*บทความวิจัย*

# การผลิตไวน์โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เซลล์ตรึงรูปในชิ้นผลไม้

**อรอนงค์ พริ้งศุลกะ* ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย และ พิชาภัค สมยูรทรัพย์**

## บทคัดย่อ

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตไวน์โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เซลล์ตรึงรูปในตัวพยุงที่เป็นผลไม้ 4 ชนิด คือ มะม่วง ฝรั่ง ชมพู่ และมะยม ที่อุณหภูมิต่างๆ (25, 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง) การตรวจสอบการตรึงเซลล์ยีสต์บนชิ้นผลไม้ทำภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด และศึกษาการหมักไวน์แบบ repeated batch fermentation โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 125 กรัมต่อลิตร และใช้ระยะเวลาในการหมัก 24 และ 48 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของเอธานอลเฉลี่ยเป็น 5.5% (v/v) และ 6.1% (v/v) ที่ระยะเวลาในการหมัก 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยการตรึงเซลล์บนผลไม้ทั้ง 4 ชนิดสามารถใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 3 ครั้งโดยผลผลิตของเอธานอลยังคงสูง การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส พบว่าไวน์ที่ผลิตจากการตรึงเซลล์จะให้กลิ่นผลไม้และรสชาติที่ดี

**คำสำคัญ:** ไวน์ *Saccharomyces cerevisiae* เซลล์ตรึงรูป ชิ้นผลไม้

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: onanong@swu.ac.th

# *Saccharomyces cerevisiae* Cell Immobilization on Fruit Pieces for Wine Production

**Onanong Pringsulaka*, Nuttika Suwannasai and Peechapack Somyoonsap**

## ABSTRACT

A biocatalyst was prepared by immobilizing a *Saccharomyces cerevisiae* strain on various fruit pieces including mango, guava, roseapple and otaheite gooseberry (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) for use in wine fermentation at various temperatures (25°C, 30°C and room temperature). Cell immobilization was confirmed by scanning electron microscopy. Repeated batch fermentation was carried out for 24 h and 48 h with an initial sugar concentration of 125 g/l. The ethanol concentration was 5.5% (v/v) on average and 6.1% (v/v) at the fermentation times 24 h and 48 h, respectively. The immobilized cells could be reused in at least 3 repeated-batches while retaining high ethanol productivity. Preliminary sensory tests established the fruity aroma and fine taste of the produced wines.

**Keywords:** wine, *Saccharomyces cerevisiae*, cell immobilization, fruit pieces

Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University
Corresponding author, e-mail: onanong@swu.ac.th

## บทนำ

ไวน์เป็นเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ที่มีการผลิตที่เป็นเอกลักษณ์ กล่าวคือจะใช้น้ำองุ่นเป็นวัตถุดิบและใช้ยีสต์เป็นเชื้อตั้งต้นในการหมัก อย่างไรก็ตามในช่วงกลางศตวรรษที่ 19 ได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการเปลี่ยนแปลงกระบวนการหมักไวน์แบบดั้งเดิม โดยวิธีหนึ่งที่นิยมใช้คือการตรึงเซลล์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำได้ไม่ยาก และมีข้อได้เปรียบมากกว่าการหมักโดยใช้เซลล์อิสระ (free cells) คือ สามารถหมักได้อย่างต่อเนื่อง ใช้เวลาในการบ่มเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สั้นกว่า ลดต้นทุนในการผลิต และไวน์ที่ได้ยังมีกลิ่นรสเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค [1] นอกจากนี้ยังมีการใช้เซลล์ตรึงรูปในการผลิตผลิตภัณฑ์หลายประเภท ได้แก่ การผลิตสารชีวโมเลกุล (biomolecules) ต่างๆ เช่น เอธานอล บิวธานอล และไอโซโพรพานอล การผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดมาลิค (malic acid) กรดซิตริก (citric acid) กรดแลคติก (lactic acid) และกรดกลูโคนิค (gluconic acid) การผลิตเอนไซม์ เช่น เซลลูเลส อะไมเลส และไลเปส การผลิตฮอร์โมนด้วยวิธี biotransformation จากสเตอรอยด์ และใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ตลอดจนใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตเบียร์ และไวน์ [2-4]

