในน้ำสับปะรด ที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 168 ชั่วโมง	27
4.2	ประสิทธิภาพในการเจริญและการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในน้ำสับปะรด ที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 168 ชั่วโมง	29
4.3	ผลของปริมาณแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* เริ่มต้นที่มีต่อกระบวนการหมัก ไวน์สับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง	31
4.4	ผลของช่วงเวลาการเติมแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ต่อการหมัก ไวน์สับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง	35
4.5	แบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ต่อกระบวนการผลิตไวน์สับปะรดด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในถังหมัก Stirred Tank Reactor ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	38
4.6	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องทะลุของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่เลี้ยงใน YM broth ที่มีความเป็นกรด-ด่างต่างๆตั้งแต่ 4.0 ถึง 2.5	40
4.7	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องทะลุของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และ *L. plantarum* ในไวน์สับปะรดชั่วโมงที่ 168 ที่มีการเติมแบคทีเรียแลคติก 7 log cfu/ml ในช่วงเริ่มต้นของการหมัก	42
4.8	ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องทะลุของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และ *L. plantarum* ในไวน์สับปะรดชั่วโมงที่ 168 ที่มีการเติมแบคทีเรียแลคติก 8 log cfu/ml ในช่วงเริ่มต้นของการหมัก	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียแลคติกมีบทบาทในกระบวนการผลิตอาหารที่หลากหลาย ทั้งในด้านอุตสาหกรรม และครัวเรือน โดยเฉพาะใช้ในกระบวนการหมักอาหารหลากหลายชนิด เช่น ผักดอง ไส้กรอกเปรี้ยว และโยเกิร์ต เป็นต้น และยังสามารถคัดแยกได้จากไวน์ในหลายขั้นตอนการผลิต ตามปกติแบคทีเรียแลคติกในกระบวนการผลิตไวน์มีบทบาททำให้เกิดกระบวนการหมักมาโล-แลคติค (Malo-lactic fermentation) ที่ส่งผลดีต่อคุณภาพของไวน์ แต่ในอีกด้านหนึ่ง แบคทีเรียชนิดนี้ยังทำให้กลิ่นรสของไวน์เปลี่ยนไป จนไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค หรือหากเกิดการปนเปื้อนในช่วงแรกของการหมักไวน์ อาจส่งผลให้กระบวนการหมักแอลกอฮอล์หยุดชะงักได้ ก่อให้เกิดปัญหาสำคัญต่อประสิทธิภาพการผลิตไวน์ สร้างความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในฤดูร้อนที่การเจริญของเชื้อปนเปื้อนเกิดขึ้นเร็ว ปัญหาที่เกิดจากแบคทีเรียแลคติกจะยิ่งพบมากขึ้นเช่นกัน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลกระทบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติคในกระบวนการหมักไวน์

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาพการหมักที่เหมาะสมต่อการอยู่ร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ในกระบวนการหมักไวน์

1.3 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการติดตามผลกระทบที่เกิดจากการเติมแบคทีเรียแลคติกเพื่อสร้างสภาวะการปนเปื้อนในกระบวนการหมักไวน์สับปะรด โดยการเติมแบคทีเรียแลคติกในปริมาณ และช่วงเวลาระหว่างกระบวนการหมักไวน์สับปะรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการทำนายผลกระทบของไวน์จากแบคทีเรียแลคติกที่ปนเปื้อนในระยะเวลาที่แตกต่างกัน เป็นประโยชน์ต่อการลดความสูญเสียทั้งด้านต้นทุนและระยะเวลาในการผลิต ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการหมักที่สูญเปล่า หรือใช้ในการประเมินความเสียหายเพื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปใช้ประโยชน์อื่นต่อไป

1.4.2 เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการต่อยอดการพัฒนาไวน์ที่ใช้ยีสต์และแบคทีเรียแลคติกร่วมกันในกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ตามความหมายของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ไวน์หมายถึง สุราแช่ หรือสุราที่ไม่ได้กลั่น ซึ่งทำจากการนำวัตถุดิบจำพวกผลไม้มาผ่านกรรมวิธีการหมักผลไม้หรือน้ำผลไม้ด้วยยีสต์เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ มีปริมาณแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15% โดยปริมาตร ในการผลิตอาจมีการเติมน้ำตาลทรายขาวเพื่อเพิ่มความหวานให้เหมาะสำหรับการหมักสุราแช่ เพื่อให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์ตามที่ต้องการ (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2546)

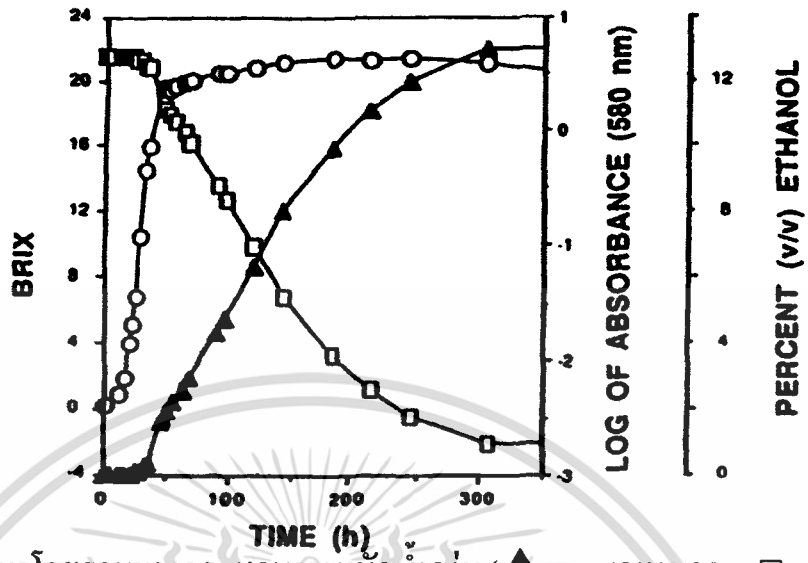
2.1 กระบวนการหมักเอทานอลในไวน์ (Hornsey et al., 2007)

กระบวนการผลิตเอทานอลเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ภาพที่ 2.1 แสดงรูปแบบโดยทั่วไปของการหมักไวน์ ค่า absorbance ที่เพิ่มขึ้นจากการเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซึ่งวัดในรูปของค่า Brix ลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากการหมัก ได้ผลลัพธ์เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถแบ่งระยะของการหมักเป็น 3 ช่วง

1. ช่วงแรกเป็นการเริ่มต้นการเจริญของยีสต์
2. ช่วงกลางเป็นระยะที่เกิดกิจกรรมการหมักสูง
3. ช่วงสุดท้ายเป็นระยะที่กิจกรรมการหมักลดลงและการยับยั้งยีสต์จากผลของเอทานอลและสารประกอบอื่นๆ เริ่มต้นขึ้น

ในช่วงแรกของวัฏจักรของการเจริญ (growth cycle) เรียกว่า lag phase เป็นช่วงที่เซลล์เกิดการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่โดยเฉพาะสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกสูงจากความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำผลไม้ แต่ยังไม่มีกิจกรรมของเมตาบอลิซึมใดๆที่สามารถสังเกตได้ เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายภาพและเคมีชีวภาพทั้งหมดภายในเซลล์ เช่น การสร้างเอนไซม์ และระบบของเอนไซม์ใหม่ ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นเพื่อให้ยีสต์สามารถเจริญในน้ำผลไม้ได้ ช่วงระยะเวลาของ lag phase จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาวะของเซลล์ที่เติมลงเป็นหัวเชื้อ (starter) และขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ เช่น องค์ประกอบของน้ำผลไม้ และอุณหภูมิในการหมักไวน์ กระบวนการหมักตามธรรมชาตินั้นช่วง lag phase ของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และจุลินทรีย์ที่จำเป็นอื่น ๆ มีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยจำเป็นจะต้องให้สั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้เพื่อหยุดยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



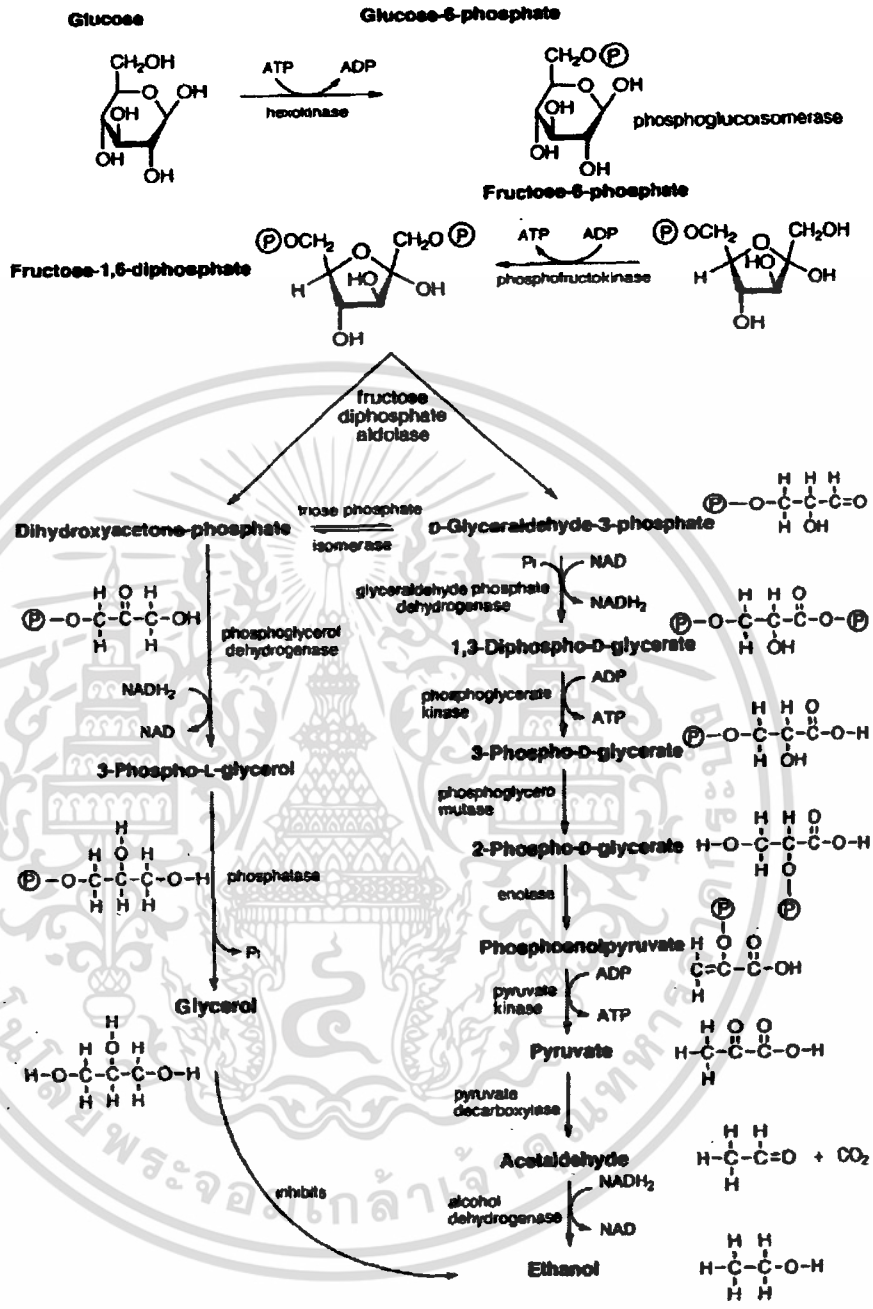
ภาพที่ 2.1 ข้อมูลโดยรวมของกระบวนการหมักน้ำองุ่น (▲ = เอทานอล, □ = บริกซ์, ○= absorbance)

ที่มา : Boulton et al. (1996)

เมื่อเซลล์สามารถปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมใหม่แล้ว เซลล์จุลินทรีย์จะเริ่มเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิซึมอีกครั้ง เพื่อเริ่มการแบ่งตัว (แตกหน่อ) ดังนั้นยีสต์จะทวีจำนวนอย่างรวดเร็วหลังจากที่ lag phase สิ้นสุดทันที จะเกิดกระบวนการหมักซึ่งจำเป็นต้องใช้แหล่งคาร์บอนและพลังงานเป็นจำนวนมากเพื่อนำมาเปลี่ยนให้เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเซลล์ ในสภาวะปกติของการผลิตไวน์ การเจริญของจุลินทรีย์จะเกิดการเร่งความเร็วอย่างมากจนนำไปสู่ช่วงของการเจริญแบบ exponential ซึ่งเป็นช่วงที่กิจกรรมภายในเซลล์และการแบ่งเซลล์สูงสุด เรียกช่วงนี้ว่า logarithmic (log) phase และเป็นช่วงที่มีการผลิตเอทานอลสูงสุด การทวีจำนวนของเซลล์จะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมีออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำผลไม้อย่างเพียงพอที่ใช้สำหรับกระบวนการสังเคราะห์ต่าง ๆ โดยทั่วไปการเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำนั้นจะทำได้โดยอาศัยการกวนน้ำผลไม้ก่อนที่จะเริ่มกระบวนการหมัก หลังจากนั้นเพียงเล็กน้อย สภาวะของการหมักจะเข้าสู่สภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic condition) ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลที่สามารถหมักได้โดยเฉพาะ กลูโคส และฟรุกโตสไปเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolytic หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) parthway) (ภาพที่ 2.2) ซึ่งเป็นกระบวนการสร้างพลังงานหลักของยีสต์และจะเกิดเฉพาะในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน การเกิดวิถีไกลโคไลซิสที่ปริมาณสูง จะเกิดการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นฟองปกคลุมเหนือสภาพการหมักและจะเป็นตัวช่วยป้องกันออกซิเจนเข้ามาด้วย ฟองที่ปกคลุมนั้นจะคงอยู่จนกระทั่งการหมักเริ่มลดลง ด้วยเหตุนี้ความเป็นไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ที่ปริมาณออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นจึงต่ำมาก และอาจมีการปล่อยฟองคาร์บอนไดออกไซด์จากก้นถังหมัก จะช่วยทำให้สารอาหารที่ละลายอยู่เกิดการกระจายตัวซึ่งจะส่งผลดีต่อเซลล์ยีสต์ด้วย



ภาพที่ 2.2 glycolytic หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) parthway

ที่มา : Hornsey et al. (2007)

วิถีไกลโคไลซิสนั้นไม่ส่งผลต่อการเพิ่มชีวมวลของยีสต์ เมื่อสารอาหารส่วนใหญ่ถูกเปลี่ยนเป็น เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ และปริมาณของเอทานอลที่สะสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ นั้น จะยังไม่ส่งผลต่อวิถีไกลโคไลซิส ตราบเท่าที่ปริมาณนั้นยังไม่ส่งผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์ยีสต์ ส่วนผลกระทบในตอนท้ายของการหมักยังไม่เป็นที่แน่ชัด เนื่องจากในช่วงที่ความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเอทานอลสูงขึ้น เซลล์ยีสต์ก็เข้าสู่ช่วงการเจริญที่ลดลงเช่นกัน แต่มีผลเสียของเอทานอลที่ได้รับการศึกษาแล้วคือ เอทานอลมีผลต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์โดยการแทรกแซงการนำกรดอะมิโนและแอมโมเนีย (NH_4^+) ไปใช้ในการเจริญ

กระบวนการหมักในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ ยีสต์ไม่ได้หยุดแบ่งตัวเนื่องจากการขาดแคลนสารอาหาร แต่เกิดจากการขาดแคลนไขมัน ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ สภาวะขาดแคลนสารอาหารจะทำให้ยีสต์หยุดการแบ่งตัวและเข้าสู่ช่วงที่กิจกรรมเมตาบอลิซึมเริ่มหยุดนิ่ง ซึ่งเป็นวิธีการของเซลล์ที่จะช่วยให้สามารถอยู่รอดได้เป็นระยะเวลานาน

เมื่อปริมาณของเซลล์ยีสต์เพิ่มสูงสุด ยีสต์จะเข้าสู่ช่วง stationary phase เป็นช่วงที่อัตราการหมักสูงสุด ความเร็วในการหมักของช่วงนี้ส่วนใหญ่จะขึ้นกับการเจริญของยีสต์ในช่วงก่อนหน้านี้ กล่าวคือหากเชื้อมีการปรับตัวและเจริญได้ดี อัตราการหมักก็จะสูงตามไปด้วย และเมื่อเซลล์เข้าสู่ stationary phase จะขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักและปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่มีในน้ำผลไม้

ในระหว่างช่วง end phase ของกระบวนการหมัก ระดับของเอทานอลที่สูงขึ้นเรื่อย ๆ นั้นจะส่งผลยับยั้งเซลล์ยีสต์เอง และร่วมกับปริมาณสารอาหารที่ขาดแคลน ส่งผลให้อัตราการเกิดไกลโคไลซิส ลดลงจนกระทั่งกระบวนการหมักสิ้นสุด ความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลนั้นขึ้นกับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลและอุณหภูมิในการหมัก ในทางทฤษฎีของปริมาณสารสัมพันธ์ ปริมาณของน้ำตาลที่สามารถหมักได้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยวิถีไกลโคไลซิสเท่านั้น แต่ความสัมพันธ์นี้เกิดขึ้นยากในการปฏิบัติจริง เหตุผลส่วนหนึ่งเกิดจากคาร์บอนบางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพอาจส่งผลให้อัตราการเกิดไกลโคไลซิสลดลงได้

ในระยะสุดท้ายของการหมัก เซลล์ยีสต์จะปล่อยกรดอะมิโนออกมาสู่ไวน์ ซึ่งอาจเกิดจากการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ (autolysis) หรือ อาจเกิดจากความเป็นพิษของเอทานอล Salgueiro et al. (1988) ได้รายงานการทดลองการเติมแอลกอฮอล์ลงในไวน์ที่หมักในห้องปฏิบัติการพบว่าเกิดการรั่วไหลของสารออกมาจากเซลล์ยีสต์ สารประกอบไนโตรเจนที่ถูกปล่อยออกมามีทั้งผลดีและผลเสีย ในแง่ดีจะช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาในขณะบ่มไวน์พร้อมกากยีสต์ (*sur lie*) ในแง่ลบกรดอะมิโนจะแตกตัวได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นยูเรียซึ่งเป็นสารตั้งต้นของยูรีเทน (urethane) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง

ในการทำไวน์สมัยใหม่จะหมักไวน์ในถัง stainless steel แบบปิดขนาดใหญ่ที่ควบคุมอุณหภูมิ ระยะเวลาในการหมักขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ การหมักที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยเพิ่มปริมาณสาร ester ซึ่งช่วยเพิ่มคุณลักษณะด้านความเป็นผลไม้ (Fruity) ให้แก่ไวน์ การหมักไวน์ที่อุณหภูมิสูงจะช่วยเร่งให้การผลิตแอลกอฮอล์สูงขึ้น รวมถึงแอลกอฮอล์โมเลกุลใหญ่ (Fusel oil) อย่าง iso-amyl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ hexanol แต่ถ้าทำการหมักที่อุณหภูมิสูงในสภาวะ pH ต่ำ ส่งผลให้ปริมาณแอลกอฮอล์โมเลกุลใหญ่ลดลง

หนึ่งในปัญหาที่ยากจะแก้ไขของการทำไวน์คือ "การหมักหยุดชะงัก" ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของยีสต์หยุดลงก่อนที่น้ำตาลจะหมดลง น้ำตาลที่เหลืออยู่นั้นจะเกื้อหนุนให้แบคทีเรียปนเปื้อนสามารถเจริญได้ การหมักที่หยุดชะงักไปแล้วยากที่จะเริ่มใหม่ได้ แต่ถ้าน้ำหมักที่มีน้ำตาลเหลืออยู่มากกว่า 15 กรัมต่อลิตรและเอทานอลต่ำกว่า 12% อาจสามารถหมักใหม่ได้ แต่ถ้าปริมาณแอลกอฮอล์ขึ้นสูงเกินกว่า 13% จะไม่สามารถนำกลับมาหมักใหม่ได้ ในการหมักขั้นต่อมามักจะพบปัญหาการปนเปื้อน เนื่องจากยีสต์เริ่มมีกิจกรรมลดลงทำให้แบคทีเรียอื่นสามารถเจริญได้ โดยจะเกิดขึ้นบ่อยในน้ำผลไม้ที่เติมซัลเฟตน้อยเกินไป และสาเหตุหลักที่ทำให้การหมักหยุดชะงักคือความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำผลไม้เริ่มต้นมากเกินไป และอุณหภูมิช่วงต้นการหมักสูงเกินไป และอาจเกิดจากสาเหตุอื่นๆ อีกเช่น อุณหภูมิในช่วงต้นของการหมักที่ต่ำไปทำให้ยีสต์มีการแบ่งตัวน้อย ความเป็นพิษของเอทานอล ทั้งนี้เนื่องจากเอทานอลไปยับยั้งการส่งผ่านคาร์โบไฮเดรตเข้าสู่เซลล์ ซึ่งมักจะเกิดร่วมกับสาเหตุอื่น เช่น น้ำตาลที่เติมมากเกินไป และกรดไขมัน C6 C8 และ C10 ที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์โดยเฉพาะ กรด decanoic

การควบคุมอุณหภูมิระหว่างการหมัก เป็นสิ่งจำเป็นในกระบวนการผลิตไวน์ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักของยีสต์ เนื่องจากกระบวนการหมักเอทานอลเป็นปฏิกิริยาคายพลังงาน ซึ่งจะทำให้อุณหภูมิของถังหมักสูงขึ้นเรื่อยๆ จึงจำเป็นต้องมีระบบหล่อเย็น และถังหมักในปัจจุบันส่วนใหญ่จะมีทั้งแบบหล่อเย็นด้านใน (cooling ring) และด้านนอก (cold jacket)

2.2. ปัจจัยในกระบวนการหมักไวน์

ปัจจัยในกระบวนการหมักไวน์ประกอบด้วย ปริมาณน้ำตาลทั้งที่มีอยู่ในน้ำหมักและที่เติมเข้าไป ระยะเวลาที่ใช้หมัก อุณหภูมิในการหมัก วัตถุดิบ สายพันธุ์ยีสต์ อากาศ จุลินทรีย์ปนเปื้อน และจลนศาสตร์การหมัก (Goelzer et al., 2009)

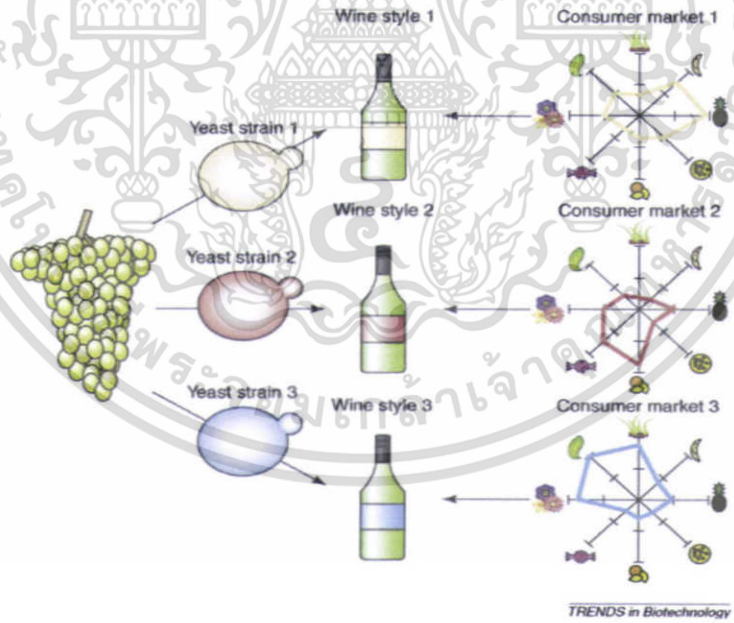
2.2.1 สายพันธุ์ยีสต์

ชนิดของยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักไวน์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อคุณลักษณะของไวน์ การเจริญของยีสต์ที่ใช้หมักไวน์นั้นมีความจำเพาะต่อเมตาบอลิซึมของยีสต์ ซึ่งจะส่งผลต่อสารประกอบให้กลิ่นต่าง ๆ ของไวน์ดังภาพที่ 2.3 หัวเชื้อยีสต์ที่ใช้อยู่ทั่วไปจะต้องมีความเสี่ยงที่จะทำให้ไวน์เน่าเสียต่ำและไม่ทำให้รสชาติของไวน์เปลี่ยนแปลง ให้กลิ่นรสของไวน์ที่มีความเหมาะสม ดังนั้นหากเชื้อยีสต์ที่ถูกเลือกมาจากคุณลักษณะที่สามารถพิสูจน์ได้ทางวิทยาศาสตร์ จากการศึกษาพบว่า *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่เหมาะสมต่อการนำมาทำเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักไวน์มากที่สุด (Romano et al., 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักไวน์ส่งผลต่อคุณลักษณะของไวน์ที่ได้ โดยเฉพาะลักษณะของกลิ่นรสเฉพาะตัวของผลไม้นั้น จากการศึกษาของ Rupasinghe และ Clegg (2007) พบว่าปริมาณของสารที่ส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอล ฮีสตามีน และแร่ธาตุในไวน์ผลไม้ 10 ชนิด คือ ไวน์องุ่น ชาเบอเน็ต (ไวน์แดง) เอลเดอร์เบอรี่ บลูเบอรี่ แบล็คเคอเรน เชอรี่ ราสเบอรี่ แครนเบอรี่ พลัม แอปเปิ้ล พีช ไอซ์ไวน์ (องุ่นที่แข็งในหิมะในฤดูหนาว) ชาโดเน่ (ไวน์ขาว) ลูกแพร และองุ่นไรชริง (องุ่นสายพันธุ์เยอรมัน) พบว่า มีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 219 ถึง 2447มิลลิกรัม เทียบเท่า ascorbic acid ต่อลิตร โดยที่มีสารต้านอนุมูลอิสร และปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุดในไวน์แดง (องุ่นชาเบอเน็ต) เอลเดอร์เบอรี่ บลูเบอรี่ และแบล็คเคอเรน รองลงมาเป็น ไวน์เชอรี่ ราสเบอรี่ แครนเบอรี่ และพลัม และพบน้อยในไวน์แอปเปิล พีช ไอซไวน์ ไวน์ขาวจากองุ่นชาโดเน่ และไวน์ลูกแพร สำหรับแร่ธาตุพบโพแทสเซียมมากที่สุดจากไวน์ทุกชนิด แคลเซียมพบมากที่สุดในไวน์แครนเบอรี่ ไวน์องุ่นทั้งไวน์ขาว ไวน์แดง และไอซไวน์มีปริมาณแมกนีเซียมสูงสุดพบธาตุเหล็ก แมงกานีส และสังกะสีเล็กน้อย และไวน์แดงพบฮีสตามีนสูงสุด(11.1 mg/L) จากไวน์ผลไม้ทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีการคิดค้นไวน์จากวัตถุดิบใหม่ ๆ เช่น ไวน์แตงโม (Reddy, 2008) ไวน์จากปาล์ม (หมากมัน) (Lasekan et al., 2007) และอื่นๆ



