ประชากรจุลินทรีย์และคุณภาพของสาโท การเปรียบเทียบระหว่างการใช้หัวเชื้อลูกแป้งและเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง

นางสาว อำภา หลวงคล้ายโพธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MICROBIAL POPULATION AND QUALITY OF SATO: COMPARISON BETWEEN THE USE OF LOOG PANG AND THE MIXED PURE CULTURES ISOLATED FROM THE LOOG PANG

Miss Ampa Luangkhlaypho

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประชากรจุลินทรีย์และคุณภาพของสาโท การเปรียบเทียบระหว่างการใช้หัวเชื้อลูกแป้งและเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง
โดย	นางสาว อำภา หลวงคล้ายโพธิ์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

……... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี)

…… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

…… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์)

…… กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

…… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ประดิษฐ์ ครุวัณณา)

อำภา หลวงคล้ายโพธิ์: ประชากรจุลินทรีย์และคุณภาพของสาโท การเปรียบเทียบระหว่างการใช้หัวเชื้อลูกแป้งและเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง. (MICROBIAL POPULATION AND QUALITY OF SATO: COMPARISON BETWEEN THE USE OF LOOG PANG AND THE MIXED PURE CULTURES ISOLATED FROM THE LOOG PANG) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ชุลี ยมภักดี, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ. ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์, ผศ. ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์ 109 หน้า.

สาโท เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านของไทย มีลูกแป้งเป็นหัวเชื้อในการผลิต ปัญหาของการผลิตสาโทในระดับอุตสาหกรรม คือ คุณภาพไม่คงที่ในทุกชุดการผลิต ซึ่งสาเหตุสำคัญมาจากคุณภาพของลูกแป้ง แนวทางการแก้ปัญหา โดยการใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่คัดแยกมาจากลูกแป้งที่มีคุณภาพดี มาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตแทนการใช้ลูกแป้ง งานวิจัยนี้มุ่งหมายเพื่อตรวจติดตามประชากรจุลินทรีย์ตลอดกระบวนการหมักและเปรียบเทียบคุณภาพของสาโท ระหว่างสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งที่คัดเลือกแล้วและจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่คัดแยกมาจากลูกแป้งนั้น ในงานวิจัยก่อนหน้าได้มีการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในลูกแป้งและสาโทโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่วิธีดังกล่าว มีข้อจำกัดมากมาย ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) ซึ่งเป็นวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลที่ช่วยในการติดตามประชากรจุลินทรีย์ โดยไม่ต้องเพาะเลี้ยงเชื้อก่อน จากรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ ซึ่งตรวจสอบโดยวิธี DGGE พบการเปลี่ยนแปลงรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่บ่งบอกถึงราสองสายพันธุ์ (*Rhizopus oligosporus* และ *Mucor racemosus*) และยีสต์ชนิด non – *Saccharomyces* สองสายพันธุ์ (*Pichia anomala* และ *Saccharomycopsis fibuligera*) ในช่วงแรกของการหมัก (วันที่ 0-3) ในวันที่ 4 ของการหมัก เมื่อมีการเปลี่ยนสภาวะจากของแข็งไปเป็นสภาวะของเหลวในการหมัก พบการเปลี่ยนแปลงประชากร ยีสต์ชนิด *Saccharomyces cerevisiae* ที่เจริญเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดและเป็นประชากรหลักแทนที่จุลินทรีย์พวกแรก ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติก คือ *Pediococcus pentosaceus* สามารถพบได้ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 7 ของการหมัก ผลการทดลองที่ได้จากวิธี DGGE สอดคล้องกับผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ ในส่วนของคุณภาพของสาโท ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ สารประกอบให้กลิ่นและการทดสอบทางประสาทสัมผัส จากผลการทดลองที่ได้พบว่า รูปแบบของกรดอินทรีย์และสารประกอบให้กลิ่นในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้ง และ เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งนั้นไม่แตกต่างกัน ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งที่คัดเลือกนั้นๆ จึงสามารถสรุปได้ว่า สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมให้คุณภาพที่ดีเท่ากับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้ง สามารถใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมเป็นหัวเชื้อในการผลิตสาโทแทนการใช้ลูกแป้ง เพื่อให้ได้สาโทที่มีคุณภาพที่ดี สม่ำเสมอกันในทุกๆครั้งการผลิต ซึ่งแนวทางนี้จะเป็นการนำไปสู่การแก้ไขปัญหาของคุณภาพสาโทที่ไม่คงที่ในแต่ละชุดการผลิต ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ภาควิชา จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....
ปีการศึกษา 2552	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....
	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

#4972612923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEYWORDS : LOOGPANG / SATO / DGGE / QUALITY

AMPA LUANGKHLAYPHO: MICROBIAL POPULATION AND QUALITY OF SATO: COMPARISON BETWEEN THE USE OF LOOG PANG AND THE MIXED PURE CULTURES ISOLATED FROM THE LOOG PANG. THESIS ADVISOR : ASST.PROF. CHULEE YOMPAKDEE, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASST.PROF. KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Ph.D., ASST.PROF. NATCHANUN LEEPIPATPIBOON, Ph.D., 109 pp.

Sato is a traditional Thai rice wine produced from the microbial starter so called Loog pang. To date, industrial manufacture of Sato production faces problems which largely stem from the inconsistency in the quality of Sato produced from each batch. Important cause due to inconsistency from its starter which leads to variation in quality and stability of the product. To solve this problem, the use of mixed pure cultures of selected good starter should lead to the consistency in Sato quality. In this study we compared microbial communities and quality of Sato produced by Loog pang NP1 and the mixed pure starter cultures isolated from the Loog pang. Historically, conventional cultivation methods were used to isolate the microorganisms in Loog pang and Sato. However, the cultivation-dependent approach has many limitations. To date, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) is a molecular technique for monitoring dynamic changes without cultivation requirement. The DGGE profile of microbial dynamics during Sato production revealed that two filamentous fungi (*Rhizopus oligosporus* and *Mucor racemosus*) and two non – *Saccharomyces* yeasts (*Pichia anomala* and *Saccharomycopsis fibuligera*) were detected at the initial stage of the fermentation (day 0-3). At day 4, when the cultivation was switched from solid-state to liquid phase fermentation, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was prominent and replaced the previous microbial populations. Lactic acid bacteria corresponded to *Pediococcus pentosaceus* was detected since day zero until day 7. The DGGE results were consistent with those obtained by the culture-dependent method. The qualities of Sato including organic acids, volatile compounds and sensory test were analyzed. The profiles of organic acids and volatile compounds were found no difference. In addition, no significant difference in sensory quality was also found between mixed pure starter cultures and the Loog pang ($p < 0.05$). It could be concluded that either Sato produced from the mixed pure starter cultures isolated from the Loog pang or that from the selected Loog pang yield the same quality. Therefore, mixed pure starter cultures could be used in place of Loog pang to produce Sato with good quality and consistency between batches. The results obtained will lead to solve the problem of quality inconsistency of Sato produced between batches in commercial scale of Sato production.

Department : Microbiology Student's Signature .....
Field of Study : Industrial Microbiology Advisor's Signature .....
Academic Year : 2009 Co-Advisor's Signature .....
Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน และรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ประดิษฐ์ ครุวัณณา ที่กรุณารับเป็นกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆเกี่ยวกับการทดสอบทางประสาทสัมผัสแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ ทองทา คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่เอื้อเฟื้อ คอลัมน์ Animex HPX-87H สำหรับการวิเคราะห์ กรดอินทรีย์

กราบขอบพระคุณ อาจารย์ ประดิษฐ์ ครุวัณณา อาจารย์ มนตรี เชาวน์สังเกต อาจารย์วัลลภ อิมะไชย์ อาจารย์ ดร. เชิดชัย เชี่ยวธีรกุล อาจารย์ทรงจิตร พูนลาภ คุณจรูญ จำปาปน คุณธวัชชัย เทพพิทักษ์ คุณวัฒน์ วรรลยางกูร คุณ กมลศักดิ์ ตั้งธรรมนิยม และ คุณ ปิยพงษ์ กาญจนธานนท์ ที่เป็นกรรมการในการทดสอบทางประสาทสัมผัส

กราบขอบพระคุณ คุณสุวิทย์ จันหวร ศาลากลางจังหวัดหนองคาย ที่ให้ความกรุณาเก็บรวบรวมลูกแป้งบางส่วนที่ใช้ในงานวิจัย

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ บุคลากร ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอบคุณ คุณบัญชา ปรีจิต คุณอภิชญา เตชะวสัญญู คุณสุพิชชา วัฒนะประเสริฐ รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับทุกความห่วงใย ความช่วยเหลือ และกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา น้อง และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโท..... 5

2.2 กระบวนการที่เกิดขึ้นในสาโท..... 6

2.3 องค์ประกอบหลักของลูกแป้งสุรา..... 8

2.4 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท..... 12

2.5 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)..... 14

2.6 ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของสาโท..... 15

2.7 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีที่สำคัญในการผลิตสาโท..... 15

2.8 สารประกอบที่ให้กลิ่นรสในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์..... 19

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 33

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย……..... 33

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ…… 34

3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง …….. 36

3.3.1 ผลิตสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมของ รา ยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1..... 37

3.3.2 ศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ในสาโทโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี PCR – DGGE…….. 38

