ศึกษาผลของสายพันธุ์ยีส *Saccharomyces* และ *Non-Saccharomyces* ต่อการผลิตไวน์มังคุด

Influence of Yeast *var Saccharomyces* and *non-Saccharomyces* to Mangosteen oxidative wine Fermentation

โกเมศ สัตยาวุธ

Komate SATAYAWUT

สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

กลุ่มวิจัยและพัฒนาการแปรรูปผลิตผลเกษตร

Abstracts

Developement of ‘Natural Oxidative wine’ shows the suitable method for tropical regional countries, in order to ferment the tropical fruit, it refers to the qualitative production by these methods comparing to the continental fruit. Mangosteen stands out the compatible material to ferment in high value alcohol product by their reputation and high essential substance compounds. Yeast strains, by the way, exposed the important carrier for the alcohol fermentation, we procure the comparative studies between yeast strain Saccharomyces and Non-saccharomyces at the Post-harvesting and Processsing research and development office between October 2010 – September 2012 in order to classify the performance of those six strains with high performance of alcohol production previously selected. Dekera anomala, issued from Non-Saccharomyces group produced harmoniuosly the high effective mangosteen wine as well as their good collaboration with the indigenious yeast Cryptococcus humicola identified by ID85 and AP-20. The experiment carrys on to the specification of these strain by the genetic mutation methods issued as “HHD1” for new strains with the high preformance of alcohol production as well as the qualitative mangosteen wine production. These strains act pridominously as the suitable strain for tropical fruit confirmed in Mangosteen as well as Banana.

Key words: Mangosteen, Mangosteen Wine, Yeast strain Saccharomyces and Non-Saccharomyces

บทคัดย่อ

การพัฒนาเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จากมังคุดในรูปแบบไวน์ธรรมชาติ (Natural Oxidative Wine) ถือเป็นกระบวนการที่เหมาะสมและมีคุณภาพดีมากสำหรับประเทศในเขตร้อนที่มีวัตถุดิบแตกต่างกับการผลิตไวน์องุ่นของประเทศเขตภาคพื้นทวีป มังคุดถือเป็นผลไม้ที่มีส่วนประกอบทางเคมีที่สามารถผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีศักยภาพเพื่อการส่งเสริมและได้รับความนิยมสูงมากโดยกระบวนการหมักแอลกอฮอล์นั้น ยีสต์ถือเป็นปัจจัยสำคัญโดยการทดลองเปรียบเทียบ สายพันธ์ ยีสต์ Saccharomyces และ Non-saccharomyces จำนวน 6 สายพันธ์ที่มีประสิทธิภาพสูงและใช้หมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ในปัจจุบัน ทำการดำเนินการที่สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ระหว่าง ตุลาคม 2553 - กันยายน 25555 โดยสามารถคัดเลือกยีสต์ที่เหมาะสมในการหมัก แอลกอฮอล์จากมังคุด ได้แก่ ยีสต์สายพันธ์ Dekera anomala ในกลุ่มยีสต์สายพันธ์ Non-Saccharomyces ที่ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพอย่างดีกับยีสต์ธรรมชาติ (Cryptococcus humicola) วิเคราะห์โดยชุดทดสอบ ID85 และ AP-20 ได้ดี นอกจากนี้โดยเทคนิคการผันแปร ทางพันธุกรรมยังสามารถพัฒนายีสต์สายพันธ์ใหม่ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์สูงในชื่อใหม่ว่า HHD1 ที่ให้ ผลในการผลิตแอลกอฮอล์ที่มีคุณภาพทั้งสี กลิ่น รสที่มีประสิทธิภาพและส่งเสริมเพื่อพัฒนาได้ในการหมัก แอลกอฮอล์จากผลไม้ในเขตร้อนได้ไม่ว่าจะเป็นมังคุด หรือกล้วย

คำสำคัญ (Key words): มังคุด, ไวน์มังคุด, ยีสต์สายพันธ์ Saccharomyces และ Non-Saccharomyces

คำนำ

มังคุดได้ชื่อว่าเป็นราชินีแห่งผลไม้เนื่องจากสารประกอบแซนโทนที่มีความสำคัญในการป้องกันและยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งการผลิตเครื่องดื่มจากผลไม้ชนิดนี้จึงมีมาอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จากมังคุดซึ่งกรมวิชาการเกษตรได้พัฒนา “แซนเต้” ขึ้นมาในปี 2552 และเพื่อนำคุณลักษณะของผลไม้ “มังคุด” ออกมาในการกำหนดคุณภาพที่ถูกต้อง การศึกษาผลของชนิดยีสต์ ที่ใช้ในการหมักจึงเป็นเรื่องสำคัญและจำเป็น ทั้งนี้ในการหมักเอทานอลแต่ละครั้งมักจะมีผลผลิตข้างเคียง ที่สามารถนำมาใช้กำหนดคุณภาพของไวน์และคุณค่าทางการ ค้าได้ (Fleet, 1990 ; Lema *at al.,* 1996 ; Lambrechts and Pretorius, 2000 ; Fleet and Heard, 1993) การเลือกใช้เชื้อที่เหมาะสมในการ

หมักหรือเชื้อที่ได้รับการเตรียมมาเพื่อการผลิตอย่างถูกต้องนั้นจะทำให้การพัฒนาทางอุตสาหกรรมของการผลิตอาหารจากการหมักมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ในส่วน ของแซนเต้ผลของชนิดของยีสต์ที่จะส่งผลถึงลักษณะทางกลิ่น สี รส มีผลการทดลองหลายอย่าง ที่สนับสนุนข้อมูลดังกล่าว อย่างเช่นในองุ่นที่งานวิจัย ได้แสดงไว้ชัดเจนว่ามีความสัมพันธ์ระหว่าง ผลของชนิดของยีสต์ต่อคุณภาพและปริมาณสารประกอบที่แตกต่างในไวน์ที่ได้ในการหมักแอลกอฮอล์ (Delfini and Bardi, 1993) ซึ่งสามารถยืนยันถึงความสัมพันธ์ของชนิด ของสารตั้งต้นในการหมักต่อ ปริมาณผลผลิตที่ได้ ที่เกิดจากผลของชนิดของยีสต์ได้เช่นกัน (Romano *et al.,* 2002) การทดลองนี้จึงมุ่งค้นหาชนิดของยีสที่ให้ผลดีที่สุดต่อการหมักแซนเต้มังคุดเพื่อการพัฒนากรรมวิธีการผลิตและเพิ่มมูลค่า ผลผลิตต่อไป

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

มังคุด ที่นำมาใช้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มผลิตในประเทศไทยแบ่งกลุ่มตามพันธ์ที่ศึกษาได้แก่ กลุ่มภาคตะวันออก (จังหวัดจันทบุรี จังหวัดระยอง) จากภาคใต้ (จังหวัดชุมพร จังหวัดสุราษฎร์ธานี และจังหวัดนครศรีธรรมราช)

ยีสต์ ในประเทศจำนวน 6 สายพันธุ์ซึ่งเป็นพันธุ์ยีสต์ที่พบทั่วไปในการใช้หมักแอลกอฮอล์ คัดเลือกจากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร รับรองโดยศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotech) แบ่งออกเป็นสองสายพันธุ์หลัก และเน้นเป็นเชื้อสด (Lyophilize) สายพันธุ์ Saccharomyces ได้แก่ *S.cerevisiae/ S.uvarum/ S.bayanus* และสายพันธุ์ Non-Saccharomyces ได้แก่ *C.stellata /D.anomala/P.fermentens* ทั้งนี้ทั้ง 6 สายพันธุ์จำเป็นต้องมีการทำ D-Glucose test เพื่อตรวจสอบการหมักก่อนจะนำมาทดลองและการทดสอบเชื้อบริสุทธิ์โดยการทำการประเมินผลทาง Morphology และผลทางการปรับตัวในระดับการ Mutation โดย UV