ภาพที่ 2.3 เมตาบอลิซึมที่แตกต่างกันของ *S. cerevisiae* ต่างสายพันธุ์ (สายพันธุ์ 1, 2 และ 3)ในวัตถุดิบเดียวกัน ให้คุณลักษณะด้านประสาทสัมผัสที่ต่างกัน : กลุ่มผู้บริโภคที่ 1 ชอบไวน์ที่มีกลิ่นรสผลไม้ , กลุ่มที่ 2 ชอบไวน์ที่มีกลิ่นรสของกรดซิตริกและออกหวาน , กลุ่มที่ 3 ชอบไวน์ที่มีกลิ่นหอมคล้ายดอกไม้และสมุนไพร ซึ่งเกิดจากความแตกต่างของเมตาบอลิซึมของยีสต์ต่างสายพันธุ์

ที่มา : Borneman et al. (2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 สารอาหาร

น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและสารตั้งต้นในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ โดยการผลิตแบบดั้งเดิมของฝรั่งเศสจะไม่มีการเติมน้ำตาลลงในน้ำองุ่นที่จะใช้หมัก แต่จะใช้องุ่นที่สุกมากเพื่ออาศัยเอนไซม์ในผลองุ่นเองเปลี่ยนเพคตินให้เป็นน้ำตาล หรือในกระบวนการผลิตแบบทั่วไปจะเติมน้ำตาลเพื่อเพิ่มแหล่งคาร์บอนและสารตั้งต้น การวัดปริมาณน้ำตาลสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวัดปริมาณ total soluble solid หรือ ค่า องศาบริกซ์ และได้มีการใช้ Shortwave-near infrared spectroscopy (800–1050 nm) เพื่อวัดน้ำตาลรีดิวซ์ในองุ่นสุก ไวน์ขาวและไวน์แดงในกระบวนการหมักและการบ่ม ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงและราคาวิเคราะห์ต่ำกว่าวิธีแบบดั้งเดิม (Fernández-Novales et al., 2009) การควบคุมปริมาณน้ำตาลในน้ำองุ่นโดยใช้เมมเบรนเพื่อลดปริมาณน้ำตาลของน้ำองุ่นที่จะผลิต ซึ่งจะส่งผลให้ระดับแอลกอฮอล์ที่หมักได้สูงขึ้นด้วย (García-Martín et al., 2009)

2.2.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิส่งผลต่อจลนศาสตร์การหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ โดยส่งผลต่อทั้งอัตราการเจริญและอัตราการหมักแอลกอฮอล์ จากการศึกษาของ Athanasios et al. (2007) แสดงให้เห็นผลกระทบของอุณหภูมิในการผลิตไวน์ชนิดตรึงเซลล์ต่อสารระเหยง่าย โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 25 20 15 และ 10 องศาเซลเซียส พบว่าที่ 10 องศาเซลเซียส ยีสต์มีความสามารถในการผลิตเอทานอลที่สูง แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิการผลิตไวน์ที่ต่ำจะช่วยเร่งการหมัก เซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงจะผลิต อีธิลเอสเทอร์ อะซิเตรทเอสเทอร์ และกรดไขมันที่ระเหยง่ายในปริมาณสูงที่อุณหภูมิ 15 และ 10 องศาเซลเซียส แต่ให้ผลตรงข้ามกับการหมักในถังหมักที่ไม่ตรึงเซลล์พบว่าเชื้อยีสต์มีประสิทธิภาพในการหมักสูงที่อุณหภูมิสูง

Blake et al. (2009) ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิและแสงต่อปริมาณ 3-Alkyl-2-methoxypyrazines (MPs) ซึ่งเป็นสารประกอบให้กลิ่นเฉพาะที่สำคัญในไวน์ในระหว่างการบ่ม โดยแบ่งสภาวะเป็น (1) อุณหภูมิห้องภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ (2) อุณหภูมิห้องในที่มืด และ (3) ในที่มืดอุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส และในการเก็บภายใต้แสงจะบ่มในขวดแก้วสีเขียว เหลืองอำพันและใส พบว่า ปริมาณ MPs ไม่มีความสอดคล้องต่อทั้งสภาวะภายใต้แสงและอุณหภูมิ ขณะที่ 3-isobutyl-2-methoxypyrazine (IBMP) ในไวน์ทั้ง 2 ชนิดลดลง 30% ภายใต้ทุกสภาวะในช่วงการเก็บรักษา 12 เดือน ส่วนปริมาณ acetate esters ลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาและไม่แตกต่างกันในทุกสภาวะการเก็บรักษา โดยที่ปริมาณ phenethyl acetate และ isoamyl acetate ลดลงอย่างมากที่ 22 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับที่ 12 องศาเซลเซียส สำหรับปริมาณ SO_2 สูงในสภาวะการเก็บที่ไม่มีแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 การเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์

ในกระบวนการผลิตไวน์ที่ต้องเป็นระบบที่สามารถป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ การปนเปื้อนของเชื้อยีสต์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของไวน์เป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่ต้องควบคุม โดยเฉพาะ *Brettanomyces bruxellensis* ที่สามารถสร้างสารประกอบฟีนอลที่ให้กลิ่นเหม็นและสูญเสียกลิ่นเฉพาะตัวของผลไม้ ทำให้ไวน์มีคุณภาพต่ำ มีการศึกษาการใช้ dimethyldicarbonate (DMDC) ที่มีสมบัติเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ ในขั้นตอนต่าง ๆ ของกระบวนการผลิตไวน์ ตั้งแต่ ในน้ำองุ่นที่พึ่งคั้นเสร็จ ขั้นตอนก่อนการหมักแอลกอฮอล์ ขั้นตอนการบ่ม และไวน์ที่ผลิตเสร็จแล้ว พบว่า DMDC ที่ใช้ไม่ส่งผลต่อรสชาติ และการติดตามประสิทธิภาพการยับยั้ง อีกทั้งยังพบว่า DMDC สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. bruxellensis* ในทุกขั้นตอนการผลิต แต่ DMDC กลับยับยั้ง *S. cerevisiae* และ *Oenococcus oeni* ที่ใช้หมักไวน์ด้วย จึงไม่ควรใช้ DMDC ก่อนสิ้นสุดกระบวนการหมัก (Renouf et al., 2008)

นอกจากนี้การปนเปื้อนจากแบคทีเรียอะซิติก หรือแบคทีเรียหมักน้ำส้มสายชูก็เป็นปัญหาสำคัญในการผลิตไวน์ แบคทีเรียอะซิติกสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีน้ำตาลและเอทานอล และเป็นเชื้อที่พบโดยทั่วไปในองุ่น ลักษณะการเน่าเสียจากแบคทีเรียอะซิติก จะเกิด biofilm ที่บริเวณคอขวดและช่องว่างเหนือไวน์ มีกลิ่นกรดน้ำส้มสายชู หรือกลิ่นคล้ายแอปเปิ้ลเน่าไวน์จะเสื่อมเสียจากแบคทีเรียอะซิติก ในขั้นตอนการหมักและการบ่มที่มีอากาศดังนั้นจึงสามารถควบคุมการเจริญของแบคทีเรียอะซิติก ได้โดยการลดหรือจำกัดปริมาณของออกซิเจนในสภาวะการผลิตและเก็บรักษา (Bartowsky and Henschke, 2008)

2.2.6 ปัจจัยอื่นๆ

ปัจจัยอื่นๆที่ส่งผลต่อคุณลักษณะของไวน์ เช่น การบ่ม ภูมิศาสตร์ จากการศึกษาของ Garde-Cerdán et al. (2009) ในไวน์สเปนที่บ่มในถังไม้กว่า 240 ตัวอย่าง พบว่า ระดับของแอลกอฮอล์มากขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม สภาพทางภูมิศาสตร์ก็มีผลเช่นกัน โดยไวน์จากบริเวณที่มีฝนตกน้อยประมาณ 1 ครั้งต่อปีจะมีระดับแอลกอฮอล์ที่สูงกว่า และไวน์ที่บ่มในถังไม้นาน ๆ ทั้งนี้รวมถึงปริมาณ ethyl esters และกรดอินทรีย์สูงกว่าด้วย

2.3 ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30

S. cerevisiae M30 เป็นยีสต์ตกตะกอนจากผลงานวิจัยของห้องปฏิบัติการทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านยีสต์ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า *S. cerevisiae* M30 ใช้ในการศึกษากระบวนการหมักไวน์จากน้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ยีสต์ M30 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 9.0% ในเวลา 48 ชั่วโมงด้วยระบบหมุนวนเซลล์ (cell recycling system) (Krusong et al., 2010) ในขณะที่การหมักแบบปกติได้ปริมาณแอลกอฮอล์ 9.0% เวลา 150 ชั่วโมง (Krusong et al., 2007) การหมักเอทานอลจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กากน้ำตาล ได้ปริมาณเอทานอล 12% ภายในเวลาการหมัก 27 ชั่วโมงและการใช้คลื่นอัลตราโซนิคความถี่ต่ำสามารถกระตุ้นให้อัตราการหมักเอทานอลของยีสต์สูงขึ้น (Klomklieng and Prateepasen, 2011) และในการศึกษาการสร้างจุลินทรีย์โปรตีน (single cell protein) จากน้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนของยีสต์ด้วยระบบหมุนวนเซลล์ 7 รอบต่อนาที ภายในเวลา 3 วัน พบว่าให้ค่าผลผลิตเซลล์สูงถึง 0.4623 และจำนวนเซลล์ยีสต์เท่ากับ 9.626 log cfu/ml เซลล์จุลินทรีย?โปรตีนที่ได้มีโปรตีน 46% ไขมัน 6.69% และความชื้น 7.52%

ผลการศึกษาการหมักไวน์สับปะรดของ Krusong และ Vichitraka (2010) พบว่าอัตาการเจริญของยีสต์สูงในชั่วโมงที่ 24 ถึง 48 ของการหมัก อัตราการหมักแอลกอฮอล์เท่ากับ 0.177 ถึง 0.275 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณแอลกอฮอล์ในช่วงสิ้นสุดการหมักเท่ากับ 9.6% ปริมาณกรด 0.5% ภายในเวลา 150 ชั่วโมง

2.4 แบคทีเรียแลคติกที่พบในไวน์ (König et al., 2009)

แบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่ที่พบในไวน์มี 3 สายพันธุ์

1. *Leuconostoc* spp. เป็น heterofermentative ลักษณะทรงกลม อยู่เกาะเป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายยาว

2. *Pediococcus* spp. เป็น homofermentative ลักษณะทรงกลม ส่วนใหญ่พบเกาะกันเป็นกลุ่ม

3. *Lactobacillus* spp. เป็น ทั้ง homofermentative และ heterofermentative รูปแท่ง พบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือ ต่อเป็นสายยาว

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่มีเอนไซม์คาตาเลส (catalase negative) รูปร่างทรงกลม รี หรือ แท่ง ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ดีในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนเล็กน้อย (microaerophile) และสามารถเจริญได้ในไวน์ เปลี่ยนน้ำตาล กรด และสารอื่นๆในไวน์ และสร้างเป็นสารประกอบหลากหลายชนิด ซึ่งบางชนิดเป็นปัจจัยในการตัดสินการเน่าเสียของไวน์

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียตัวสำคัญในจุลชีววิทยาทางอาหารและโภชนาการของมนุษย์ มีบทบาทสำคัญในกระบวนการผลิตและถนอมอาหาร โดยเฉพาะความสามารถในการเป็นโปรไบโอติกของมัน นอกจากนั้น ยังเป็นปัญหาสำคัญของการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มด้วย (Kandler and Weiss 1986) แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่รูปร่างแทนหรือบางครั้งพบเห็นเป็นทรงกลมรี ส่วนใหญ่พบต่อกันเป็นสายยาว แต่ก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ช่วงของการเจริญ และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารด้วย ส่วนความยาวของเซลล์นั้นจะขึ้นกับส่วนประกอบต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อและความเข้มข้นของออกซิเจน ทนต่อความเป็นกรด และชอบสภาวะที่เป็นกรด แต่มี pH เหมาะสมต่อการเจริญที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.2

สามารถแบ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ออกเป็นสองกลุ่มด้วยการเมาตาบอไลซ์น้ำตาลเฮกโซส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Strict heterofermenters แบคทีเรียที่หมักน้ำตาลได้ผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิดในทุกสภาวะ ได้แก่ *L. brevis, L. hilgardii*
- Facultative heterofermentative แบคทีเรียที่หมักน้ำตาลได้ผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายในบางสภาวะ ได้แก่ *L. casei, L. plantarum*

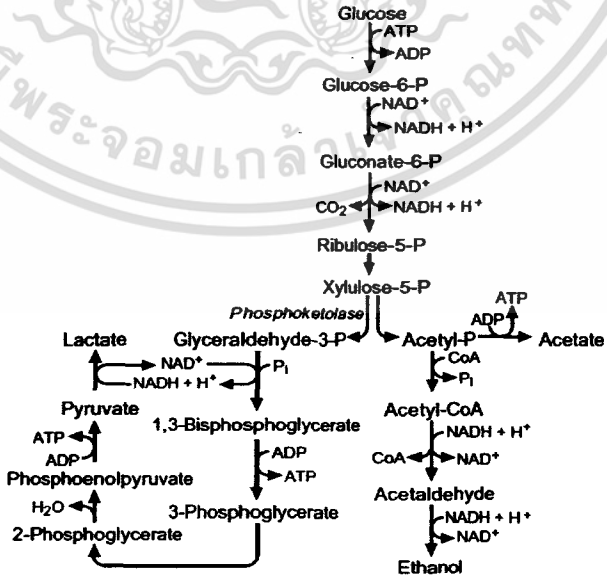
เมตาบอลิซมแบบ heterofermentative นั้นกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก และสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์แสดงดังภาพที่ 2.4

แต่ยังมีแบคทีเรียกลุ่มที่สามคือ strict homofermentative ซึ่งไม่พบในไวน์

Lactobacillus สามารถทนต่อออกซิเจน และอาศัยอยู่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศก็ได้ ต้องการอาหารที่อุดมด้วยคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน เปปไทด์ กรดไขมัน แร่ธาตุและวิตามิน

บางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ pseudocatalase และ nitrite reductase สามารถสร้างพลังงานได้ทั้ง homofermentative และ heterofermentative จากการหมักคาร์บอนไดออกไซด์ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน

Lactobacillus หลากหลายสายพันธุ์สามารถแยกได้จากทั้งอุ่นและไวน์จากทั่วโลก มีทั้ง *L. brevis, L. bucheri, L. casei, L. paracasei, L. cellobiosus, L. curvatus, L. delbrueckii, L. diolivorans, L. fructivorans, L. heterohiochii, L.hilgardii, L. jensenii, L. kunkeei, L. leichmanni, L. lindneri, L. mali, L. nagelli, L. plantarum, L. trichodes, L. vermiforme, L. vini, L. yamanashiensis* และ *L. zeae* (Douglas and Cruess, 1936; Fornachon, 1957; Costello et al., 1983; Lafon-Lafourcade et al., 1983; Davis et al., 1986; Sieiro et al., 1990; Edwards et al., 2000; Du Plessis et al., 2004; Beneduce et al., 2004; Moreno-Arribas and Polo, 2008)



ภาพที่ 2.4 วิถีเมทาบอริซมนิด heterofermentative น้ำตาลกลูโคส ของแบคทีเรียแลคติก

ที่มา Kenneth และ Charles (2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 แบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum เซลล์มีลักษณะเป็นทรงแท่ง 0.9-1.2 μm x 3.0-8.0 μm พบทั้งเซลล์เดี่ยว คู่ และสายสั้น สามารถใช้ไนเตรตในสภาวะที่มีกลูโคสจำกัดและความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 6.0 สร้าง pseudocatalase ในสภาวะกลูโคสต่ำ พบ ribitol หรือ กรด glycerol teuchoic บนผนังเซลล์ พบได้ในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์หญ้าหมักที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ (silage) กระหล่ำปลีดอง ผักดอง แป้งหมัก ขนมปัง ขี้วัว ช่องปาก ลำไส้และอุจจาระของคน น้ำเน่า สิ่งปฏิกูล และน้ำหมักอุ่น จากงานวิจัยของ Radler และ Yannissis (1972) กล่าวว่า เอนไซม์มาโลแลคติกสามารถพบได้ใน *L. plantarum* แต่เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไม่สามารถทนต่อไวน์ที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สูงได้จึงถูกให้ความสำคัญในบทบาทของการหมักมาโลแลคติกน้อยว่า *O. oeni* ซึ่งสามารถทนต่อแอลกอฮอล์และกรดในปริมาณสูงกว่า

ปรนีย์ และคณะ (2547) ได้คัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการสร้างกรดจากถั่วเหลืองในโรงงานผลิตน้ำนมถั่วเหลืองเพื่อนำมาใช้ในการหมักกากถั่วเหลืองผลิตอาหารสัตว์ พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้และเหมาะสมต่อการผลิตอาหารสัตว์เป็น *L. plantarum* และสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร*ประกอบด้วย Listeria innocua, Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella Anatum, Staphylococcus aureus* และ *Clostridium perfringens* บนอาหารแข็งได้อีกด้วย

2.6 แหล่งที่พบแบคทีเรียแลคติก (Dharmadhikari, 2010)

แบคทีเรียแลคติกสามารถพบได้ทั้งผิวหน้าและใบขององุ่น แต่โดยทั่วไปพบในปริมาณน้อยและขึ้นกับความสุกและสภาวะของผล และยังพบการปนเปื้อนบนเครื่องมือในโรงงาน เช่น ปั๊ม วาล์ว และถังเก็บ รวมถึงไม้ที่ยากต่อการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ

ในขั้นตอนการบีบและคั้นตรวจพบปริมาณแบคทีเรียแลคติกเพียง 10^3 ถึง 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. และ *Leuconostoc* spp. ส่วนในขั้นตอนการหมักแอลกอฮอล์ ปริมาณของแบคทีเรียแลคติกลดลง ซึ่งอาจจะเกิดจากการแข่งขันกับเชื้อยีสต์ รวมถึงผลกระทบจากเอทานอลและซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ยีสต์สร้างขึ้นระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ หลังจากนั้นแบคทีเรียที่รอดชีวิตจะฟื้นตัวและเข้าสู่กระบวนการหมักมาโล-แลคติค ปริมาณเซลล์จะเพิ่มสูงขึ้นถึง 10^6 ถึง 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยทั่วไปการหมักมาโล-แลคติคจะเกิดจาก *Leuconostoc* spp. แต่ในกรณีที่ pH สูงกว่า 3.5 การหมักมาโล-แลคติคจะเกิดจาก *Pediococcus* spp. และ *Lactobacillus* spp. ภายหลังจากการหมักมาโล-แลคติค การอยู่รอดของแบคทีเรียแลคติกจะขึ้นกับสภาวะของไวน์ หากไวน์มี pH สูง (> 3.5) และมีปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไม่เพียงพอจะเกิดการเน่าเสียจากแบคทีเรียแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ลักษณะการเน่าเสียของไวน์ที่เกิดจากแบคทีเรียแลคติก (Dharmadhikari, 2010)

การเน่าเสียของไวน์ที่เกิดจากแบคทีเรียแลคติกนั้นเกิดจากหลายปัจจัย เช่น ชนิดของแบคทีเรียแลคติก ส่วนประกอบและสภาวะของไวน์ และข้อปฏิบัติของโรงผลิต ซึ่งการเน่าเสียของไวน์สามารถจำแนกดังต่อไปนี้

2.7.1 การหมักของน้ำตาล

แบคทีเรียแลคติก รวมถึงสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการหมักมาโล-แลคติคสามารถเมตาบอไลซ์น้ำตาลเช่น กลูโคส และ ฟรุคโตส และสร้างกรดแลคติคและอะซิติค ทำให้ไวน์มีกลิ่นเปรี้ยว เนื่องจากระดับของกรดที่ระเหยได้สูง (high volatile acid) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การหมักไวน์หยุดชะงัก และการเน่าเสียของไวน์ที่มีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่มาก (sweet wine) แต่จะมีปัญหาน้อยมากกับไวน์ที่มีปริมาณน้ำตาลต่ำ (dry wine) แต่จะเกิดกรณีที่แบคทีเรียแลคติกใช้น้ำตาลเพนโตสที่เหลืออยู่เพียงเล็กน้อย เกิดกรดแลคติคและอะซิติคที่เป็น by-product ทำให้ปริมาณของกรดที่สามารถไตเตรตได้สูงขึ้น และ pH ต่ำลงส่งผลต่อการเจริญของเชื้อชนิดอื่น

2.7.2 การย่อยสลายกลีเซอรอล

แบคทีเรียแลคติกย่อยสลายกลีเซอรอลได้เป็นกรดแลคติค อะซิติค และอะโครเลอิน (acrolein) ทำให้ไวน์มีกลิ่นของกรดอะซิติค บิวทิริคและรสขมที่ได้จากอะโครเลอิน

2.7.3 การหมักของกรดทาร์ทาริค (tartaric acid)

การเน่าเสียชนิดนี้ แบคทีเรียแลคติกจะหมักกรดทาร์ทาริคได้เป็นกรดแลคติค อะซิติคและคาร์บอนไดออกไซด์ การย่อยสลายกรดทาร์ทาริคจะเกิดขึ้นกับไวน์ที่มีความเป็นกรดต่ำและมี pH สูงกว่า 3.5 ทำให้ไวน์มีกลิ่นของกรดอะซิติค และรสชาติไม่เป็นที่ยอมรับ จนกระทั่งมีกลิ่นเหม็นคล้ายหนู (mousy)

2.7.4 การหมักกรดซิตริค

ปริมาณของกรดซิตริคจะลดลงระหว่างการเกิดการหมักมาโล-แลคติค ขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และ pH ของไวน์ โดยการย่อยสลายกรดซิตริคมีความสัมพันธ์กับการเกิดไดอะซิติล (diacetyl) และอะซิโตน (acetone) เช่นเดียวกับกรดอะซิติค

2.7.5 การเกิดความข้นหนืด

แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Leuconostoc* spp. พบว่าสามารถสร้างเมือกเดคเตรน (dextran slime) หรือสารเมือกชนิดอื่นในไวน์ได้ ทำให้ไวน์ข้นคล้ายน้ำมัน (oily) และอาจมีปริมาณของกรดที่ระเหยได้สูงด้วย โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียแลคติกบางกลุ่มเกี่ยวข้องกับการเกิดการหมักของกรดมาลิคและองค์ประกอบอื่นๆในไวน์ ทำให้เกิดสารประกอบต่าง ๆ มากมายที่ทำให้ไวน์เกิดกลิ่นรสไม่ดี ในบางกรณีอธิบายการเน่าเสียของไวน์ว่า acetic หรือ sour buttery cheesy กลิ่นคล้ายกระหล่ำปลีดอง (sauerkraut-like) ขม (bitter) กลิ่นหมักดอง (pickle aroma) กลิ่นคล้ายหนู (mousy) และกลิ่นคล้ายดอกเจอราเนียม (geranium)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.6 กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์อื่นๆ

กลิ่นต่าง ๆ ที่ไม่เป็นที่น่าพอใจ รวมถึงกลิ่นคล้ายหนู และกลิ่นคล้ายดอกเจอราเนียม โดยกลิ่นเหม็นคล้ายหนูเกิดจากสารประกอบที่เรียกว่า acetyltetrahydropyridine ซึ่งสร้างจาก *Lactobacillus* สองสายพันธุ์ ส่วนกลิ่นคล้ายดอกเจอราเนียมเกิดจากสารประกอบที่รู้จักในชื่อ 2-ethoxyhexa-3, 5-diene สารประกอบชนิดนี้เกิดจากการสลายกรดซอร์บิค (sorbic acid) โดยแบคทีเรียแลคติก ในไวน์ที่มีน้ำตาลสูงกรดซอร์บิคจะทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่จะไปหมักน้ำตาลที่เหลืออยู่ แต่เมื่อถูกแบคทีเรียแลคติกย่อยสลายเกิด 2-ethoxyhexa-3, 5-diene ที่มีกลิ่นคล้ายดอกเจอราเนียม ดังนั้นไวน์หวานที่เติมกรดซอร์บิคควรมีการควบคุมแบคทีเรียแลคติกที่ดี

2.8 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในไวน์ (Dharmadhikari, 2010)

การเน่าเสียของไวน์จากแบคทีเรียแลคติก โดยส่วนใหญ่เกิดจากแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. และ *Leuconostoc* spp. ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย แลคติก ประกอบด้วย (1) องค์ประกอบของไวน์และน้ำหมัก (2) ข้อปฏิบัติในการทำไวน์ และ (3) ปฏิสัมพันธุ์กับจุลินทรีย์อื่น

2.8.1 องค์ประกอบของไวน์และน้ำหมัก

pH เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งจะมีผลตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นและระหว่างการหมักมาโล-แลคติค ก่อให้เกิดผลต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในไวน์และยังส่งผลต่อเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ซึ่งดูได้จากผลพลอยได้ (by-product) ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น โดยทั่วไป pH ของไวน์อยู่ในช่วง 3.0 – 4.0 ยิ่ง pH มากขึ้น เวลาที่ใช้ในกระบวนการหมักมาโล-แลคติค จะยิ่งลดลง ตามที่ Bousbouras และ Kunkee (1971) รายงานไว้ว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักมาโล-แลคติค ในสภาพ pH 3.18 เท่ากับ 23.4 สัปดาห์ ในขณะที่ pH 3.83 สิ้นสุดการหมักภายในระยะเวลาสองสัปดาห์