ในการเลือกใช้วัตถุดิบเพื่อเป็นตัวพยุงโดยทั่วไปควรใช้ชนิดที่สามารถใช้กับอาหารได้ (food grade quality) หาได้ง่ายในธรรมชาติ และราคาไม่แพง โดยในการผลิตไวน์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปนี้ได้มีรายงานการใช้ตัวพยุงหลากหลายชนิด [5, 6] โดยส่วนใหญ่จะเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่พบมากในธรรมชาติ การใช้ตัวพยุงเหล่านี้สามารถใช้ได้ทันทีหรืออาจเปลี่ยนแปลงลักษณะบางประการของสารดังกล่าวเล็กน้อย เช่น การเพิ่มรูพรุน การเพิ่มประจุที่พื้นผิว ตัวอย่างของสารอนินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวพยุงได้แก่ mineral kissiris ซึ่งได้จากวัสดุภูเขาไฟในประเทศกรีซ [7, 8] γ-alumina [9] เป็นต้น สารอินทรีย์ เช่น alginates, cellulose, carrageenan, agar, pectic acid และ chitosan เป็นต้น ส่วนตัวพยุงที่มาจากวัตถุดิบธรรมชาติ (natural supports) ที่นิยมใช้ เช่น delignified cellulosic materials (DCM) [10] และ gluten pellets (GP) [11-13] อย่างไรก็ตามตัวพยุงเหล่านี้มักมีราคาแพง จึงไม่เหมาะในการนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม

การใช้ตัวพยุงประเภทผลไม้และเปลือกผลไม้ซึ่งมีราคาถูกและหาได้ง่ายในท้องถิ่น จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการหมักไวน์ โดยมีข้อได้เปรียบกว่าการหมักโดยใช้เซลล์อิสระ คือ ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูง ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่า สามารถเพิ่มปริมาณของเอธิลอะซิเตท (ethyl acetate) ทำให้กลิ่นรสในไวน์ดีขึ้น [14, 15] และไวน์ที่ได้ยังมีกลิ่นของผลไม้นั้นๆ [16] นอกจากนี้ยังช่วยลดต้นทุนในการผลิต รวมทั้งสามารถประยุกต์ใช้ในการหมักได้อย่างต่อเนื่อง โดยได้มีการศึกษาในชิ้นแอปเปิ้ล เปลือกองุ่น ควินซ์ (quince) และแพร์ (pear) เป็นตัวพยุง (solid support) ในการหมักไวน์แบบ repeated batch และ continuous ทดแทนการหมักโดยใช้เซลล์อิสระ พบว่าให้ผลดีและเป็นที่ยอมรับทางรสสัมผัส [3, 10, 15-17] จากความสำคัญดังกล่าวในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้ผลไม้ที่หาได้ง่ายและราคาไม่แพงเป็นตัวพยุงในการตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการผลิตไวน์ โดยประเทศไทยเป็นประเทศที่มีผลไม้ตามฤดูกาลเป็นจำนวนมากในแต่ละปี จึงเหมาะที่จะใช้เป็นตัวพยุงในการผลิตไวน์ที่มีกลิ่นและรสที่เป็นเอกลักษณ์ ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะสามารถพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตไวน์ทางอุตสาหกรรม โดยใช้วัตถุดิบในประเทศ ลดต้นทุนการผลิต และเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์

## วิธีดำเนินการวิจัย

### การเตรียมเชื้อยีสต์เริ่มต้น

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในอาหารแข็งเอียง MPYD ที่ประกอบด้วย maltose 3 กรัม peptone 5 กรัม yeast extract 3 กรัม dextrose 10 กรัม และวุ้น 20 กรัม ต่อลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว MPYD 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิห้อง นำเชื้อยีสต์ที่เตรียมได้ 3% เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MPYD 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไป centrifuge ที่ 2,000xg นาน 5 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย phosphate buffer saline pH 6.0 (ประกอบด้วย phosphate 200 mM และ KCl 600 mM) [18]

### การเตรียมน้ำองุ่น

ใช้องุ่นแดงพันธุ์ Cardinal มาเตรียมเป็นน้ำองุ่นสำหรับหมักไวน์ โดยนำองุ่นมาล้างด้วย chlorine solution 20 ppm จากนั้นปั่นแยกน้ำองุ่น และนำมาปรับให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 12 องศาบริกซ์ (°Brix) คิดเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 125 กรัมต่อลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเก็บไว้ใช้ทดลองขั้นต่อไป