การเก็บตัวอย่างมังคุด มังคุดโดยมีดัชนีการสุกสูงสุดจากสถาบันวิจัยพืชสวนจันทบุรีและแปลงเกษตรกรจังหวัดระยอง, สุราษฎร์ธานีและนครศรีธรรมราช

การเก็บสายพันธุ์ยีสต์ที่นำมาศึกษา ข้อผลมังคุดปริมาณ 1 กรัมนำไปเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่ 10^{-6} จากนั้นนำตัวอย่างปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรไปขยายในจานเพาะเชื้อYM (Yeast Malt Agar plate) เลี้ยงบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่ 30°C

การคัดเลือกยีสต์จากมังคุด ยีสต์ที่ได้มาจากการเก็บตัวอย่างนำมาจำแนกสายพันธุ์จากลักษณะทางกายภาพโดยเฉพาะสายพันธุ์ Saccharomyces spp. ในจานเพาะเชื้อ YM เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์และบ่มเป็นเวลา48 ชั่วโมงที่ 30°C จากนั้นนำเชื้อที่เก็บมาได้เก็บในหลอดเก็บเชื้อที่ -4°C จากนั้นนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางสรีรวิทยา และชีวเคมีตามหลักของ Beger's Technique ได้แก่ การทดสอบการหมักน้ำตาล การใช้สารประกอบคาร์บอนและไนโตรเจน การทดสอบโดยเอนไซม์ยูรีเอส และกำหนดชื่อเป็นสายพันธุ์ “flor” จากธรรมชาติ

สายพันธุ์ที่นำมาศึกษา

สายพันธุ์แอลกอฮอล์ดีกรีสูง HHD1 พัฒนาโดยเวกเตอร์ MAT a/α ura3-52/URA3 leu2-3,112/ LEU2 MAL2-8 C /MAL2-8 C SUC2/SUC2, ได้มาจากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ CEN.PK113-5D กับ CEN.PK113-16B; Entian and Kotter, 1998, ในรูปแบบยีสต์ผงปริมาณ 500 กรัม ยีสต์สายพันธุ์เหล้าถูกกระตุ้นให้แตกสปอร์และนำ meiotic products

อาหารเลี้ยงเชื้อ ผู้ทดลองใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด YPD (1% yeast extract, 2%peptone, and 2% glucose), อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ชนิดแข็ง (YPD ผสมวุ้นเพิ่ม 2%), อาหารเลี้ยงเชื้อ SD ชนิดแข็ง (0.17% yeast nitrogen base [Difco Laboratories] ยกเว้นกรดอะมิโนและแอมโมเนียมซัลเฟต, 0.5% ammonium sulfate, 2% glucose, และ 2% agar), และอาหารเลี้ยงเชื้อกระตุ้นการแตกสปอร์ SPO (0.1% yeast extract [Difco], 1% potassium acetate, 0.05% glucose, และ 2% agar) และเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อชนิด YPD มีการเพิ่มเอทานอลลงไปจะเปลี่ยนชื่อใหม่เป็น YPDE (ระบุปริมาณเอทานอล). สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์จำเป็นต้องใช้ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของ กรดอะมิโน ในอาหาร SD

สภาวะการเลี้ยงเชื้อ

(i)การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อในชุดทดลองจากกระบวนการเลี้ยงเชื้อต่อเนื่องโดยอัตราการเลี้ยงเชื้อนี้เปลี่ยนตามปริมาณ pH ที่ตั้งไว้ในแต่ละชุดการทดลอง ยีสต์จะถูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในอ่างปรับอุณหภูมิเป็นเวลา 2 - 3 ชั่วโมงในปริมาณ 10 มิลลิลิตร ต่อหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด YPD ปริมาณ 3 มิลลิลิตรโดยถือเป็น stationary phase จากนั้นนำตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ตั้งไว้สองประเภทคือ YPD หรือ YPDE ปริมาณ 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในอ่างปรับอุณหภูมิอีกครั้งที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ตามเวลาที่กำหนดกับเครื่องวัดความหักเหแสงที่การดูดกลืนที่ 660 นาโนเมตร (A660)โดย เครื่องวัดความดูดกลืนแสง (Spectrophotometer UV-visible Recordy ;Graphtcord, Shimasu) เพื่อหาปริมาณกลูโคสที่เหลืออยู่และค่า pH จะถูกบันทึกจนกระทั่งกลูโคส หมดไปจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย pHs ที่ได้จะนำมาใช้กำหนดช่วงของ pH ในการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ ต่อเนื่อง เราจะสังเกตได้ว่ามีการเพิ่มขึ้นแบบเอโพเนเชียลของการทดลอง ของปริมาณกลูโคสในค่า A660 ระหว่าง 0.1 และ 0.5 โดยจะระบุเป็นค่าการเจริญเติบโตโดยมีการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณเซลล์ นำหนักแห้งและปริมาณค่าการดูกลืนแสงที่ทดสอบ

(ii) การศึกษาชุดการผลิตเอทานอล โดยจากตัวอย่าง (1.5 มิลลิลิตร) ของstationary-phase จากตัวอย่างยีสต์สายพันธุ์ไวน์ ACA4 และIF1256 ได้ถูกเลี้ยงรวมกันในขวดรูปชมพู่ปริมาณ100 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ปริมาณ 28.5 มิลลิลิตรและเติมกลูโคสปริมาณ 30 ถึง 45% โดยแต่ละขวดที่เลี้ยงเชื้อปิดด้วยหลอดดักอากาศจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอ่างเขย่าและมีการนำตัวอย่างไปวัดค่า A660 ในเวลาที่กำหนด

การเลี้ยงเชื้อต่อเนื่อง ควบคุมโดยค่า โดยใช้เครื่อง Biostat A plus fermentor (Sartorius product Co., Inc, ประเทศเยอรมันนี) กับถังเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 ลิตร ถังเลี้ยงเชื้อติดตั้งเครื่องวัดปริมาณ pH และ

ควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์โดยโปรแกรม pH controller (ระบบSatorius model micro DCU system with touch panel) ปั้มอาหารของถังเลี้ยงเชื้อมีอัตราการเจือจาง, D, อยู่ที่ 0.5 ชั่วโมง-1 ซึ่งส่วนใหญ่จะมีค่ามากกว่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อที่ใช้ทดลอง (ตัวอย่างเช่นอัตรา0.47 ชั่วโมง-1 สำหรับสายพันธุ์ ACA4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่ 30องศาเซลเซียส) ปั้มอาหารจะควบคุมโดยเครื่องควบคุม pH ซึ่งหากเชื้อยีสต์มีการเจริญเติบโตทำให้ pH มีค่าต่ำกว่าค่า pHc ระบบจะเปิดปั้มอาหารและถังเลี้ยงเชื้อจะถูกเจือจางโดยอาหารที่ใส่เพิ่มเข้าไป (D > μ) จากนั้น pH จะเพิ่มขึ้นจนเหนือกว่า pHc แล้วระบบจะปิดปั้มเพื่มให้คืนสู่ภาวะปกติ (D = 0) โดยระบบดังกล่าวถือเป็นผลจากการเลี้ยงเชื้อกึ่งต่อเนื่อง (ตามรูปภาพที่ 1) ตามอัตราการเจือจางในแต่ละ