นักวิจัยหลายคนได้รายงานถึงผลกระทบของ pH ต่อสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เจริญในไวน์ โดยทั่วไปแล้วที่ pH ต่ำกว่า 3.5 การหมักมาโล-แลคติกจะเกิดจาก *Leuconostoc* spp. ในขณะที่ pH ประมาณ 3.5 สายพันธุ์ *Pediococcus* spp. และ *Lactobacillus* spp. มีการเจริญที่ดีกว่า และยังพบว่ามี *Lactobacillus* spp. หลายสายพันธุ์ ที่ส่งผลทำให้ไวน์เน่าเสีย นอกจากนั้น pH ยังส่งผลต่อกระบวนการ เมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์อีกด้วย เช่นว่า ที่ pH 3.5 หรือสูงกว่านั้น แบคทีเรียแลคติกสามารถย่อยสลายน้ำตาล กรดทาร์ทาริค และกรดซิตริค และทำให้ระดับของกรดที่ระเหยได้สูงขึ้น ดังที่กล่าวมาแล้วแสดงให้เห็นว่า การควบคุม pH ของไวน์เป็นหนึ่งในการป้องกันกาเน่าเสียของไวน์ได้

ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) มีผลต่อการฆ่าเชื้อซึ่งใช้อย่างแพร่หลายในการทำไวน์ เพื่อควบคุมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในไวน์จะอยู่ในรูปอิสระและเกาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกี่ยวกับสารอื่น ในทุกรูปแบบนั้นจะมีความสัมพันธุ์กับ pH โดยที่ความเข้มข้นของซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระจะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH ของไวน์ลดลง ดังนั้นที่ pH ต่ำ ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะยิ่งมากขึ้น ในรูปที่เกาะเกี่ยวกับสารอื่น เช่น สารประกอบคาร์บอนิล อาทิ อะซิทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) เมื่อแบคทีเรียแลคติกย่อยสลายสารประกอบคาร์บอนิล จะปล่อยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไปในตัว ทำให้เกิดซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และซัลเฟอร์ไดออกไซด์มีผลในการฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้น 0.8 ppm ซึ่งเพียงพอต่อการยับยั้งแบคทีเรียแลคติก

แอลกอฮอล์ โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียแลคติกสามารถอยู่รอดและเจริญได้ในไวน์ (table wine) และขึ้นกับความทนทานแอลกอฮอล์ของแต่ละสายพันธุ์ เช่น *L. trichods* สามารถพบได้ในไวน์ที่มีแอลกอฮอล์สูงถึง 20% ซึ่งความต้านทานแอลกอฮอล์นั้นจะขึ้นกับค่า pH และอุณหภูมิในการเก็บรักษาด้วย

ออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ รวมถึงสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ (microaerophilic) เหมาะแก่การเจริญของแบคทีเรียแลคติก แต่ยังมีงานวิจัยที่พิสูจน์ว่าคาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวกระตุ้นให้แบคทีเรียแลคติกเจริญด้วยและอาจจะช่วยกระตุ้นให้เกิดการหมักมาโล-แลคติคด้วยเช่นกัน ซึ่ง Kelly et al. (1989) ได้สรุปไว้เช่นกันในกรณีที่ระดับของออกซิเจนต่ำโดยใช้ในโตรเจนแทนที่

สารอาหาร แบคทีเรียแลคติกต้องการแหล่งพลังงานเช่น คาร์โบไฮเดรตและเกลืออนินทรีย์ ยิ่งไปกว่านั้นยังต้องการสารอาหารอื่นๆที่ช่วยในการเจริญ เช่น วิตามิน และกรดอะมิโน อนึ่งการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ (yeast autolysis) ส่งผลให้สารอาหารในไวน์สูงขึ้น ดังนั้นในไวน์ที่หมักเสร็จใหม่อาจเกิดการเน่าเสียจากแบคทีเรียแลคติกได้

2.8.2 ข้อปฏิบัติในการทำไวน์

การปฏิบัติในการทำไวน์ที่อาจมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในโรงไวน์ ตั้งแต่การตรวจสภาพของผลไม้ การปรับน้ำหมัก การทำให้ใส สภาวะการหมักระยะเวลาที่เปลือกแช่ในน้ำหมัก (ในกรณีของไวน์แดง) การเก็บรักษาและสุขลักษณะในโรงไวน์

โดยทั่วไปผลไม้จะมีปริมาณของแบคทีเรียแลคติกบนผิวไม่สูงนัก ดังนั้นการใช้ผลไม้ที่ดีไม่เน่าเสีย และการทำความสะอาดสามารถช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์ได้ การเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในขั้นตอนการบีบและคั้น การเติมกรดทาร์ทาริคเพื่อปรับความเป็นกรดก่อนการหมัก ซึ่งการหมักที่ pH ต่ำจัดเป็นการควบคุมโอกาสการเน่าเสียของน้ำไวน์จากแบคทีเรียแลคติก

สภาวะการหมักมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก เช่น ในกรณีของการหมักหยุดชะงัก แบคทีเรียแลคติกจะใช้น้ำตาลและเพิ่มปริมาณของกรดที่ระเหยได้ การควบคุมสภาวะการหมักควรตั้งแต่เริ่มต้น และต่อเนื่อง สามารถช่วยป้องกันการเน่าเสียจากแบคทีเรียแลคติก ส่วนในไวน์ที่หมักเสร็จใหม่แล้วปล่อยให้ตะกอนแช่ไว้โดยไม่กรองออกอาจไม่เกิดการหมักมาโล-แล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คติค เนื่องจากสารอาหารที่ปล่อยออกมาจากการย่อยสลายตัวเองของยีสต์และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ลดลง เพื่อป้องกันกรณีดังกล่าวจึงต้องมีการทำไวน์ให้ใสโดยเฉพาะการกรองด้วยเยื่อที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร เพื่อลดปริมาณของจุลินทรีย์และการเน่าเสีย

ข้อปฏิบัติต่างๆในโรงไวน์ทั้งการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อเครื่องมือและถังหมักต่างๆ เป็นข้อพึงปฏิบัติที่ผู้ผลิตไวน์จะต้องปฏิบัติเพื่อควบคุมการเน่าเสียของไวน์

2.8.3 ปฏิสัมพันธ์กับจุลินทรีย์อื่น

แบคทีเรียแลคติกเจริญได้ไม่ดีนักในน้ำหมักระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ เนื่องจากยีสต์มีผลต่อการขัดขวางการเจริญของแบคทีเรียแลคติก จากหลายปัจจัย เช่น การแข่งขัน และการแย่งสารอาหารของยีสต์ การแข่งขันกับยีสต์ประจำถิ่น (เช่น *Pichia* spp.) การสร้างเอทานอล ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และสารประกอบอื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติยับยั้งที่ผลิตโดยยีสต์

ในทางตรงกันข้าม ยีสต์มีอิทธิพลต่อการกระตุ้นให้แบคทีเรียแลคติกเจริญ ตัวอย่างเช่น การปล่อยให้ตะกอนที่เกิดจากการย่อยสลายตัวเองของยีสต์นั้นเป็นตัวเร่งให้แบคทีเรียแลคติกเจริญดีขึ้น

จุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น เชื้อรา *Botrytis cineria* และแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติค (acetic acid bacteria) มีผลต่อการกระตุ้น โดยเฉพาะแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติคที่มีการรายงานว่ามีการดำรงชีวิตแบบพึ่งพากันกับแบคทีเรียแลคติก

2.9. การหมักมาโล-แลคติค (Hormsey et al., 2007)

การหมักไวน์เป็นกระบวนการร่วมที่เกิดจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น ยีสต์และแบคทีเรียแลคติก การหมักมาโล-แลคติกจะเกิดขึ้นภายหลังการหมักแอลกอฮอล์ด้วยแบคทีเรียแลคติก ในระหว่างกระบวนการหมักมาโล-แลคติกดังกล่าว กรดแอล-มาลิก (L-malic acid) จะถูกดึงคาร์บอนไดออกไซด์ออก (decarboxylation) เปลี่ยนเป็นกรดแอล-แลคติก (L-lactic acid) และคาร์บอนไดออกไซด์ ผลที่ได้จากกระบวนการหมักนี้ทำให้ไวน์มีคุณภาพสูงขึ้นเนื่องจากความเป็นกรดลดลง ลักษณะด้านประสาทสัมผัสดีขึ้น และความเสถียรด้านจุลินทรีย์ของไวน์ก่อนบรรจุขวดสูงขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกชนิดที่แยกได้จากไวน์นั้นประกอบด้วย *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Oenococcus* spp. และ *Pediococcus* spp. แต่โดยทั่วไปแล้วกระบวนการหมักมาโล-แลคติคจะเกิดจาก *O. oeni* เป็นหลัก ซึ่งแต่เดิมรู้จักกันในชื่อ *Leu. oenos* โดยในระหว่างการหมักไวน์ *O. oeni* มีประสิทธิภาพสูงในการเปลี่ยนกรดมาลิคในสภาวะเครียดที่มี pH ต่ำ ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สูง และยังสามารถทนต่อสารประกอบอื่น ๆ (เช่น กรดไขมัน) ที่ยีสต์สังเคราะห์ขึ้น และสารที่เติมลงไประหว่างการหมัก เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เติมลงไปเพื่อป้องกันการออกซิเดชันและยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียที่ไม่พึงประสงค์โดยเฉพาะแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดมาลิกในสับปะรด (*Ananas Comosus* (L.) Merrill) จะค่อยๆเพิ่มขึ้นตั้งแต่ช่วงออกผลจนกระทั่งเก็บเกี่ยวเพื่อส่งขาย (17 สัปดาห์หลังผลิดอก) ปริมาณกรดมาลิกในสับปะรดช่วงเก็บเกี่ยวประมาณ 5 มิลลิกรัมในเนื้อสับปะรดหนึ่งกรัม (Saradhuldhat and Paull, 2006) จึงมีความเป็นไปได้ว่าการหมักมาโล-แลคติกสามารถเกิดขึ้นในไวน์ที่หมักจากน้ำสับปะรดได้เช่นกัน

แนวโน้มในปัจจุบันได้มีการศึกษา *L. plantarum* ในเชิงของการใช้เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียมาโลแลคติกเพิ่มขึ้นเนื่องจากผลการศึกษาที่ผ่านๆ มาพบว่า *L. plantarum* สามารถทนต่อแอลกอฮอล์ได้ค่อนข้างสูง เจริญในความเป็นกรด-ด่างต่ำ และทนต่อซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ยีสต์ผลิตได้ มียีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์มาโลแลคติก มีเอนไซม์อื่นที่มีส่วนในการสร้างสารให้กลิ่นที่เพิ่มคุณภาพของไวน์ เช่น glycosidase protease esterase phenolic acid decarboxylase และ citrate lyase นอกจากนั้นยังสามารถสร้างแบคเทอริโอซิน โดยเฉพาะ plantaricin ซึ่งช่วยยับยั้งแบคทีเรียแลคติกที่ทำให้ไวนน์เน่าเสียได้อีกด้วย (Toit et al., 2011)

2.10 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีสต์และแบคทีเรียแลคติกในไวน์ (Alexandre et al., 2004)

กระบวนการหมักมาโลแลคติก เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อคุณภาพและการค้าของการผลิตไวน์ แต่ว่า การหมักมาโล-แลคติก อาจส่งผลเชิงลบต่อรสชาติของไวน์ด้วย โดยในน้ำองุ่นที่มีความเป็นกรดต่ำ ในสภาพอากาศอบอุ่น จะทำให้ความเป็นกรดด่างกรดที่น้อยอยู่แล้วลดต่ำลงไปอีก จนอาจเกิดการเน่าเสียจากจุลินทรีย์และส่งผลเสียต่อลักษณะด้านประสาทสัมผัส

ช่วงการเริ่มต้นของ การหมักมาโล-แลคติก เริ่มต้นช่วง growth phase ของแบคทีเรียมาโลแลคติก (โดยเฉพาะ *O. oeni*) จนกระทั่งเพิ่มจำนวนได้ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือมากกว่า ซึ่งโดยทั่วไปจะเกิดภายหลังการหมักแอลกอฮอล์สิ้นสุด ในการทำไวน์แบบดั้งเดิมนั้นจะปล่อยให้แบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ตามธรรมชาติเจริญขึ้นและเหนี่ยวนำให้เกิดการหมักมาโล-แลคติกเอง แต่ในสภาวะเครียดทั้งด้านกายภาพและเคมีในไวน์ ที่มีทั้ง pH ต่ำ ปริมาณเอทานอลสูง มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และสารอาหารต่ำ ซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมที่ยากต่อการเจริญของแบคทีเรียมาโลแลคติก จึงได้มีการพัฒนาและคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียอย่างต่อเนื่อง จนได้สายพันธุ์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหมักมาโล-แลคติกได้ แต่อย่างไรก็ตามการใช้กล้าเชื้อของแบคทีเรียมาโลแลคติกก็ยังมีโอกาสที่ การหมักมาโล-แลคติก จะเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์และไวน์เกิดการเสื่อมเสียได้ จากจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ เช่น แบคทีเรียอะซิติก แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่ทำให้ไวน์เกิดการเน่าเสีย และยีสต์จำพวก *Brettanomyces* spp. หรือ *Dekkera* spp. ในความเป็นจริงนั้น หลังจากการหมักแอลกอฮอล์เสร็จสิ้น การหมักมาโล-แลคติก จะเกิดได้ดีในไวน์ที่ไม่มี SO_2 และในช่วงนั้น การหมักมาโล-แลคติก อาจเกิดขึ้นล่าช้า หรือล้มเหลวจากการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.1 อิทธิพลของยีสต์บางสายพันธุ์ที่ส่งผลยับยั้งแบคทีเรียมาโล-แลคติก

ปฏิสัมพันธ์ในส่วนของยีสต์ที่ยับยั้งแบคทีเรียมาโลแลคติกจะส่งผลเสียต่อการลดปริมาณกรด ปริมาณการผลิต และคุณภาพของไวน์ การยับยั้งดังกล่าวเกิดจากปัจจัยที่หลากหลายซึ่งอาจส่งผลร่วมกันหรือเฉพาะตัว ได้แก่ เกิดจากเมตาบอลิซึมของยีสต์ และการแย่งสารอาหาร โดยเอทานอลเป็นปัจจัยแรกที่ได้รับรายงานว่าส่งผลลบ เอทานอลที่ผลิตโดยยีสต์ระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียมาโลแลคติกยิ่งกว่ากิจกรรมการหมักมาโลแลคติก ที่เอทานอลความเข้มข้น 4% (v/v) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมาโล-แลคติกได้

ยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถผลิตซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) โดยแต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตซัลเฟอร์ไดออกไซด์ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่ผลิตได้ต่ำกว่า 30 มิลลิลิตรต่อลิตร แต่บางสายพันธุ์ผลิตได้มากกว่า 100 มิลลิลิตรต่อลิตร และในกระบวนการผลิตไวน์โดยทั่วไปก็มีการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ลงไปในน้ำผลไม้เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในกระบวนการหมัก ซึ่งซัลเฟอร์ไดออกไซด์มีผลยับยั้งการเกิดการหมักมาโล-แลคติกเช่นกัน

กรดไขมันสายกลางที่ยีสต์สร้าง เช่น decanoic acid มีผลยับยั้งทั้งยีสต์และแบคทีเรียมาโล-แลคติก และมีผลลดประสิทธิภาพในการสลายกรดมาลิก ซึ่งผลกระทบขึ้นกับชนิดและความเข้มข้นของกรดไขมัน Edward และ Beelman (1987) รายงานว่าการเติม decanoic acid ในน้ำองุ่นปริมาตร 5-10 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลยับยั้งแบคทีเรียมาโล-แลคติก และการหมักมาโล-แลคติก ในขณะที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร มีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียมาโล-แลคติกและยับยั้งการหมักมาโล-แลคติกโดยสมบูรณ์ ต่อมา Capucho และ San Romao (1994) รายงานว่า decanoic acid และ dodecanoic acid ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 12.5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีผลกระตุ้นให้เกิดการหมักมาโล-แลคติก แต่ในขณะที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ผลที่ได้กลับตรงข้าม คือ เริ่มเกิดการยับยั้งการหมักมาโล-แลคติกและมีแนวโน้มยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น และ Lonvaud-Funel et al. (1988) ได้ทดลองการเติม hexanoic octanoic และ decanoic acid ร่วมกันมีผลยับยั้งการเจริญและการหมักมาโล-แลคติกได้ดีกว่าการใช้กรดไขมันชนิดเดียว

ผลยับยั้งของกรดไขมันสายกลางขึ้นกับความเข้มข้นของกรดไขมันสายกลาง ค่า pH ของสภาพแวดล้อม เช่น ความเป็นพิษของ decanoic acid ที่มีผลต่อการเปลี่ยนกรดมาลิกไปเป็นกรดแลคติกของ *O. oeni* ซึ่งพบว่าที่ pH 3.0 มีพิษมากกว่าที่ pH 6.0 โดยโมเลกุลของกรดไขมันที่ยังไม่แตกตัวซึ่งเป็นรูปที่ไวต่อปฏิกิริยานั้นเมื่อแทรกเข้าไปในเซลล์แล้วเกิดการสูญเสียโปรตอน จะเหนี่ยวนำให้ภายในเซลล์มีสภาวะเป็นกรดทำให้การถ่ายเทสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ค่อยลดลง (Capucho และ San Romao, 1994) จากรายงานของ Carreté et al. (2002) พบว่ากรดไขมันสายกลางอย่าง decanoic acid และ dodecanoic acid มีผลส่งเสริมกันกับเอทานอล โดยมีผลยับยั้ง ATPase ของ *O. oeni* ซึ่งเอนไซม์นี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับกิจกรรมการหมักมาโล-แลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dick et al. (1992) รายงานว่ายีสต์สามารถสร้างสาร metabolizes ที่เป็นโปรตีนซึ่งมีผลยับยั้งแบคทีเรียมาโล-แลคติกได้เช่นกัน Osbone และ Edwards (2007) รายงานว่าในระหว่างกระบวนการหมักไวน์ด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ RUBY.ferm สามารถผลิตเปปไทด์ขนาด 5.9 kDa ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของ *O. oeni* ขณะที่ Caridi และ Corte (1997) ได้รายงานว่า ไวน์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทนอุณหภูมิต่ำ (cryotolerant yeast) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากการหมักมาโลแลคติกน้อยกว่าไวน์ที่ผลิตจากยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic yeast) โดยที่ไวน์ที่ผลิตจากยีสต์ทนความเย็นมีความเสถียรด้านจุลินทรีย์มากกว่าเนื่องจากมีการสร้าง succinic acid และ β-phenylethanol และผลการยับยั้งแบคทีเรียแลคติกนั้นมาจากใช้สารอาหารของยีสต์ หลังจากการหมักแอลกอฮอล์สิ้นสุด สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในไวน์ เช่น วิตามิน และกรดอะมิโนอาจินีนจะเหลืออยู่เพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่เพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก อนึ่ง Nygaard และ Prahl (1996) เสนอว่า ไวน์ที่หมักจากยีสต์ *S. cerevisiae* var. bayanus เกิดปัญหาในการหมักมาโล-แลคติกมากกว่าไวน์ที่หมักจาก *S. cerevisiae* var. cerevisiae และยังชี้อีกว่าความสำเร็จของกระบวนการหมักมาโล-แลคติกนั้นเชื่อมโยงกับ death phase ของยีสต์ โดยสังเกตจาก *S. cerevisiae* var. bayanus ที่มีความสามารถในการอยู่รอดสูงกว่าภายหลังกระบวนการหมักแอลกอฮอล์สิ้นสุด ซึ่งจะแตกตัวปล่อยสารออกมาให้แบคทีเรียแลคติกใช้ไปด้วย แต่ Patynowski et al. (2002) ให้ข้อเสนอที่ขัดแย้งกันว่า จากการสังเกตระหว่างจลศาสตร์การตายของเซลล์ยีสต์และการเจริญของแบคทีเรียมาโล-แลคติกอย่าง *O. oeni* Lc5p ไม่มีความสัมพันธ์กันจากการทดสอบทางเคมี

กุณฑิกา เวชกลาง (2547) ศึกษาการใช้ยีสต์ร่วมกับแบคทีเรียแลคติคในการพัฒนากระบวนการผลิตไวน์สับปะรด พบว่า การใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* var. champagne ร่วมกับ *S. lactis* มีการผลิตแอลกอฮอล์สูงถึง 14.48% ค่าความเป็นกรด-ด่างของการหมักยีสต์ร่วมกับการใช้ KMS ในการฆ่าเชื้อลดลงมากกว่าการหมักยีสต์ร่วมกับแบคทีเรียผลิตแลคติค ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เหลือมากที่สุดการหมักของ *S. cerevisiae* var. champagne ร่วมกับ *L. brevis* subsp. brevis ซึ่งมีปริมาณ 95 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณกรดสูงสุด 26.43 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และมีความแตกต่างด้านประสาทสัมผัสกับไวน์ที่หมักจากยีสต์เพียงอย่างเดียว

2.10.2. อิทธิพลของยีสต์ที่ใช้หมักไวน์ที่มีผลกระตุ้นแบคทีเรียมาโล-แลคติก

Fornachon (1968) ได้เสนอว่านอกจากผลการยับยั้งของยีสต์แล้ว ยีสต์ที่ใช้ผลิตไวน์บางสายพันธุ์มีผลสนับสนุนต่อการเจริญของแบคทีเรียมาโล-แลคติก ซึ่งสัมพันธ์กับการย่อยสลายเซลล์ (autolysis) ของยีสต์ที่เกิดขึ้นหลังการหมักแอลกอฮอล์สิ้นสุด แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของสารอาหารที่ยีสต์ปล่อยออกมา โดยเฉพาะสารประกอบไนโตรเจนที่เป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของแบคทีเรียในไวน์ สารประกอบไนโตรเจนในไวน์นั้นจะผันแปรตามชนิดและสายพันธุ์ของผลไม้ ความสุก อัตราการให้ปุ๋ยไนโตรเจน และสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้หมักไวน์ และยิ่งไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กว่านั้นการย่อยสลายเซลล์ของยีสต์ระหว่างการบ่มนั้นส่งผลต่อความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจน กรดอะมิโน เปปไทด์ และโปรตีน (Charpentier และ Feuillat, 1993; Martínez-Rodriquez et al., 2001, 2002; Alexandre et al., 2001; Fornairon-Bonnefond et al., 2001) และสารโมเลกุลใหญ่อื่นๆ อย่าง กลูแคน และแมนโนโปรตีนที่ปล่อยออกมาระหว่างการย่อยสลายเซลล์ของยีสต์ (Charpentier และ Feuillat, 1993 ; Fornairon-Bonnefond et al., 2001) และการหมักแอลกอฮอล์ (Llaubéres et al., 1987) และปริมาณของสารโมเลกุลใหญ่ที่ยีสต์ปล่อยออกมาในไวน์จะขึ้นกับสายพันธุ์ของยีสต์ (Rosi et al., 1999 ; Escot et al., 2001) และข้อปฏิบัติของการผลิตไวน์

Feuillat et al.(1977) แสดงให้เห็นถึงเปปไทด์แยกส่วนที่มีขนาดน้อยกว่า 1000 Da ว่ามีผลกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในไวน์ ส่วน Guilloux-Benatier และ Chassagne (2003) ได้แยกส่วนโมเลกุลของสารที่ได้จากการย่อยสลายเซลล์ของยีสต์ ออกเป็น 4 ช่วงคือ น้อยกว่า 0.5 0.5-1 1-10 และมากกว่า 10 kDa และพบว่ามีผลช่วยในการเจริญของแบคทีเรียในอาหารสังเคราะห์ แต่โปรตีนในไวน์ที่ผ่านการแยกส่วน (ขนาดมากกว่า 5,000 Da) นั้นช่วยสนับสนุนการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยกว่าเปปไทด์ที่ผ่านการแยกส่วน ชิ้นส่วนโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่าที่ได้จากการย่อยสลายเซลล์ของยีสต์มีผลกระตุ้นการเจริญของแบททีเรียและการทำงานของเอนไซม์ของแบคทีเรียด้วยเช่นกัน

2.10.3 บทบาทของแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้งยีสต์

การยับยั้งยีสต์ของแบคทีเรียแลคติกมักจะเกิดจากช่วงที่แบคทีเรียแลคติกเข้าสู่ log phase ก่อนที่กระบวนการหมักแอลกอฮอล์จะสิ้นสุด ผลจากการหมักคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียทำให้เกิดกรดแลคติกซึ่งจะทำให้คุณภาพไวน์เสื่อมเสีย จากการศึกษาของ Boidron (1969) พบว่าแบคทีเรียแลคติกสามารถยับยั้งการหมักแอลกอฮอล์และอัตราการหมักจะลดลงตามความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียแลคติกที่เพิ่มขึ้น ส่วน King และ Beelman (1986) อธิบายไว้ว่าแบคทีเรียจะไม่ส่งผลต่อการเจริญจนถึงช่วง stationary phase แต่จะเหนี่ยวนำให้อัตราการตายของยีสต์ค่อย ๆ เพิ่มขึ้น

Mendoza Manca และ Farias (2010) ได้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีสต์และแบคทีเรียแลคติกที่พบในไวน์ด้วยเทคนิค double-layer plate-growth method โดยเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกไว้บน MRS agar และเททับด้วย YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) agar แล้วถ่ายเชื้อยีสต์ไว้ด้านบน พบว่า ส่วนใหญ่แบคทีเรียแลคติกจะถูกยับยั้งด้วยยีสต์ โดย *O. oeni* จะอ่อนแอกว่า *L. hilgardii* ในอาหารที่มี *S. cerevisiae* mc2 หรือ *Candida pulcherrima* 3 โดยที่ *S. cerevisiae* มีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงาน

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

น้ำสับปะรดเข้มข้น	
น้ำตาลทรายขาว	มิตรผล ประเทศไทย

3.1.2 สารเคมี

95% Ethanol	องค์การสุรา ประเทศไทย
Calcium carbonate	MERCK ประเทศเยอรมนี
Copper (II) sulphate	CARLO ประเทศอิตาลี
Cycloheximide	Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
Diamonium phosphate (DAP)	Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย
Magnesium sulphate	Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย
Methylene blue	MERCK ประเทศเยอรมนี
Phenolphtalein	MERCK ประเทศเยอรมนี
Potassium sodium (+)-tartrate	Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย
Sodium hydroxide	Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย
Tri-Sodium citrate	Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Agar powder	S.P. SCIENCE ประเทศไทย
Man Rogosa Sharpe (MRS) broth	HIMEDIA ประเทศอินเดีย
Meat extract powder	HIMEDIA ประเทศอินเดีย
Peptone powder	HIMEDIA ประเทศอินเดีย
Potato dextrose agar	HIMEDIA ประเทศอินเดีย
Yeast extract powder	HIMEDIA ประเทศอินเดีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4 เครื่องมือ