### การตรึงเซลล์ยีสต์ (yeast cell immobilization) ในชิ้นผลไม้

โดยทำตามวิธีของ Kourkoutas และคณะ (2001) [4] เริ่มจากนำตัวอย่างผลไม้ที่มีคุณภาพดีจากตลาดมาใช้เป็นตัวพยุงสำหรับการตรึงรูปยีสต์ ได้แก่ ฝรั่ง มะม่วง มะยม และชมพู่ จำนวน 200 กรัม หั่นให้แต่ละชิ้นมีขนาด 2-3 เซนติเมตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ใส่ผลไม้ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์ (วัดความขุ่นที่ OD 590 nm เท่ากับ 2) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MPYD broth ที่ pH 5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดการหมัก 8-12 ชั่วโมง จากนั้นแยกส่วนน้ำที่มียีสต์อิสระที่ไม่ถูกตรึงออกให้เหลือแต่ชิ้นผลไม้ที่มียีสต์เซลล์ตรึงรูป ล้างด้วยน้ำองุ่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 200 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แล้วนำไปทำการหมักกับน้ำองุ่นที่เตรียมไว้ข้างต้น

### การหมักไวน์แบบ repeated batch fermentation

โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ตรึงอยู่บนชิ้นผลไม้ข้างต้น มาเติมน้ำองุ่น 200 มิลลิลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดปริมาณน้ำตาลที่เหลือโดยใช้ hand refractometer จากนั้นเทส่วนน้ำองุ่นที่หมักแล้วออกเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอธานอล ส่วนผลไม้ที่มีเซลล์ยีสต์ตรึงรูปให้ทำการล้างด้วยน้ำองุ่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 200 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ทำการหมักแบบ repeated batch เช่นนี้จำนวน 3 รอบ โดยทำที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) 25 และ 30 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับไวน์ที่หมักด้วยเซลล์อิสระ [18]

**การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ยีสต์**

โดยตัดชิ้นผลไม้ที่มีเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่ผ่านการหมักทุกครั้งจำนวน 10 กรัม นำมาทำให้เป็นเนื้อเดียวกันใน Ringer solution 90 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย NaCl 90 กรัม $CaCl_2$ 2 กรัม และ KCl 2 กรัม ต่อลิตร นับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วย haemocytometer และตรวจสอบการเกาะติดของยีสต์บนชิ้นผลไม้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy) ยี่ห้อ Hitachi รุ่น S510 (Japan) [15]

**การวิเคราะห์ปริมาณเอธานอล**

นำน้ำองุ่นที่ผ่านการหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นผลไม้และเซลล์อิสระมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-2010 โดยใช้ก๊าซไนโตรเจนเป็นตัวพา (carrier gas) ที่อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจสอบโดยใช้ FID detector ที่อุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส [19] และเปรียบเทียบปริมาณเอธานอลที่ผลิตได้กับกราฟมาตรฐานเอธานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

**การวิเคราะห์กลิ่นรส**

ทดสอบโดยการชิมและให้คะแนน 0-10 (0 ไม่ยอมรับ และ 10 ดีเยี่ยม) ด้านรสชาติ (taste) และกลิ่น (aroma) โดยเปรียบเทียบระหว่างไวน์ที่หมักด้วยเซลล์อิสระกับไวน์ที่หมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นผลไม้

## ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

**การตรึงเซลล์และการหมัก**

การหมักไวน์โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนชิ้นผลไม้ชนิดต่างๆ ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 โดยพบว่า ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เกาะอยู่ที่ชิ้นผลไม้จะมีประมาณ 6.29-7.49 log cell/ml อย่างไรก็ตาม ในการหมักแบบ repeated batch ในรอบที่ 2 และรอบที่ 3 หลังจากที่ล้างและเปลี่ยนน้ำองุ่นแล้วนำมานับปริมาณของเซลล์ยีสต์ในวันที่ 0 พบว่าปริมาณของเซลล์ยีสต์จะลดลงเล็กน้อย (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งอาจเนื่องมาจากชิ้นผลไม้เกิดการเปื่อยจึงทำให้เซลล์ยีสต์หลุดจากการยึดเกาะไปในขณะที่ล้าง อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ปริมาณยีสต์จะเพิ่มขึ้นจนใกล้เคียงกับในการหมักรอบแรก โดยการที่เซลล์ยีสต์ถูกตรึงบนชิ้นผลไม้นั้นเกิดจากพันธะไฮโดรเจน และแรงแวนเดอร์วาวส์ (van der Waals force) [19] หรือการดูดซับระหว่างประจุบนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์และชิ้นผลไม้ [12] ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาการตรึงเซลล์ของยีสต์บนแอปเปิ้ล [4] และเปลือกแตงโม [19] นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเซลล์ที่คงเหลืออยู่บนชิ้นผลไม้ในการหมักแบบตรึงเซลล์จะมากกว่าการหมักแบบอิสระ ทั้งนี้อาจเกิดจากยีสต์สามารถใช้น้ำตาลในผลไม้ที่เป็นตัวพยุงนอกเหนือจากการใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำองุ่นทำให้มีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้น