บทที่		หน้า
	3.3.3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆของสาโทที่ได้.....	39
	3.3.4 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น (Volatile compounds) ในสาโทที่ได้…….	41
	3.3.5 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory taste) ในสาโท.....	41
4 ผลการทดลอง…….....		42
	4.1 ผลิตสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมของ รา ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1.....	42
	4.2 ติดตามประชากรของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักสาโทโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อควบคู่กับวิธี PCR – DGGE.....	47
	4.3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆของสาโทที่ได้.....	53
	4.4 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น (Volatile compound) ในสาโทที่ได้.....	59
	4.5 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory taste) ในสาโท.....	66
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ……		70
	5.1 ผลิตสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมของ รา ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1.....	70
	5.2 ติดตามประชากรของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักสาโทโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อควบคู่กับวิธี PCR – DGGE.....	71
	5.3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆของสาโทที่ได้.....	73
	5.4 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น (Volatile compound) ในสาโทที่ได้.....	75
	5.5 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory taste) ในสาโท.....	75
รายการอ้างอิง.....		78
ภาคผนวก.....		84
	ภาคผนวก ก.....	85
	ภาคผนวก ข.....	88
	ภาคผนวก ค.....	92
	ภาคผนวก ง.....	95
	ภาคผนวก จ.....	96
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....		109

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงองค์ประกอบและปริมาณของสารประกอบเอสเทอร์และฟูเซลออยล์ที่พบในเครื่องดื่มแอลกอออล์ชนิดต่างๆ.....	19
2.2	แสดงองค์ประกอบและปริมาณของสารประกอบเอสเทอร์และฟูเซลออยล์ที่พบในสาโทต่างๆ.....	20
2.3	กรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นและฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในไวน์องุ่น.....	22
4.1	การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันในฐานข้อมูลใน GenBank.....	45
4.2	แสดงปริมาณ ยีสต์ รา และ แบคทีเรียกรดแลคติกจากลูกแป้งสุรา NP1 ในวันที่ 0.	45
4.3	การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1.....	47
4.4	แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1.....	48
4.5	การจำแนกชนิดของรา ยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 26S และ16S ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ตามลำดับ เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันในฐานข้อมูลใน GenBank.....	52
4.6	แสดงองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1.....	53
4.7	แสดงปริมาณของสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของฟูเซลแอลกอฮอล์ ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนเท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่าลูกแป้ง NP1 ที่วิเคราะห์โดยวิธี GC-MS……..	61
4.8	แสดงปริมาณของสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของเอสเทอร์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนเท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่าลูกแป้ง NP1 ที่วิเคราะห์โดยวิธี GC-MS……..	64
ข1	แสดงความเข้มข้นของสารมาตรฐานรวมของกรดอินทรีย์ กลีเซอรอล และเอทานอล.……...……	90

ง1	แสดงค่าคะแนนรวมเฉลี่ยของผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโททางการค้าชนิดที่ 1 และ 2…….....	95
ง2	แสดงค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสทั้ง สี, กลิ่น, รส และการยอมรับของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1……	95
จ1	วิเคราะห์ผล Organic acid และ Glycerol ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ในอัตราส่วนต่างๆกัน ด้วย SPSS v16.0……	96
จ2	วิเคราะห์ผล Volatile compound ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ในอัตราส่วนต่างๆกัน ด้วย SPSS v16.0 …….....	99
จ3	วิเคราะห์ผล Sensory taste ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ในอัตราส่วนต่างๆกัน ด้วย SPSS v16.0 …….	104

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แสดงแผนภูมิการผลิตลูกแป้งแบบภูมิปัญญาท้องถิ่น.....	11
2.2	การเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล.....	16
2.3	การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล.....	16
2.4	แสดงเมแทบอลิซึมของยีสต์ภายใต้ภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ.....	17
2.5	แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดอะมิโนไปเป็นฟูเซลแอลกอฮอล์.....	22
2.6	การสร้างสารประกอบทุติยภูมิของกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ที่มีกรดไพรูวิกเป็นสารตั้งต้น.....	26
2.7	แสดงวิถีการย่อยสลายกลูโคสเป็นกลีเซอรอล ซัคซิเนตและสารประกอบอื่นๆ โดยยีสต์ ในภาวะที่ไม่ใช้อากาศ.....	28
2.8	การเกิดเอสเทอริฟิเคชันระหว่างกรดและแอลกอฮอล์ โดยมีเอนไซม์เอสเทอเรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	30
2.9	การเกิดเอสเทอริฟิเคชันระหว่างการหมักโดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลกอฮอล์อะเซทิลทรานสเฟอเรส และ แอลกอฮอล์เอซิลทรานสเฟอเรส.....	31
4.1	แสดงการแบ่งกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด ที่แยกได้บนอาหาร MRS agar โดยแบ่งได้ตามรูปแบบชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอ โดยวิธี PCR-RAPD.....	43
4.2	แสดงตัวแทนกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกได้ตามรูปแบบชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอ โดยวิธี PCR-RAPD.....	44
4.3	การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1.....	47
4.4	การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1.....	48
4.5	แสดงแถบดีเอ็นเอของยีสต์และราจากน้ำหมักในวันที่ 0 1 2 3 4 5 6 7 9 11 และ 13 โดยวิธี PCR – DGGE.....	50
4.6	แสดงแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำหมักในวันต่างๆโดยวิธี PCR – DGGE.....	51
4.7	แสดงปริมาณของ กรดซิตริก กรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดแอซิติก และกลีเซอรอล ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม.....	55

4.8 แสดงรูปแบบของสารประกอบให้กลิ่นในสาโทโดยวิธี GC-MS โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ในอัตราส่วนต่างๆ..... 59
4.9 แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (sensory taste) ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโททางการค้าชนิดที่ 1 และ 2..... 67
4.10 แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (sensory taste) ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1..... 68
4.11 แสดงผลคะแนนเฉลี่ยของการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (sensory taste) ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1..... 69
จ1 แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมของกรดอินทรีย์และกลีเซอรอลที่ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 107
จ2 แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารประกอบให้กลิ่นที่วิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) 108

บทที่ 1

บทนำ

การผลิตสาโท (ไวน์ข้าว) โดยใช้ลูกแป้งสุราเป็นที่รู้จักกันมานานแล้วในประเทศแถบเอเชีย โดยในประเทศไทยนั้น นิยมผลิตและบริโภคกันเองภายในท้องถิ่น มีชื่อเรียกต่างกันไปตามแต่ละท้องที่ เช่น สาโท (เหล้าโท) อุ และน้ำขาว เป็นต้น ผู้ผลิตก็ไม่นิยมที่จะจดบันทึกรายละเอียดวิธีการทำเป็นลายลักษณ์อักษร แต่จะถ่ายทอดกันภายในหมู่เครือญาติจึงทำให้การผลิตสาโทของประเทศไทยไม่ก้าวหน้าเท่าที่ควร (มนตรี เชาวน์สังเกต, 2521) แต่ในปี 2547 รัฐบาลได้มีการสนับสนุนให้เกิดการพัฒนาในระดับท้องถิ่นโดยได้จัดตั้งโครงการหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ เพื่อให้แต่ละท้องถิ่นผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพออกมาจำหน่าย จึงทำให้ท้องถิ่นที่นิยมผลิตสาโทดื่มกันเองในชุมชนทำการผลิตสาโทออกจำหน่ายเป็นผลิตภัณฑ์ในท้องถิ่นตน ทำให้ปัจจุบันสาโทเป็นที่รู้จักและนิยมมากขึ้นในระดับหนึ่ง

ราและยีสต์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการผลิตสาโท จุลินทรีย์กลุ่มราทำหน้าที่เปลี่ยนแป้งที่เป็นองค์ประกอบในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เรียกปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงนี้ว่าแซ็กคาริฟิเคชัน (Saccharification) สำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งโดยรา ให้เป็นแอลกอฮอล์โดยผ่านกระบวนการหมักที่เรียกว่ากระบวนการหมักแอลกอฮอล์ (alcoholic fermentation) ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดได้ดีในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ลูกแป้งสุราที่ดีนอกจากจะมีเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยแป้งและการหมักให้ได้เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์สูงแล้ว จะต้องเป็นเชื้อที่ให้กลิ่นรสที่ดีอีกด้วย ในระหว่างกระบวนการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ยีสต์ไม่ได้สร้างเฉพาะแต่แอลกอฮอล์เพียงอย่างเดียว แต่ยังมีการสร้างผลผลิตอื่นอีกมากมายซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญต่อสมบัติของกลิ่นรสที่ดีในไวน์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เอสเทอร์ และ ฟูเซลแอลกอฮอล์ ที่ถูกสร้างระหว่างกระบวนการหมัก มีบทบาทสำคัญในเรื่องกลิ่นรสของไวน์ (Valero และคณะ, 2002)

จากงานวิจัยที่ผ่านมามีการแยกจุลินทรีย์ในลูกแป้งสุราโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารโดยยังไม่มีการใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลเข้าช่วย พบว่าจุลินทรีย์หลักในลูกแป้งสุราได้แก่ ราและยีสต์ ส่วนแบคทีเรียยังมีรานงานไม่มากนัก อภิชญา เตชะวสัญญู (2550) ได้มีการจำแนกและศึกษาลักษณะสมบัติของราและยีสต์ในลูกแป้งสุราเพื่อการผลิตสาโท โดยเก็บรวบรวมลูกแป้งสุราที่ผลิตจากแหล่งต่างๆทั่วประเทศและคัดเลือกลูกแป้งสุราที่มีกิจกรรมเอนไซม์ในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้สูงในน้ำต้อยและมีกิจกรรมเอนไซม์ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้สูงในน้ำหมักสาโท รวมทั้งสาโทที่มีกลิ่น รส ที่ดีจากการดมและชิมจากผู้เชี่ยวชาญ ทำให้สามารถคัดเลือกได้ลูกแป้งสุราจำนวน 6 แหล่งที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ได้แก่ ลูกแป้งสุราจากจังหวัดนครพนม (NP1) ลูก