เครื่องเขย่า	ประเทศไทย
เครื่องชั่ง รุ่น TP-1102	DENVER INSTRUMENT ประเทศแคนาดา
ถังหมัก stainless steel พร้อมระบบน้ำหล่อเย็น	ประเทศไทย
อุปกรณ์เครื่องแก้ว	Pyrex ประเทศเยอรมนี Witeg ประเทศเยอรมนี
Autoclave รุ่น SS-245	TOMY SEIKO ประเทศญี่ปุ่น
Ebuliometer	DUJARDIN-SALLERON ประเทศฝรั่งเศส
Hand refractometer	ATAGO ประเทศญี่ปุ่น
Hot air oven	WTC binder ประเทศเยอรมัน
pH meter รุ่น 3510	JENWAY ประเทศอังกฤษ

3.2 แผนการทดลอง

3.2.1 การเตรียมน้ำสับปะรดที่ใช้หมักไวน์

เตรียมน้ำสับปะรดในอัตราส่วนน้ำสับปะรดเข้มข้น 1% (w/v) แล้วเติมแมกนีเซียมซัลไฟต์ ($MgSO_4$) 0.02% (w/v) และ ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP) 0.05 % (w/v) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ด้วยน้ำตาลทราย แล้ววัดด้วย hand refractometer ให้ได้ 20 องศาบริกซ์ ปรับ pH ด้วย กรดซิตริก 10% (w/v) หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 10 N ให้ได้ pH 5.5-6.0 ฆ่าเชื้อที่ 90 องศาเซลเซียส 10 นาที

3.2.2 การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการศึกษาเป็นแบคทีเรียที่คัดเลือกจากน้ำหมักไวน์จากโรงงานอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยอาศัยการคัดเลือกเชื้อบนอาหาร MRS agar ที่เติม cycloheximide 0.01% เพื่อยับยั้งการเจริญของยีสต์ (Ruiz et al., 2010) และ calcium carbonate 0.5% แยกโคโลนีที่สร้างบริเวณใสของ calcium carbonate และเก็บเชื้อ จากนั้นจึงส่งวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA ณ ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* ที่ระดับ 100% รายงานการตรวจวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก หัวเชื้อนี้จะถูกเก็บรักษาในอาหาร MRS agar slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในน้ำสับปะรด

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์จาก MRS agar slant จำนวน 1 loop ลงในน้ำสับปะรด (ข้อ 3.2.1) ปริมาตร 14 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายใส่น้ำสับปะรดที่ใช้หมัก 3 ลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 5 ลิตร ติดตามผลทุก 12 ชั่วโมง โดยนับจำนวนเชื้อใน MRS agar ที่เติม calcium carbonate 0.5 % บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะ Micro-aerophilic condition และวัด pH ของน้ำหมักด้วย pH meter (Model 3510, JENWAY, UK) หาปริมาณกรดด้วยวิธีไตเตรท และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Lane and Eynon (AOAC, 1984) การทดลองทั้งสิ้นทำ 3 ซ้ำ

3.2.4 ศึกษาประสิทธิภาพในการเจริญและผลิตแอลกอฮอล์ของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30

เตรียมหัวเชื้อโดยเขี่ยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 จาก YM agar slant (บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง) ลงใน YM broth ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายใส่น้ำสับปะรด (ข้อ 3.2.1) ปริมาตร 3 ลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 5 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง ติดตามผลทุก 12 ชั่วโมงโดยวัดปริมาณแอลกอฮอล์ด้วย Ebulliometer วัด pH หาปริมาณกรดด้วยวิธีไตเตรท นับปริมาณเชื้อยีสต์บน YM agar และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Lane and Eynon (AOAC, 1984)

3.2.5 ศึกษาปริมาณเชื้อแลคติกเริ่มต้น ต่อกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ M 30

3.2.5.1เตรียมหัวเชื้อของยีสต์โดยเขี่ยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 จาก YM agar slant (บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง) ลงใน YM broth ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.5.2 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียแลคติก โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์จาก MRS agar ลงในน้ำสับปะรด (ข้อ 3.2.1) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ปริมาณแบคทีเรียแลคติก 8 7 6 5 และ 4 log cfu/ml ตามลำดับ จะต้องใช้หัวเชื้อปริมาตร 50 5 0.5 0.05 และ 0.005% ของน้ำหมักตามลำดับ

3.2.5.3 ถ่ายเชื้อยีสต์ M30 (ข้อ 3.2.5.1)ในน้ำสับปะรดที่ใช้หมักไวน์ (ข้อ 3.2.1) ปริมาตร 3 ลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 5 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ความเข้มข้นต่างๆ ในน้ำสับปะรด (ข้อ 3.2.5.2) แต่ละขวดรูปชมพู่ ติดตามผลทุก 12 ชั่วโมง โดยติดตามการเจริญของยีสต์บน YM agar การเจริญของ แบคทีเรียแลคติก บน MRS agar ที่เติม cycloheximide 0.01% และ calcium carbonate 0.5% ซึ่งบ่มในสภาวะ Micro-aerophilic condition พร้อมทั้งวัดปริมาณแอลกอฮอล์ pH ปริมาณกรดด้วยวิธีไตเตรท และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.6 ศึกษาผลกระทบของการเติมแบคทีเรียแลคติกที่ช่วงเวลาต่างๆ ระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* M30

3.2.6.1 เตรียมหัวเชื้อของยีสต์โดยเขี่ยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 จาก YM agar slant (บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง) ลงใน YM broth ปริมาตร 150 มิลลิลิตร คิดเป็น 5% ของน้ำสับปะรดที่ใช้ในการหมัก เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6 log cfu/ml เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.6.2 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียแลคติก โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์จาก MRS agar ลงในน้ำสับปะรด (ข้อ 3.2.1) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร คิดเป็น 5% ของน้ำสับปะรดที่ใช้ในการหมัก เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 7 log cfu/ml บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.6.3 ถ่ายเชื้อยีสต์ M30 (ข้อ 3.2.6.1) ในน้ำสับปะรดที่ใช้หมักไวน์ (ข้อ 3.2.1) ปริมาตร 3 ลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 5 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลคติกในน้ำสับปะรด (ข้อ 3.2.5.2) ภายหลังจากการหมักของยีสต์ที่ 0 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ติดตามผลทุก 12 ชั่วโมงโดย ติดตามการเจริญของยีสต์บน YM agar การเจริญของแบคทีเรียแลคติกบน MRS agar ที่เติม calcium carbonate 0.5% ซึ่งบ่มในสภาวะ Micro-aerophilic condition พร้อมทั้งวัดปริมาณแอลกอฮอล์ pH ปริมาณกรดด้วยวิธีไตเตรท หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

3.2.7 ศึกษาสภาวะการอยู่ร่วมกันระหว่างยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และ แบคทีเรียแลคติกในถังหมัก Stirred Tank Reactor

ใช้ผลจากการทดลองในข้อ 3.2.5 ที่ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และแลคทีเรียแลคติกสามารถอยู่ร่วมกันและผลิตแอลกอฮอล์ได้ในปริมาณสูง นำมาหมักในถังหมัก Stirred Tank Reactor ขนาด 50 ลิตรที่มีระบบน้ำหล่อเย็น ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส

3.2.7.1 เตรียมหัวเชื้อของยีสต์โดยเขี่ยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 จาก YM agar slant (บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง) ลงใน YM broth ปริมาตร 75 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายใส่น้ำสับปะรด 1.5 ลิตรมิลลิลิตร ที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อของน้ำสับปะรดในถังหมัก ปริมาตร คิดเป็น 5% ของน้ำสับปะรดที่ใช้ในการหมัก เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6 log cfu/ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง

3.2.7.2 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียแลคติกเช่นเดียวกับข้อ 3.2.5.2 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ปริมาณแบคทีเรียแลคติก 7 และ 8 log cfu/ml ตามลำดับ จะต้องใช้หัวเชื้อปริมาตร 50 และ 5% ของน้ำหมักตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.7.3 เตรียมน้ำสับปะรดที่ใช้หมักไวน์ปริมาตร 30 ลิตร ถ่ายใส่ถังหมัก Stirred Tank Reactor ที่มีระบบน้ำหล่อเย็น

3.2.7.4 ถ่ายเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในจากข้อ 3.2.7.1 จากนั้นทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลคติกในน้ำสับปะรด (ข้อ 3.2.7.2) ภายหลังจากการหมักของยีสต์และแบคทีเรียแลคติกในระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.5 ติดตามผลทุก 12 ชั่วโมงโดย ติดตามการเจริญของยีสต์บน YM agar การเจริญของแบคทีเรียแลคติกบน MRS agar ที่เติม calcium carbonate 0.5% ซึ่งบ่มในสภาวะ Micro-aerophilic condition พร้อมทั้งวัดปริมาณแอลกอฮอล์ pH ปริมาณกรด หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

3.2.8 ศึกษาผลของกรดแลคติกต่อการเจริญและผนังเซลล์ของยีสต์ M30

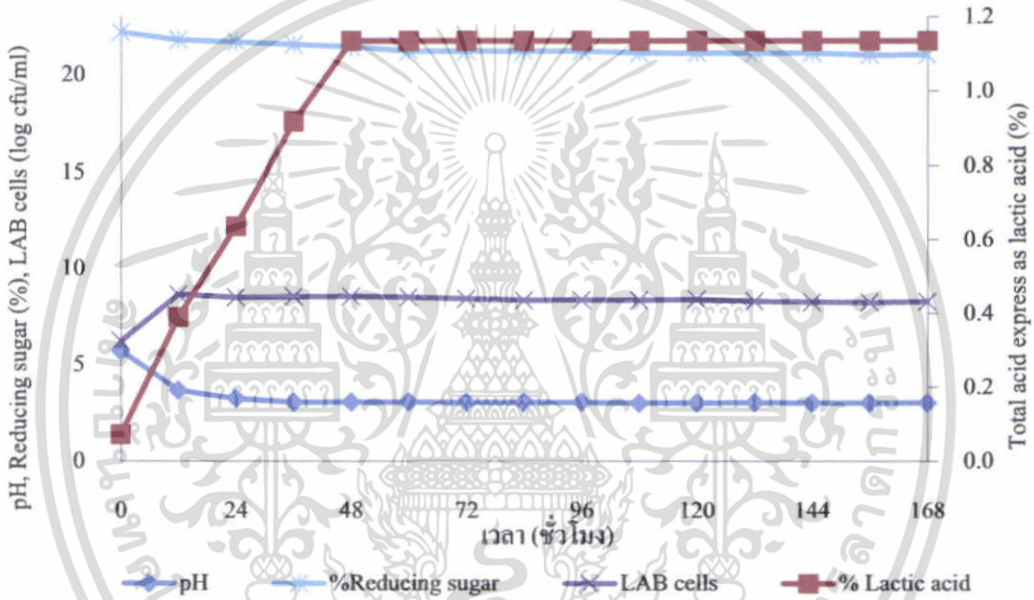
ถ่ายเชื้อยีสต์ M30 จาก starter ที่เลี้ยงแบบเขย่าใน YM broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงใน YM broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH ด้วย กรดแลคติกเข้มข้น 85% ให้ได้ pH เท่ากับ 4.0 3.5 3.0 และ 2.5 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 72 ชั่วโมงและเก็บตัวอย่างไวน์ที่เติมแบคทีเรียแลคติกในปริมาณเซลล์เริ่มต้น 7 และ 8 log cfu/ml ที่สิ้นสุดการหมักแอลกอฮอล์แล้ว (ชั่วโมงที่ 168) ส่งวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องทะลุ (Transmission electron microscope) ที่งานทรัพยากรชีวภาพและความหลากหลายทางชีวภาพ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เพื่อศึกษาผลกระทบของกรดแลคติกต่อเยื่อหุ้มเซลล์ยีสต์ในสภาวะ pH ต่างๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาความสามารถในการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ในน้ำสับปะรด

เพื่อศึกษาผลกระทบที่เกิดจากการเจริญของ *L. plantarum* ในน้ำหมักสับปะรด ที่ไม่ถูกรบกวนด้วยการเจริญแข่งขันและแอลกอฮอล์ที่เกิดจากยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่ใช้หมักไวน์ โดยผลการเจริญของ *L. plantarum* ในน้ำสับปะรดแสดงดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ผลการเจริญของแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ในน้ำสับปะรดที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4.1 แสดงความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของ LAB ได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาสั้น ภายใน 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก สามารถผลิตกรดได้ 1.134% ด้วยอัตราการผลิตกรด 0.022% ต่อชั่วโมงแสดงในตารางที่ 4.1 หลังจากชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไปอัตราการผลิตกรดเป็นศูนย์ ปริมาณกรดคงที่ตลอดการติดตาม และความเป็นกรด-ด่างลดต่ำลงเหลือ 3.036 ± 0.022 จาก 5.738 ± 0.071 ที่เวลาเริ่มต้นการหมัก โดยการลดลงของความเป็นกรด-ด่างเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกและค่อยๆคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 36 ทั้งนี้เชื้อ *L. plantarum* สามารถแบ่งตัวในน้ำสับปะรดได้สูงสุด 8.66 log cfu/ml ภายใน 12 ชั่วโมงแรก ซึ่งมี generation time 89.7 นาที/generation หลังจากชั่วโมงที่ 12 เชื้อมีปริมาณค่อนข้างคงที่ ลดลงเล็กน้อยจนกระทั่งชั่วโมงที่ 168 เชื้อมีปริมาณ 8.281 ± 0.087 log cfu/ml มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพียงเล็กน้อย ทำให้ปริมาณน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รีดิวซ์ลดต่ำลงเพียงเล็กน้อยในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก *L. plantarum* เป็น heterofermentative ซึ่งเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เป็นกรดแลคติก 1 โมเลกุล คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอลหรือ กรดอะซิติกอย่างใดอย่างหนึ่งอีก 1 โมเลกุล (Kenneth และ Charles, 2007)

ตารางที่ 4.1 อัตราการผลิตแอลกอฮอล์และ generation time ของ *L. plantarum* ในน้ำสับปะรด ที่อุณหภูมิ 32 ± 1 องศาเซลเซียส

อัตราการผลิตกรด (%ต่อชั่วโมง)		Generation time (นาทีต่อgeneration)
12 ชั่วโมงแรก	หลังชั่วโมงที่ 48	12 ชั่วโมงแรก
0.022	0.000	89.7

4.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการเจริญและการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในน้ำสับปะรด

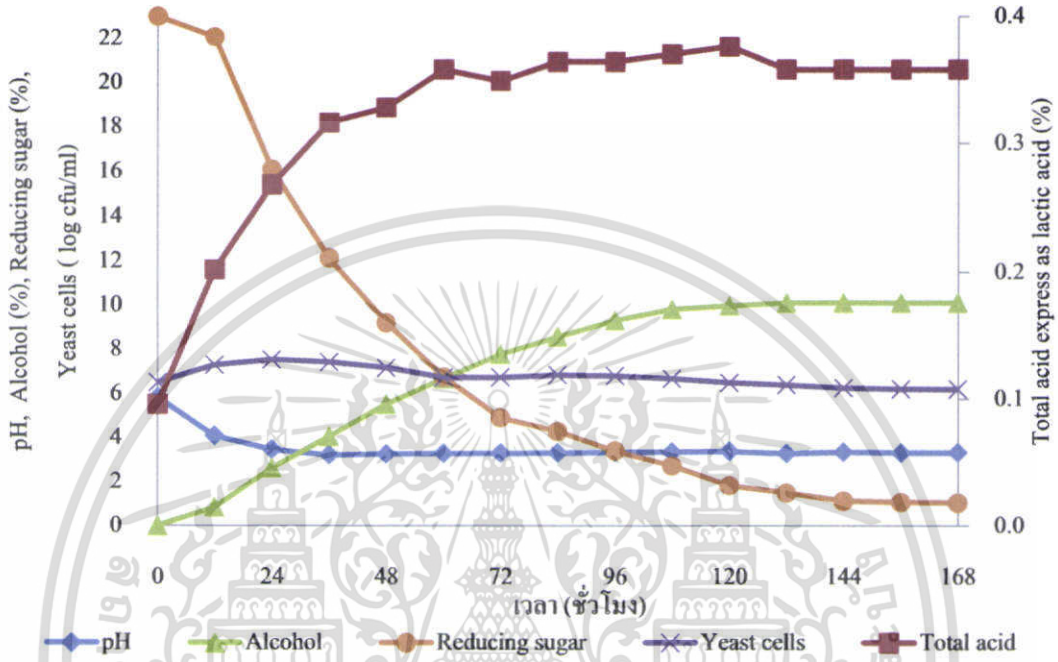
เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสูงสุดในการเจริญและการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในน้ำหมักสับปะรดที่ไม่มีผลกระทบจากการปนเปื้อนแบคทีเรียแลคติก โดยการหมักไวน์สับปะรดด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง 32 ± 1 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพที่ 4.2

จากภาพที่ 4.2 แสดงผลการติดตามสภาวะการหมักไวน์สับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักสับปะรดเริ่มต้นที่ 5.806 ± 0.013 และลดต่ำลงเหลือ 3.300 ± 0.014 ในช่วงท้ายของการหมัก ปริมาณกรดทั้งหมดแสดงในรูปของกรดแลคติก มีค่าเริ่มต้นที่ 0.096 ± 0.010% และเพิ่มขึ้นถึง 0.328 ± 0.021% อย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 48 คิดเป็นอัตราการผลิตกรด 0.0048% ต่อชั่วโมงและมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยจนกระทั่งสิ้นสุดการติดตามที่ 168 ชั่วโมง

อัตราการผลิตแอลกอฮอล์ (ตารางที่ 4.2) ใน 12 ชั่วโมงแรกเท่ากับ 0.069% ต่อชั่วโมง และมีอัตราการหมักสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ถึง 48 เท่ากับ 0.131% ต่อชั่วโมง ชั่วโมงที่ 48 ถึง 108 อัตราการหมักลดลงเกือบเท่าตัว เหลือเพียง 0.071% ต่อชั่วโมง หลังจากนั้นมีการผลิตเพียงเล็กน้อยจนยุติการหมักในชั่วโมงที่ 132 ปริมาณแอลกอฮอล์สุดท้าย 10.1 ± 0.173% ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ถึง 48 ชั่วโมงแรกของการหมักอัตราการใช้น้ำตาลคิดเป็น 0.32% ต่อชั่วโมง และลดลงเรื่อยจนสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 1.040 ± 0.007% ยีสต์มีอัตราการเจริญสูงในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก และหลังจากนั้นปริมาณเซลล์ยีสต์ลดต่ำลงเรื่อยๆ เนื่องจากอัตราการตายที่สูงกว่าอัตราการเจริญ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ในไวน์ที่ได้จากการไตเตรทมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่ามากกว่าน้ำตาลที่เติมลงไปเนื่องมาจากในไวน์ยังคงมีสารอื่นที่มีคุณสมบัติเป็น reducing substance เช่นเดียวกับน้ำตาลรีดิวซ์จึงมีส่วนร่วมต่อการทำปฏิกิริยากับ fehling solution ได้ด้วยเช่นกัน (Fraser-Reid et al., 2008)



ภาพที่ 4.2 ประสิทธิภาพในการเจริญและการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในน้ำสับปะรด ที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.2 อัตราการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในน้ำสับปะรด ที่อุณหภูมิ 32 ± 1 องศาเซลเซียส

อัตราการผลิตแอลกอฮอล์ (% ต่อชั่วโมง)			
12 ชั่วโมงแรก	ชั่วโมงที่ 12 ถึง 48	ชั่วโมงที่ 48 ถึง 108	หลังชั่วโมงที่ 108
0.069	0.131	0.071	0.013

4.3 การศึกษาผลกระทบของปริมาณเชื้อแลคติก *L. plantarum* เริ่มต้น ต่อกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* M30

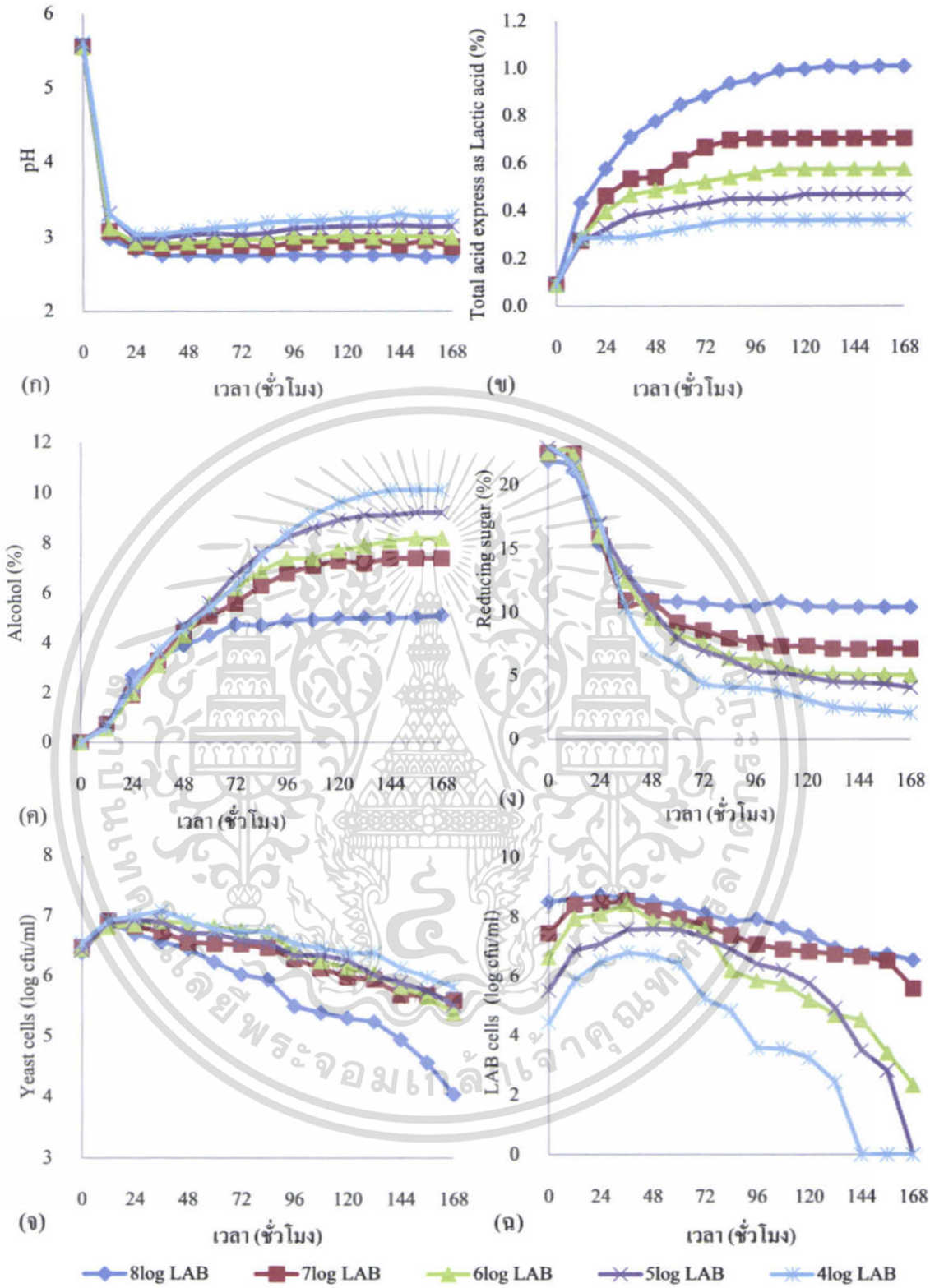
เพื่อศึกษาผลกระทบของปริมาณเซลล์แลคติกแบคทีเรียเริ่มต้นต่อประสิทธิภาพการหมักแอลกอฮอล์และการเจริญของยีสต์ โดยการถ่ายหัวเชื้อ *L. plantarum* ในปริมาณต่างๆตั้งแต่ 4 ถึง 8 log cfu/ml ในน้ำหมักไวน์พร้อมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.3 แสดงผลของปริมาณแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นที่มีต่อกระบวนการหมักไวน์สับปะรดของยีสต์ M30 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบในด้านต่างๆของตัวอย่างไวน์สับปะรดที่เติมแบคทีเรียแลคติกในช่วงเริ่มต้นของการหมัก ในภาพที่ 4.3(ก) แสดงผลการติดตามความเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างตลอดระยะเวลาหมัก 168 ชั่วโมง พบว่า เมื่อปริมาณของแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นมากขึ้น ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักสับปะรดลดต่ำสอดคล้องกับผลการติดตามความเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดแลคติกในน้ำหมักสับปะรดที่แสดงในภาพที่ 4.3 (ข) เมื่อปริมาณของแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นมากขึ้น การผลิตกรดในน้ำหมักก็จะยิ่งมากขึ้นเช่นกัน จากผลการศึกษาในหัวข้อ 4.2 พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีอัตราการสร้างกรดสูงในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก เมื่อเปรียบเทียบกับผลกระทบจากปริมาณการเติมแบคทีเรียแลคติกลงไปแล้วพบว่า ยิ่งปริมาณเชื้อมากขึ้นอัตราการผลิตกรดแลคติกในช่วง 48 ชั่วโมงแรกจะยิ่งสูงยิ่งอีกเช่นกัน ซึ่งเท่ากับ 0.0144 0.0095 0.0083 0.0063 และ 0.0043% ต่อชั่วโมงในน้ำหมักที่เติมแบคทีเรียแลคติกปริมาณ 8 7 6 5 และ 4 log cfu/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) ในตัวอย่างน้ำหมักสับปะรดที่เติมแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้น 8 log cfu/ml ณ ชั่วโมงการหมักที่ 168 พบว่ามีปริมาณกรดแลคติกสูงสุดถึง 1.08 ± 0.00 % และมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่ 2.733 ± 0.01 ปริมาณกรดแลคติกสุดท้ายจะค่อยๆ ต่ำลง ตั้งแต่ 0.702 0.576 0.468 และ 0.360 และค่าความเป็นกรด-ด่างจะค่อยๆ สูงขึ้นตั้งแต่ 2.868 ± 0.017, 2.993 ± 0.008, 3.135 ± 0.001 และ 3.263 ± 0.009 ในไวน์สับปะรดที่เติมแบคทีเรียแลคติกในช่วงเริ่มต้นปริมาณ 7 6 5 และ 4 log cfu/ml ตามลำดับ