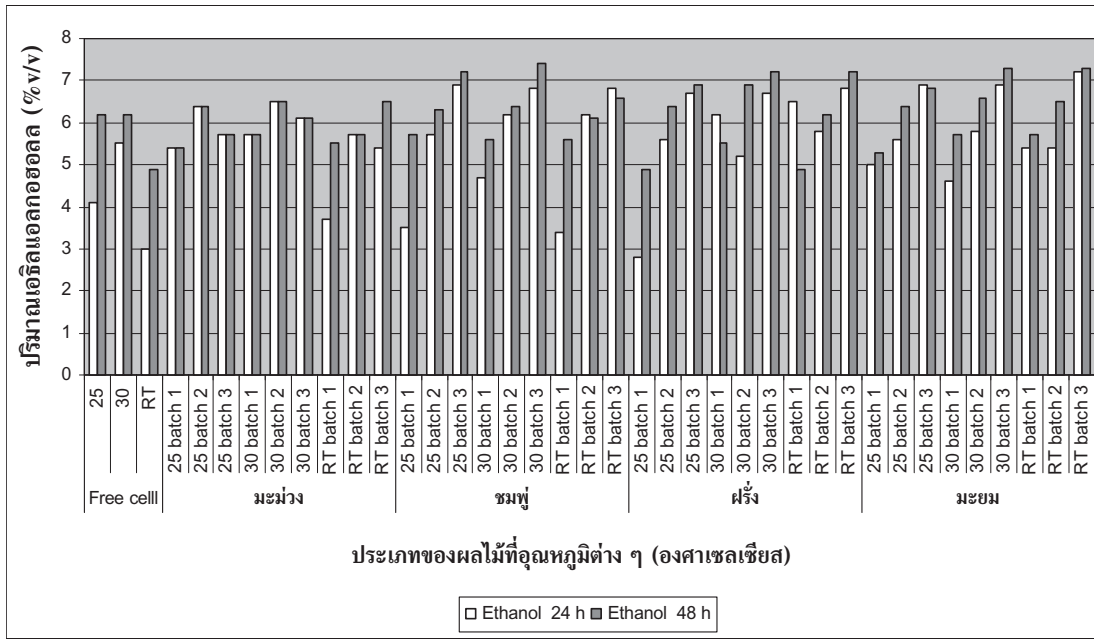
**ตารางที่ 1** ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้จากการหมักแบบ repeated batch fermentation ในผลไม้ชนิดต่างๆ และการหมักด้วยเซลล์อิสระ ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน โดยใช้เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง

| Fruit | Temp (˚C) | Repeated batches | Ethanol concentration (% v/v) | | Free cell concentration (log cell/ml) | Residual sugar (˚Brix) | Conversion (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 24 h | 48 h | | | |
| Free | 25 | | 4.1 | 6.2 | 6.35 | 7.2 | 39.988 |
| celll | 30 | | 5.5 | 6.2 | 6.47 | 6.6 | 44.989 |
| | อุณหภูมิห้อง | | 3.0 | 4.9 | 6.29 | 7.6 | 36.654 |
| มะม่วง | 25 | 1 | 5.4 | 5.4 | 6.79 | 4 | 66.66 |
| | | 2 | 6.4 | 6.4 | 6.82 | 3.4 | 71.661 |
| | | 3 | 5.7 | 5.7 | 6.86 | 3.4 | 71.661 |
| | 30 | 1 | 5.7 | 5.7 | 6.89 | 3 | 74.995 |
| | | 2 | 6.5 | 6.5 | 6.86 | 3 | 74.995 |
| | | 3 | 6.1 | 6.1 | 6.88 | 3.8 | 68.327 |
| | อุณหภูมิห้อง | 1 | 3.7 | 5.5 | 6.95 | 4 | 66.66 |
| | | 2 | 5.7 | 5.7 | 6.92 | 3 | 74.995 |
| | | 3 | 5.4 | 6.5 | 6.88 | 3.6 | 69.994 |
| ชมพู่ | 25 | 1 | 3.5 | 5.7 | 6.97 | 4 | 66.66 |
| | | 2 | 5.7 | 6.3 | 6.83 | 3.5 | 70.8275 |
| | | 3 | 6.9 | 7.2 | 6.80 | 2.7 | 77.4955 |
| | 30 | 1 | 4.7 | 5.6 | 7.38 | 3.4 | 71.661 |
| | | 2 | 6.2 | 6.4 | 6.99 | 2.8 | 76.662 |
| | | 3 | 6.8 | 7.4 | 6.94 | 2.0 | 83.33 |
| | อุณหภูมิห้อง | 1 | 3.4 | 5.6 | 7.38 | 3.5 | 70.8275 |
| | | 2 | 6.2 | 6.1 | 7.13 | 3.0 | 74.995 |
| | | 3 | 6.8 | 6.6 | 6.99 | 2.5 | 79.1625 |
| ฝรั่ง | 25 | 1 | 2.8 | 4.9 | 7.10 | 4 | 66.66 |
| | | 2 | 5.6 | 6.4 | 6.94 | 4.6 | 61.659 |
| | | 3 | 6.7 | 6.9 | 6.89 | 3.2 | 73.328 |
| | 30 | 1 | 6.2 | 5.5 | 6.98 | 4 | 66.66 |
| | | 2 | 5.2 | 6.9 | 6.95 | 3.6 | 69.994 |
| | | 3 | 6.7 | 7.2 | 6.89 | 3 | 74.995 |
| | อุณหภูมิห้อง | 1 | 6.5 | 4.9 | 7.10 | 6.4 | 46.656 |
| | | 2 | 5.8 | 6.2 | 6.85 | 4.2 | 64.993 |
| | | 3 | 6.8 | 7.2 | 6.88 | 3 | 74.995 |