แป้งสุราจากจังหวัดน่าน (NN6 NN25 และ NN27) ลูกแป้งสุราจากจังหวัดหนองคาย (NK2) ลูกแป้งสุราจากจังหวัดลำปาง (LA1) ในจำนวนนี้ลูกแป้งสุราจากจังหวัดนครพนม (NP1) ถูกเลือกนำมาศึกษาต่อ เนื่องจากเมื่อนำมาผลิตสาโทพบว่าได้สาโทที่มีกลิ่นรสดี (นริสา ตรีเนตร, 2550) ราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งสุราจากจังหวัดนครพนม (NP1) (อภิชญา เตชะวสัญญ, 2550) พบรา 2 ชนิด คือ *Mucor racemosus* และ *Rhizopus oligosporus* และยีสต์ 3 ชนิด คือ *Saccharomyces cerevisiae Saccharomycopsis fibuligera* และ *Pichia anomala*

คุณภาพของสาโทขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆด้าน ได้แก่ คุณภาพของน้ำ สายพันธุ์ข้าว เครื่องเทศหรือสมุนไพรและคุณภาพของลูกแป้งสุรา จุลินทรีย์ที่อยู่ในลูกแป้งสุราเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญอย่างยิ่งต่อคุณภาพของสาโท การผลิตลูกแป้งสุรายังไม่มีสูตรและกระบวนการผลิตที่แน่นอน ทำให้คุณภาพของลูกแป้งสุราไม่คงที่ส่งผลต่อคุณภาพของสาโทไม่คงที่ด้วย การใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์ผสมเป็นหัวเชื้อแทนการใช้ลูกแป้งสุราในการผลิตสาโทเป็นแนวทางหนึ่งในการควบคุมทั้งชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในการผลิตตลอดจนควบคุมการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่จำเป็นต่อการหมักได้ จะส่งผลให้ได้สาโทคุณภาพดีสม่ำเสมอในแต่ละชุดการผลิต นอกจากนี้การทราบชนิดและการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโทจะช่วยเป็นข้อมูลสำหรับการผลิตกล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสมแทนลูกแป้งสุรา เพื่อการผลิตสาโทได้ใกล้เคียงกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสามารถควบคุมคุณภาพของสาโทให้คงที่ได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ติดตามชนิดและการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารควบคู่กับวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ระหว่างสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้ NP1 กับการใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกจากลูกแป้งสุรา NP1 ตลอดจนเปรียบเทียบคุณภาพสาโทที่ได้ในด้านการทดสอบทางประสาทสัมผัสและรูปแบบสารให้กลิ่นโดยวิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบผลของการใช้ลูกแป้งสุราและจุลินทรีย์บริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุราที่มีต่อคุณภาพด้านกลิ่นรสของสาโท ผลการทดลองที่ได้จะเป็นข้อมูลสำหรับการผลิตกล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสมแทนลูกแป้งสุราเพื่อการผลิตสาโทให้ได้คุณภาพใกล้เคียงกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา ตลอดจนสามารถควบคุมคุณภาพของสาโทให้คงที่ได้ในแต่ละชุดการผลิตสามารถเป็นองค์ความรู้เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาคุณภาพของสาโทเพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีบทบาทสำคัญต่อวัฒนธรรมและวิถีชีวิตของคน ทั้งในแถบซีกโลกตะวันออกและตะวันตก ขณะที่ประเทศในแถบทวีปยุโรป และตะวันออกกลาง นิยมผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จากผลไม้ แต่ประเทศในแถบเอเชียแปซิฟิก นิยมผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จากธัญพืช (Cereals) ประเทศไทย นับได้ว่าเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์มาตั้งแต่สมัยโบราณ เป็นดินแดนที่เต็มไปด้วยพืชพรรณ ธัญญาหาร ประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรมที่มีผลผลิตทางการเกษตรตลอดปี ผลผลิตที่มีความสำคัญอันดับหนึ่งคือ ข้าว ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจของไทยและเป็นอาหารหลักประจำชาติ สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นเครื่องดื่มหมักพื้นบ้าน ซึ่งเกิดจากภูมิปัญญาชาวบ้านของไทย ที่แสดงถึงวัฒนธรรมที่สืบทอดกันมาจากโบราณจนถึงปัจจุบัน โดยมีชื่อเรียกต่างๆกันไปตามแต่ละท้องถิ่น เช่น กระแช่ อุ น้ำขาว น้ำแดง สาโท เป็นต้น

สาโท เป็นสุราแช่พื้นบ้านของไทยที่แสดงถึงภูมิปัญญาท้องถิ่นที่ได้รับการถ่ายทอดสืบต่อกันมาหลายชั่วอายุคน นิยมผลิตและบริโภคกันเองภายในท้องถิ่น เป็นสุราแช่มีความแรงแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรี ผลิตโดยการหมักข้าวเหนียวนึ่งด้วยลูกแป้งสุรา ลูกแป้งในประเทศไทยแบ่งออกได้หลายชนิด ได้แก่ ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งสุรา และลูกแป้งน้ำส้มสายชู ลูกแป้งสุรา ตามพระราชบัญญัติสุรา พ.ศ. 2493 มาตรา 4 จัดเป็นเชื้อสุราอย่างหนึ่งมีนิยามดังนี้ “เชื้อสุรา” หมายความถึงแป้งสุรา แป้งข้าวหมาก หรือเชื้อใดๆ เมื่อหมักกับวัสดุหรือ ของเหลวอื่นๆ แล้วสามารถทำให้เกิดแอลกอฮอล์ที่ใช้ทำสุรา ลูกแป้งสุรา ใช้ในการหมักสุราประเภทเมรัยได้แก่ น้ำขาว กระแช่ สาโท อุ และสุราแช่ กระบวนการผลิตไวน์ข้าวของแต่ละประเทศจะมีความแตกต่างกันทั้งวัตถุดิบ สัดส่วน อุณหภูมิ และระยะเวลา แต่โดยรวมแล้วเป็นการหมักแบบธรรมชาติโดยใช้ธัญพืชเป็นหลักโดยแต่ละแห่งมีการทำก้อนแป้งหัวเชื้อ (Starter) ด้วยส่วนผสม รูปร่าง และเชื้อจุลินทรีย์แตกต่างกัน และมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ โดยหัวเชื้อที่มีลักษณะคล้ายลูกแป้งในประเทศแถบเอเชียมีหลายชนิดและมีชื่อเรียกต่างกันตามแต่ละท้องถิ่นของหัวเชื้อชนิดนั้นๆ เช่น ญี่ปุ่นเรียกว่าโคจิ (koji) จีนเรียกว่าชู (chou) เกาหลีเรียกว่านุรุก (nuruk) อินโดนิเซียเรียกว่าราจิ (ragi) (Haruta และคณะ, 2006) ไทย เรียกว่า ลูกแป้ง (Loogpang)

ลูกแป้ง ในแต่ละหมู่บ้านมีสูตรเฉพาะเป็นของตนเองและส่วนใหญ่ถูกปกปิดเป็นความลับไม่เผยแพร่แก่ผู้อื่น สูตรการทำลูกแป้งของแต่ละแหล่งจะมีความแตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น โดยภูมิปัญญาท้องถิ่นยังเชื่อมโยงกับภาวะแวดล้อมหรือความหลากหลายทางชีวภาพ เช่น สมุนไพร

ที่นำไปทำเป็นหัวเชื้อ เป็นต้น ซึ่งถือว่าลูกแป้งเป็นหัวใจของการหมักที่ทำให้เกิดความหลากหลายของกลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะในแต่ละท้องถิ่น การผลิตสาโทในช่วง 3 วันแรกของการหมัก ราจะย่อยแป้งในข้าวเหนียวนึ่งให้เป็นของเหลวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลสูง เรียกว่า น้ำต้อย หลังจากนั้นเติมน้ำลงไป 2 เท่าของข้าวเหนียวนึ่ง เรียกขั้นตอนนี้ว่า การผ่าน้ำ เป็นการสร้างภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นผลให้ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์และสารอื่นๆ หมักต่อไปอีก 7-10 วัน จะได้สาโทที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีขุ่นหรือสีตามข้าว รสหวานหอม เฝื่อนเล็กน้อย (สุพัฒน์ กุมพิทักษ์ และ กำพล กาหลง, 2545)

ลูกแป้ง คือ กล้าเชื้อจุลินทรีย์ในรูปแบบของเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่เก็บไว้ในรูปเชื้อแห้ง ที่ได้จากการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ในรูปแบบของลูกแป้ง ตามกรรมวิธีพื้นบ้านสมัยก่อน ซึ่งสามารถนำมาหมักกับวัตถุดิบทางการเกษตรได้เป็นอาหารหมักหลายชนิด ลูกแป้งเป็นแหล่งของจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งชนิดที่จำเป็นซึ่งมีประโยชน์ต่อการหมักและชนิดที่ไม่จำเป็นซึ่งทำให้สาโทเน่าเสียหรือทำให้มีกลิ่นรสเสียไป ปัจจุบันวิธีการหมักยังคงอนุรักษ์กรรมวิธีการผลิตตามรูปแบบดั้งเดิมที่สืบทอดต่อๆกันมา ทำให้ยากต่อการควบคุมคุณภาพให้คงที่ในระหว่างชุดการผลิตได้ ทำให้มักจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพที่ไม่แน่นอน เช่น มีเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ต่ำหรือสูงเกินไป หรืออาจมีกลิ่นรสที่ไม่ชวนดื่ม ตลอดจนปัญหาอื่นๆอีกมาก ซึ่งส่วนหนึ่งของปัญหาเกิดขึ้นเนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในลูกแป้ง ทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณภาพตลอดจนปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักหรือขยายกำลังการผลิตให้สูงขึ้นจากเดิมได้ หากสามารถคัดแยกชนิดของ รายีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกจากลูกแป้งสุรา ที่มีคุณภาพดีและคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ดี เพื่อการปรับปรุงคุณภาพของสาโทในด้านต่างๆ เช่น ให้มีกลิ่นและรสชาติดีขึ้น ซึ่งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาเพื่อการผลิตสาโทที่มีคุณภาพดีและคงที่ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโท

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโทก็เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อคุณภาพของสาโท แต่ยังไม่ค่อยมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับวัตถุดิบต่างๆที่มีผลต่อคุณภาพต่างๆของสาโท

2.1.1 ข้าว

เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตสาโท มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ คือ *Oryza sativa* โดยข้าวที่ปลูกในประเทศไทยจัดอยู่ใน indica type มี 2 ชนิด คือ ข้าวเจ้า (Rice, Ordinary rice) และข้าวเหนียว (Glutinous rice, Sticky rice) มีลักษณะเมล็ดเรียว ยาว

องค์ประกอบสำคัญที่พบในเมล็ดข้าว คือ แป้ง (Starch) และส่วนที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch constituents) ซึ่งได้แก่ โปรตีน ไขมัน เส้นใย วิตามินและแร่ธาตุต่างๆ แป้ง (Starch) เป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุด ซึ่งอยู่ในรูปของเม็ดแป้ง (Starch granule) ซึ่งมีความสำคัญในการเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลและแอลกอฮอล์ เมื่อมีการหมักเกิดขึ้น แป้งมีสูตรทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)n$ มีค่า n ไม่น้อยกว่า 1,000 แป้งส่วนใหญ่เป็นสาร Heterogeneous ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของกลูโคส ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ Amylose และ Amylopectin เป็นองค์ประกอบหลัก และจะมีผลต่อคุณสมบัติของข้าวเมื่อนึ่งสุกแล้ว และมีผลต่อการแทงเส้นใยของเชื้อราเข้าสู่ภายในเมล็ดข้าว (สุภมาส ไข่คำ, 2544)

การทำสาโทนิยมใช้ข้าวเหนียวขาวหรือข้าวเหนียวดำ เป็นวัตถุดิบมากกว่าข้าวเจ้า เนื่องจากข้าวเหนียวให้กลิ่นและรสที่ดีกว่า และจุลินทรีย์ในลูกแป้งสุราสามารถย่อยแป้งข้าวเหนียวได้ดีกว่าแป้งข้าวเจ้า (มนตรี เชาวสังเกต, 2521) ส่วนการขัดสีข้าวก็อาจมีผลต่อคุณภาพและการหมักสาโท หากใช้ข้าวที่ยังมีรำข้าวเหลืออยู่บ้างอาจช่วยให้มีการหมักดีขึ้น เนื่องจากมีสารอาหารให้จุลินทรีย์มากกว่าข้าวขัดขาว

2.1.2 น้ำ

เป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในสาโทไม่ต่ำกว่า 80% คุณภาพของน้ำมีผลต่อคุณภาพของสาโทเป็นอย่างมาก การผลิตจะต้องคำนึงถึงคุณภาพของน้ำเป็นพิเศษ น้ำที่เหมาะสมควรเป็นน้ำที่มีคุณภาพใกล้เคียงกับมาตรฐานน้ำดื่ม คือ ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และไม่มีรสชาติ สะอาด ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ควรเป็นน้ำอ่อน ไม่มีสนิมเหล็ก ไม่มีคลอรีน เพราะคลอรีนจะไประงับการเจริญของยีสต์ ทำให้ปฏิกิริยาการหมักเกิดขึ้นช้า และจะทำให้สาโทมีกลิ่นที่ผิดปกติไป

2.1.3 ลูกแป้งสุรา

เป็นกล้าเชื้อผสม (Mixed cullture) ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่เป็นตัวการสำคัญในการเปลี่ยนแป้งในข้าวให้กลายเป็นน้ำตาลหรือแอลกอฮอล์ (กฤษฎา ขุนแหลม, 2542) ลูกแป้งสุรามีหลายชนิดผลิตขึ้นตามวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้ เช่นลูกแป้งสุรา ลูกแป้งสุราข้าวหมาก ลูกแป้งสุราทำน้ำส้มสายชู เป็นต้น (มนตรี เชาวสังเกต, 2521) การผลิตลูกแป้งสุรามักทำกันเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือน โดยมีกรรมวิธีที่คล้ายคลึงกัน และคล้ายคลึงกับการผลิตลูกแป้งสุราของชนชาติอื่น ต่างกันแต่เพียงองค์ประกอบของวัตถุดิบ ขนาด รูปร่าง ตลอดจนชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์เท่านั้น (มนตรี เชาวสังเกต, 2521) องค์ประกอบสำคัญของลูกแป้งสุรา ก็คือปลายข้าว ซึ่งใช้ได้ทั้งข้าวเหนียวและข้าวเจ้า นำมาผสมกับเครื่องเทศหรือสมุนไพรต่างๆ คุณภาพของลูกแป้งสุราขึ้นอยู่กับคุณภาพของข้าวและเครื่องเทศ

ลักษณะทั่วๆไปของลูกแป้งสุราที่ดีคือ จะมีลักษณะโปร่งเบา สีขาวนวล (Grey-white) ไม่มีรอยแตกร้าว ก้อนแป้งเป็นรูพรุน ซึ่งเกิดจากการฟูของแป้งขณะบ่ม เมื่อขยี้จะยุ่ยเป็นผงละเอียด ไม่มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว ลูกแป้งสุราที่ผลิตจากแต่ละแหล่งจะมีประสิทธิภาพการหมักต่างกัน (นภา โล่ห์ทอง, 2535)

บทบาทสำคัญของจุลินทรีย์ในลูกแป้งสุราต่อกระบวนการหมัก มี 2 ประเภท คือ

1) การเปลี่ยนแป้งในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาล โดยรา เช่น *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus* spp. จะสร้างเอนไซม์ amylase ชนิด α-Amylase และ Glucoamylase

2) การหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้น ให้เป็นแอลกอฮอล์กับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยยีสต์ เช่น *S. cerevisiae* ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ (นภา โล่ห์ทอง, 2535)

2.2 กระบวนการที่เกิดขึ้นในสาโท มีดังนี้

2.2.1. กระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล มีกระบวนการดังนี้

1.) Gelatinization เป็นขั้นตอนการทำให้แป้งสุก เม็ดแป้งในข้าวเมื่อสัมผัสความร้อนชื้นทำให้โครงสร้างของแป้งขยายตัวและเกิด Gelatinization ทำให้แป้งมีลักษณะนุ่มเหนียวเหมาะสมต่อการทำกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Tester และ Morrison, 1990)

2.) Liquefaction เป็นขั้นตอนเพื่อลดความหนืดของแป้งที่ gelatinize แล้ว โดยเอนไซม์จะย่อยโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม (Random hydrolysis) เมื่อการไฮโดรไลซ์เกิดขึ้นจะทำให้ Polymer ของกลูโคส ถูกตัดเป็นสายสั้นๆ มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ทำให้มีความหนืดลดลง

3.) Saccharification เป็นการไฮโดรไลซ์แป้งให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาลดังนั้นหลังการย่อยแล้วจะได้ Monosaccharide หรือ Disaccharide หรือ น้ำตาลที่มีโมเลกุลสูงกว่าบ้างเล็กน้อย จะได้เป็นน้ำตาลกลูโคส มอลโทส หรือ มอลโทไทรโอส

2.2.2.กระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดยจุลินทรีย์

การหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาล แสดงได้เป็นสมการดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 + H_2O \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

การหมักแอลกอฮอล์จากแป้งมีความจำเป็นที่ต้องใช้เชื้อราในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ปัจจุบันการผลิตแอลกอฮอล์นิยมใช้เอนไซม์ α -Amylase และGlucoamylase จากรา การใช้รายย่อยแป้งเพื่อผลิตแอลกอฮอล์หรือที่เรียกว่า Amylo process (Inui และคณะ, 1965) นั้น ใช้เชื้อราในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล และเชื้อราเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้เล็กน้อย ดังนั้นการหมักแอลกอฮอล์จึงจำเป็นต้องเติมยีสต์ร่วมด้วย เพื่อจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการหมักสาโท

เอนไซม์ที่มีความสำคัญมากในการหมักสาโท คือ เอนไซม์ Amylase ซึ่งเป็น Extracellular enzyme มีความสามารถในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจากการสร้างของจุลินทรีย์หลายชนิด

เอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยแป้ง สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดตามตำแหน่งการย่อยแป้งดังนี้

1. Endoamylase เป็นเอนไซม์ที่ย่อย (Hydrolyze) แป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง α-D-(1, 4) glycosidic linkage ถ้าการย่อยไม่สมบูรณ์จะมีกลูโคส มอลโตส และเด็กสตรินเกิดขึ้น ถ้าการย่อยสมบูรณ์จะได้น้ำตาลมอลโตส และกลูโคสเท่านั้น เอนไซม์ประเภทนี้ ได้แก่ α-Amylase หรือAmylo (1, 4) dextrinase พบได้ใน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์