ปริมาณแอลกอฮอล์ในช่วงเวลาต่างๆ แสดงในภาพที่ 4.3(ค) สามารถสังเกตผลกระทบของแบคทีเรียแลคติกต่อการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ได้อย่างชัดเจน ปริมาณแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นยิ่งมาก อัตราการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ (ตารางที่ 4.4) และปริมาณแอลกอฮอล์ในช่วงสิ้นสุดการหมักก็จะยิ่งน้อยลง เมื่อเปรียบเทียบกับผลอัตราการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ที่ไม่มีการปนเปื้อนจะมีประสิทธิภาพสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ถึง 48 ซึ่งได้จากข้อ 4.3 อัตราการผลิตแอลกอฮอล์ในช่วงเวลาดังกล่าวเท่ากับ 0.1074 0.1097 0.1037 0.1032 และ 0.0912% ต่อชั่วโมง ซึ่งอัตราการผลิตจะลดลงเพียงเล็กน้อยในสภาวะที่เติมแบคทีเรียแลคติกในไวน์มากขึ้น แต่ทั้งนี้การยับยั้งการหมักแอลกอฮอล์กลับเห็นได้ชัดในช่วง 48 ถึง 108 ชั่วโมงของการหมัก อัตราการผลิตแอลกอฮอล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด เท่ากับ 0.0767 0.0650 0.0517 0.0428 และ 0.0228% ต่อชั่วโมง และปริมาณแอลกอฮอล์สุดท้ายเท่ากับ 10.1 ± 0.0, 9.2 ± 0.0, 8.2 ± 0.0, 7.4 ± 0.0 และ 5.1 ± 0.1% ในไวน์ที่เติมแบคทีเรียแลคติกในปริมาณ 4 5 6 7 และ 8 log cfu/ml ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงผลการยับยั้งกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ที่ค่อยๆ เกิดขึ้น กระบวนการหมักจะค่อยๆช้าลงและหยุดไปไม่ได้เกิดการหยุดชะงักในทันทีทันใดแม้ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนแบคทีเรียแลคติกปริมาณมากถึง 8 log cfu/ml ก็ตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 ผลของปริมาณแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* เริ่มต้นที่มีต่อกระบวนการหมักไวน์สับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง : (ก) ความเป็นกรด-ด่าง; (ข) ปริมาณกรด; (ค) ปริมาณแอลกอฮอล์; (ง) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (จ) ปริมาณเซลล์ยีสต์; (ฉ) ปริมาณเซลล์แบคทีเรียแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลของปริมาณแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* เริ่มต้นที่มีต่ออัตราการผลิตกรดในน้ำหมักสับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิ 32 ± 1 องศาเซลเซียส

ปริมาณแบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	อัตราการผลิตกรด (% ต่อชั่วโมง)	
	48 ชั่วโมงแรก	หลังชั่วโมงที่ 48
4	0.0044	0.0005
5	0.0063	0.0006
6	0.0083	0.0008
7	0.0950	0.0013
8	0.0144	0.0019

ตารางที่ 4.4 ผลของปริมาณแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* เริ่มต้นที่มีต่ออัตราการผลิตแอลกอฮอล์ในน้ำหมักสับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิ 32 ± 1 องศาเซลเซียส

ปริมาณแบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	อัตราการผลิตแอลกอฮอล์ (% ต่อชั่วโมง)			
	12 ชั่วโมงแรก	ชั่วโมงที่ 12 ถึง 48	ชั่วโมงที่ 48 ถึง 108	หลังชั่วโมงที่ 108
4	0.0556	0.1074	0.0767	0.0222
5	0.0625	0.1097	0.0650	0.0120
6	0.0500	0.1037	0.0517	0.0097
7	0.0542	0.1032	0.0428	0.0102
8	0.0542	0.0912	0.0228	0.0009

ผลกระทบของปริมาณแบคทีเรียแลคติกต่อการเจริญของยีสต์แสดงในภาพที่ 4.3(จ) เห็นได้ชัดเจนในช่วงหลังการหมัก 108 ชั่วโมงซึ่งเป็นช่วงที่อัตราการผลิตแอลกอฮอล์ใกล้หยุดนิ่งและเชื่อมโยงกับช่วง death phase ของยีสต์ด้วยเช่นกันเนื่องจากแอลกอฮอล์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ยีสต์ผลิตช่วงที่มีการเจริญ (growth associated product) ในไวน์ที่ไม่มีการปนเปื้อนอัตราการตายของยีสต์ในชั่วโมงที่ 108 ถึง 168 ค่อยข้างต่ำ (0.0041 log cfu/ml ต่อชั่วโมง ภาพที่ 4.2) การเจริญของยีสต์ในน้ำหมักที่เติมแบคทีเรียแลคติกในปริมาณ 4 ถึง 7 log cfu/ml มีการเปลี่ยนแปลงที่ใกล้เคียงกัน อัตราการตายใกล้เคียงกันคือ 0.0109 0.0141 0.0142 และ 0.0088 log cfu/ml ต่อชั่วโมงตามลำดับ แต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในน้ำหมักที่เติมแบคทีเรียในปริมาณ 8 log cfu/ml สามารถสังเกตเห็นอัตราการตายของยีสต์ที่เร็วกว่าในสภาวะอื่นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งเท่ากับ 0.0229 log cfu/ml ต่อชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Boidron (1969) ที่สรุปไว้ว่า แบคทีเรียแลคติกมีผลต่อการยับยั้งกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์และความรุนแรงของผลกระทบจะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียแลคติกในไวน์ ส่วน King และ Beelman (1986) ได้อธิบายไว้ว่า เซลล์แบคทีเรียแลคติกที่มีชีวิตมีผลต่อการเหนี่ยวนำให้อัตราการตายของยีสต์เร็วขึ้น

ผลการติดตามการเจริญของแบคทีเรียแลคติกตลอดช่วงการหมัก 168 ชั่วโมง ที่เริ่มต้นที่ปริมาณต่างๆกัน แสดงดังภาพที่ 4.3(ฉ) เมื่อปริมาณเริ่มต้นของแบคทีเรียแลคติกน้อย ปริมาณเชื้อที่เหลือรอดและเจริญจะน้อยตามลงด้วย สภาวะที่มีแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้น 4 log cfu/ml เชื้อมีการเจริญแต่ไม่สามารถอยู่รอดได้จนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมักของยีสต์ อาจเป็นเพราะปริมาณของเชื้อที่ต่ำ ไม่สามารถเจริญแข่งขันกับยีสต์ได้ ประกอบกับปริมาณแอลกอฮอล์ที่ยีสต์ผลิต มีอัตราที่เร็วใกล้เคียงกับในสภาวะที่ไม่เติมแบคทีเรียแลคติกเลยซึ่งส่งผลกระทบต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติกอย่างชัดเจน เมื่อย้อนกลับไปดูที่ผลกระทบด้านอื่นๆ จะเห็นได้ว่า ในสภาวะที่เติมแบคทีเรียแลคติกปริมาณ 4 log cfu/ml นั้นไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการหมักและการเจริญของยีสต์แต่อย่างใด และในสภาวะที่เติมแบคทีเรียแลคติกในปริมาณ 7 และ 8 log cfu/ml เชื้อสามารถเจริญอยู่ได้ตลอดระยะเวลาหมัก เนื่องจากกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์หยุดลงที่ 7.4 และ 5.3% ตามลำดับ ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ต่ำ สารอาหารและน้ำตาลยังคงเหลือ

ผลกระทบของแบคทีเรียแลคติกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักสับปะรดแสดงดังภาพที่ 4.3(ง) รูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลมีลักษณะใกล้เคียงกันคือ มีการลดต่ำลงในช่วง 12 ถึง 48 ชั่วโมงแรกของการหมักซึ่งแสดงถึงช่วง log phase ของการเจริญของยีสต์ที่ยีสต์จำเป็นต้องใช้น้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่จำเป็นต่อการเจริญ และผลการลดลงของน้ำตาลยังสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักของยีสต์ นอกจากนี้ยังเห็นได้ว่าปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียแลคติกยิ่งมากเท่าใด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงสุดท้ายยิ่งเหลือมาก แสดงถึงผลของการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่มีต่อกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์

4.4 ศึกษาผลกระทบของช่วงเวลาการเติมแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ที่ช่วงเวลาต่างๆ ระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* M30

เพื่อศึกษาความรุนแรงของผลกระทบที่เกิดจากการปนเปื้อนแบคทีเรียแลคติกในช่วงเวลาต่างๆ หลังจากเริ่มต้นการหมักด้วยยีสต์ โดยการถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 5% ของน้ำหมักเพื่อให้ได้ *L. plantarum* เริ่มต้นปริมาณ 7 log cfu/ml ในน้ำหมักสับปะรดที่เติมหัวเชื้อ *S. cerevisiae* M30 ในชั่วโมงที่ 0 24 48 72 และ 96 ของการหมัก ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างตลอดระยะเวลาการหมักแสดงดังภาพที่ 4.4 (ก) การเปลี่ยนแปลงมีลักษณะคล้ายคลึงกันคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดต่ำลงอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก ซึ่งจะเกิดจากกิจกรรมของยีสต์ ความแตกต่างที่สังเกตเห็นมีเพียงในสภาวะการหมักที่เติมแบคทีเรียแลคติกในชั่วโมงที่ 0 หรือช่วงเริ่มต้นการหมักเท่านั้นที่ค่าความเป็นกรด-ด่างจะต่ำกว่าสภาวะการหมักอื่นเล็กน้อยและเป็นเช่นนี้ตลอดระยะเวลาการหมัก

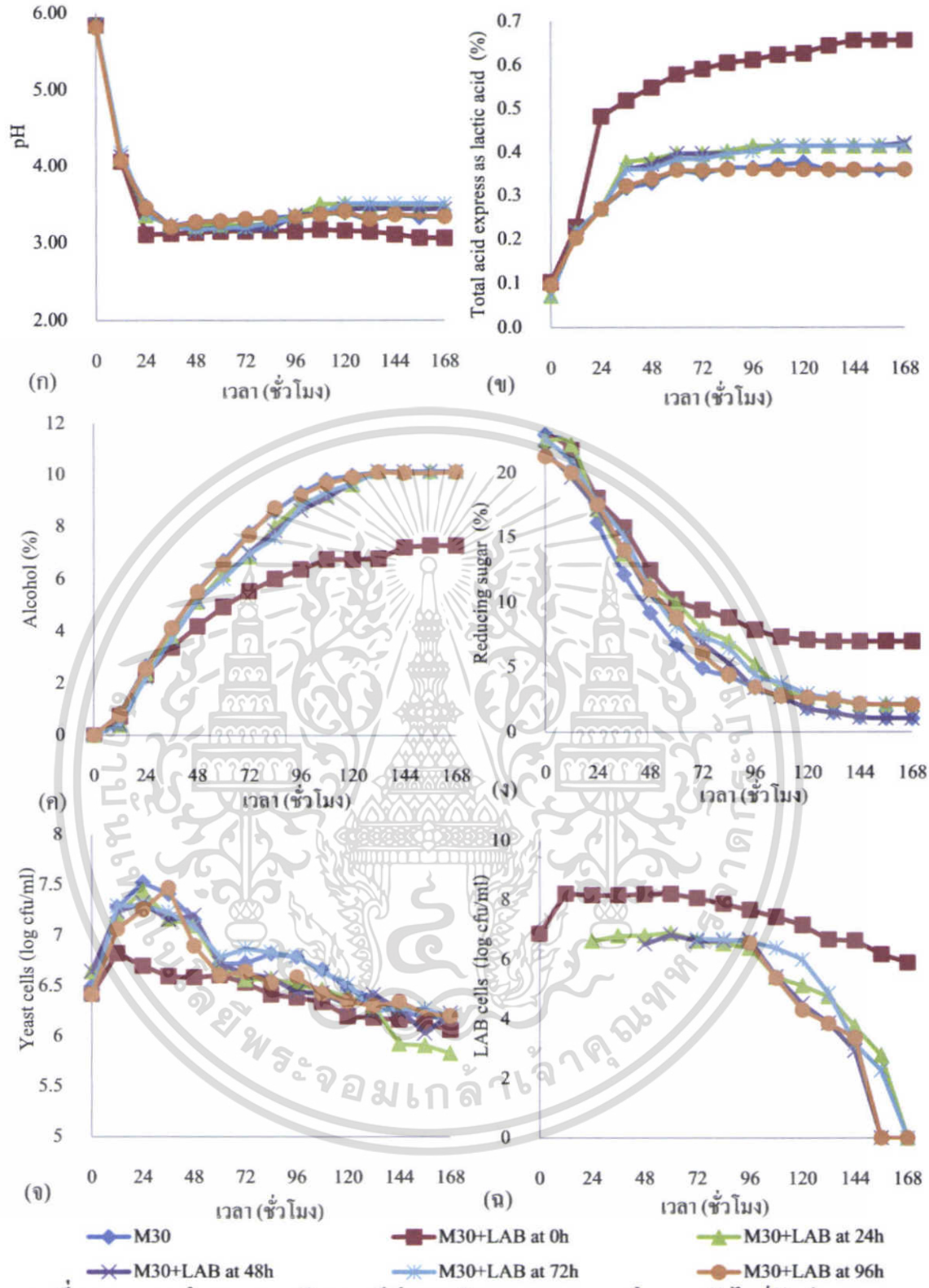
ปริมาณกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักแสดงในภาพที่ 4.4 (ข) สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของการเพิ่มขึ้นของกรดแลคติกในน้ำหมักสับปะรดที่เติมแบคทีเรียแลคติกในชั่วโมงที่ 0 ได้อย่างชัดเจน ใน 12 ชั่วโมงแรกปริมาณกรดในทุกสภาวะยังคงรักษาระดับที่เท่ากันที่ประมาณ 0.2% แต่ในชั่วโมงที่ 24 ปริมาณกรดของน้ำหมักที่เติมแบคทีเรียแลคติกที่ 0 ชั่วโมงสูงขึ้นถึง 0.482 ± 0.01% และสูงทีละเล็กน้อยจนกระทั่งสิ้นสุดการติดตามที่ชั่วโมงที่ 168 ปริมาณกรดเท่ากับ 0.656 ± 0.027% ในขณะที่ปริมาณกรดของการหมักสภาวะอื่นมีลักษณะใกล้เคียงกัน

เมื่อเทียบกับ 48 ชั่วโมงแรกเช่นเดียวกับสภาวะอื่นๆ อัตราการผลิตกรดของไวน์ที่เติมแบคทีเรียแลคติกในชั่วโมงที่ 0 สูงที่สุดคิดเป็น 0.0093% ต่อชั่วโมง ในขณะที่การเติมแบคทีเรียแลคติกในชั่วโมงที่ 24 48 72 และ 96 มีอัตราการผลิตกรดใน 48 ชั่วโมงแรกเท่ากับ 0.0065 0.0063 0.0060 และ 0.0051% ต่อชั่วโมงตามลำดับ

เช่นเดียวกับปริมาณกรด ผลกระทบจากแบคทีเรียแลคติกชัดเจนในน้ำหมักที่เติมเชื้อแบคทีเรียที่ชั่วโมงที่ 0 ดังภาพที่ 4.4(ค) อัตราการผลิตแอลกอฮอล์เริ่มลดต่ำกว่าสภาวะอื่นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 และลดต่ำลงเรื่อยๆ อัตราการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ในชั่วโมงที่ 12 ถึง 48 ของไวน์ที่เติมแบคทีเรียแลคติกในชั่วโมงที่ 0 24 48 72 และ 96 เท่ากับ 0.0963 0.1315 0.1315 0.1333 และ 0.1301% ต่อชั่วโมงตามลำดับ และในช่วงชั่วโมงที่ 48 ถึง 108 ของการหมัก อัตราการผลิตแอลกอฮอล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด คือ 0.0422 0.0678 0.0656 0.0689 และ 0.0695% ต่อชั่วโมงตามลำดับ สามารถสังเกตได้ชัดเจนว่ามีเพียงการเติมแบคทีเรียแลคติกในชั่วโมงที่ 0 เท่านั้นที่มีผลกระทบต่ออัตราการผลิตแอลกอฮอล์ ซึ่งกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์หยุดลงที่ชั่วโมงที่ 144 ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้เท่ากับ 7.2 ± 0.4% ในขณะที่การหมักสภาวะอื่นๆ ไม่แตกต่างจากน้ำหมักที่ไม่เติมแบคทีเรียแลคติกมากนัก

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แสดงดังภาพที่ 4.4(ง) แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงมีลักษณะคล้ายกัน แต่สามารถสังเกตความแตกต่างได้ในสภาวะที่เติมแบคทีเรียแลคติกในชั่วโมงที่ 0 การใช้น้ำตาลเริ่มชะลอในชั่วโมงที่ 72 และหยุดลงในชั่วโมงที่ 120 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้ายคงเหลือ 7.028 ± 0.069% ซึ่งสัมพันธ์กับการหมักแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 ผลของช่วงเวลาการเติมแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ต่อการหมักไวน์สับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง : (ก) ความเป็นกรด-ด่าง (ข) ปริมาณกรด; (ค) ปริมาณแอลกอฮอล์; (ง) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์; (จ) ปริมาณเซลล์ยีสต์; (ฉ) ปริมาณเซลล์แบคทีเรียแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการติดตามปริมาณเซลล์ยีสต์ M30 แสดงดังภาพที่ 4.4 (จ) สังเกตการเจริญของยีสต์ในน้ำหมักที่เติมแบคทีเรียแลคติกในชั่วโมงที่ 0 ของการหมัก แสดงให้เห็นอัตราการเจริญที่ต่ำกว่าในสภาวะอื่นๆ ใน 48 ชั่วโมงแรก อัตราการเจริญเท่ากับ 0.0031 log cfu/ml ต่อชั่วโมง แต่ยีสต์ยังคงมีชีวิตรอดตลอดการติดตาม 168 ชั่วโมง ในขณะที่ยีสต์ในไวน์ที่มีการเติมแบคทีเรียแลคติกในชั่วโมงที่ 24 48 72 และ 96 ของการหมักมีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.0095 0.0074 0.0141 และ 0.0100% ต่อชั่วโมงตามลำดับ

การเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่เติมลงในน้ำหมักสับปะรด ณ ช่วงเวลาต่างๆ แสดงดังภาพที่ 4.4(ฉ) แบคทีเรียแลคติกที่เติมในช่วงเวลาต่างๆ ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ และค่อยๆลดจำนวนลงยิ่งเวลาในการเติมช้าเท่าใด อัตราการเจริญของแบคทีเรียแลคติกจะยิ่งต่ำลงเท่านั้น ต่างจากในน้ำหมักที่เติมแบคทีเรียแลคติกในชั่วโมงที่ 0 พบว่า เชื้อสามารถเจริญเพิ่มจำนวน และอยู่รอดได้ตลอดระยะเวลาที่ติดตามผล อันเนื่องมาจากในช่วงเวลาที่เติมแบคทีเรียแลคติกลงไปนั้น น้ำหมักยังอุดมไปด้วยสารอาหาร และมีปริมาณแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์แบคทีเรียต่ำทำให้เชื้อสามารถปรับตัวและเจริญร่วมกับยีสต์ได้ ต่างจากการเติมเชื้อในช่วงหลังที่สารอาหารจะค่อยๆลดน้อยลง และปริมาณแอลกอฮอล์จากการหมักของยีสต์ค่อยๆมากขึ้นเกินกว่า 7% ทำให้การปรับตัวและการเจริญของแบคทีเรียแลคติกต่ำลงด้วย ผลที่ได้สามารถสังเกตเกณฑ์ความปลอดภัยจากการปนเปื้อนแบคทีเรียแลคติกชนิดนี้ว่าหากมีการปนเปื้อนภายหลังเริ่มต้นการหมัก 24 ชั่วโมงหรือในสภาวะที่น้ำหมักมีแอลกอฮอล์สูงกว่า 2.5% การปนเปื้อนของแบคทีเรียแลคติกจะไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ M30 ในไวน์สับปะรด ผลการวิจัยในระดับห้องปฏิบัติการของ Lonvaud-Funel et al. (1991) พบว่า *L. plantarum* สามารถรอดชีวิตในไวน์ที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สูงสุด 7% เป็นเวลา 3 วัน

4.5 ศึกษาสภาวะการอยู่ร่วมกันระหว่างยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ในถังหมัก Stirred Tank Reactor

จากผลการศึกษาผลกระทบของแบคทีเรียแลคติกต่อการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ในข้อที่ 4.3 และ 4.4 เลือกสภาวะที่เชื้อทั้งสองมีชีวิตรอดตลอดช่วงการติดตาม 168 ชั่วโมง คือ สภาวะการหมักไวน์สับปะรดด้วยยีสต์ที่เติมแบคทีเรียแลคติกปริมาณ 7 และ 8 log cfu/ml ในช่วงเริ่มต้นของการหมัก เพื่อนำมาศึกษาผลกระทบของแบคทีเรียแลคติกต่อการหมักไวน์และสังเกตสภาวะการอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสองในสภาวะควบคุมอุณหภูมิ โดยหมักไวน์สับปะรดในถังหมัก Stirred Tank Reactor ที่มีระบบหล่อเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิการหมักให้คงที่ 30 องศาเซลเซียส ขนาดถัง 50 ลิตร ปริมาตรไวน์ที่หมัก 30 ลิตร และระบบกวนด้วยใบพัดความเร็ว 50 รอบต่อนาที เพื่อใช้ในการกวนเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียที่ตกตะกอนก่อนเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 4.5

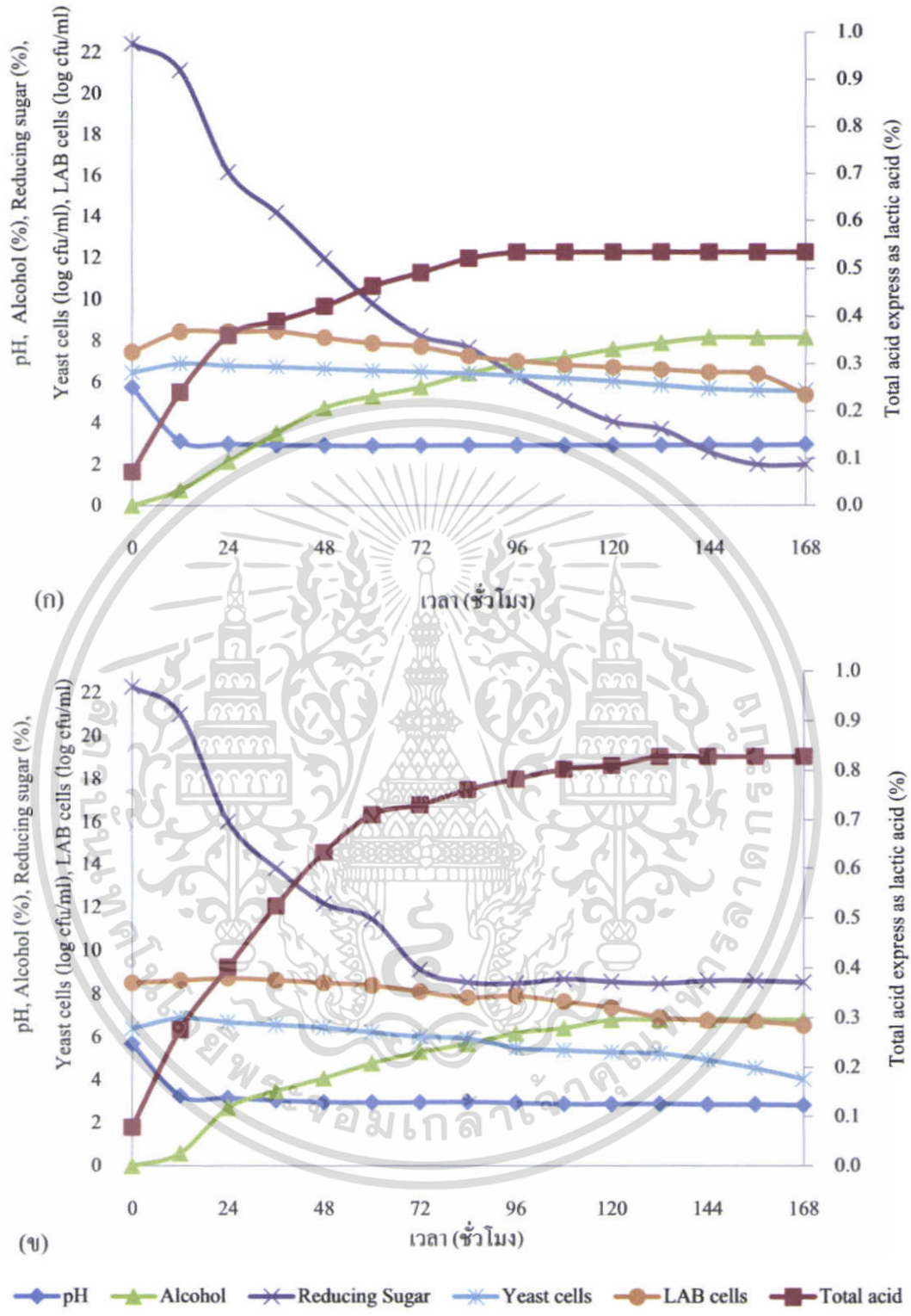
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบผลของการหมักไวน์สับปะรดที่เติมแบคทีเรียแลคติกในปริมาณเท่ากัน ไวน์ที่หมักในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 3 ลิตร และถังหมัก Stirred Tank Reactor ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาตร 30 ลิตร พบว่าการหมักไวน์ในถังหมักควบคุมอุณหภูมิมีอัตราการหมักไวน์ที่เพิ่มขึ้นและการผลิตกรดที่ลดลง เนื่องมาจากวัตถุประสงค์หลักของถังหมักควบคุมอุณหภูมิ เพื่อใช้ลดอุณหภูมิที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของยีสต์ หากความร้อนจากการหมักจะยิ่งสูงขึ้นจะส่งผลให้อัตราการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ลดลง การเจริญและการผลิตกรดของยีสต์และแบคทีเรียแลคติกสูงขึ้น ในไวน์ที่เติมแบคทีเรียแลคติก 7 log cfu/ml มีอัตราการผลิตแอลกอฮอล์ (ตารางที่ 4.5) ในชั่วโมงที่ 12 ถึง 48 เท่ากับ 0.1111 และ 0.0977% ต่อชั่วโมง และในชั่วโมงที่ 48 ถึง 108 เท่ากับ 0.0411 และ 0.03867% ต่อชั่วโมง ในขณะที่อัตราการผลิตกรด (ตารางที่ 4.6) ใน 48 ชั่วโมงแรก เท่ากับ 0.0073 และ 0.01158% ต่อชั่วโมงในไวน์ที่เติมแบคทีเรียแลคติกในปริมาณ 7 และ 8 log cfu/ml ตามลำดับ ผลในถังหมัก 50 ลิตรยังคงมีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกับในขวดรูปชมพู่คือ ในไวน์ที่เติมแบคทีเรียแลคติกในปริมาณ 8 log cfu/ml ยังคงมีอัตราการผลิตกรดที่สูงกว่า อัตราการผลิตแอลกอฮอล์ที่ต่ำกว่าไวน์ที่เติมแบคทีเรียแลคติกในปริมาณ 7 log cfu/ml ปริมาณแอลกอฮอล์สุดท้ายเพิ่มขึ้น และปริมาณกรดสุดท้ายลดลง ทั้งนี้ Mills et al.(2008) กล่าวไว้ว่า ยิ่งอุณหภูมิในการหมักเพิ่มขึ้นความสามารถในการทนต่อแอลกอฮอล์ของยีสต์จะยิ่งลดลง ซึ่งจะส่งผลต่ออัตราการผลิตแอลกอฮอล์เช่นกัน ดังนั้นความจำเป็นในการควบคุมอุณหภูมิในถังหมักขนาดใหญ่ซึ่งจะเกิดความร้อนจากกิจกรรมของยีสต์จึงจำเป็นอย่างยิ่ง