ชุดการทดลอง อย่างไรก็ตามอัตราดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกับช่วงเวลาของอัตราการเจือจาง มากทางสถิติจึงถือเป็นระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องนั่นเองโดยผู้ทดลองจะนำเชื้อในภาวะ stationary phase ปริมาณ 15 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30°C และอัตราคนอยู่ที่ 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 0.5 หน่วยของเครื่องหมัก จากนั้นมีการเก็บตัวอย่างต่อเนื่องโดยตัวอย่าง ที่เก็บจะเจือจางด้วยน้ำกลั่นก่อนจะถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร

วิธีการทดสอบ ใช้กระบวนการทดสอบตามวิธีของ AOAC เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ ของแข็งละลายน้ำได้ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกรด ปริมาณกรดระเหยได้ pH และปริมาณแอลกอฮอล์

การประเมินค่าความพอใจในผลิตภัณฑ์ การทดสอบทางประสาทสัมผัสใช้กรรมการจำนวน 8 คน หลังจากฝึกหักมาเป็นเวลา 1 เดือน โดยทดสอบวัดสี ความใส รสชาติและความพอใจโดยรวม ในระบบ 5 คะแนน (5 สำหรับความพึงพอใจมากและ 1 สำหรับความไม่พอใจ) จากนั้นมีการทดสอบกลิ่น โดยวิธี e-nose detection techniquesพัฒนาร่วมกันระหว่างกรมวิชาการเกษตรและภาควิชานาโนเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (ภาพที่ 1)

สารเคมี Potassium Monosulfate (HPLC grade, 99.8%, Prolabo); Ammonium Sulfate (HPLC grade, 99.9%, Carlo Erba);) Methanol (HPLC grade, 99.9%, Carlo Erba);

วัสดุ ทดลองการหมักโดย Fermenter (ENVI-18, 0.5g, 6ml) และวิเคราะห์สายพันธ์ยีสต์ โดยชุดทดสอบน้ำตาล ID-85 และ AP-20 จากนั้นส่งรับรองผล ที่ศูนย์พันธุวิศกรรมแห่งประเทศไทย (Biotech)

เครื่องมือ <u>High Performance Liquid Chromatography – Fluorescence</u> ที่มีปั๊มแปรผันแรงดันต่ำ ยี่ห้อ Varian 9010, หัวฉีดชนิด Rheodyne 7125 ที่แบ่งปริมาณฉีดที่ 20 ไมโครลิตร, การ์ดคอลัมน์ชนิด C18 Silica, คอลัมน์ชนิด C18 Silica ยี่ห้อ Supelcosil LC-PAH 20cm x 4.6 mm(5μm), เตาอบชนิด Water Column Heater Module โดยใช้ตัวแปรผันชนิด Waters Temperature Control Module เพื่อจัดการกับอุณหภูมิของคอลัมน์, ตัวตรวจจับสัญญาณชนิด Fluorescence ยี่ห้อ Thermo Quest FL 3000, โปรแกรมแปรผลชื่อว่า TC4 Navigator, ความเร็วของ Mobile Phase ที่ 1.5 $mL.min^{-1}$ โดยในช่วงแรกอุณหภูมิของคอลัมน์ยังไม่เสถียรดังนั้นการปรับ gradient จึงใช้ที่อุณหภูมิห้องและรอจนอุณหภูมิของคอลัมน์อยู่ที่ 35 องศาเซลเซียส และโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์อยู่ที่ 55 นาที / <u>High</u>

Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet ที่มีปั๊มแปรผันแรงดันต่ำยี่ห้อ Shimadzu LC-6A, หัวฉีดชนิด Manual injection ที่แบ่งปริมาณฉีดที่ 20 ไมโครลิตร, การ์ดคอลัมน์ชนิด C18 Silica, คอลัมน์ชนิด C18 Silica ยี่ห้อ EnviroSep-PP-PAH (EPA Method 610) 125 x 4.6 mm, ตัวตรวจจับสัญญาณชนิด DAD ยี่ห้อ Shimadzu SPD-SAV,เครื่องแปรงผลรุ่น SPD-SAV และโปรแกรมแปรผล LCanalysis, ความเร็วของ Mobile Phase ที่ 0.8 $mL.min^{-1}$ และโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์อยู่เพียง 30 นาที/ Scent of Wine (Nez du vin) จากบริษัท Aromes de vin ประกอบไปด้วย 54 กลิ่นหลักในไวน์เพื่อใช้ในการฝึก และทดสอบ Panel list

การศึกษาแบ่งออกเป็น 3 ระยะได้แก่

1. ทดสอบสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์จาก 2 สายพันธุ์
   เพื่อศึกษาผลของการหมักของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดมาในน้ำมังคุดต่อการผลิตแอลกอฮอล์และประเมินผลิตภัณฑ์พลอยได้โดยใช้ปัจจัยของการทำ Classic Rose Vinification ศึกษาต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน(demi-reaction) 10 วัน(Stability Reaction) 15 วัน (Second stability Reaction) แล้ว 30 วัน (Final Reaction)และการทำ Total plate count ในระยะต่างๆ แล้วศึกษายีสต์ที่เกิดมาแข่งขันหากมีการค้นพบ(Competitive indigenous yeast : CIY) จากนั้นแยกเชื้อยีสต์คู่แข่ง(CIY) ทดสอบการหมักและการทำเชื้อบริสุทธิ์แล้วนำมาทดสอบขั้นตอน Classic Rose Vinification และตรวจสอบชุดการทดลองทั้งหมดด้วย วิธีการตรวจสอบทางชีวเคมี เช่น การตรวจสอบกลีเซอรอลที่เกิดมาจากปฏิกิริยาย้อนกลับการเกิดกรดแลคติกของการหมักกรดแลคติกคู่ขนาน และการเกิดกรดซิตริกของปัญหาการหมักต่อยอด
2. พัฒนาวิธีการหมักไวน์จากมังคุดจากยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด
   เพื่อศึกษาสารประกอบภายในของน้ำมังคุดและแอลกอฮอล์จากมังคุดในชุดกลุ่มสารให้สี (Anthocyanin)และสารให้กลิ่น(S-glycosyl และ Terpene)ก่อนและจากการหมักโดยวิธี GC-FID และ HPLC พร้อมทดลองประยุกต์ใช้ E-nose เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารให้สีและกลิ่น ภายในโดยการทำ Classic Rose Vinification จากนั้นทดสอบคุณภาพโดยวิธีทางประสาทสัมผัส (Organoleptic Profil/ Hedonist test) แล้วทดสอบโดยการทำ Triangle Test ซ้ำและเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดอย่างน้อย 2 สายพันธุ์เพื่อเข้าสู่ขั้นต่อไป แล้วประเมินปัจจัยในการหมักโดยการพัฒนาการหมักจาก Classic Rose Vinification เป็นการหมักแบบ Oxidative Vinification ในการพัฒนาเป็นไวน์ธรรมชาติ โดยการกำหนดปัจจัยดังนี้ โดยการเพิ่มน้ำตาล (Chaptalisation) และการเพิ่มออกซิเจน (Oxigenation) โดยการวัดปริมาณแก๊สออกซิเจนเข้าไปต่อนาทีที่ 5 – 10 – 20 มิลลิลิตรต่อนาที เรามีการควบคุมปัจจัยที่พอเหมาะในการเจริญเติบโตของยีสต์ เช่น pH ที่เหมาะสมของยีสต์ แต่ละสายพันธุ์โดยการเติมกรดทาทาริกและปริมาณไนโตรเจนในน้ำมังคุดโดยการเติม แอมโมเนียมฟอสเฟต จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้หลังสิ้นสุด การหมัก จำนวนวันในการหมักและผลิตภัณฑ์พลอยได้ นอกจากนี้ศึกษาผลต่อการหยุดหมักของยีสต์ แต่ละสายพันธุ์โดยวิเคราะห์ผลทางกลศาสตร์ในการหมักและ

การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีผลผลิตคุ้มค่าที่สุด และการประเมินยีสต์เพชฆาต (Killer Factor Yeast: KFY) แล้วเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยีสต์ท้องถิ่นกับยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้โดยทดสอบสายพันธุ์ยีสต์ท้องถิ่นที่คัดเลือกมาจากแหล่งผลิตมังคุด 4 แหล่งใหญ่ ที่มีในประเทศได้แก่ จังหวัดจันทบุรี จังหวัดชุมพร จังหวัดสุราษฎร์ธานี และจังหวัดนครศรีธรรมราช ทั้งนี้ทั้ง 5 ตัวอย่างจำเป็นต้องมีการทำ D-Glucose test เพื่อตรวจสอบการหมักก่อนจะนำมาทดลอง และการทดสอบเชื้อบริสุทธิ์โดยการทำการประเมินผลทาง Morphology และผลทางการปรับตัว ในระดับการ Mutation โดย UV จากนั้นประเมินปัจจัยในการหมักโดยการพัฒนาการหมักจาก Classic Rose Vinification เป็นการหมักแบบ Oxidative Vinification ในการพัฒนาเป็นไวน์ธรรมชาติโดยการกำหนดปัจจัย ดังนี้โดยการเพิ่มน้ำตาล (Chaptalisation) และการเพิ่มออกซิเจน(Oxigenation) โดยการวัดปริมาณ แก๊สออกซิเจนเข้าไปต่อนาทีที่ 5 – 10 – 20 มิลลิลิตรต่อนาที เรามีการควบคุมปัจจัยที่พอเหมาะในการเจริญเติบโตของยีสต์ เช่น pH ที่เหมาะสมของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ โดยการเติมกรดทาทาริก และปริมาณไนโตรเจนในน้ำมังคุดโดยการเติมแอมโมเนียมฟอสเฟต จากนั้นวิเคราะห์ ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้หลังสิ้นสุดการหมักจำนวนวันในการหมักและผลิตภัณฑ์พลอยได้นอกจากนี้ศึกษาผลต่อการหยุดหมักของยีสต์แต่ละสายพันธุ์โดยวิเคราะห์ผลทางกลศาสตร์ในการหมักและการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีผลผลิตคุ้มค้าที่สุดและการประเมินยีสต์เพชฆาต (Killer Factor Yeast: KFY)

ระยะเวลา ตุลาคม 2553 – กันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงชุมพร
ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี

ผลการทดลองและวิจารณ์

ทดสอบสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์จาก 2 สายพันธุ์

เราสามารถจำแนกยีสต์ที่ใช้ในการผลิตไวน์ผลไม้ในกลุ่ม *Saccharomyces* ตามหลักทางอนุกรมวิธานตั้งแต่ปี 1984 โดย Lodder et Kregger-van Rij ว่ายีสต์ถือตามการจัดใหม่ของ Phylogenetic จัดรวมเป็นพวก *Ascomycete/ Basidiomycete* และ *Imperfect mushroom* ประกอบไปด้วย 81 genus และกว่า 590 สายพันธ์โดยตั้งแต่ศตวรรตที่ 19 ได้มีการประยุกต์ใช้มาแล้วกว่า 4000 ชื่อยีสต์ อย่างไรก็ตามยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอลฮอล์ และยีสต์ที่ก่อให้เกิดโรคในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีน้อยมาก เพียงไม่ถึง 15 ชนิด โดยเราสามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ***(ตารางที่ 1)*** ซึ่งจะสังเกตได้ว่ายีสต์ในการผลิตแอลกอฮอล์แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มหลักและ 2 กลุ่มชัดเจนคือพวกที่เป็นสายพันธ์ Saccharomyces และพวก Non-Sachharomyces (Spermoptoracae+Cryptoccaceae) อย่างไรก็ตามในการคัดเลือกสายพันธ์ที่จะนำมาใช้ในการทดลองนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาลักษณะเบื้องต้นทางด้านกายภาพและทาง

ความสามารถในการหมักน้ำตาล (Sugar Fermentation) ที่เป็นคุณลักษณะสำคัญของยีสต์ผลิตแอลกอฮอล์ โดย Barnett ได้เสนอการทดสอบเมื่อปี 1990 ในน้ำตาลชนิดต่างๆ และการเจริญเติบโตในน้ำตาลชนิดต่างๆ และผลการทดลองเลี้ยงเชื้อยีส ต์และการหมักน้ำตาลในยีสต์ต่างสายพันธุ์ ***(ตารางที่ 2)*** จะสังเกตุได้ว่ายีสต์ที่นำมาทดสอบ มีพฤติกรรมคล้ายคลึงกันเป็น 2 คู่ระหว่าง กลุ่ม Saccharomyces *cerevisiae* และ Dekkera *anomala* และคู่ของ Saccharomyces *lugwigii* และ Candida *stellata* (คล้ายกับ Pichia *fermentens*) โดยการหมักเกิดขึ้นตามลำดับดังนี้ D.anomala > S.Ludwigii > S.cerevisiae > P.fermentens โดยเราพบตะกอนของ S.cerevisiae น้อยที่สุดถือเป็นตะกอนหยาบ ๆ ส่วนตะกอนของ S.ludwidgii เช่นเดียวกับ P.fermentens มีมากลักษณะเหมือนตะกอนทราย ต่างกับตะกอนของ D.anomala เป็นตะกอนที่ละเอียดมากเป็นผงเหมือนฝุ่งแป้ง ส่วนสีของไวน์ที่หมักโดย S.Ludwidgii และ P.fermentens โทนสีเด่นชัดเจนแต่ในด้านความใส : D.anomala ให้ไวน์ที่มีความขุ่นเรียงตามลำดับ P.Fermentens > S.Ludwidgii > S.cerevisiae > D.anomala ดังนั้นในการพัฒนาไวน์ชมพูทางผู้ทดลองจึงได้เลือกD.anomalaเป็นหลักและนำไปพัฒนาการหมักต่อในการทดลองถัดไป