2. Exoamylase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยแป้งจากปลายทางด้าน non-reducing เข้ามา ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคส (Glucose unit) โดยย่อยที่ β-D-(1, 4) glycosidic linkage และ β-D-(1, 6) glycosidic linkage เอนไซม์ประเภทนี้ ได้แก่ α-Amylase และ Glucoamylase

α-Amylase จะย่อยแป้งที่ตำแหน่ง β-D-(1, 4) glycosidic linkage เข้าไปที่ละ 2 หน่วยของกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยพันธะที่ต่อแบบ β-D-(1, 6) glycosidic linkageได้ ผลที่ได้จากการย่อยคือ น้ำตาลมอลโทส และเด็กสตรินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เอนไซม์ชนิดนี้ พบได้ในพืชชั้นสูง เช่น ธัญพืช มันเทศ และแบคทีเรียบางชนิด

Glucoamylase เป็นเอนไซม์ที่พบครั้งแรกในจุลินทรีย์ และพบว่ามีในเนื้อเยื่อของสัตว์ด้วย โดยสามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์จากปลายทางด้าน non-reducing ที่ตำแหน่ง β-D-(1, 4) glycosidic linkage เข้าไปทีละ 1 หน่วยกลูโคส แล้วยังสามารถย่อยที่ตำแหน่ง β-D-(1, 6) glycosidic linkage และ β-D-(1, 3) glycosidic linkage ได้ดีพอๆกับ β-D-(1, 4) glycosidic linkage อีกด้วย ดังนั้นผลการย่อยที่สมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคส (D-glucose) เพียงอย่างเดียว

2.3 องค์ประกอบหลักของลูกแป้งสุรา

2.3.1 ข้าวหรือแป้ง สามารถใช้ได้ทั้งข้าวเหนียวและข้าวเจ้า โดยที่ข้าวที่นำมาใช้ ควรเป็นข้าวที่ไม่อับราหรือผ่านการแช่น้ำมาก่อน มีขนาดสม่ำเสมอ ไม่เป็นข้าวป่นหรือมีมอด เวลาแช่ต้องซาวข้าวเอาสิ่งสกปรกออกให้หมด

2.3.2 สมุนไพร มีสูตรการผลิตหลายแบบที่มักจะเก็บเป็นความลับ และถ่ายทอดให้ทราบภายในครอบครัว สมุนไพรที่ใช้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน (สุหัทยา นำชัยสี่วัฒนา, 2549) โดยไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลลินทรีย์ที่จำเป็นต่อการหมัก เช่น กระเทียม ข่า พริกแดง เป็นต้น นำมาบดรวมกัน สมุนไพรที่ใช้ต้องตากให้แห้งสะอาดและไม่เก่าเกินไป

2.2.3 ลูกแป้งสุราเก่า เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักสาโทตามท้องถิ่นนั้นๆ ส่วนใหญ่จะเป็นรา และยีสต์ โดยใช้ลูกแป้งสุราเก่าเป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตลูกแป้งใหม่

2.2.4 น้ำ ต้องใช้น้ำสะอาด สำหรับปริมาณน้ำที่ใช้ไม่แน่นอนขึ้นกับความชำนาญของผู้ทำ

ขั้นตอนการผลิตลูกแป้งแบบภูมิปัญญาท้องถิ่น แสดงดังภาพที่ 2.1 แสดงให้เห็นว่าทุกขั้นในการผลิตมีโอกาสที่เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่จำเป็นต่อการหมัก ตั้งแต่ตัวแป้ง สมุนไพร ลูกแป้งเก่า การนวด การปั้น การตาก การบ่ม ไม่มีการควบคุม ตลอดจนการเก็บซึ่งส่วนใหญ่จะห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547) และปัจจุบันยังไม่มีสูตรและกระบวนการผลิตลูกแป้งที่แน่นอนซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อคุณภาพของสาโทที่ได้ไม่คงที่ เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการผลิตสาเกซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประจำชาติของญี่ปุ่น ในกระบวนการผลิตสาเกนั้นใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วในการหมัก โดยขั้นแรกสาเกมีการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยใช้ *Aspergillus oryzae* และจากนั้นน้ำตาล จะถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์โดย *Saccharomyces sake* ซึ่งการใช้เชื้อบริสุทธ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วนี้มีข้อดีคือ ช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อการหมัก ทำให้ได้คุณภาพของสาเกที่ค่อนข้างคงที่ จากแนวคิดนี้ทำให้ได้มีนักวิจัยหลายคนได้ศึกษาเกี่ยวกับการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์จากลูกแป้งสุรา ดังนี้

มนตรี เชาว์สังเกตุ (2521) ได้ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และราเพื่อใช้ผลิตไวน์ข้าวจากลูกแป้งทั่วประเทศ พบว่าราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งได้ดี ปริมาณกรดต่ำ และให้กลิ่นรสที่ดีแก่สาโทได้แก่ *Rhizopus* MM-52 และ *Amylomyces rouxii* MM-136 ส่วนยีสต์ที่ทนปริมาณแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นสูง และให้กลิ่นรสที่ดีคือ *Saccharomyces cerevisiae* MS-52

วรรัตน์ โชติวรรณพร (2539) ทำการศึกษาการผลิตไวน์ข้าวเหนียวดำโดยการหมักโดยเชื้อบริสุทธิ์ โดยรวบรวมลูกแป้งจากทั่วประเทศและคัดแยกราและยีสต์ พบว่าราLM 18 ซึ่งเป็นลูกแป้ง

สุราจากจังหวัดแพร่ ย่อยแป้งได้ดีที่สุด และยีสต์ LY 17 หมักน้ำตาลได้ดีและทนต่อแอลกอฮอล์สูง ข้อมูลเบื้องต้นนี้สามารถนำไปสู่การพัฒนาการผลิตสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ต่อไป (วรรัตน์ โชติวรรณพร, 2539)

อภิชญา เตชะวสัญญ (2550) ทำการคัดแยก จำแนกยีสต์ และราในลูกแป้งสุราจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย และศึกษาสมบัติของยีสต์และราในด้านการย่อยแป้งและความสามารถในการผลิตเอทานอล พบว่า สามารถจำแนกชนิดของยีสต์ได้เป็น *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomycopsis fibuligera*, *Pichia anomala*, *Issatchenkia orientalis*, *Tolulaspora delbrueckii* และ *Candida glabrata* และ สามารถจำแนกราที่คัดแยกได้เป็น *Mucor hiemalis*, *Mucor racemosus*, *Mucor indicus*, *Rhizopus microsporus* และ *Rhizopus oryzae* และพบว่า รา *Mucor heimalis* NN 609 มีความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งเป็นของเหลว (Liquefaction) ได้ดีที่สุด และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* NK 1933 มีความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอลสูงสุด (อภิชญา เตชะวสัญญ, 2550)

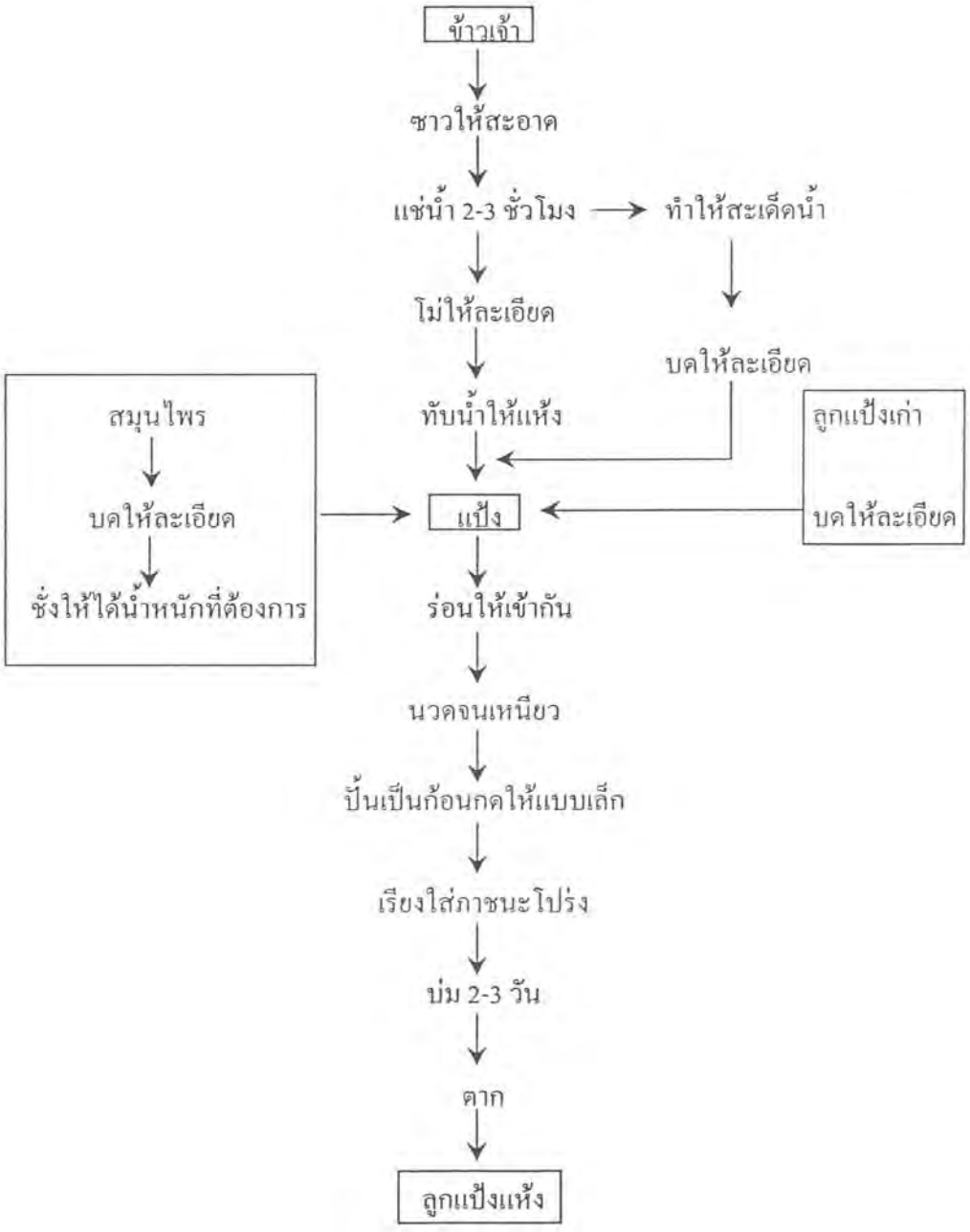
ซึ่งแนวทางการใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์นั้นจะทำให้สามารถควบคุมชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ได้ ตลอด จนสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่จำเป็นต่อการหมัก ทำให้สามารถสังเกตประสิทธิภาพการหมักได้ และยังทำให้สาโทที่ได้มีความคงที่ทุกรุ่นการผลิตดีกว่าวิธีการใช้ลูกแป้งสุรา (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547)

จุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในลูกแป้งสุรา ประกอบด้วย

รา ซึ่งสามารถย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาล โดยใช้เอนไซม์กลุ่มอะไมเลส ประกอบด้วย อัลฟาอะไมเลส, เบต้าอะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส ย่อยโมเลกุลของแป้งให้เป็นน้ำตาลหลายโมเลกุล โมเลกุลคู่และโมเลกุลเดี่ยว มีหลายสายพันธุ์ได้แก่รามีเส้นใยสีขาวฟู รามีเส้นใยสีเทาดำ รามีเส้นใยสีเทาเหลือง รามีเส้นใยสีเหลืองเขียว และบางชนิดมีสี เช่น Amylomyces, Aspergillus และ *Rhizopus* spp. เป็นต้น

ยีสต์ เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุดเพราะนอกจากจะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์แล้ว ยังให้กลิ่นและรสที่เป็นเอกลักษณ์ของสาโทอีกด้วย เช่น กลุ่ม *Saccharomyces* ได้แก่ *S. cerevisia* และ *S. sake* กลุ่ม non-*Saccharomyces* ได้แก่ *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Pichia anomala* เป็นต้น

แบคทีเรีย จะพบแบคทีเรียในกลุ่ม แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก แบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติค เช่น *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp. , *Lactococcus* spp. (Rittiplang และคณะ, 2007) *Pediococcus pentosaceus* และอาจพบ *Lactobacillus* spp. (นภา โล่ห์ทอง, 2535) นอกจากนี้อาจพบ *Bacillus* spp. ในลูกแป้งจากการปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ เช่น แป้ง และสมุนไพร แต่ถ้าส่วนผสมของสมุนไพรเหมาะสม สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์นี้ได้มาก (นภา โล่ห์ทอง, 2535)



ภาพที่ 2.1 แสดงแผนภูมิการผลิตลูกแป้งแบบภูมิปัญญาท้องถิ่น

ที่มา: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547

2.4 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท

2.4.1 รา

ในระหว่างการหมักสาโท ราเจริญได้ดีในช่วง 2 - 3 วันแรกของการหมัก ซึ่งเป็นภาวะการหมักที่ใช้อากาศ เนื่องจากการบรรจุข้าวในถังหมัก จะบรรจุเพียง 1 ใน 4 ของปริมาตร เพื่อให้ราได้รับออกซิเจนจากอากาศอย่างทั่วถึง จากนั้นเมื่อเกิดน้ำเชื่อมข้าว (น้ำต้อย) ขึ้น และยีสต์เริ่มการหมัก ทำให้มีปริมาณแอลกอฮอล์ และภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งเกิดจากการที่ยีสต์ปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ทำให้ราตายไป

2.4.2 ยีสต์

แม้ว่าในช่วงแรกของการหมัก พบยีสต์ในลูกแป้งเป็นชนิด *Saccharomycopsis* sp. แต่ในระหว่างการหมักสาโท ยีสต์นี้จะเจริญเพียงช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้นแล้วยีสต์นี้จะตายไป แต่จะพบยีสต์ *Saccharomyces* sp. ทำหน้าที่ในการหมักแทน โดยยีสต์ *Saccharomyces* sp. มีความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ได้ดีกว่า และทนปริมาณแอลกอฮอล์ได้สูงกว่ายีสต์ชนิด *Saccharomycopsis* sp. แหล่งที่มาของยีสต์ที่ทำให้เกิดการหมักนี้ยังไม่ทราบเป็นที่แน่นอน แต่อาจมาจากลูกแป้งเช่นกัน แต่มีอยู่ในลูกแป้งในปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในภาวะที่เหมาะสมของการหมักสาโท

การที่สามารถพบยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. ในลูกแป้งสุรานั้น สามารถอธิบายได้ดังนี้ เนื่องจากเอนไซม์จากราไม่สามารถย่อยแป้งได้หมด เพราะราจะตายไปหลังจากการหมักเพียง 3 วัน ดังนั้นจึงต้องอาศัยเอมไซม์ของยีสต์นี้ ช่วยย่อยแป้งที่เหลือเพื่อให้เกิดเป็นน้ำตาล เพื่อยีสต์จะได้ใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ต่อไป

2.4.3 แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับสาโท

2.4.3.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก มีความสำคัญต่อการหมักสาโท เนื่องจากสาเหตุ 2 ประการ คือ แบคทีเรียเหล่านี้มีส่วนในการทำให้สาโทเสื่อมเสีย และทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะของผลิตภัณฑ์

2.4.3.2 แบคทีเรียกรดแอซิติก

แบคทีเรียกรดแอซิติก หรือที่เรียกว่า แบคทีเรียกรดน้ำส้มสายชู เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง สามารถออกซิไดส์เอทานอลให้เป็นกรดแอซิติก (กรดน้ำส้มสายชู) แบ่งเป็น 2 genera คือ *Acetobacter* sp. และ *Gluconobacter* sp. ซึ่งทำให้เกิดการเสื่อมเสียของสาโท ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรสน้ำส้มสายชู นอกจากนั้นการเจริญของแบคทีเรียแอซิติกในระหว่างการหมักสาโทยังอาจมีผลต่อการเจริญของยีสต์ด้วย

จากงานวิจัยที่ผ่านมามีการแยกจุลินทรีย์ในลูกแป้งโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารโดยยังไม่มีการใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล เข้าช่วย พบว่าจุลินทรีย์เด่นในลูกแป้งได้แก่ ราและยีสต์ รา ส่วนใหญ่ที่แยกได้ ได้แก่ *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus* spp. ปริมาณที่พบมากน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของลูกแป้ง สำหรับยีสต์ที่พบส่วนใหญ่ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* ในปริมาณมากกว่า *Endomycopsis* spp. (*Saccharomycopsis* spp.) นอกจากนี้ยังมียีสต์ชนิดอื่นที่พบได้ในลูกแป้งเฉพาะแหล่ง ได้แก่ *Candida* spp. และ *Torulopsis* spp. เป็นต้น ในส่วนของแบคทีเรีย ตรวจพบแบคทีเรียแลคติก ซึ่งส่วนใหญ่ ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* และอาจพบ *Lactobacillus* spp. (นภา โล่ห์ทอง, 2535)

จากงานของ อภิชญา เตชะวสัญญ (2550) ได้มีการจำแนกและศึกษาลักษณะสมบัติของราและยีสต์ในลูกแป้งสุราเพื่อการผลิตสาโท โดยเก็บรวบรวมลูกแป้งสุราที่ผลิตจากแหล่งต่างๆทั่วประเทศและคัดเลือกลูกแป้งสุราที่มีกิจกรรมเอนไซม์ในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้สูงในน้ำต้อย และมีกิจกรรมเอนไซม์ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้สูงในน้ำหมักสาโท รวมทั้งสาโทที่มีกลิ่น รส ที่ดีจากการดมและชิมจากผู้เชี่ยวชาญ ทำให้สามารถคัดเลือกได้ลูกแป้งสุราจำนวน 6 แหล่ง ในจำนวนนี้ลูกแป้งสุราจากจังหวัดนครพนม (NP1) ถูกเลือกนำมาศึกษาต่อ เนื่องจากเมื่อนำมาผลิตสาโทพบว่าได้สาโทที่มีกลิ่นรสดี (นริสา ตรีเนตร, 2550) ราและยีสต์ที่จำแนกได้จากลูกแป้งสุราจากจังหวัดนครพนม (NP1) (อภิชญา เตชะวสัญญ, 2550) ได้รา 2 ชนิด คือ *Mucor racemosus, Rhizopus oligosporus* และยีสต์ 3 ชนิด คือ *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomycopsis fibuligera* และ *Pichia anomala* โดยไม่มีการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลูกแป้งสุรา NP1