**ตารางที่ 1** (ต่อ)

| Fruit | Temp (°C) | Repeated batches | Ethanol concentration (% v/v) | | Free cell concentration (log cell/ml) | Residual sugar (°Brix) | Conversion (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 24 h | 48 h | | | |
| มะยม | 25 | 1 | 5.0 | 5.3 | 7.38 | 4 | 66.66 |
| | | 2 | 5.6 | 6.4 | 7.33 | 3.0 | 74.995 |
| | | 3 | 6.9 | 6.8 | 6.97 | 2.5 | 79.1625 |
| | 30 | 1 | 4.6 | 5.7 | 7.38 | 3.5 | 70.8275 |
| | | 2 | 5.8 | 6.6 | 7.25 | 2.7 | 77.4955 |
| | | 3 | 6.9 | 7.3 | 6.92 | 2.0 | 83.33 |
| | อุณหภูมิห้อง | 1 | 5.4 | 5.7 | 7.45 | 3.5 | 70.8275 |
| | | 2 | 5.4 | 6.5 | 7.00 | 3.0 | 74.995 |
| | | 3 | 7.2 | 7.3 | 6.44 | 2.7 | 77.4955 |

จากการทดลองยังพบว่าเมื่อตรึงเซลล์ยีสต์บนชิ้นผลไม้ ยีสต์จะมีการใช้น้ำตาลมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ และสามารถเปลี่ยนเป็นเอธานอลได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบโดยรวมพบว่าผลไม้ทุกชนิดให้ปริมาณเอธานอลอยู่ในช่วง 2.8-7.3% (v/v) โดยมีค่าเฉลี่ยโดยรวมเป็น 5.5% (v/v) เมื่อใช้เวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง และอยู่ในช่วง 4.9-7.4% (v/v) โดยมีค่าเฉลี่ยโดยรวมเป็น 6.1% (v/v) เมื่อใช้เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง โดยปริมาณเอธานอลสูงสุดที่ผลิตได้ในผลไม้แต่ละชนิด คือ มะม่วง ชมพู่ ฝรั่ง และมะยม เป็น 6.5, 7.4, 7.2 และ 7.3% v/v ตามลำดับ และจะมีปริมาณของน้ำตาลเหลือเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 2.0-6.4 องศาบริกซ์ โดยเมื่อเปรียบเทียบโดยการหมักโดยใช้เซลล์อิสระ พบว่า ให้ปริมาณเอธานอลในช่วง 3.0-4.1% (v/v) เมื่อใช้เวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง และ 4.9-6.2% (v/v) เมื่อใช้เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมส่วนใหญ่อยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) และเมื่อทำการหมักแบบ repeated batch จำนวน 3 รอบ พบว่าปริมาณเอธานอลที่ผลิตได้ยังคงสูงกว่าการหมักในรอบแรก อย่างไรก็ตามปริมาณเอธานอลที่ 24 และ 48 ชั่วโมงไม่ต่างกันมากนัก (รูปที่ 1) ดังนั้นในการนำไปประยุกต์ใช้จึงควรเลือกใช้การหมักที่อุณหภูมิห้องและทำการหมักเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้เมื่อวัดปริมาณเมธานอลพบว่า ไม่มีเมธานอลเกิดขึ้น (ไม่ได้แสดงข้อมูล)