ตารางที่ 4.5 ผลของปริมาณแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* เริ่มต้นที่มีต่ออัตราการผลิตแอลกอฮอล์ในน้ำหมักสับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในถังหมัก Stirred Tank Reactor ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส

ปริมาณแบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	อัตราการผลิตแอลกอฮอล์ (%ต่อชั่วโมง)			
	12 ชั่วโมงแรก	ชั่วโมงที่ 12 ถึง 48	ชั่วโมงที่ 48 ถึง 108	หลังชั่วโมงที่ 108
7	0.0639	0.1111	0.0411	0.0164
8	0.0486	0.0977	0.0387	0.0063

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ผลของแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ต่อกระบวนการผลิตไวน์สับปะรดด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในถังหมัก Stirred Tank Reactor ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส: (ก) สภาวะการเติมแบคทีเรียแลคติก 7 log cfu/ml; (ข) สภาวะการเติมแบคทีเรียแลคติก 8 log cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

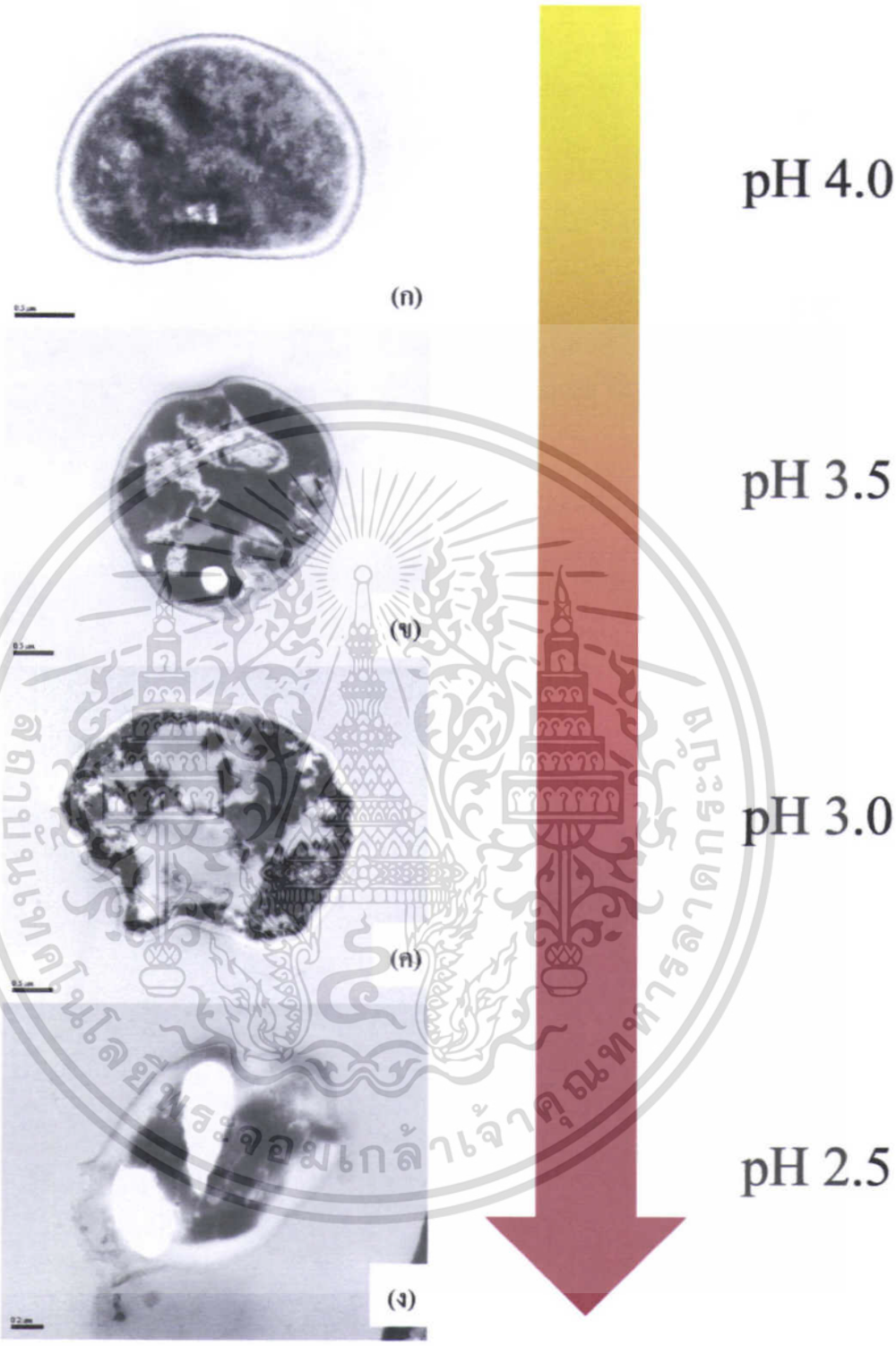
ตารางที่ 4.6 ผลของปริมาณแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* เริ่มต้นที่มีต่ออัตราการผลิตกรดในน้ำหมักสับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในถังหมัก Stirred Tank Reactor ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส

ปริมาณแบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	อัตราการผลิตกรด (%ต่อชั่วโมง)	
	48 ชั่วโมงแรก	หลังชั่วโมงที่ 48
7	0.0073	0.0009
8	0.0116	0.0016

4.6 ศึกษาผลของกรดแลคติกต่อการเจริญและผนังเซลล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* M30

ในศึกษาผลกระทบของกรดแลคติกต่อลักษณะทางกายภาพของผนังเซลล์ยีสต์ โดยการศึกษาสภาพเซลล์และผนังเซลล์ของยีสต์ที่เจริญใน YM broth ที่ถูกปรับค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ ด้วยกรดแลคติกเข้มข้นเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อเป็นตัวอย่างอ้างอิงถึงลักษณะผลกระทบโดยตรงของกรดแลคติกต่อเซลล์ยีสต์พบว่า เมื่อความเป็นกรด-ด่างต่ำลงด้วยการเพิ่มปริมาณของกรดแลคติก สภาพของผนังเซลล์ยีสต์จะถูกทำลายลงเรื่อยๆตั้งแต่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.5 ลงมาดังภาพที่ 4.6 สภาพเซลล์ยีสต์เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ที่เกิดจากการที่เติมกรดลงไป เมื่อความเป็นกรด-ด่างลดต่ำลงถึง 3.0 เซลล์ยีสต์มีการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์มากขึ้น และสามารถสังเกตพบบางเซลล์เริ่มมีรูรั่วที่ผนังเซลล์ จนกระทั่งความเป็นกรดด่างต่ำลง ถึง 2.5 เซลล์ยีสต์ถูกทำลายด้วยกรด และเห็นรอยฉีกขาดที่เกิดจากการเติมกรดอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นถึงความเข้มข้นของกรดที่มีต่อค่าความเป็นกรด-ด่างซึ่งมีผลกระทบโดยตรงต่อเซลล์ยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องทะลุของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่เลี้ยงใน YM broth ที่มีความเป็นกรด-ด่างต่างๆตั้งแต่ 4.0 ถึง 2.5: (ก) ความเป็นกรด-ด่าง 4.0 กำลังขยาย 30,000 เท่า; (ข) ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 กำลังขยาย 20,000 เท่า; (ค) ความเป็นกรด-ด่าง 3.0 กำลังขยาย 20,000 เท่า; (ง) ความเป็นกรด-ด่าง 2.5 กำลังขยาย 40,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

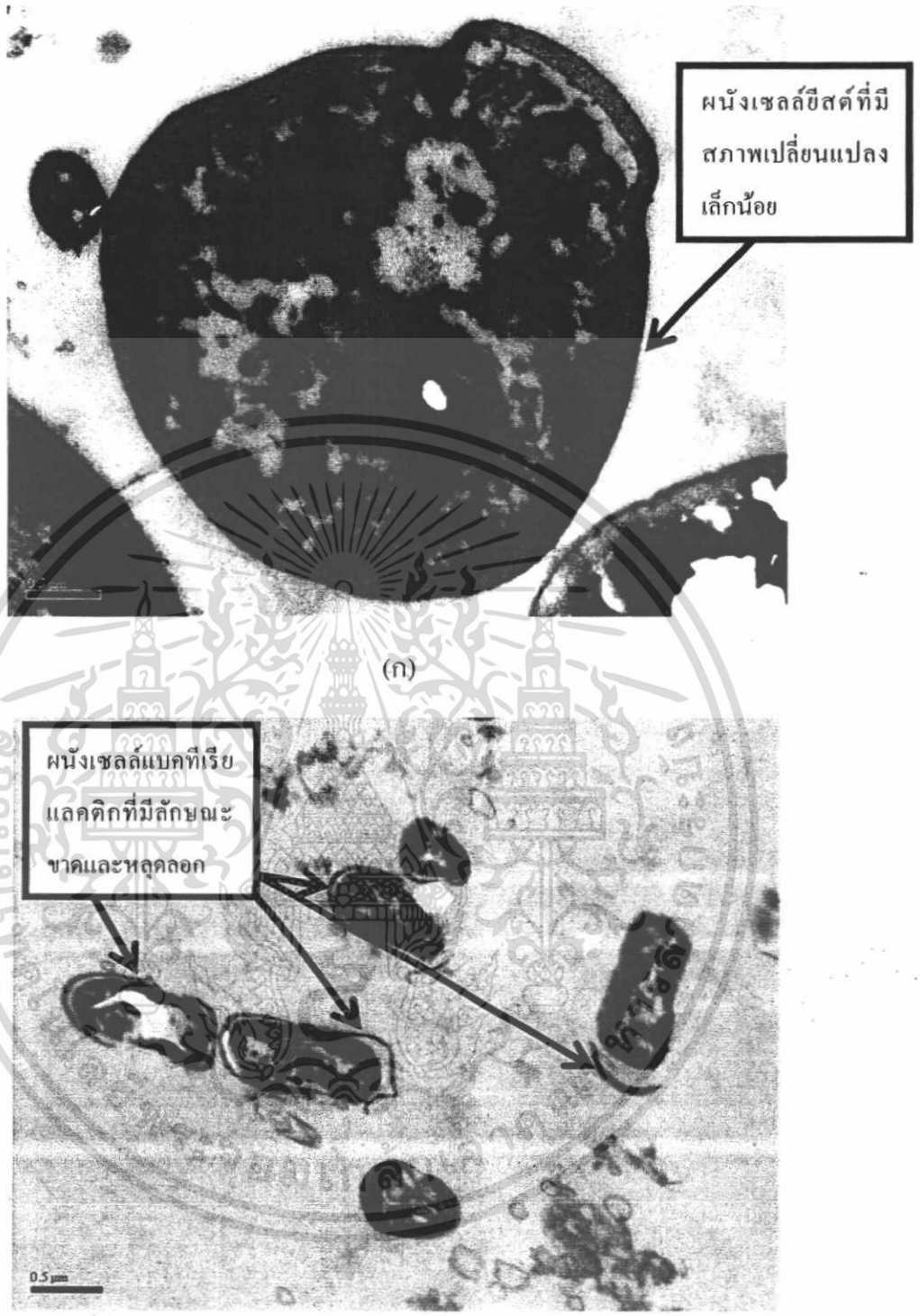
ในการศึกษาผลกระทบของกรดที่เกิดจากการหมักของ *L. plantarum* ต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์และผนังเซลล์ยีสต์และผลกระทบของแอลกอฮอล์ที่เกิดจากการหมักของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ต่อเซลล์และผนังเซลล์แบคทีเรียแลคติก โดยการนำตัวอย่างไวน์สับปะรดที่ถ่ายหัวเชื้อ *L. plantarum* ปริมาตร 7 และ 8 log cfu/ml ณ ช่วงเริ่มต้นของการหมัก โดยเก็บตัวอย่างไวน์ในชั่วโมงที่ 168 นำมาวิเคราะห์สภาพเซลล์ของเชื้อทั้งสองด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องทะลุ พบว่า ในไวน์ที่เติม *L. plantarum* ปริมาณ 7 log cfu/ml สภาวะสิ้นสุดการหมักมีปริมาณแอลกอฮอล์ 7.867 ± 0.058% กรดแลคติก 0.654 ± 0.010% ความเป็นกรด-ด่าง 2.987 ± 0.004 จากภาพที่ 4.7(ก) แสดงลักษณะผลกระทบต่อเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ผนังเซลล์เปลี่ยนสภาพเล็กน้อย จากสภาวะของไวน์ดังกล่าว และในภาพที่ 4.7(ข) แสดงให้เห็นถึงผลกระทบของแอลกอฮอล์จากการหมักของยีสต์รวมถึงกรดที่เกิดจากการหมักของจุลินทรีย์ทั้งสอง ต่อเซลล์ *L. plantarum* อย่างชัดเจน ผนังเซลล์มีลักษณะหลุดลอกและฉีกขาด แต่ไซโตพลาซมในเยื่อหุ้มเซลล์ยังคงลักษณะเดิมอยู่ ไม่มีออแกนเนล หรือ สารใดๆ หลุดจากเซลล์

ในไวน์ที่เติม *L. plantarum* 8 log cfu/ml สภาวะสิ้นสุดการหมักมีปริมาณแอลกอฮอล์ 5.400 ± 0.100% กรดแลคติก 0.936 ± 0.000% ความเป็นกรด-ด่าง 2.816 ± 0.023 จากภาพที่ 4.8(ก) แสดงให้เห็นลักษณะการฉีกขาดของผนังเซลล์ยีสต์อย่างชัดเจน ซึ่งเกิดจากกรดที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นในไวน์ ในภาพที่ 4.8 (ข) แสดงภาพของแบคทีเรียแลคติกที่มีลักษณะท่อนสั้น บางเซลล์มีลักษณะกลมรีซึ่งเกิดจากผลกระทบจากสภาวะเครียดที่เกิดจากทั้งกรดและแอลกอฮอล์ (König et al., 2009) และสนับสนุนผลงานวิจัยของ Lonvaud-Funel et al. (1991) ที่ว่า *L. plantarum* สามารถรอดชีวิตในไวน์ที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สูงสุด 7%

Navarro et al. (2000) ได้ทำการแยกแบคทีเรียแลคติกจากไวน์แดงริโอจา (Rioja red wine) พบว่า *L. plantarum* สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน J-51 ซึ่งมีผลยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิดรวมทั้ง *S. cerevisiae* และแบคเทอริโอซินชนิดนี้ยังเสถียรที่ค่าความเป็นกรดที่ 3 และ 9 จึงอาจเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลยับยั้งยีสต์นอกเหนือจากกรดที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น

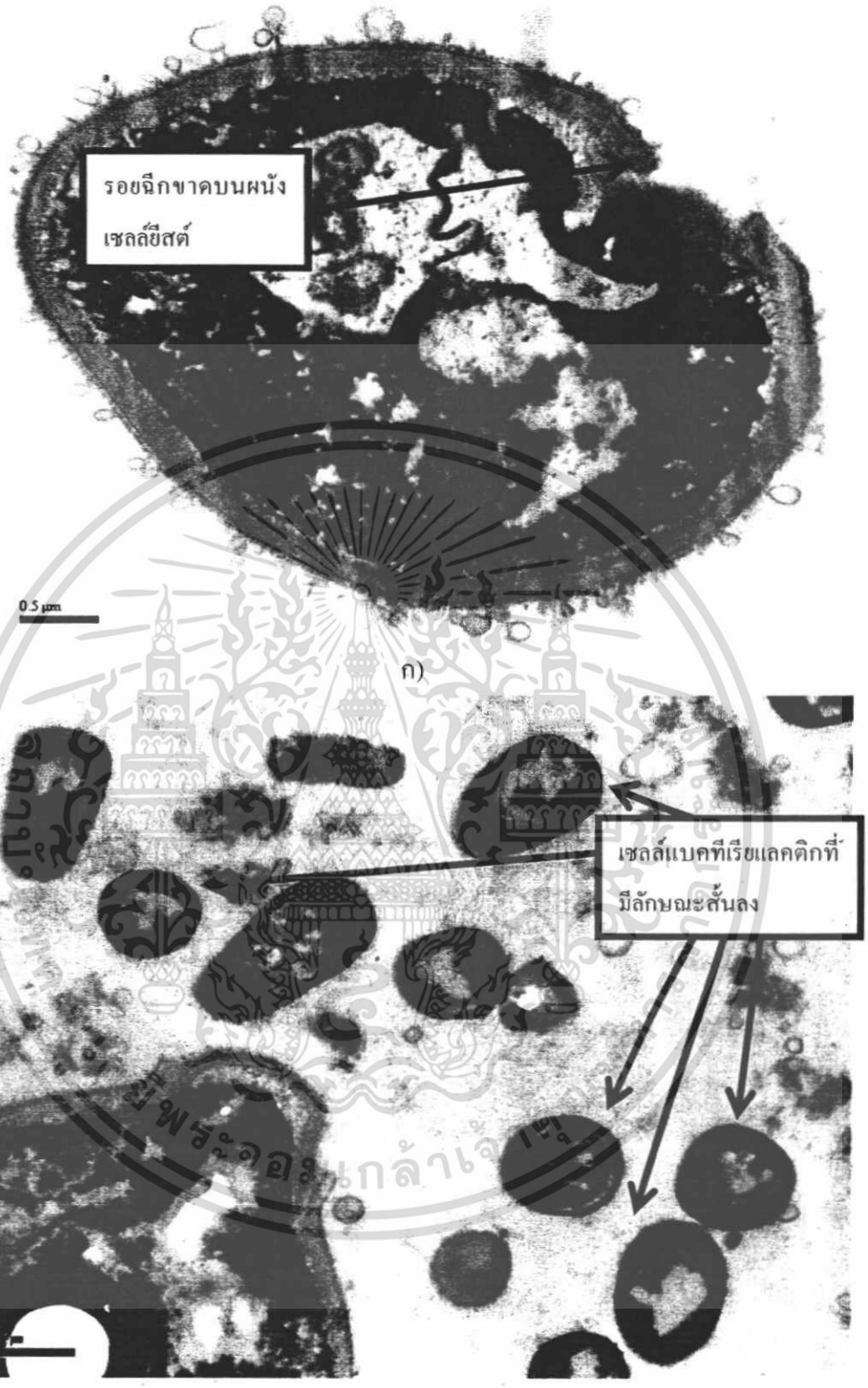
เมื่อเปรียบเทียบภาพถ่ายเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงใน YM broth ที่ถูกปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดแลคติกเข้มข้นกับยีสต์ในไวน์ที่มีการเติมแบคทีเรียแลคติก พบว่าความรุนแรงของผลกระทบจากกรดโดยตรงมีมากกว่ากรดที่เกิดจากการหมักของแบคทีเรียแลคติก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารอาหารบางชนิดที่อยู่ในไวน์มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ซึ่งช่วยลดผลกระทบที่เกิดจากกรด นอกจากนั้นกรดแลคติกที่เติมลงไปมีค่า pKa = 3.81 แตกตัวให้โปรตอนมากกว่า แต่กรดที่เกิดจากการหมักไม่ได้มีเพียงกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว กรดในไวน์ยังเกิดจากกิจกรรมของยีสต์ด้วยเช่นกัน มีทั้งกรดซักซินิก กรดเบนโซอิก กรดซิตริก กรดบิวทาริก กรดมาลิก และกรดโพรพิโอนิก ซึ่งมีค่า pKa = 4.16 ถึง 5.74 แตกตัวให้โปรตอนน้อยกว่าความเป็นกรดจึงน้อยกว่าและเป็นอันตรายต่อเซลล์ยีสต์น้อยกว่า (Rib´ereau-Gayon et al., 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องทะลุของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และ *L. plantarum* ในไวน์สับปะรดชั่วโมงที่ 168 ที่มีการเติมแบคทีเรียแลคติก 7 log cfu/ml ในช่วงเริ่มต้นของการหมัก: ก) เซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 กำลังขยาย 20,000 เท่า; ข) เซลล์แบคทีเรียแลคติก *L.plantarum* กำลังขยาย 20,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องทะลุของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และ *L. plantarum* ในไวน์สับปะรดชั่วโมงที่ 168 ที่มีการเติมแบคทีเรียแลคติก 8 log cfu/ml ในช่วงเริ่มต้นของการหมัก: ก) เซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 กำลังขยาย 20,000 เท่า; ข) เซลล์แบคทีเรียแลคติก *L.plantarum* กำลังขยาย 20,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 เชื้อที่แยกจากไวน์ปนเปื้อน และนำมาทดสอบเป็นแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ซึ่งมีบทบาทในการหมักมาโลแลคติกเช่นกัน แต่นักวิจัยส่วนใหญ่ให้ความสนใจน้อย เนื่องจากคุณสมบัติที่ดีของแบคทีเรียมาโลแลคติก จำเป็นต้องมีคือการทนต่อแอลกอฮอล์ความเข้มข้นสูง เนื่องจากกระบวนการหมักมาโลแลคติก จะเกิดหลังจากที่การหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์สิ้นสุดลงแล้ว

5.1.2 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงจุดวิกฤตของการปนเปื้อนแบคทีเรียแลคติกชนิด *L. plantarum* ที่พบบ่อยในการผลิตไวน์ การปนเปื้อนจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการหมักไวน์ก็ต่อเมื่อเกิดการปนเปื้อนก่อน 24 ชั่วโมงแรกของกระบวนการหมักเท่านั้น และปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่ปนเปื้อนในช่วงเริ่มต้นนั้น อัตราการยับยั้งกระบวนการหมักแอลกอฮอล์และการเจริญของยีสต์ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของแบคทีเรียแลคติก ยิ่งความเข้มข้นของแบคทีเรียแลคติกที่ปนเปื้อนสูงขึ้น การยับยั้งกิจกรรมของยีสต์จะยิ่งมากขึ้นตามไปด้วย

5.1.3 ถังหมัก Stirred Tank Reactor มีประสิทธิภาพเหมาะสมต่อการหมักไวน์ สามารถรักษาอุณหภูมิให้คงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก และลดผลกระทบที่เกิดจากการปนเปื้อนแบคทีเรียแลคติกได้เช่นกัน

5.1.4 กรดแลคติกที่เกิดจากแบคทีเรียแลคติกที่ปนเปื้อนในไวน์ ส่งผลกระทบต่อการหมักและโครงสร้างเซลล์ยีสต์ โดยเฉพาะผนังเซลล์ และเช่นกัน แอลกอฮอล์ที่เกิดจากการหมักของยีสต์ก็ส่งผลต่อโครงสร้างของแบคทีเรียแลคติก โดยเฉพาะผนังเซลล์ และเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น

5.2 ข้อเสนอแนะ

ปรับปรุงสูตรน้ำสับปะรดที่ใช้ในการหมักโดยลดปริมาณน้ำตาล เพื่อลดปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดจากการหมักของยีสต์ เพื่อศึกษาสภาวะการอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสองให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ที่ใช้ในงานวิจัยสามารถเจริญในไวน์ที่มีแอลกอฮอล์สูงสุด 7 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กุณฑิกา เวชกลาง. 2547. การใช้ยีสต์ร่วมกับแบคทีเรียแลคติกในการพัฒนากระบวนการผลิตไวน์สับปะรด. สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม.

ปรนีย์ ศรีพินิจ ภัณธิรา เทศถนอม ศิวพร พุดตาน ทัศนียา จำเริญสุข และ วราวุฒิ ครูส่ง. 2547. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติกจากกากถั่วเหลืองที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในการหมักกากถั่วเหลืองเพื่อเป็นอาหารสัตว์. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

วราวุฒิ ครูส่ง สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา และอัสนี วิจิตระกะ. 2550. ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูระบบ Single stage. คณะอุตสาหกรรมเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

วรรณภา ไผ่พันธ์ สวรรยา เม็งเกร็ด และวราวุฒิ ครูส่ง. 2547. การผลิตจุลินทรีย์โปรตีนจากน้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนโดย *Saccharomyces cerevisiae* M30. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 22. 47-60.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. 2546. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ไวน์ผลไม้, มผช. 2/2546.

Alexandre, H., P.J. Costello, F. Remize, J. Guzzo, and M. Guilloux-Benatier. 2004. *Saccharomyces cerevisiae–Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. International Journal of Food Microbiology. 93. 141– 154.