การคัดแยกและติดตามประชากรจุลินทรีย์ในอาหารแบบดั้งเดิมใช้วิธีเพาะเลี้ยงบนอาหารที่สามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดซึ่ง มีข้อจำกัด คือ ไม่สามารถตรวจสอบจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ รวมทั้งจุลินทรีย์ที่อาหารยังไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญหรือจุลินทรีย์ที่เจริญช้ากว่าจุลินทรีย์ตัวอื่นๆ ปัจจุบันมีการนำเทคนิค DGGE ซึ่งเป็นเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล สามารถแยกความแตกต่างของลำดับเบสที่แตกต่างกันเพียงหนึ่งเบสบนสายดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันได้ จึงมีการนำเทคนิคดังกล่าวไปใช้ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างโดยตรงโดยไม่ต้องเลี้ยงจุลินทรีย์ก่อนทำให้สามารถตรวจพบจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ตามช่วงเวลาการหมักในอาหารหมักหลายๆ ชนิดได้ ดังเช่น การจำแนกความหลากหลายของแบคทีเรียในนมหมักแบบดั้งเดิมของอียิปต์ (Zabady) (Baradei และคณะ, 2008) ในการหมักไวน์ตามธรรมชาติ (Maro และคณะ, 2007) ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากข้าว (rice vinegar) (Hurata และคณะ, 2006) ในการผลิตและบ่มเนยแข็งแบบธรรมชาติ (Florez และ Mayo, 2006) ในกิมจิ (ผักดองแบบดั้งเดิมของเกาหลี) (Lee และคณะ,

2005) ในการหมักไวน์ (Cocolin และคณะ, 2000) ในอาหารหมักบางชนิดพบเชื้อที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ในเนยแข็ง (Florez และ Mayo, 2006) และ กิมจิ (Lee และคณะ, 2005) เป็นต้น

จากงานวิจัยของ Baradei และคณะ (2008) Florez และ Mayo (2006) พบว่าในการศึกษาชนิดและการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ทั้งหมดจากตัวอย่าง จำเป็นที่จะต้องใช้วิธีเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารและวิธี PCR-DGGE ควบคู่กัน เนื่องจากแต่ละวิธีต่างก็มีข้อจำกัด จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบว่ามีการใช้วิธีเพาะเลี้ยงในอาหารควบคู่กับวิธี PCR-DGGE ในการศึกษาชนิดและติดตามประชากรจุลินทรีย์ในลูกแป้งและสาโท โดยจะเป็นข้อมูลอย่างละเอียดใช้ประกอบการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้

2.5 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

Denaturing gradient gel electrophoresis หรือ (DGGE) เป็นเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลสามารถแยกความแตกต่างของลำดับเบสที่แตกต่างกันเพียงหนึ่งเบสบนสายดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันได้ จึงมีการนำเทคนิคดังกล่าวไปใช้ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างโดยตรงโดยไม่ต้องเลี้ยงจุลินทรีย์ก่อนทำให้สามารถตรวจพบจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงของประชากร จุลินทรีย์ตามช่วงเวลาการหมักในอาหารหมักหลายๆชนิดได้ ซึ่งทำได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอเกลียวคู่ในโพลีอะคริลาไมด์เจลที่มีสารที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (denaturant) ผสมอยู่ในความเข้มข้นต่างกันแบบต่อเนื่อง (linear gradient) สารที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพที่ใช้ เช่น ยูเรียและฟอร์มาไมด์ หรือใช้อุณหภูมิขณะที่โมเลกุลของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านไปในเจลที่มีความเข้มข้นของสารที่ทำให้เสียสภาพนั้น ส่วนของดีเอ็นเอก็จะเริ่มคลายเกลียวออก เนื่องจากค่า T_m ของแต่ละส่วนไม่เท่ากัน ส่วนย่อยหนึ่งที่เสียสภาพที่อุณหภูมิเดียวกันมีขนาดอยู่ระหว่าง 25 ถึงหลายร้อยคู่เบส ส่วนย่อยที่อยู่ติดกันอาจจะเสียสภาพที่อุณหภูมิต่างกันหลายองศาเซลเซียส ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 100-1,000 คู่เบสโดยทั่วไปจะมีการเสียสภาพไม่พร้อมกัน แบ่งได้ 2-5 ส่วน จากความรู้พื้นฐานเป็นที่ทราบกันดีว่าส่วนประกอบของเบสในโมเลกุลมีผลต่อค่า T_m ของดีเอ็นเอและ conformation มีผลต่อการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า

ดังนั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของเบสทำให้ค่า T_m ในส่วนย่อยของดีเอ็นเอนั้นเปลี่ยนไปโดยเกิดการเสียสภาพได้เร็วขึ้นหรือช้าลงและมีผลต่อการเปลี่ยน conformation ของโมเลกุลจึงเคลื่อนที่ไปได้ด้วยระยะทางต่างกันในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ในทางปฏิบัตินำดีเอ็นเอในสภาพเกลียวคู่มาทำอิเล็กโทรโฟรีซีส โมเลกุลดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ไปเป็นสัดส่วนกลับกับขนาดโมเลกุลในช่วงแรกของเจล เมื่อเคลื่อนไปเรื่อย ๆ ผ่านเจลที่มีสาร denaturant เพิ่มขึ้นตามลำดับ จนถึงบริเวณที่มีสาร denaturant เข้มข้นมากเท่ากับอุณหภูมิที่เป็นค่า T_m ของส่วนย่อยแรก โมเลกุลของดีเอ็นเอ

ส่วนนั้นจะแยกเป็นสายเดี่ยว ทำให้ขัดขวางการเคลื่อนที่จึงเคลื่อนได้ช้าลง ส่วนโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีเบสเปลี่ยนแปลงไปมีผลต่อค่า T_m ของส่วนย่อย ทำให้ระยะที่จะเคลื่อนตัวช้าลงแตกต่างกันไป จึงสามารถแยกออกจากกันได้ อย่างไรก็ตามถ้ามีการเปลี่ยนแปลงของเบสในส่วนย่อยที่มีค่า T_m สูงสุด มักจะแยกความแตกต่างไม่ได้เนื่องจากเมื่อโมเลกุลของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปถึงบริเวณดังกล่าวมักจะเสียสภาพเป็นสายเดี่ยวหมดแล้วหรือสิ้นสุดการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแล้ว ดีเอ็นเอที่นำมาตรวจสอบการกลายพันธุ์ หรือการเปลี่ยนแปลงของเบสโดยวิธี DGGE นี้อาจมาจากชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนไว้ในเวคเตอร์หรือผลผลิตของพีซีอาร์ก็ได้

2.6 ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของสาโท

1. ลูกแป้ง จุลินทรีย์ในลูกแป้งมีทั้งชนิดที่จำเป็นและไม่จำเป็นต่อการหมัก ลูกแป้งที่ผลิตในแหล่งที่ต่างกันมีชนิดของจุลินทรีย์ที่ต่างกัน ดังนั้นการคัดเลือกลูกแป้งจากแหล่งต่างๆที่ให้กลิ่นและรสชาติที่ดีในสาโทก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ
2. สายพันธุ์ของข้าวที่ใช้ในการหมัก ข้าวแต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติต่างๆ เช่น ความเหนียวของข้าว กลิ่นหอมของข้าว และรสชาติที่แตกต่างกันไป อันจะส่งผลให้เกิดกลิ่นและรสชาติในสาโทแตกต่างกัน
3. การเก็บรักษาหลังการหมัก หากเก็บในภาชนะที่ไม่ดี มีผลทำให้กลิ่นและรสชาติที่ดีของสาโทเสียไปได้

2.7 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีที่สำคัญในการผลิตสาโท (ไพบูลย์ ด่านวิรุฑัยและพัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2548)

ในกระบวนการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์นั้น การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีถือได้ว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อคุณภาพและลักษณะเฉพาะของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แต่ละชนิด วัตถุดิบที่หลากหลายผสมผสานกับการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรสชาติ กลิ่น สี และเนื้อสัมผัส ที่เป็นเอกลักษณ์ที่ลงตัวของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์นั้นๆ

2.7.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยรา

การเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการหมักสาโทที่ใช้แป้งเป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิต ราที่เกี่ยวข้องเป็นกลุ่มที่สามารถสังเคราะห์อะไมโลไลติกเอนไซม์ (amylolytic enzyme) เช่น *Mucor hiemalis*, *M. racemosus* และ *Rhizopus oryzae* เป็นต้น (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ถูกส่งออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายแป้ง อะไมโลไลติกเอนไซม์ ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) และ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) หรืออะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) ซึ่งสามารถย่อยพันธะ แอลฟา -1,4 และพันธะแอลฟา-1,6- ไกลโคซิดิก

(α-1,4-และα-1,6-glycosidic) ของสายพอลิเมอร์ของแป้ง ทั้งที่มีโครงสร้างเป็นอะไมโลส หรืออะไมโลเพกทินได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ดังภาพที่ 2.2 นอกจากราจะเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลแล้ว รายังผลิตสารประกอบที่ให้กลิ่นและรสชาติในสาโทด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีสต์ชนิด *Saccharomycopsis fibuligera* สามารถทำการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลได้ด้วย (Tsuyoshi และคณะ, 2005)

$$(C_6H_{10}O_5)_n \xrightarrow{\text{อะไมโลไลติกเอนไซม์}} nC_6H_{12}O_6$$

แป้ง เอนไซม์ น้ำตาล

ภาพที่ 2.2 การเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล

2.7.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยยีสต์

ยีสต์ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ ทนต่อแอลกอฮอล์ได้ดีและตกตะกอนแยกออกจากไวน์ได้ง่าย ซึ่งยีสต์หลักที่ทำการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ได้แก่ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งกิจกรรมหลักของยีสต์นั้น จะเปลี่ยนน้ำตาล 1 โมเลกุลให้ได้เป็น เอทานอล 2 โมเลกุล คาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล และพลังงาน ดังภาพที่ 2.3 ซึ่งปฏิกิริยาที่แสดงนี้เป็นปฏิกิริยาพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลงในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทุกชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีสต์ในกลุ่ม Non- *Saccharomyces* เช่น *Hanseniaspora guilliermondii* และ *Pichia anomala* ยังมีบทบาทในการสร้างสารให้กลิ่นรสในไวน์องุ่นอีกด้วย (Rajas และคณะ, 2001)