**รูปที่ 1** การเปรียบเทียบปริมาณเอธานอลในผลไม้ทั้ง 4 ชนิดที่อุณหภูมิต่างๆ

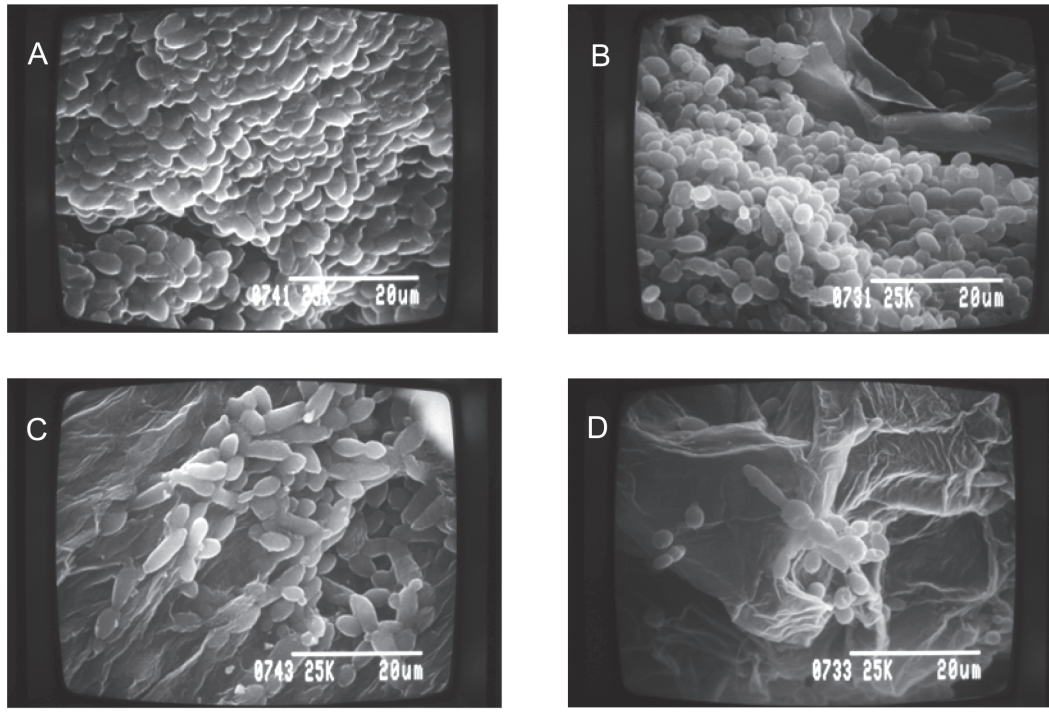
เมื่อทำการเปรียบเทียบตัวพยุงต่างๆ ที่ได้เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 2) พบว่า การใช้ผลไม้เป็นตัวพยุงในการทดลองนี้จะสามารถผลิตเอธานอลอยู่ในระดับปานกลาง และใกล้เคียงกับการใช้ตัวพยุงที่เป็นเปลือกส้ม แต่น้อยกว่าการใช้ตัวพยุงที่เป็น delignified cellulosic materials ชิ้นควินซ์ แอปเปิ้ล และแตงโม อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ของยีสต์และอุ่นที่นำมาใช้ วัตถุดิบและสภาวะที่ใช้ ระยะเวลาในการหมัก การเกาะเข้ากับพื้นผิวตัวพยุงที่แตกต่างกัน ทำให้ปริมาณของเอธานอลแตกต่างกัน

**ตารางที่ 2** การเปรียบเทียบพารามิเตอร์ที่ใช้ในการหมักไวน์โดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้ตัวพยุงชนิดต่างๆ

| ตัวพยุง (carrier) | medium | Initial sugar (g/l) | Ferm. time (h) | Residual sugar (g/l) | Ethanol (g/l) | Conversion (%) | Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| mineral kissiris | กลูโคส | 113 | 16 | 7.5 | 48.0 | 93.4 | Kana และคณะ (1989) [20] |
| delignified cellulosic materials | Molasses/sucrose | 172 | 36 | 10.2 | 104.0 | 94.0 | Iconomou และคณะ (1995) [21] |
| ชิ้นควินซ์ | น้ำองุ่น | 185 | 28 | 0.1 | 84.5 | 99.9 | Kourkoutas และคณะ (2003) [15] |
| ชิ้นแอปเปิ้ล | น้ำองุ่น | 206 | 80 | 30.8 | 85.0 | 85.0 | Kourkoutas และคณะ (2001) [4] |
| เปลือกส้ม | กลูโคส | 125 | 9 | 4.0 | 51.4 | 96.8 | Plessas และคณะ (2007) [22] |
| เปลือกแตงโม | น้ำองุ่น | 200 | 22 | <0.3 | 95 | 99.17 | Antony (1984) [19] |
| ชิ้นมะม่วง | น้ำองุ่น | 125 | 48 | 31 | 51.35 | 75.2 | การทดลองนี้ |
| ชิ้นชมพู่ | น้ำองุ่น | 125 | 48 | 20.8 | 58.46 | 83.3 | การทดลองนี้ |
| ชิ้นฝรั่ง | น้ำองุ่น | 125 | 48 | 31 | 56.88 | 75.2 | การทดลองนี้ |
| ชิ้นมะยม | น้ำองุ่น | 125 | 48 | 28.1 | 57.67 | 77.5 | การทดลองนี้ |