Alexandre, H., D. Heintz, D. Chassagne, M. Guilloux-Benatier, C. Charpentier, and M. Feuillat. 2001. Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 26. 235– 240.

A.O.A.C., 1984. Official methods of analysis, 14th Edition., Association of official analytical chemists. Washington D.C.

Athanasios, M., L. Paul, B. Argyro, K. Athanasios, and K. Michael. 2007. Ambient and low temperature winemaking by immobilized cells on brewer's spent grains: Effect on volatile composition. Food Chemistry. 104. 918–92.

Bartowsky, E.J., and P.A. Henschke. 2008. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—A review. International Journal of Food Microbiology. 125. 60–70.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Beneduce, L., G. Spano, A. Vernile, D. Tarantino, and S. Massa. 2004. Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage. Journal of Basic Microbiology. 44. 10-16.

Blake, A., Y. Kotseridis, I.D. Brindle, D. Inglis, and G.J. Pickering. 2010. Effect of light and temperature on 3-alkyl-2-methoxypyrazine concentration and other impact odourants of Riesling and Cabernet Franc wine during bottle ageing. Food Chemistry. 119. 935–944.

Borneman, A. R., P. J. Chambers, and I. S. Pretorius. 2007. Yeast systems biology: modelling the winemaker's art. Trends in Biotechnology. 25.

Boulton, R.B., V.L. Singleton, L.F. Bisson, and R.E. Kunkee. 1996. Principles and practices of winemaking. Kluwer Academic/Plenum Publishing, New York.

Bousboura, G.E., and R.E. Kunkee. 1971. Effect of pH in malolactic fermentation in wine. American Journal Enology and Viticulture. 22. 121-126.

Boidron, A.M. 1969. Etude de l'antagonisme entre les levures et les bacte´ries du vin. Connaissance de la Vigne et du Vin 3. 315–378.

Capucho, I., and M.V. San Romao. 1994. Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Leuconostoc oenos*. Applied Microbiology and Biotechnology. 42. 391–395.

Carrete´, R., M. Teresa Vidal, A. Bordons, and M. Constanti. 2002. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. FEMS Microbiology Letters. 211. 155–159.

Charpentier, C., and M. Feuillat. 1993. Yeast autolysis. In: Fleet, G.H. (Ed.). Wine microbiology and biotechnology. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.

Caridi, A., and V. Corte.1997. Inhibition of malolactic fermentation by cryotolerant yeasts. Biotechnology Letters. 19. 723–726.

Costello, P.J., G.J. Morrison, T.H. Lee, and G.H. Fleet. 1983. Numbers and species of lactic acid in wine during vinification. Australian Food Technology. 35. 14-18.

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

Mills, D.A., T. Phister, E. Neeley, and E. Johannsen. 2008. Chapter 6: Wine Fermentation. Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods. Springer. 162-192.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dharmadhikari, M. Lactic acid bacteria and wine spoilage. Available: http://www.extension.iastate.edu/Wine/Resources/lacticacidbacteriaandWine spoilage.htm. (Accessed 2 June 2010).

Dick, K.J., P.C. Molan, and R. Eschenbruch. 1992. The isolation from *Saccharomyces cerevisiae* of two antibacterial cationic proteins that inhibit malolactic bacteria. Viticulture. 31. 105– 116.

Douglas, H.C., and W.V. Cruess. 1936. A *Lactobacillus* from California wine: *Lactobacillus hilgardii.* Food Research. 1. 113-119.

Du Plessis, H.W., L.M. Dicks, I.S. Pretorius, M.G. Lambrechts, and M. Du Toit. 2004. Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. International Journal Food Microbiology. 91. 19-29.

Edwards, C.G., M.D. Collins, P.A. Lawson, and A.V. Rodriguez. 2000. *Lactobacillus nagelii* sp. nov., an organism isolated from a partially fermented wine. International journal systematic Evolutional Microbiology. 50. 699-702.

Edwards, C.G., and R.B. Beelman. 1987. Inhibition of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* (PSU-1) by decanoic acid and subsequent removal of the inhibition by yeast ghosts. American Journal of Enology and Viticulture. 38. 239–242.

Escot, S., M. Feuillat L. Dulau, and C. Charpentier. 2001. Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. Australian Journal of Grape and Wine Research. 7. 153–159.

Fernández-Novales, J., M.I. López, M.T. Sánchez, J. Morales, and V. González-Caballero. 2009. Shortwave-near infrared spectroscopy for determination of reducing sugar content during grape ripening, winemaking, and aging of white and red wines. Food Research International. 42. 285–291.

Feuillat, M., P. Bidan, and Y. Rosier. 1977. Croissance des bacte´ries lactiques a` partir des principaux constituants azote´s du vin. Annales de Technologie Agricole. 19. 141– 154.

Fornairon-Bonnefond, C., C. Camarasa, M. Moutounet, and J.-M. Salmon. 2001. Etat des connaissances scientifiques actuelles sur le phe´nome`ne d'autolyse des levures et l'e´levage des vins sur lies. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin. 35. 57–78.

Fornachon, J.C.M. 1957. The occurrence of malo-lactic fermentation in Australian wines. Australian Journal of Applied Science. 8. 120-129.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fornachon, J.C.M. 1968. Influence of different yeasts on the growth of lactic acid bacteria in wine. Journal of the Science of Food and Agriculture. 19. 374–378.

Fraser-Reid, O.B., K. Tatsuta, and J. Thiem. 2008. Glycoscience chemistry and chemical biology. Springer-verlag, Berlin, Heidelberg.

García-Martín, N., L. Palacio, P. Prádanos, A. Hernández, M. Ortega-Heras, S. Pérez-Magariño, and D.C. González-Huerta. 2009. Evaluation of several ultra- and nanofiltration membranes for sugar control in winemaking. Desalination. 245. 554–558.

Garde-Cerdán, T., C. Lorenzo, J.M. Carot, M.D. Esteve, M.D. Climent, and M.R. Salinas. 2009. Differentiation of barrel-aged wines according to their origin, variety, storage time and enological parameters using fermentation products. Food Control. 20. 269–276.

Goelzer, A., B. Charnomordic, S. Colombié, V. Fromion, and J.M. Sablayrolles. 2009. Simulation and optimization software for alcoholic fermentation in winemaking conditions. Food Control. 20.635–642.

Guilloux-Benatier, M., and D. Chassagne. 2003. Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51 (3). 746–751.

Hornsey, I. 2007. The chemistry and biology of winemaking. Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge.

Kandler, O., and N. Weiss. 1986 Regular, non-sporing gram-positive rods. In P.H.A. Sneath, N. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2.* 1208-1234. Willium and Wilkins, Baltimore.

King, S.W., and R.B. Beelman. 1986. Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. American Journal of Enology and Viticulture. 37. 53–60.

Kelly, W.J., R.V. Asmundson, and D.H. Hpcraft. 1989. Growth of *Leucnostoc oenos* under anaerobic conditios. American Journal Enology and Viticulture. 40. 277-282.

Kenneth C. F. and G. E. Charles. 2007. Wine Microbiology. Lactic Acid Bacteria. Springer. 22-44

Klomklieng, W., and A. Prateepasen. 2011. Using low-power ultrasonic for enhancing *Saccharomyces cerevisiae* M30 productivity for ethanol producing from molasses. International Conference on Food Engineering and Biotechnology. 9. 234-239.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

König, H., G. Unden, and J. Fröhlich. 2009. Biology of microoranisms on grapes, in must and in wine. Springer, Heidelberg.

Krusong, W., P. Petch-nom, and P. Pinviset2. 2010. Semi-continuous production process of corn vinegar in stirred tank reactor using fixation of *Acetobacter aceti* WK on surface of loofa sponge. Kasetsart Journal, National Science. 44. 454–461.

Krusong, W., and A. Vichitra, and S. Pornpakdeewattana. 2007. Luffa sponge as supporting material of *Acetobacter aceti* WK for corn vinegar production in semi-continuous process. KMITL Science Journal. 7. No. 2

Krusong, W., and A. Vichitraka. 2010. An investigation of simultaneous pineapple vinegar fermentation interaction between acetic acid bacteria and yeast. Asian Journal of Food and Agro-Industry. 3(01). 192-203.

Lafon-Lafourcade, S., E. Carre, and P. Ribereau-Gayon. 1983. Occurrence of lactic acid bacteria during the different Stages of vinification and conservation of wines. Applied environmental microbiology. 46. 874-880.

Lasekan, O., A. Buettner, and M. Christlbauer. 2007. Investigation of important odorants of palm wine (*Elaeis guineensis*). Food Chemistry. 105. 15–23.

Lonvaud-Funel, A., A. Joyeux, and C. Dessens. 1988. Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. Journal of the Science of Food and Agriculture. 44.183– 191.

Lonvaud-Funel A., A. Joyeux, and O. Ledoux. 1991. Specific enumeration of lactic-acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with nonisotopic DNA probes. Journal of Applied Bacteriology. 71. 501–508.

Llaube´res, R.M., D. Dubourdieu, and J.C. Villetaz. 1987. Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in wine. Journal of the Science of Food and Agriculture. 41. 277– 286.

Martı´nez-Rodriguez, A.J., A.V. Carrascosa, and M.C. Polo. 2001. Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system. International Journal of Food Microbiology. 68. 155– 160.

Martı´nez-Rodriguez, A.J., A.V. Carrascosa, P.J. Martı´n-Alvarez, V. Moreno-Arribas, and M.C. Polo. 2002. Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides and proteins during sparkling wine production by the traditional method. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 29. 314– 322.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mendoza, L.M., M.C. Manca de Nadra, and M.E. Farías. 2010. Antagonistic interaction between yeasts and lactic acid bacteria of oenological relevance. Food Research International. 43. 1990–1998.

Miyoshi, A., R. Rochat, J-J. Gratadoux, Y. Le Loir, S. Costa Oliveira, P. Langella, and V. Azevedo. 2003. Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. Genetic Molecular Research. 2. 348-359.

Moreno-Arribas, M.V., and C. Polo. 2008. Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. Food Microbiol. 25. 875-881.

Navarro, L., M. Zarazaga, J. Saenz, F. Ruiz-Larrea, and C. Torres. 2000. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. Journal of Applied Microbiology. 88. 44–51.

Nygaard, M., and C. Prahl. 1996. Compatibility between strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* as an important factor for successful malolactic fermentation. Proceedings of the Fourth International Symposium on Cool-Climate Viticulture and Oenology, Rochester, New York .

Osborne, J.P., and C.G. Edwards. 2007. Inhibition of malolactic fermentation by a peptide produced by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. International Journal of Food Microbiology. 118. 27–34

Patynowski, R.J., V. Jiranek, and A.J. Markides. 2002. Yeast viability during fermentation and sur lie ageing of a defined medium and subsequent growth of *Oenococcus oeni*. Australian Journal of Grape and Wine Research. 8. 62–69.

Radler F, and C. Yannissis. 1972. Decomposition of tartrate by lactobacilli. Arch Microbiology. 82. 219–239

Renouf, V., P. Strehaiano, and A. Lonvaud-Funel. 2008. Effectiveness of imethlydicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. Food Control. 19. 208–216.

Rib´ereau-Gayon, P., Y. Glories, A. Maujean, and D. Dubourdieu. 2006. Handbook of enology Volume 2: The chemistry of wine and stabilization and treatments. John Wiley & Sons, New Jersey.

Romano, P., C. Fiore, M. Paraggio, M. Caruso, and A. Capece. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavor. International Journal of Food Microbiology. 86. 169–180.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rosi, I., A. Gheri, P. Domizio, and G. Fia. 1999. Production de macromole´cules parie´tales de *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la fermentation et leur influence sur la fermentation malolactique. Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques. 94. 18– 20.

Ruiz, P., P.M. Izquierdo, S. Seseña, and M.Ll. Palop. 2010. Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintages. Food Control. 21. 70–75.

Sablayrolles, J.M., 2009. Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect, International Food Research, 42, 418–424.

Salgueiro, S.P., I. Sá-Correia, and J.M. Novais. 1988. Ethanol-induced Leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. Applied Environmental Microbiology. 54. 903.

Saradhuldhat, P. and Paull, R.E. 2007. Pineapple organic acid metabolism and accumulation during fruit development. Scientia Horticulturae. 112. 297–303.

Sieiro,C., J. Cansado, D. Agrelo, J.B. Velázquez, and T.G. Villa. 1990. Isolation and enological characterization of malolactic bacteria from the vineyards od North-western Spain. Applied Environmental Microbiology. 56. 2936-2938.

Vasantha Rupasinghe, H.P., S. and Clegg. 2007. Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. Journal of Food Composition and Analysis. 20. 133–137.

Veeranjaneya Reddy, L., Y. Harish Kumar Reddy, L. Prasanna Anjaneya Reddy, and O. Vijaya Sarathi Reddy. 2008. Wine production by novel yeast biocatalyst prepared by immobilization on watermelon (*Citrullus vulgaris*) rind pieces and characterization of volatile compounds. Process Biochemistry. 43. 748–752.

Toit M.d., L. Engelbrecht, E. Lerm, and S.K. Weber. 2011. Lactobacillus: the next generation of malolactic fermentation starter cultures—an overview. Food Bioprocessing Technology. 4. 876–906.

Tutiyaporn, A., and Krusong, W. 2012. Impact of lactic acid bacteria contamination during pineapple wine fermentation for ready to drink alcoholic beverages. Proceedings of the International Conference on Food Science and Nutrition. Pacific Sutera Hotel, Kota Kinabalu, Sabah, Malasia. 2-4 April 2012. 844-852

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

รายงานผลการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วว.

คำขอบริการที่ 25553-017 ที่ ฝวช.

รายงานผลการทดสอบและวิเคราะห์

ให้แก่

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

การทดสอบ / วิเคราะห์	การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA ของตัวอย่าง LAB2
วิธีทดสอบ / วิเคราะห์	การวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA
ภาวะการทดสอบ / วิเคราะห์ : อุณหภูมิ	- °C ความชื้นสัมพัทธ์ - %
วันที่ทดสอบ / วิเคราะห์	13 มีนาคม 2555
ผลการทดสอบ / วิเคราะห์	การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA ของตัวอย่าง LAB2 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* ที่ระดับ 100%

ผู้ทดสอบ / วิเคราะห์

1. นางสาวนันธรา นิวาสะบุตร

ผู้ตรวจสอบ

(ดร. ภูมิ[illegible])

ผู้รับรอง

(นางฉันทิรา ศูนย์กิ[illegible])

ผู้อำนวยการฝ่ายวิเคราะห์ศาสตร์ชีวภาพ

วันที่ 5 เมษายน 2555

ผลการทดสอบ หรือ วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่าง หรือ รายการที่ได้ระบุไว้เท่านั้น การแก้ไขรายงานนี้ถือเป็นความผิดทางกฎหมาย การนำรายงานนี้ไปใช้ทางโฆษณา ดัดแปลงหรือการนำผลบางส่วน ไปลงพิมพ์ต้องสามารถขอได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้บริหาร วว.

แก้ไขครั้งที่ : 0	แบบฟอร์มประกาศใช้วันที่ 16 ตุลาคม 2551	FM-BSD-WI-10-02 (ไทย)

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
[illegible]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางผลการติดตามผลกระทบของแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ต่อการหมักไวน์สับปะรดด้วย *S. cerevisiae* M30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข 1 ผลการติดตามการเจริญของแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ในน้ำสับปะรดที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส)

เวลา(ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง		กรด (%)		แอลกอฮอล์ (%)		น้ำตาลรีดิวซ์ (%)		แบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
0	5.738	0.071	0.072	0.000	0.000	0.000	22.180	0.060	6.222	0.070
12	3.665	0.019	0.390	0.010	0.000	0.000	21.771	0.071	8.638	0.183
24	3.223	0.022	0.636	0.010	0.000	0.000	21.687	0.069	8.495	0.044
36	3.047	0.022	0.918	0.000	0.000	0.000	21.527	0.068	8.536	0.052
48	3.012	0.030	1.134	0.000	0.000	0.000	21.422	0.079	8.541	0.088
60	3.062	0.014	1.134	0.000	0.000	0.000	21.213	0.092	8.507	0.116
72	3.041	0.015	1.134	0.000	0.000	0.000	21.208	0.093	8.431	0.059
84	3.021	0.007	1.134	0.000	0.000	0.000	21.205	0.081	8.347	0.113
96	3.001	0.031	1.134	0.000	0.000	0.000	21.207	0.084	8.368	0.114
108	3.004	0.009	1.134	0.000	0.000	0.000	21.112	0.077	8.352	0.156
120	3.002	0.024	1.134	0.000	0.000	0.000	21.106	0.081	8.392	0.060
132	3.031	0.013	1.134	0.000	0.000	0.000	21.103	0.083	8.288	0.172
144	2.997	0.005	1.134	0.000	0.000	0.000	21.101	0.077	8.249	0.026
156	3.017	0.032	1.134	0.000	0.000	0.000	21.004	0.083	8.243	0.114
168	3.036	0.022	1.134	0.000	0.000	0.000	21.011	0.083	8.281	0.087

ตารางที่ ข 2 ประสิทธิภาพในการเจริญและการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 น้ำสับปะรด ที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส)

เวลา(ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง		กรด (%)		แอลกอฮอล์ (%)		น้ำตาลรีดิวซ์ (%)		ยีสต์ (log cfu/ml)	
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
0	5.806	0.013	0.096	0.010	0.000	0.000	22.994	0.400	6.493	0.123
12	4.086	0.012	0.202	0.010	0.833	0.104	22.070	0.943	7.279	0.239
24	3.466	0.005	0.268	0.052	2.633	0.058	16.079	0.185	7.523	0.176
36	3.216	0.009	0.316	0.000	4.067	0.115	12.130	0.380	7.407	0.318
48	3.268	0.020	0.328	0.021	5.533	0.231	9.198	0.483	7.156	0.046
60	3.282	0.013	0.358	0.010	6.667	0.231	6.730	0.098	6.719	0.116
72	3.303	0.015	0.349	0.005	7.767	0.153	4.907	0.140	6.724	0.157
84	3.316	0.016	0.364	0.010	8.567	0.473	4.294	0.018	6.820	0.200
96	3.340	0.013	0.364	0.010	9.300	0.500	3.416	0.113	6.785	0.152
108	3.364	0.019	0.370	0.000	9.800	0.361	2.729	0.060	6.660	0.086
120	3.384	0.017	0.376	0.010	9.967	0.231	1.823	0.181	6.477	0.346
132	3.284	0.025	0.358	0.010	10.100	0.173	1.492	0.031	6.386	0.325
144	3.358	0.015	0.358	0.010	10.100	0.173	1.125	0.043	6.244	0.144
156	3.324	0.014	0.358	0.010	10.100	0.173	1.066	0.038	6.196	0.703
168	3.330	0.014	0.358	0.010	10.100	0.173	1.040	0.007	6.190	0.017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข 3 ผลของแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ปริมาณ 4 log cfu/ml ที่เติมลงในช่วงเริ่มต้นกระบวนการหมักไวน์สับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส)

เวลา(ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง		กรด (%)		แอลกอฮอล์ (%)		น้ำตาลรีดิวซ์ (%)		ยีสต์ (log cfu/ml)		แบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
0	5.613	0.004	0.240	0.010	0.000	0.000	23.099	0.028	6.528	0.128	4.427	0.074
12	3.299	0.004	0.246	0.010	0.667	0.115	21.366	0.541	6.929	0.010	5.863	0.057
24	3.038	0.006	0.276	0.021	2.333	0.058	17.041	0.171	6.994	0.016	6.498	0.063
36	3.039	0.015	0.300	0.010	3.567	0.115	10.406	0.034	7.080	0.023	6.802	0.056
48	3.083	0.009	0.312	0.010	4.533	0.115	7.076	0.156	6.925	0.029	6.693	0.061
60	3.122	0.011	0.330	0.010	5.500	0.173	5.873	0.010	6.783	0.004	6.421	0.113
72	3.147	0.005	0.342	0.018	6.233	0.115	4.402	0.092	6.737	0.020	5.230	0.026
84	3.192	0.003	0.348	0.021	7.600	0.173	4.115	0.021	6.743	0.005	4.828	0.104
96	3.209	0.006	0.354	0.010	8.467	0.208	4.001	0.007	6.539	0.041	3.574	0.138
108	3.213	0.002	0.354	0.010	9.133	0.153	3.694	0.029	6.467	0.022	3.539	0.038
120	3.251	0.018	0.360	0.000	9.567	0.058	3.104	0.010	6.378	0.049	3.233	0.088
132	3.243	0.004	0.360	0.000	9.900	0.100	2.543	0.051	6.380	0.047	1.715	1.497
144	3.298	0.009	0.360	0.000	10.067	0.058	2.356	0.004	6.126	0.069	0.000	0.000
156	3.256	0.011	0.360	0.000	10.067	0.058	2.225	0.008	5.974	0.050	0.000	0.000
168	3.263	0.009	0.240	0.010	10.067	0.058	2.042	0.006	5.811	0.070	0.000	0.000

ตารางที่ ข 4 ผลของแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ปริมาณ 5 log cfu/ml ที่เติมลงในช่วงเริ่มต้นกระบวนการหมักไวน์สับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส)

เวลา(ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง		กรด (%)		แอลกอฮอล์ (%)		น้ำตาลรีดิวซ์ (%)		ยีสต์ (log cfu/ml)		แบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
0	5.574	0.013	0.090	0.000	0.000	0.000	22.856	0.065	6.422	0.071	5.518	0.013
12	3.311	0.010	0.270	0.018	0.750	0.000	21.473	0.536	6.908	0.016	6.875	0.044
24	2.978	0.005	0.323	0.019	2.250	0.000	16.909	0.225	6.934	0.015	7.097	0.038
36	2.986	0.002	0.372	0.010	3.667	0.058	13.187	3.344	6.894	0.017	7.578	0.064
48	3.028	0.002	0.390	0.010	4.700	0.000	10.285	2.603	6.711	0.047	7.569	0.219
60	3.047	0.012	0.408	0.010	5.600	0.000	7.960	1.599	6.695	0.125	7.575	0.035
72	3.030	0.005	0.426	0.010	6.733	0.058	6.965	1.200	6.592	0.061	7.308	0.098
84	3.054	0.008	0.438	0.010	7.600	0.000	6.296	1.000	6.556	0.012	6.909	0.066
96	3.115	0.008	0.444	0.010	8.233	0.058	5.382	0.683	6.336	0.095	6.413	0.050
108	3.127	0.002	0.450	0.000	8.600	0.000	5.242	0.585	6.348	0.029	6.202	0.122
120	3.143	0.003	0.456	0.010	8.900	0.000	4.913	0.372	6.264	0.031	5.754	0.073
132	3.144	0.002	0.462	0.010	9.033	0.115	4.531	0.101	6.015	0.038	4.918	0.031
144	3.153	0.003	0.462	0.010	9.033	0.115	4.457	0.112	5.885	0.044	3.437	0.312
156	3.133	0.003	0.462	0.010	9.100	0.173	4.355	0.146	5.750	0.019	2.765	0.277
168	3.135	0.001	0.462	0.010	9.100	0.173	4.064	0.004	5.505	0.151	0.000	0.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข 5 ผลของแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ปริมาณ 6 log cfu/ml ที่เติมลงในช่วงเริ่มต้นกระบวนการหมักไวน์สับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส)

เวลา(ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง		กรด (%)		แอลกอฮอล์ (%)		น้ำตาลรีดิวซ์ (%)		ยีสต์ (log cfu/ml)		แบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
0	5.544	0.007	0.090	0.000	0.000	0.000	22.536	0.185	6.448	0.079	6.635	0.080
12	3.118	0.012	0.276	0.021	0.600	0.087	22.304	0.108	6.815	0.020	7.960	0.019
24	2.921	0.006	0.402	0.010	2.067	0.115	16.065	0.428	6.859	0.019	8.101	0.021
36	2.913	0.014	0.468	0.000	3.133	0.058	12.522	0.059	6.908	0.011	8.437	0.079
48	2.925	0.014	0.486	0.000	4.333	0.058	9.600	0.030	6.888	0.012	7.832	0.205
60	2.950	0.005	0.501	0.005	5.667	0.115	8.370	0.042	6.826	0.017	7.782	0.027
72	2.967	0.015	0.522	0.000	6.233	0.058	7.587	0.028	6.763	0.027	7.592	0.090
84	2.967	0.018	0.540	0.000	6.967	0.115	6.467	0.018	6.748	0.020	6.202	0.055
96	3.003	0.008	0.558	0.000	7.400	0.000	6.291	0.019	6.400	0.071	5.861	0.021
108	2.983	0.007	0.564	0.010	7.433	0.058	5.824	0.007	6.243	0.074	5.745	0.020
120	3.030	0.008	0.570	0.010	7.733	0.058	5.260	0.051	6.141	0.015	5.198	0.103
132	2.996	0.001	0.570	0.010	7.900	0.000	5.220	0.027	6.049	0.050	4.706	0.080
144	3.016	0.004	0.570	0.010	8.033	0.115	5.143	0.005	5.818	0.037	4.539	0.026
156	2.999	0.003	0.570	0.010	8.100	0.173	5.098	0.067	5.656	0.024	3.401	0.139
168	2.993	0.008	0.576	0.000	8.100	0.173	5.065	0.057	5.391	0.098	2.302	0.222

ตารางที่ ข 6 ผลของแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ปริมาณ 7 log cfu/ml ที่เติมลงในช่วงเริ่มต้นกระบวนการหมักไวน์สับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส)

เวลา(ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง		กรด (%)		แอลกอฮอล์ (%)		น้ำตาลรีดิวซ์ (%)		ยีสต์ (log cfu/ml)		แบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
0	5.560	0.016	0.084	0.000	0.000	0.000	22.463	0.145	6.474	0.061	7.462	0.030
12	3.075	0.011	0.270	0.018	0.650	0.132	22.402	0.100	6.920	0.060	8.420	0.025
24	2.873	0.019	0.468	0.018	1.767	0.231	16.067	0.000	6.822	0.070	8.477	0.014
36	2.847	0.004	0.540	0.018	3.200	0.173	10.948	0.203	6.735	0.064	8.552	0.019
48	2.866	0.005	0.540	0.000	4.367	0.144	10.825	0.070	6.562	0.059	8.221	0.040
60	2.880	0.009	0.618	0.010	5.000	0.173	9.194	0.022	6.535	0.029	7.960	0.048
72	2.888	0.008	0.672	0.010	5.567	0.058	8.594	0.018	6.527	0.020	7.731	0.093
84	2.858	0.004	0.690	0.021	6.267	0.058	7.969	0.025	6.468	0.018	7.380	0.146
96	2.931	0.004	0.696	0.010	6.667	0.231	7.605	0.012	6.283	0.034	7.085	0.048
108	2.939	0.006	0.696	0.010	6.933	0.289	7.328	0.029	6.128	0.023	6.913	0.057
120	2.936	0.007	0.696	0.010	7.133	0.289	7.366	0.011	5.981	0.038	6.847	0.056
132	2.947	0.001	0.696	0.010	7.133	0.115	7.132	0.018	5.941	0.024	6.750	0.032
144	2.892	0.003	0.696	0.010	7.333	0.115	7.086	0.010	5.682	0.054	6.677	0.032
156	2.947	0.048	0.696	0.010	7.367	0.058	7.151	0.095	5.677	0.039	6.534	0.040
168	2.868	0.017	0.696	0.010	7.400	0.000	7.133	0.064	5.597	0.080	5.565	0.165