<u>ศึกษากรรมวิธีการจำแนกสายพันธ์ยีสต์โดยวิธีทางชีวเคมีและพันธุศาสตร์</u>

ผู้ทำการทดลองได้ศึกษาต่อเนื่องในระดับชีวเคมีของยีสต์ที่ศึกษาโดยในการจัดหมวดหมู่ของยีสต์ล่าสุดในปี 1984 โดยKreger-Van Rij ได้ให้ความสำคัญถึงเบสสำคัญใน DNA ของยีสต์สองชนิดได้แก่ Guanine และ Cytosine โดยการใช้หลักการ reassociation DNA-DNA ในยีสต์ทั้ง 6 ชนิดที่ผู้ทำการทดลองได้คัดเลือกมาพบว่า ยีสต์ 3 ชนิดในสายพันธ์ Saccharomyces มีความแตกต่างกันมากและต่างกับสายพันธ์ Non-Saccharomyces โดยสิ้นเชิง ***(ตารางที่ 3)*** สังเกตุได้ว่ายีสต์ทั้ง 6 สายพันธ์มีความแตกต่างกันโดยสิ้นเชิงและแตกต่างกันระหว่างสายพันธ์ได้ชัดเจน กันทางสถิติ (R = -0.008) จากนั้นเพื่อศึกษาเตรียมความพร้อมก่อนการประเมินคุณสมบัติทางการหมักน้ำมังคุด และเพื่อกำหนดลักษณะทางชีวเคมีและพันธุศาสตร์ที่ชัดเจนของยีสต์แต่ละตัวเราได้พัฒนาหลักการทางพันธุศาสตร์โดยใช้วิธี PCR-RFLP โดยการใช้ยีนส์ที่มีชื่อว่า *MET2* โดยการทำ Entier amplification จากการอุ่น DNA จากยีสต์ที่ได้มาในน้ำอุ่นที่ 95 องศาเซลเซียสภายในเวลา 10 นาทีโดยใช้ Restriction Enzyme 2 ชนิดได้แก่ EcoR1 และ Pst1 (Masneuf et al., 1996a and 1996b) โดยยีนส์ MET2 (580 pb) จะตัด DNA เป็นสองส่วน (369 และ 211 pb) สำหรับยีสต์สายพันธ์ S.cerevisiae โดย EcoR1 และ (215 และ 365 pb) สำหรับสายพันธ์ S.bayanus โดย Pst1 ส่วน S. uvarum นั้นจะใช้เอนไซม์ชนิดอื่นเช่น Mae III ในการตัด ซึ่งจะเห็นได้ว่ายีสต์แต่ละสายพันธ์มีความจำเพาะของตัวเอง ***(ภาพที่ 2)*** จากนั้นเราได้นำหลักการดังกล่าวไปทดลองในยีสต์ที่มีขายตามท้องตลาดในการหมักไวน์และเครื่องดื่ม แอลกอฮอล์ในประเทศไทยและต่างประเทศผลออกมา ***(ตารางที่ 4)*** อย่างไรก็ตามยังมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สายพันธ์ยีสต์ โดยการใช้วิธีอื่นๆที่ง่ายและรวดเร็วกว่าได้แก่การใช้เทคนิค PCR –microsatellite ที่ใช้เบสเพียง 10 ตัวในการประเมินโดยการศึกษาโดยใช้ Electrophoresis บนเจลอาคลิลาเมล โดยเราใช้ microsatellite เพียงไม่ถึง 6 ชิ้น ในการแยกสายพันธ์ยีสต์กว่า 51 สายพันธ์แต่อย่างไรก็ตามความแปรผันระหว่าง Colony ยังมีมากทำให้ผลลัพธ์ไม่แน่นอนเท่าที่ควร โดยส่วนใหญ่ ผลที่ได้จะเป็นขนาดของ microsatellite จำนวนคู่เบส และคู่เบสซ้ำเท่านั้นทำให้

ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการทดลองได้ ดังนั้นวิธีดังกล่าวถือเป็นการ ประเมินผลเพียงคร่าวๆ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยล่าสุดเรื่องการนำยีนต์ภายใน mitochondria (Lopez et al, 2003) ของยีสต์มาศึกษาที่ชื่อว่า COX1 ซึ่งให้ผลเป็นที่น่าพอใจและสามารถนำมาจำแนกสายพันธ์ยีสต์ได้ชัดเจน โดยอยู่ระหว่างขั้นตอนการพัฒนา

<u>ศึกษาผลของการหมักของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดมาในน้ำมังคุดต่อการผลิตแอลกอฮอล์และประเมินผลิตภัณฑ์พลอยได้โดยใช้ปัจจัยของการทำ Classic Rose Vinification</u>

(ตารางที่ 5.1, 5.2) เราพบลำดับการเกิดของการหมักแอลกอฮอล์ดังนี้ D.anomala > S.Ludwigii > S.cerevisiae > P.fermentens และพบตะกอนของ S.cerevisiae น้อยที่สุดมีลักษณะเป็นตะกอนหยาบ ๆ ตะกอนของ S.ludwidgii มีเยอะ ลักษณะเหมือนตะกอนทราย ตะกอนของ D.anomala เป็นตะกอนที่ละเอียดมากเป็นผงเหมือนฝุ่งแป้ง ตะกอนของ P.fermentens คล้ายคลึงกับ S.Ludwidgii ลักษณะสีของไวน์ที่หมักโดย S.Ludwidgii และ P.fermentens มีสีสวยงาม สำหรับการหมักโดย D.anomala ให้กากที่ละเอียด ลักษณะคล้ายฟองน้ำ และระดับความใส : D.anomala ให้ไวน์ที่มีความขุ่นเรียงตามลำดับ P.Fermentens > S.Ludwidgii > S.cerevisiae > D.anomala ดังนั้นในการพัฒนาไวน์ชมพูทางผู้ทดลองจึงได้เลือก D.anomala

พัฒนาวิธีการหมักไวน์จากมังคุดจากยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด เตรียมเชื้อทดลองทำ Classic Rosé vinification โดยมีการทดลองหมักไวน์มังคุดตามวิธีดังกล่าวและผลการทดลอง ควบคุมปัจจัยที่พอเหมาะในการเจริญเติบโตของยีสต์ เช่น pH ที่เหมาะสมของยีสต์แต่ละสายพันธุ์โดยการเติมกรดทาทาริก และปรับปริมาณไนโตรเจนในน้ำมังคุด โดยการเติม แอมโมเนียฟอสเฟต ***(ตารางที่6)*** จากการทดลองพบว่า **คุณภาพมังคุดที่ได้จากภาคใต้มีอัตราการหมัก ที่ดีกว่ามังคุดที่มาจากภาคตะวันออก** โดยข้อสังเกตคือ มังคุดจากภาคใต้มีการทำงานร่วมกันของยีสต์สายพันธุ์พื้นเมือง และ D.anomala เกิดการทำงานร่วมกันที่ดีกว่ามังคุดจากภาคตะวันออก ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ยีสต์สายพันธุ์พื้นเมืองจากภาคใต้ มีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในกระบวนการหมัก จึงได้ทำการศึกษาต่อ โดยการทำการทดลอง โดยใช้วิธี API-20 มาทดสอบยีสต์สายพันธุ์พื้นเมือง พบว่า ยีสต์พื้นเมืองของภาคใต้ ที่72ชั่วโมง สามารถหมักน้ำตาล GLU GLY 2KG SOR TRE จากการทดสอบพบว่า มีสายพันธุ์ที่น่าจะเป็นยีสต์พันธุ์เมืองคือ สายพันธุ์ ***Candida colliculosa , Candida famata*** และ ***Cryptococcus humicola*** ส่วน ยีสต์สายพันธุ์พื้นเมืองของภาคตะวันออก มีการหมักกับน้ำตาล ในช่อง GLU GLY 2KG XYL XLT SOR NAG โดยมีสายพันธุ์ที่น่าจะเป็นยีสต์พื้นเมืองคือ ***Cryptococcus humicola*** และผู้ทำการทดลองได้ทดสอบ ID32 อีกครั้งหนึ่ง ซึ่งก็ให้ผลยืนยันได้ว่า **ยีสต์สายพันธุ์พื้นเมือง จากภาคตะวันออกและภาคใต้เป็นสายพันธุ์ *Cryptococcus humicola* คนละ strain**