**การตรวจสอบการเกาะติดของยีสต์บนชิ้นผลไม้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด**

จากการตรวจสอบเซลล์ยีสต์ที่เกาะอยู่ที่ชิ้นผลไม้ พบว่ายีสต์สามารถเพิ่มจำนวนได้บนเนื้อเยื่อผิวของชิ้นผลไม้ (รูปที่ 2) ซึ่งเป็นผลมาจากการเกาะยึดของยีสต์กับบริเวณช่องว่างในเนื้อผลไม้ โดยอาศัยพันธะไฮโดรเจน และแรงแวนเดอร์วาวส์ [19] หรือการดูดซับระหว่างประจุบนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์และชิ้นผลไม้ [12] จะเห็นว่าเซลล์ยีสต์มีความสามารถในการยึดเกาะในผลไม้ที่เป็นตัวพยุงทั้ง 4 ชนิด โดยส่วนใหญ่ไม่ถูกชะไปหลังจากการล้างและเปลี่ยนน้ำองุ่น ทำให้การสร้างเอธานอลเพิ่มขึ้นเมื่อมีการหมักซ้ำแบบ repeated batch




**รูปที่ 2** การตรวจสอบการเกาะติดของยีสต์บนชิ้นผลไม้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด A: มะม่วง B: ชมพู่ C: ฝรั่ง และ D: มะยม

**การวิเคราะห์กลิ่นรส**

การวิเคราะห์กลิ่นรสจากอาสาสมัคร 10 คน พบว่า ให้รส และกลิ่น ได้คะแนนความพึงพอใจโดยรวมที่ได้เฉลี่ยเท่ากับ 7.5 และ 8.5 ตามลำดับ ซึ่งไม่ต่างจากการหมักโดยใช้เซลล์อิสระซึ่งให้รส และกลิ่น ได้คะแนนความพึงพอใจโดยรวมที่ได้เฉลี่ยเท่ากับ 8.6 และ 8.0 ตามลำดับ นอกจากนี้การหมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปในผลไม้มีกลิ่นของผลไม้ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของผลไม้ที่ใช้ตรึงเซลล์แต่ละชนิด

## สรุปผลการวิจัย

จากการนำชิ้นผลไม้ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ฝรั่ง มะม่วง มะยม และชมพู่ มาเป็นตัวพยุงในการหมักไวน์ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าสามารถใช้เป็นเซลล์ตรึงรูปในการผลิตไวน์ได้เป็นอย่างดี และสามารถหมักซ้ำได้หลายรอบ ให้ปริมาณเอธานอลสูงกว่าการหมักโดยใช้เซลล์อิสระ เมื่อใช้เวลาเท่ากัน และสามารถใช้อุณหภูมิในการหมักได้หลายอุณหภูมิ นอกจากนี้ผลไม้ที่นำมาใช้เป็นตัวพยุงยังหาได้ง่าย ราคาถูก ให้กลิ่นผลไม้ และรสชาติดี ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ทางการค้า และอุตสาหกรรมในการผลิตไวน์ของประเทศต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย (เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์) ประจำปี 2552 และขอขอบคุณ นางสาวอรพรรณ สมุทรสุวรรณ นางสาววรรณิศา เครือแสง นางสาววาสนา บุญมี และนางสาวปริชญา สุโขมีทรัพย์ ที่ช่วยให้งานวิจัยสำเร็จไปด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