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข 7 ผลของแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ปริมาณ 8 log cfu/ml ที่เติมลงในช่วงเริ่มต้นกระบวนการหมักไวน์สับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส)

เวลา(ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง		กรด (%)		แอลกอฮอล์ (%)		น้ำตาลรีดิวซ์ (%)		ยีสต์ (log cfu/ml)		แบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
0	5.517	0.005	0.090	0.000	0.000	0.000	21.892	0.197	6.633	0.072	8.618	0.052
12	2.980	0.009	0.438	0.010	0.650	0.087	21.112	0.836	6.952	0.018	8.615	0.084
24	2.814	0.003	0.594	0.018	2.400	0.100	15.332	1.296	6.861	0.025	8.725	0.045
36	2.746	0.005	0.708	0.010	3.267	0.115	13.176	0.499	6.708	0.058	8.608	0.046
48	2.749	0.001	0.780	0.010	3.933	0.058	11.101	0.249	6.600	0.089	8.482	0.017
60	2.746	0.004	0.852	0.010	4.467	0.153	10.825	0.143	6.386	0.066	8.324	0.082
72	2.743	0.010	0.888	0.010	4.817	0.076	10.690	0.019	6.200	0.070	8.113	0.013
84	2.747	0.002	0.942	0.010	5.067	0.058	10.513	0.094	6.052	0.055	7.856	0.081
96	2.755	0.009	0.960	0.010	5.233	0.115	10.488	3.192	5.783	0.098	7.790	0.051
108	2.748	0.006	0.984	0.027	5.300	0.173	10.828	0.180	5.636	0.122	7.564	0.071
120	2.750	0.004	1.002	0.010	5.300	0.173	10.489	0.270	5.454	0.146	7.189	0.137
132	2.748	0.002	1.002	0.010	5.300	0.173	10.421	0.135	5.448	0.082	6.963	0.121
144	2.757	0.002	1.002	0.010	5.300	0.173	10.408	0.146	5.240	0.096	6.735	0.060
156	2.728	0.009	1.008	0.000	5.300	0.173	10.401	0.134	5.033	0.162	6.558	0.139
168	2.733	0.020	1.008	0.000	5.300	0.173	10.402	0.151	4.263	0.024	6.580	0.096

ตารางที่ ข 8 ผลของช่วงเวลาการเติมแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ในชั่วโมงที่ 0 ต่อกระบวนการหมักไวน์สับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส)

เวลา(ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง		กรด (%)		แอลกอฮอล์ (%)		น้ำตาลรีดิวซ์ (%)		ยีสต์ (log cfu/ml)		แบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
0	5.843	0.031	0.102	0.000	0.000	0.000	23.164	0.154	6.416	0.057	6.882	0.023
12	4.058	0.040	0.228	0.010	0.733	0.076	21.816	0.465	6.823	0.039	8.203	0.087
24	3.101	0.027	0.482	0.010	2.317	0.144	18.045	0.749	6.593	0.364	8.148	0.093
36	3.113	0.034	0.518	0.010	3.367	0.153	15.729	0.497	6.591	0.068	8.148	0.061
48	3.126	0.036	0.548	0.014	4.200	0.265	12.458	0.477	6.563	0.167	8.188	0.085
60	3.144	0.042	0.578	0.000	4.933	0.208	10.233	0.175	6.602	0.073	8.197	0.040
72	3.148	0.036	0.590	0.021	5.533	0.379	9.420	0.044	6.530	0.045	8.044	0.152
84	3.151	0.041	0.605	0.027	6.000	0.265	8.826	0.036	6.391	0.186	7.812	0.294
96	3.145	0.042	0.611	0.005	6.367	0.404	7.905	0.174	6.348	0.236	7.637	0.179
108	3.165	0.042	0.623	0.016	6.733	0.551	7.378	0.258	6.276	0.285	7.404	0.199
120	3.152	0.047	0.626	0.010	6.733	0.702	7.130	0.159	6.177	0.160	7.003	0.460
132	3.141	0.044	0.644	0.010	6.767	0.351	7.024	0.076	6.130	0.277	4.423	3.832
144	3.104	0.049	0.656	0.027	7.200	0.400	7.024	0.084	6.135	0.196	0.000	0.000
156	3.060	0.048	0.656	0.027	7.267	0.306	7.029	0.091	6.063	0.292	0.000	0.000
168	3.058	0.048	0.656	0.027	7.267	0.306	7.028	0.069	6.033	0.205	0.000	0.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข 9 ผลของช่วงเวลาการเติมแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ในชั่วโมงที่ 24 ต่อกระบวนการหมักไวน์สับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส)

เวลา(ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง		กรด (%)		แอลกอฮอล์ (%)		น้ำตาลรีดิวซ์ (%)		ยีสต์ (log cfu/ml)		แบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
0	5.852	0.018	0.072	0.000	0.000	0.000	22.593	0.174	6.642	0.036	0.000	0.000
12	4.100	0.044	0.216	0.000	0.400	0.000	22.251	0.760	7.199	0.139	0.000	0.000
24	3.351	0.099	0.270	0.000	2.400	0.265	17.171	0.550	7.433	0.114	6.591	0.251
36	3.226	0.007	0.378	0.018	3.800	0.100	13.723	1.204	7.166	0.036	6.804	0.078
48	3.214	0.007	0.384	0.010	5.133	0.058	11.364	0.298	7.098	0.032	6.763	0.261
60	3.232	0.010	0.396	0.000	6.200	0.000	9.938	0.442	6.686	0.127	6.906	0.060
72	3.217	0.009	0.396	0.000	6.867	0.115	7.994	0.175	6.563	0.042	6.639	0.079
84	3.247	0.042	0.402	0.010	8.000	0.000	7.048	0.197	6.570	0.057	6.548	0.031
96	3.349	0.017	0.414	0.000	8.900	0.000	5.188	0.291	6.518	0.013	6.393	0.049
108	3.500	0.012	0.414	0.000	9.200	0.000	3.395	0.255	6.466	0.037	5.403	0.126
120	3.500	0.012	0.414	0.000	9.633	0.058	2.697	0.060	6.389	0.031	5.125	0.114
132	3.462	0.022	0.414	0.000	10.133	0.058	2.484	0.089	6.304	0.048	3.134	2.718
144	3.448	0.026	0.414	0.000	10.133	0.058	2.155	0.087	5.921	0.065	0.000	0.000
156	3.445	0.015	0.414	0.000	10.133	0.058	2.155	0.087	5.893	0.151	0.000	0.000
168	3.448	0.017	0.414	0.000	10.133	0.058	2.155	0.087	5.828	0.075	0.000	0.000

ตารางที่ ข 10 ผลของช่วงเวลาการเติมแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ในชั่วโมงที่ 48 ต่อกระบวนการหมักไวน์สับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส)

เวลา(ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง		กรด (%)		แอลกอฮอล์ (%)		น้ำตาลรีดิวซ์ (%)		ยีสต์ (log cfu/ml)		แบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
0	5.841	0.027	0.072	0.000	0.000	0.000	21.683	0.225	6.642	0.036	0.000	0.000
12	4.126	0.040	0.216	0.000	0.433	0.058	19.648	0.621	7.234	0.080	0.000	0.000
24	3.375	0.022	0.270	0.000	2.200	0.100	17.122	0.811	7.321	0.042	0.000	0.000
36	3.214	0.018	0.360	0.000	3.700	0.100	13.989	0.198	7.158	0.023	0.000	0.000
48	3.163	0.013	0.372	0.010	5.167	0.058	10.659	0.112	6.897	0.632	6.492	0.199
60	3.199	0.008	0.396	0.000	6.000	0.100	8.733	0.175	6.717	0.048	6.842	0.063
72	3.159	0.030	0.396	0.000	7.000	0.000	6.909	0.140	6.625	0.042	6.634	0.056
84	3.176	0.027	0.396	0.000	7.833	0.058	5.294	0.018	6.578	0.054	6.639	0.030
96	3.349	0.006	0.402	0.010	8.600	0.100	3.418	0.113	6.428	0.105	6.681	0.024
108	3.378	0.021	0.414	0.000	9.100	0.100	2.730	0.060	6.402	0.194	5.404	0.199
120	3.433	0.058	0.414	0.000	9.667	0.058	1.830	0.181	6.305	0.075	4.526	0.083
132	3.436	0.034	0.414	0.000	10.133	0.058	1.492	0.031	6.395	0.160	2.577	2.233
144	3.436	0.021	0.414	0.000	10.133	0.058	1.125	0.043	6.275	0.039	0.000	0.000
156	3.431	0.023	0.414	0.000	10.133	0.058	1.066	0.038	5.840	0.571	0.000	0.000
168	3.432	0.023	0.420	0.010	10.133	0.058	1.040	0.007	6.227	0.041	0.000	0.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข 11 ผลของช่วงเวลาการเติมแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ในชั่วโมงที่ 72 ต่อกระบวนการหมักไวน์สับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส)

เวลา(ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง		กรด (%)		แอลกอฮอล์ (%)		น้ำตาลรีดิวซ์ (%)		ยีสต์ (log cfu/ml)		แบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
0	5.852	0.037	0.072	0.000	0.000	0.000	22.705	0.084	6.416	0.057	0.000	0.000
12	4.178	0.035	0.216	0.000	0.400	0.000	20.885	0.255	7.290	0.066	0.000	0.000
24	3.377	0.040	0.270	0.000	2.200	0.100	17.670	0.799	7.295	0.033	0.000	0.000
36	3.221	0.026	0.360	0.000	3.700	0.100	15.039	0.557	7.220	0.116	0.000	0.000
48	3.155	0.015	0.360	0.000	5.200	0.000	11.028	0.214	7.097	0.049	0.000	0.000
60	3.192	0.005	0.384	0.010	6.000	0.173	8.180	0.477	6.782	0.066	0.000	0.000
72	3.195	0.002	0.384	0.010	6.933	0.058	7.408	0.066	6.867	0.053	6.693	0.088
84	3.253	0.014	0.396	0.000	7.567	0.153	6.465	0.296	6.831	0.038	6.684	0.028
96	3.310	0.015	0.402	0.010	8.767	0.153	4.410	0.115	6.787	0.060	6.609	0.027
108	3.378	0.021	0.414	0.000	9.333	0.058	3.778	0.143	6.634	0.114	6.379	0.132
120	3.503	0.022	0.414	0.000	9.667	0.058	2.952	0.000	6.495	0.179	6.003	0.066
132	3.502	0.012	0.414	0.000	10.100	0.000	2.594	0.181	6.246	0.109	3.240	2.806
144	3.504	0.017	0.414	0.000	10.100	0.000	2.171	0.008	6.266	0.108	0.000	0.000
156	3.503	0.006	0.414	0.000	10.100	0.000	2.131	0.077	6.264	0.091	0.000	0.000
168	3.499	0.006	0.414	0.000	10.100	0.000	2.133	0.074	6.184	0.125	0.000	0.000

ตารางที่ ข 12 ผลของช่วงเวลาการเติมแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ในชั่วโมงที่ 96 ต่อกระบวนการหมักไวน์สับปะรดของยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (32 ± 1 องศาเซลเซียส)

เวลา(ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง		กรด (%)		แอลกอฮอล์ (%)		น้ำตาลรีดิวซ์ (%)		ยีสต์ (log cfu/ml)		แบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
0	5.809	0.009	0.096	0.000	0.000	0.000	21.305	0.270	6.416	0.057	0.000	0.000
12	4.069	0.017	0.202	0.010	0.817	0.126	20.025	0.527	7.066	0.042	0.000	0.000
24	3.447	0.016	0.268	0.052	2.567	0.058	17.503	0.245	7.259	0.241	0.000	0.000
36	3.200	0.029	0.321	0.009	4.133	0.153	14.000	0.413	7.468	0.076	0.000	0.000
48	3.263	0.029	0.339	0.012	5.500	0.346	11.030	0.294	6.897	0.632	0.000	0.000
60	3.277	0.018	0.358	0.010	6.567	0.115	8.832	0.179	6.602	0.073	0.000	0.000
72	3.305	0.011	0.357	0.005	7.667	0.153	6.052	0.384	6.530	0.045	0.000	0.000
84	3.325	0.011	0.360	0.000	8.700	0.265	4.406	0.211	6.391	0.186	0.000	0.000
96	3.331	0.022	0.360	0.000	9.200	0.557	3.493	0.053	6.348	0.236	6.534	0.208
108	3.361	0.021	0.360	0.000	9.667	0.306	2.788	0.129	6.276	0.285	5.366	0.132
120	3.404	0.016	0.360	0.000	9.900	0.173	2.665	0.192	6.177	0.160	4.250	0.311
132	3.301	0.023	0.360	0.000	10.100	0.000	2.521	0.074	6.130	0.277	2.604	2.265
144	3.363	0.019	0.360	0.000	10.067	0.058	2.180	0.047	6.135	0.196	0.000	0.000
156	3.340	0.007	0.360	0.000	10.067	0.058	2.129	0.040	6.063	0.292	0.000	0.000
168	3.336	0.022	0.360	0.000	10.100	0.000	2.107	0.070	6.033	0.205	0.000	0.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. YM (Yeast extract Malt extract) broth

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 5.5-6.0 ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. YM (Yeast extract Malt extract) ager

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 5.5-6.0 ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. MRS (Yeast extract Malt extract) agar

MRS agar	67.15	กรัม
Calcium carbonate	5	กรัม
Cycloheximide	0.1	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 6.5 ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

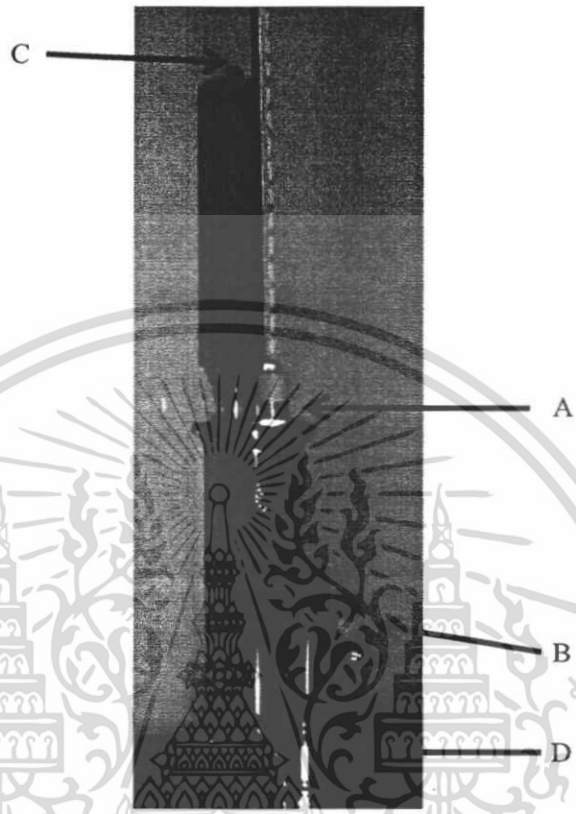
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

วิธีวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 หาปริมาณแอลกอฮอล์ด้วย อีบูลิโอมิเตอร์



ภาพที่ ค 1 อีบูลิโอมิเตอร์

1.1. การล้าง boiler ก่อนใช้งาน

- ล้าง cooling tank โดยการเทน้ำทางช่อง C แล้วใส่น้ำใน boiler ทางช่อง A
- ไขก๊อก (B) แล้วเอียงตัวเครื่อง 45 องศา เพื่อเทน้ำออกให้หมด
- ตรวจสอบของเหลวที่อาจตกค้างโดยการเปิดก๊อกไว้แล้วเป่าลงเข้าทางช่อง C โดยใช้นิ้วโป้งอุดช่อง A เอาไว้

1.2 วัดจุดเดือดน้ำ (calibration)

- ตวงน้ำด้วย graduated glass ถึงตำแหน่ง EAU แล้วเทลงใน boiler ผ่านทางช่อง A
- การวัดนี้จำเป็นต้องวัดในช่วงที่น้ำกลายเป็นไอ จึงไม่จำเป็นต้องใส่น้ำลงใน cooling tank
- เสียบเทอโมมิเตอร์ลงในช่อง A สอดตะเกียงแอลกอฮอล์ใต้ฐาน boiler (ตำแหน่ง D) แล้วจุดตะเกียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

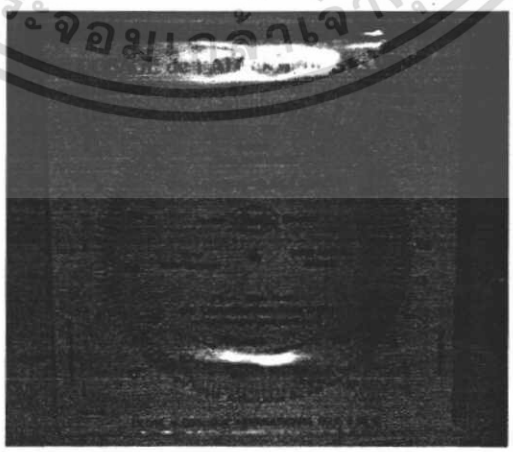
- รอจนสังเกตเห็นไอน้ำลอยขึ้นจากช่องด้านบนของ cooling tank และปรอทค่อนข้างหยุดนิ่ง อ่านอุณหภูมิน้ำเดือด
- ปรับอุณหภูมิบนแผ่นเปรียบเทียบจุดเดือด-ปริมาณแอลกอฮอล์ (calculating disk) ให้อุณหภูมิของน้ำเดือดที่อ่านได้ตรงกับขีด 0 ของสเกลปริมาณแอลกอฮอล์

1.3 วัดตัวอย่างไวน์

- ล้าง boiler ตามข้อ 1 ด้วยไวน์ตัวอย่างที่จะวัด หลังจากเทไวน์ออกจนหมด ปิดก๊อกให้สนิท
- ตวงไวน์ที่จะวัดด้วย graduated glass ให้ได้ปริมาณถึงขีด VIN ถ่ายใส่ boiler ผ่านทางช่อง C เสียบเทอโมมิเตอร์ลงช่อง A
- เติมน้ำเย็นจนเต็ม cooling tank แล้วให้ความร้อนด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์
- หลังจากให้ความร้อนประมาณ 5 นาที ปรอทจะสูงขึ้นจนกระทั่งหยุด รอประมาณ 30 วินาที อ่านอุณหภูมิ
- ในขณะนี้ cooling tank จะค่อยๆอุ่นขึ้นเรื่อยๆ ระวังอย่าให้ร้อน
- ดับตะเกียงแอลกอฮอล์ แล้วล้างทำความสะอาดเครื่องมือ

1.4 การอ่านค่า

- ถือแผ่นสี่เหลี่ยมด้วยมือซ้าย หมุนปรับแผ่นวงกลมด้านบนที่มีสเกลของอุณหภูมิ โดยหมุนอุณหภูมิน้ำเดือดให้ตรงกับค่า 0 ของปริมาณแอลกอฮอล์บนแผ่นสี่เหลี่ยม
- อ่านอุณหภูมิที่วัดจากการทดสอบไวน์ แล้วอ่านปริมาณแอลกอฮอล์ที่ตรงกับอุณหภูมิดังกล่าว จะได้ปริมาณแอลกอฮอล์ในไวน์หน่วยเป็น % โดยปริมาตร



ภาพที่ ค 2 บนแผ่นเปรียบเทียบจุดเดือด-ปริมาณแอลกอฮอล์ (calculating disk)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 การวัดปริมาณกรด

2.1 การเตรียมสารเคมี

2.1.1 สารละลาย NaOH มาตรฐาน

เตรียมสารละลาย NaOH 0.1 N โดยชั่ง NaOH 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป standardize ด้วยสารละลายมาตรฐาน potassium phthalate ($KHC_8H_4O_4$)

วิธี standardize สารละลาย NaOH ทำโดย

- ละลาย $KHC_8H_4O_4$ ที่ผ่านการอบแห้งที่ 120 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และทำให้เย็นใส desiccator ปริมาณ 0.6000-0.7000 กรัม ในน้ำกลั่น 50—75 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่
- หยดสารละลาย phenolphyhalein 1% ในสารละลาย $KHC_8H_4O_4$ จำนวน 2 หยด
- นำไปไตเตรทกับสารละลาย NaOH ที่บรรจุในบิวเรต จนกระทั่งสารละลายเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพูอ่อนที่คงตัว โดยทำการไตเตรท 3 ครั้ง บันทึกปริมาณของสารละลาย NaOH ที่ใช้

$$\text{Normality ของ NaOH} = \frac{\text{จำนวนกรัม } KHC_8H_4O_4 \times 1000}{\text{มิลลิลิตร NaOH} \times 204.229}$$

2.1.2 สารละลาย phenolphthalein 1%

ละลาย phenolphthalein 1 กรัม ใน ethanol 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.2 วิธีการวิเคราะห์

- ตวงน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย phenolphthalein 2-3 หยด
- ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน NaOH จนได้สีชมพูจางๆ บันทึกปริมาตรของสารละลาย NaOH ที่ใช้ซึ่งเป็นค่า blank
- ปิเปตตัวอย่างสารละลายอาหาร 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร หยดสารละลาย phenolthalein 2-3 หยด
- ไตเตรทด้วยสารละลาย NaOH มาตรฐาน จนได้สีชมพูจางๆ บันทึกปริมาตรของสารละลาย NaOH ที่ใช้ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง
- คำนวณปริมาณกรดในตัวอย่างอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{ปริมาณกรด (\%)} = \frac{(V)(N)(\text{eq. Wt.})(100)}{1000(v)}$$

V = ปริมาณของสารละลายมาตรฐาน NaOH

N = Normality ของสารละลายมาตรฐาน NaOH

v = ปริมาตรของสารละลายอาหารตัวอย่าง (5 มิลลิลิตร)

eq. Wt. = น้ำหนักสมมูลย์ของกรด เป็นกรัม

(กรดทาทาริก = 75, กรดมาลิก = 67, กรดซิตริก = 64,

กรดแลคติก = 90, กรดซัลทูริก = 49, กรดอะซิติก = 60)

หมายเหตุ : น้ำกลั่นที่ใช้ในการทดลองนี้ ให้ต้มไล่ CO_2 ออกไปและทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำมาใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Lane & Eynon (AOAC, 1984)

3.1 การเตรียมสารเคมี

3.1.1 Fehling solution

สารละลาย A: ละลาย $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 34.64 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร

สารละลาย B: ละลาย $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ 173 กรัม และ NaOH 50 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน ที่อุณหภูมิห้อง กรองก่อนนำไปใช้

3.1.2 Methylene blue indicator (1%)

ละลาย methylene blue 1 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.1.3 สารละลายกลูโคสบริสุทธิ์

กลูโคสที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator ปริมาณ 2.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร

3.2 วิธีวิเคราะห์

3.2.1 การหาค่ามาตรฐานของ Fehling solution

ไตเตรทสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ตามวิธีต่อไปนี้

3.2.1.1 วิธีไตเตรทแบบอินครีเมนตัล (Incremental method of titration)

ปิเปต Fehling solution 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ นำไปต้มให้เดือดบน hot plate ไขสารละลายกลูโคสมาตรฐานจากบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ประมาณ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต้มให้เดือด 10-15 นาที ถ้าหาก Fehling solution ยังคงมีสีน้ำเงินอยู่ ให้ไขสารละลายกลูโคสมาตรฐานลงไปอีกครั้งละ 3-5 หยด แล้วต้มให้เดือด 2-3 วินาที ทำเช่นนี้จนกระทั่งสีน้ำเงินของ Fehling solution จางลง เติม methylene blue 3-4 หยด ไตเตรทต่อไปจนสีของ methylene blue หายไปหมดและเกิดตะกอนสีน้ำตาลแดง จดปริมาตรของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ซึ่งเป็นจุดยุติที่ทราบคร่าวๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.2 วิธีไตเตรทแบบมาตรฐาน

ไขสารละลายกลูโคสมาตรฐานจากบิวเรตลงในขวดรูปชมพู่ ซึ่งมี Fehling solution 20 มิลลิลิตร ต้มเดือดอยู่ โดยไขสารละลายกลูโคสมาตรฐานให้น้อยกว่าค่าที่ทราบตามวิธีไตเตรทในข้อ ค.3.2.1.1 ประมาณ 1 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดอีก 30 วินาที เติม methylene blue ลงไป 3-4 หยด แล้วไตเตรทต่อไปโดยไขสารละลายกลูโคสมาตรฐานครั้งละ 2-3 หยด จนกระทั่งสีของ methylene blue หายไปหมด และเกิดตะกอนสีน้ำตาลแดง การไตเตรทนี้จะต้องเสร็จภายใน 1 นาที นับตั้งแต่เติม methylene blue จดปริมาตรของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (A)

3.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

นำไวน์ตัวอย่างไปไตเตรทตามวิธีที่บรรยายไว้ในข้อ 3.2.1.1 และ 3.2.1.2 จดปริมาตรของไวน์ตัวอย่างที่ใช้ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์} = \frac{250 \times A\%}{V}$$

A = ปริมาตรของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ใช้ในการหาค่ามาตรฐานของ Fehling solution (มิลลิลิตร)

V = ปริมาตรของตัวอย่างไวน์ที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายอธิพงษ์ ทุติยาภรณ์
วัน เดือน ปีเกิด	26 สิงหาคม พ.ศ. 2529 ที่ราชบุรี
ที่อยู่	105 หมู่ 5 ต.ท่าเคย อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี 70180
ประวัติการศึกษา	2552 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้