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของยีสต์ท้องถิ่นกับยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้

จาก ***(ตารางที่ 7)*** **ยีสต์สายพันธุ์ S2 (สุราษฎร์ธานี**) มีศักยภาพสูงสุดในการหมักไวน์จากมังคุดและการพัฒนา โดยเรานำไปวิเคราะห์ตามหลักการของกิจกรรมที่ 1 ทำให้ทราบว่าเป็นสายพันธุ์ S. cerevisiae ซึ่งเป็นคนละ Strain กันกับเชื้อพันทางการค้า จากนั้นเราเพาะเลี้ยงโดยวิธีการพัฒนายีสต์ทนแอลกอฮอล์ได้เป็น**ยีสต์ strain ใหม่ที่ชื่อว่า HHD1** มีศักยภาพในการทนแอลกอฮอล์สูงมากถึง 20% w/w นอกจากนี้ยังพบสายพันธุ์ Non-saccharomyces ที่มีศักยภาพได้แก่ *Kloeckera, Hanseniaspora , Debaryomyces,* apiculate *Hanseniaspora uvarum* และ *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima* และ *Candida pulcherrima,* นอกจากนี้ *Pichia membranefaciens, Hansula anomala, Candida stellata, Cryptococcus* spp. *และสายพันธุ์ Rhodotorula* spp.ที่มีศักยภาพสูงมาก ***(ตารางที่ 8)***

เชื้อทุกสายพันธุ์ผลิตแอลกอฮอล์ได้ต่ำลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือในอาหารสูงขึ้นและไม่ผลิตแอลกอฮอล์เมื่อเติมเกลือโซเดียมคลอไรท์ 10% ในบรรดาเชื้อยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงสุดในอาหารที่ไม่เติม เกลือโซเดียมคลอไรท์และผลิตได้สูงสุดในอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรท์ 5% คือ HHD1 ซึ่งผลิตได้ 9.04 และ 4.82% โดยน้ำหนักตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นสูงคือ TJ3 ซึ่งผลิตแอลกอฮอล์ได้ 1.54% โดยน้ำหนักในอาหารที่เติมเกลือ 7% ดังนั้นจึงได้คัดเลือก HHD1 สำหรับใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ผ่ายผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงและ TJ3 เป็นสายพันธุ์ทนเค็ม จากนั้นนำเชื้อ ทั้งสองชนิดไปทำโปรโตพลาสฟิวชั่น ตามวิธีของ Seki et al. (1980) เพื่อศึกษาการหมักไวน์มังคุดแบบใช้ออกซิเจนที่นำไปใช้ได้ในโรงงานสุราทั่วไป

อภิปรายผล (Discussion)

จากผลของการเปรียบเทียบยีสต์ทั้งสองสายพันธ์ในการหมักไวน์มังคุดในเขตร้อนทำให้ทราบว่า ยีสต์ สายพันธ์ Non-Saccharomyces มีผลชัดเจนต่อคุณภาพ สี กลิ่น และรสในไวน์ ชัดเจนกอปรกับการทำงานของยีสต์เพชฆาตในธรรมชาติของมังคุดทั้งสองแหล่งผลิตสำคัญของประเทศไทย ส่งผลชัดเจนต่อการผลิตไวน์มังคุดเราสังเกตุได้ว่าคุณภาพมังคุดภาคใต้ มีศักยภาพในการส่งเสริม การผลิตไวน์มังคุดทีมีคุณภาพมากกว่า อย่างไรก็ตามเราสามารถนำผลการทดลองไปพัฒนายีสต์ สายพันธ์ที่มีศักยภาพสูงเพื่อการผลิตแอลกอฮอล์ที่มีดีกรีสูงและทนเค็มในชื่อ สายพันธ์ใหม่ว่า HHD1 รับรองผล โดยสำนักพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งทางผู้ทดลองได้พัฒนาร่วมกับโครงการผลิต อาหารเพื่อสุขภาพจากกล้วย และได้ยีสต์สายพันธ์ใหม่จำนวน 3 สายพันธ์ เพื่อหมดสำหรับการผลิตแอลกอฮอล์ สามรูปแบบได้แก่ BAbeer (สำหรับการผลิตเบียร์) BAwine (สำหรับการผลิตไวน์) BAspirit (สำหรับการผลิตแอลกอฮอล์ดีกรีสูง) และได้ตีพิมพ์ผลงานในงานประชุมกล้วยนานาชาติ ณ โรงแรมดิอิมเพลส จังหวัดเชียงใหม่ ในเดือนมกราคม 2555 ที่ผ่านมา โดยศักยภาพของยีสต์ HHD 1 ที่คัดเลือกได้ในครั้งนี้ถือว่าเป็นความสำเร็จที่ได้จากการทดลองที่สามารถนำไปใช้จริงและสมควรได้รับการพัฒนาต่อเนื่องเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมแอลกอฮอล์ไม่ว่าจะเป็นอาหารหรือพลังงานต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เราได้กระบวนการพัฒนาเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จากมังคุดที่มีคุณภาพในรูปแบบไวน์ธรรมชาติ (Xante Natural Wine) และ พร้อมทั้งทดสอบสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ในการหมักสูงสุดจากสายพันธุ์ Saccharomyces – Non-Saccharomyces โดยสามารถคัดเลือกชนิดของยีสต์ที่เหมาะสมในการหมักไวน์มังคุดได้ โดยเป็นสายพันธ์ยีสต์ใหม่ที่ คัดเลือกได้เฉพาะถิ่น (indigenous yeast) ที่สามารถเจาะลิขสิทธิ์ได้ พร้อมกรรมวิธีการคัดแยกสายพันธ์จากมังคุดท้องถิ่น 2 แหล่งคือภาคตะวันออก และภาคใต้ จากผลการทดลองเปรียบเทียบศักยภาพของยีสต์ ทั้งสองสายพันธ์ Dekera anomala ยีสต์สายพันธ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูงและพัฒนายีสต์สายพันธ์ใหม่ที่ชื่อว่า HHD1 ที่มีศักยภาพสูง ในการผลิตแอลกอฮอล์

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

มีการส่งเสริมและประชาสัมพันธ์ในตลาดทั้งภายในและต่างประเทศถึงเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จากมังคุดในรูปแบบไวน์ธรรมชาติ (Natural Wine) เพื่อเป็นสินค้าเอกลักษณ์ของไทยจากทรัพยากรภายในประเทศและคุณภาพที่สม่ำเสมอสามารถพัฒนากรรมวิธีการผลิตไวน์มังคุดที่มีประสิทธิภาพโดยมีการจัดการถ่ายทอดใน หลายงานนิทรรศการของกรมวิชาการเกษตรหรือแม้แต่การจัดการสาธิตพัฒนาแซนเต้ ให้เป็นที่รับรู้และ นำไปใช้ประโยชน์ได้โดยในปัจจุบันมีไวน์มังคุดที่เกิดจากกระบวนการที่ทำการทดลองออกสู่ตลาดหลาย ยี่ห้อแล้ว

เอกสารอ้างอิง

Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. (1990) *Yeasts: Characterization and Identification* 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press.