1. Kennedy, J., Barker, S., and Humphreys, S. 1976. Microbial Cell Living Immobilized on Metal Hydroxides. *Nature* 261: 242-244.
2. Mensour, N. A., Margaritis, A., Briens, C. L., Pilkington, H., and Russell, I. 1997. New Developments in the Brewing Industry Using Immobilised Yeast Cell Bioreactor Systems. *Journal of the Institute of Brewing* 3: 363-370.
3. Pilkington, P. H., Margaritis, A., Mensour, N. A., and Russel, I. 1998. Fundamentals of Immobilized Yeast Cells for Continuous Beer Fermentation: A Review. *Journal of the Institute of Brewing* 104: 19-31.
4. Kourkoutas, Y., Komaitis, M. Koutinas, A. A., and Kanellaki, M. 2001. Wine Production Using Yeast Immobilized on Apple Pieces at Low and Room Temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 74: 1417-1425.
5. Colagrande, O., Silva, A., and Fumi, M. D. 1994. Recent Applications of Biotechnology in Wine Production. *Biotechnology Progress* 10: 2-18.
6. Divies, C., Cachon, R., Cavin, J. F., and Prevost, H. 1994. Theme 4: Immobilized Cell Technology in Wine Production. *Critical Reviews in Biotechnology* 14: 135-153.
7. Bakoyianis, V., Kanellaki, M., Kalliafas, A., and Koutinas, A. A. 1992. Low Temperature Wine-Making by Immobilized Cells on Mineral Kissiris. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1293-1296.
8. Bakoyianis, V., Kana, K., Kalliafas, A., and Koutinas, A. A. 1993. Low Temperature Continuous Wine-Making by Kissiris-Supported Biocatalyst: Volatile By-Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 465-468.
9. Loukatos, P., Kiaris, M., Ligas, I., Bourgos, G., Kanellaki, M., Komaitis, M., and Koutinas, A. A. 2000. Continuous Wine-Making by γ-Alumina-Supported Biocatalyst. Quality of the Wine and Distillates. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 89: 1-13.
10. Bardi, E. P., Koutinas, A. A., Soupioni, M., and Kanellaki, M. 1996. Immobilization of Yeast on Delignified Cellulosic Material for Low Temperature Brewing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 463-467.

11. Bardi, E. P., Soupioni, M., Koutinas, A. A., and Kanellaki, M. 1996. Effect of Temperature on the Formation of Volatile By-Products in Brewing by Immobilized Cells. *Food Biotechnology* 10: 203-217.
12. Bardi, E. P., Bakoyianis, V., Koutinas, A. A., and Kanellaki, M. 1996. Room Temperature and Low Temperature Wine Making Using Yeast Immobilized on Gluten Pellets. *Process Biochemistry* 31: 425-430.
13. Bardi, E., Koutinas, A. A., and Kanellaki, M. 1997. Room and Low Temperature Brewing with Yeast Immobilized on Gluten Pellets. *Process Biochemistry* 32: 691-696.
14. Kourkoutas, Y., Koutinas, A. A., Kanellaki, M., Banat, I. M., and Marchant, R. 2002. Continuous Wine Fermentation Using a Psychrophilic Yeast Immobilized on Apple Cuts at Different Temperatures. *Food Microbiology* 19: 127-134.
15. Kourkoutas, Y., Komaitis, M., Koutinas, A. A., Kaliafas, M., Kanellaki, M., Marchant, R., and Banat, I. M. 2003. Wine Production Using Yeast Immobilized on Quince Pieces Biocatalyst at Temperatures between 30°C and 0°C. *Food Chemistry* 82: 353-360.
16. Mallouchos, A., Reppa, P., Aggelis, G., Koutinas, A. A., Kanellaki, M., and Komaitis, M. 2002. Grape Skins as a Natural Support for Yeast Immobilization. *Biotechnology Letters* 23: 1331-1335.
17. Mallios, P., Kourkoutas, Y., Iconomopoulou, M., Koutinas, A. A., Psarianos, C., Marchant, R., and Banat, I. M. 2004. Low-Temperature Wine Making Using Yeast Immobilized on Pear Pieces. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 1615-1623.
18. Reddy, L. V. A., Reddy, Y. H. K., and Reddy, O. V. S. 2006. Wine Production by Guava Piece Immobilized Yeast from Indian Cultivar Grapes and Its Volatile Composition. *Biotechnology* 5(4): 449-454.
19. Antony, J. C. 1984. Malt Beverages and Malt Brewing Materials: Gas Chromatographic Determination of Ethanol in Beer. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 67: 192-193.
20. Kana, M., Kanellaki, C., Psarianos, A., and Koutinas, A. 1989. Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Mineral Kissiris. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 68(2): 144-147.
21. Iconomou, L., Psarianos, C., and Koutinas, A. 1995. Ethanol Fermentation Promoted by Delignified Cellulosic Material. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79(3): 294-296.
22. Plessas, S., Bekatorou, A., Koutinas, A. A., Soupioni, M., and Marchant, R. 2007. Use of *Saccharomyces cerevisiae* Cells Immobilized on Orange Peel as Biocatalyst for Alcoholic Fermentation. *Bioresource Technology* 98: 860-865.

*ได้รับบทความวันที่ 28 มิถุนายน 2553*
*ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 14 กรกฎาคม 2553*