Brandolini, V. Menziani, E. Mazzotta, D. Vecchiati, G. Ponti, I. (1995) Impatto ambientale dell'impiego del rame in viticoltura. *Vitivinicoltura,* 39, 53-56

Constanti, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A. And Guillamon, J.M. (1997) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in newly established winery. *American Journal of Enological Viticulture* 48, 339-344

Delfini, C. Bardi, L. (1993) Esiste un'interazione del lievito con il vitigno? *Vignevini,* 7-8, 35-37

Fleet, G.H. (1990) Growth of yeasts during wine fermentations. *Journal of Wine Research,* 1, 211-223

Fleet, G.H. and Heard, G.M. (1993) The microorganisms of winemaking : isolation, enumeration and identification. In *Wine Microbiology and Biotechnology* ed. Fleet, G.H. pp. 27-54. Switzerland: Harwood Academic Publishers

Frezier, V. and Dubourdieu, D. (1992) Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *American Journal of Enological Viticulture* 43, 375-380.

Lema, C. Garcia-Jares, C. Orriols, I. Angulo, L. (1996) Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *American Journal of Enology and Viticulture,* 47, 206 – 216

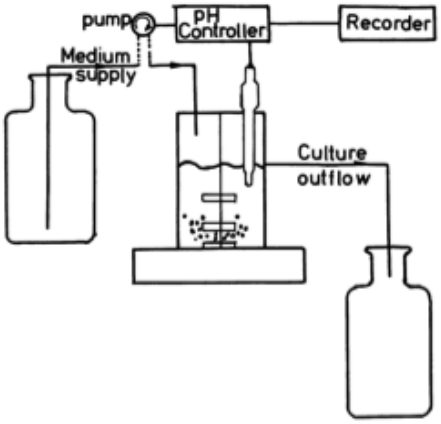
Masneuf, I. (1996) Recherche sur l'identification génétique des levurés de vinification. Application œnologiques, Thèse de Doctorat de l'Université de Bordeaux II

Querol, A., Barrio, E. and Ramon, D. (1992b) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 439-446

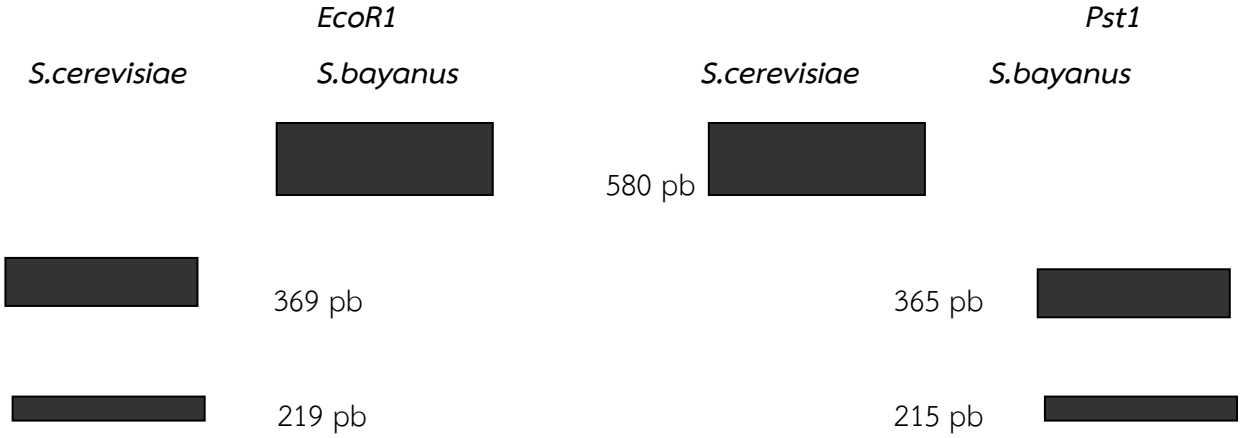
Vezinhet, F., Hallet, J., Valade, M. And Poulard, A. (1992) Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *American Journal of Enological Viticulture* 43, 83-86

ภาคผนวก

ภาพที่ 1. ระบบควบคุม (Chemostat) ซึ่งมีระบบควบคุมอัตโนมัติเชื่อมต่อกับเครื่อง pH-meter ปั๊มอาหารของ ระบบควบคุมจะเชื่อมต่อโดยตรงกับระบบควบคุมปริมาณ pH (โปรแกรม Touch Panel), โดยจะเปิด (D > μ) และปิด (D = 0) ตามปริมาณ pH ในอ่างเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ใกล้เคียงกับ pHc ซึ่งเป็นผลจากการศึกษาระบบการเลี้ยงเชื้อต่อเนื่องใน stationary phase



ภาพที่ 2 แสดงหลักการพัฒนาการประเมินชนิดของยีสต์บริสุทธิ์สายพันธ์ S. cerevisiae และ S. bayanus โดยเทคนิค PCR-RFLP โดยยีนส์ MET2 โดยใช้เอนไซม์ EcoR1 และ Pst1



ตารางที่ 1 Yeast Genus Classification ที่พบในการผลิตแอลกอฮอล์ (Kregger-van Rij, 1984)

Family Saccharomycetaceae			Family Spermoptoracae	Family Cryptococcaceae
Sub-Family Schizosaccharomycetoideae	Sub-Family Nadsonioideae	Sub-Family Saccharomycetoideae		
Genus				
Schizosaccharomyces	Saccharomycodes Hansenuaspora	Saccharomyces Debaryomyces Dekkera Hansenula Kluyveromyces Pichia Zygosaccharomyces Torulaspora	Metschinikowia	Brettanomyces Candida Kloeckera Rhodotorula

YEAST VARIETIES	F1 – D-Glucose Fermentation	F2- D-Galactose Fermentation	F3 – Maltose Fermentation	F5 – Sucrose Fermentation	F8 – Lactose Fermentation	C1 – D-Glucose growth	C2 – D-Galactose growth	C10 – Sucrose growth	N1 – L-lysine growth	T2 Growth at 30 C	O3 1% Acetic acid growth	M2 Acetic acid production
Candida stellata	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Dekkera anomala	+	V	V	+	V	+	V	V	+	+	-	+
Pichia fermentens	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
Saccharomyces cerevisiae	+	V	V	V	-	+	V	V	-	+	-	-
Saccharomyces ludwigii	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-

(bayanus)												

ตารางที่ 2 ผลการทดลองทางชีวเคมีความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์บางส่วนตาม Bergy's yeast strain selection

+ : Positive Test / - : Negative Test / v : Variable Test

ตารางที่ 3 ผลการทดลองการ reassociation DNA/DNA ระหว่างสายพันธ์ยีสต์ทั้ง 6 ชนิดที่นำมาทดสอบ

	S.cerevisiae	S. bayanus	S. pastorianus	P. fermentus	D. anomala	C. stella
S. cerevisiae	100					
S. bayanus	20	100				
S. pastorianus (uvarum)	58	70	100			
P. fermentus	2	0	3	100		
D. anomala	1	0	1	38	100	
C. stella	3	5	0	23	14	100

ตารางที่ 4 การศึกษาชนิดของสายพันธ์ยีสต์โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ในยีสต์การค้าเพื่อการหมักไวน์ และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

Souche	Commercial Mark	Origin	Enologique designation	Species
VL1	Zymaflore VL1	FOEB	*S. cerevisiae*	*S.cerevisiae*
VL3c	Zymaflore VL3	FOEB	*S. cerevisiae*	*S. cerevisiae*
F10	Zymaflore F10	FOEB	*S. bayanus*	*S. cerevisiae*
QA23	Lalvin QA23	UTM	*S. bayanus*	*S. cerevisiae*
IOC182007	IOC 182007	IOEC	*S. bayanus*	*S. cerevisiae*
O16	Lalvin O16	UB	*S. bayanus*	*S. cerevisiae*

ตารางที่ 5.1 ผลการทดลองหมักยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์

Date	S.cerevisiae			S.Luwidgii			D. anomala			P.fermentens		
	Brix	pH	Alcohol	Brix	pH	Alcohol	Brix	pH	Alcohol	Brix	pH	Alcohol
Day 1	20.00	3.25	0.00	20.00	3.21	0.40	18.20	3.02	2.40	20.40	3.22	0.00
Day 2	17.20	3.17	2.12	17.50	3.14	2.20	15.00	3.13	5.00	18.00	3.10	2.40
Day 3	12.00	3.07	7.60	11.00	3.10	8.02	8.40	3.06	11.10	10.80	3.07	8.80
Day 4	10.20	3.09	8.36	10.00	3.11	9.00	7.80	3.11	11.90	9.80	3.06	10.00
Day 5	9.20	3.15	10.24	9.00	3.20	10.10	7.00	3.20	13.20	8.80	3.13	11.36
Day 6	8.00	3.00	11.50	8.20	3.01	11.14	6.00	3.02	13.30	6.80	3.02	11.60
Day 7	7.00	3.32	11.90	7.20	3.30	11.34	6.00	3.29	12.90	7.00	3.24	11.90
Day 10	6.00	3.20	12.46	6.00	3.19	12.46	x	x	x	6.00	3.16	14.50

ตารางที่ 5.2 ผลการเจริญเติบโตของยีสต์ทั้งสี่สายพันธุ์ที่ใช้ในการหมัก

Date	Cell (CFU : ml)			
	S.cerevisiae	S.Ludwigii	D.anomala	P.fermentens
Day 1	4,916,666.667	1,833,333.333	1,833,333.333	3,250,000.000
Day 2	2,141,666.667	1,591,666.667	716,666.667	1,708,333.333
Day 3	45,000.000	257,500.000	333,333.333	210,000.000
Day 4	190,000.000	193,333.333	333,333.333	164,166.667
Day 5	45,000.000	145,000.000	333,333.333	35,833.333
Day 10	7,500.000	30,000.000	3,500,000.000	28,333.333

ตารางที่ 6 ทดลองเปรียบเทียบยีสต์ธรรมชาติจาก 2 แหล่งผลิต

	ตารางการทดลองยีสต์ที่ใช้หมักมังคุดจากจันทบุรีและนครศรีธรรมราช				
ภาคตะวันออก	ชั่วโมงที่	pH	Brix	อุณหภูมิ	แอลกฮอล์
4DM	176	3.30	13.0	30.0	9.5
CDB	176	2.60	13.6	31.2	9.0
D. anomala	176	2.47	19.0	32.8	7.6
Montrachet	176	3.29	10.0	32.5	10.5
California	176	3.23	10.0	32.2	11.0
ภาคใต้					
4DM	176	3.35	9.4	31.2	10.5
CDB	176	3.27	9.3	31.6	10.5

D. anomala	176	2.40	16.1	31.5	5.5
Montrachet	176	2.47	14.9	32.6	7.8
California	176	2.53	13.8	32.6	9.8

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบหมักแอลกอฮอล์และการเจริญของเชื้อยีสต์ที่เก็บมาได้จากมังคุดสายพันธ์จันทบุรี (E1) และสายพันธ์ชุมพร(S1) สายพันธุ์สุราษฎร์ธานี(S2) สายพันธุ์นครศรีธรรมราช(S3) ในน้ำมังคุดเพียวเล่มาตรฐานปรับกรดและน้ำตาลเพื่อเหมาะสมในการผลิตไวน์มังคุดที่ 35 องศาเซลเซียส

	สายพันธุ์ E1	**สายพันธุ์ S1**	**สายพันธุ์ S2**	**สายพันธุ์ S3**
ค่าความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น (ค่า O.D. ที่ 660 nm)	1.60	1.62	1.63	1.61
ค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด (ค่า O.D. ที่ 660 nm)	9.0	15.78	15.73	15.80
ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (% โดยน้ำหนัก)	21.00	21.00	21.00	21.00
ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดที่หมักได้ (% โดยน้ำหนัก)	6.73	7.37	7.64	7.20
ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (% โดยน้ำหนัก)	4.40	3.90	2.60	5.09
น้ำหนักแห้งสูงสุด (กรัม/ลิตร)	1.62	2.61	2.45	2.50
อัตราการเพิ่มปริมาณเซลล์สูงสุด 1/ (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	0.083	0.134	0.125	0.156
อัตราการหมักสูงสุด 2/ (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	1.50	1.875	2.25	2.17
ประสิทธิภาพของการหมัก 3/ (% ของค่าทางทฤษฎี)	78	84	95	89

1/ อัตราการเพิ่มปริมาณเซลล์ (Cell mass production rate) หมายถึงอัตราการเพิ่มปริมาณเซลล์โดยคิดเป็นกรัมของน้ำหนักแห้งต่อปริมาตรของปริมาณน้ำมังคุดที่ใช้หมัก 1 ลิตร ในเวลา 1 ชั่วโมง มีหน่วยเป็น กรัม/ลิตร/ชั่วโมง

2/ อัตราการหมักแอลกอฮอล์ (Alcohol production rate) หมายถึงอัตราการหมักได้เอทิลแอลกอฮอล์คิดเป็นกรัมต่อปริมาตรน้ำมังคุดที่ใช้หมัก 1 ลิตร ในเวลา 1 ชั่วโมง มีหน่วยเป็น กรัม/ลิตร/ชั่วโมง

3/ ประสิทธิภาพการหมัก (Yield of product formation) เป็นค่าความสามารถที่เชื้อจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอธิลแอลกอฮอล์ โดยเปรียบเทียบกับค่าทางทฤษฎีคือ น้ำตาล 100 กรัม จะถูกเปลี่ยนเป็นแอทธิลแอลกอฮอล์ 51.1 กรัมจะมีประสิทธิภาพการหมัก 100%

ตารางที่ 8 การเก็บยีสต์จากโรงงานแอลกอฮอล์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมัก

Code	ปริมาณแอลกอฮอล์ (% โดยน้ำหนัก)							
	NaCl 0%		NaCl 5%		NaCl 7%		NaCl 10%	
	0hr	72hr	0hr	72hr	0hr	72hr	0hr	72hr
HHD1	0.38	9.04	0.29	4.82	0.30	1.04	0.31	0.28
SC90	0.29	9.14	0.27	4.20	0.30	1.03	0.35	0.31
M30	0.38	9.35	0.32	4.36	0.27	0.98	0.26	0.24
191	0.28	8.88	0.33	4.46	0.34	0.34	0.29	0.28
281	0.36	8.62	0.27	3.98	0.29	0.30	0.30	0.27
TJ1	0.36	8.88	0.34	3.01	0.34	0.43	0.34	0.30
TJ3	0.27	6.98	0.37	4.63	0.28	1.54	0.31	0.27

รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา
SC90	โรงงานสุราอยุธยา
M30	แยกจากโรงงานสุราสุราษฎร์ธานี
191	แยกจาก Mold brand ของโรงงานน้ำส้มสายชูประเทศจีน
281	แยกจากกากน้ำตาล จากโรงงานจังหวัดนครราชสีมา
TJ1	แยกจากกากน้ำตาล จากโรงงานจังหวัดขอนแก่น
TJ3	แยกจากกากน้ำตาล จากโรงงานจังหวัดกาญจนบุรี