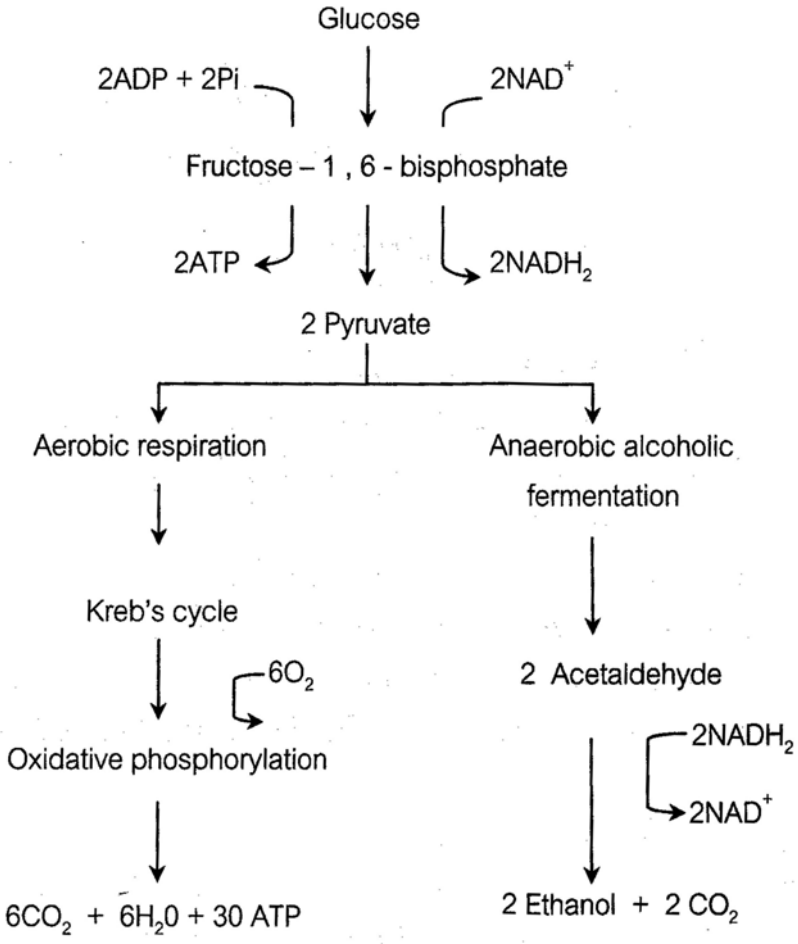
$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow[\text{ยีสต์}]{} 2C_2H_5OH + 2CO_2 + \text{Energy}$$

น้ำตาล เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ พลังงาน

ภาพที่ 2.3 การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล

ชีวเคมีของการเกิดเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ส่วนใหญ่จะเป็นการเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของยีสต์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งในภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงสรุปดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 แสดงเมแทบอลิซึมของยีสต์ภายใต้ภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ

ที่มา : Roehr, 2001

ขั้นตอนแรกคือ เมื่อยีสต์เจริญในอาหารที่มีน้ำตาล ยีสต์จะย่อยสลายน้ำตาลผ่านวิถีไกลโคลิซิส (glycolytic pathway) โดยการเปลี่ยนจากกลูโคส 1 โมเลกุลเป็นไพรูเวต 2 โมเลกุล ได้พลังงานในรูปของ ATP 2 โมเลกุล และ $NADH_2$ 2 โมเลกุล การเปลี่ยนในขั้นตอนนี้เกิดขึ้นไม่ว่ายีสต์จะเจริญในภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน

ขั้นตอนต่อมาไพรูเวตจะถูกเปลี่ยนต่อไปให้ผลผลิตสุดท้ายต่างกันตามชนิดของยีสต์และภาวะแวดล้อมในระหว่างกระบวนการหมัก โดยแบ่งการเปลี่ยนแปลงเป็น 2 ประเภท คือ

1. ออกซิเดทิฟเมแทบอลิซึม (aerobic respiration) ในภาวะที่มีออกซิเจน ยีสต์ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นไพรูเวต จากนั้นไพรูเวตถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำโดยผ่านวัฏจักรเครบ (Kreb's cycle) และวิถีการหายใจ (oxidative respiration) ได้พลังงาน 30 ATP รวมกับขั้นตอนแรก 6-8 ATP (2 ATP รวมกับ 4-6 ATP ที่ได้จากการเปลี่ยน $NADH_2$ 2 โมเลกุล) เป็น 36-

38 ATP ในภาวะนี้ยีสต์นำ ATP ที่ได้ไปใช้เป็นพลังงานในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของยีสต์ให้มากขึ้น

2. เฟอเมนเททิฟเมแทบอลิซึม (anaerobic fermentation) ในกรณีที่น้ำตาลกลูโคสมีความเข้มข้นสูงและหรือภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ไพรูเวตถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเรียกว่าเกิดภาวะ “การหมัก” (fermentation) ขึ้น โดยภาวะนี้มีจำนวนเซลล์ยีสต์เพิ่มเล็กน้อยและมีการเปลี่ยนไพรูเวตให้เป็นอะซีทัลดีไฮด์แล้วถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นเอทานอล ส่วน 2 $NADH_2$ ที่ได้จากขั้นตอนแรกถูกเปลี่ยนเป็น 2 NAD^+ ในขั้นตอนการเปลี่ยนเป็นเอทานอลเพื่อนำกลับไปใช้ในการสังเคราะห์ 2 ATP อีกรอบหนึ่ง ทำให้วิถีการเจริญของยีสต์ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนดำเนินต่อไปได้ โดยมี 2 NAD^+ เพียงพอในการใช้งาน

องค์ประกอบทางเคมีในสาโท

มนตรี เชาวน์สังเกต (2521) ได้ทำการวิเคราะห์สาโทในขณะที่ยังมีปฏิกิริยาของการหมักจากบางแหล่งในประเทศ 11 ตัวอย่าง พบว่ามีลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีดังนี้

ค่าความเป็นกรด-เบส	3.40 – 4.70
ปริมาณกรดทั้งหมด (% กรดแลคติก)	0.29 – 0 .93
กรดระเหยง่าย (% กรดแอซิติก)	0.001 – 0.061
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (°Brix)	5.2 – 13.8
น้ำตาลรีดิวซ์ (%)	0.15 – 5.95
แอลกอฮอล์ (%)	3.0 – 11.0

และในการวิเคราะห์องค์ประกอบของสาโทที่หมักโดยลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ 5 ตัวอย่าง และปล่อยให้เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์ ปรากฏว่าได้สาโทที่มีลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีดังนี้

ค่าความเป็นกรด-เบส	3.71 – 4.00
ปริมาณกรดทั้งหมด (% กรดแลคติก)	1.18 – 4.23
กรดระเหยง่าย (% กรดแอซิติก)	0.026 – 2.43
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (°Brix)	7.8 – 15.6
น้ำตาลรีดิวซ์ (%)	0.0 – 7.3
แอลกอฮอล์ (%)	6.8 – 14.8

2.8 สารประกอบที่ให้กลิ่นรสในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

สารประกอบที่ให้กลิ่นรสในสาโทนั้นมีความคล้ายคลึงกับที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดอื่นๆ ซึ่งสารประกอบที่ให้กลิ่นรสนั้นเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by product) ที่เกิดขึ้นโดยยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ในการสร้างสารประกอบให้กลิ่นของยีสต์มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง เช่น การเปลี่ยนแปลงภาวะในการหมัก ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส และการกวน เป็นต้น ดังนั้นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสในเครื่องดื่มแอลกฮอล์แต่ละประเภทมีชนิดและปริมาณที่แตกต่างกันไปแปรผันตามวัตถุดิบ สายพันธุ์จุลินทรีย์ และกระบวนการที่ใช้ในการผลิต ตารางที่ 2.1 แสดงสารประกอบที่ให้กลิ่นรสในเครื่องดื่มแอลกออล์ประเภทต่างๆ และตารางที่ 2.2 แสดงสารประกอบที่ให้กลิ่นรสในสาโทจากแหล่งต่างๆ ซึ่งจะพบว่ามีสารประกอบที่ให้กลิ่นรสในปริมาณที่แตกต่างกัน จากปัจจัยที่กล่าวมาแล้ว

ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบและปริมาณของสารประกอบเอสเทอร์และฟูเซลออยล์ที่พบในเครื่องดื่มแอลกออล์ชนิดต่างๆ

สารประกอบที่ให้กลิ่นรส	ชนิดของเครื่องดื่มแอลกออล์		
	สาเก	ไวน์	เบียร์
สารประกอบเอสเทอร์ (มก. /ล.)			
เอทิลอะซิเทต	20-30	33.5	8.2-47.6
ไอโซบิวทิลอะซิเทต	0.2-0.5	0.02	0.03-0.25
เอทิลบิวทิเรท	0.5	0.13	0.09
ไอโซเอมิลอะซิเทต	2	2.2	0.23
เอทิลคาโพรเอท	2	0.71	-
เอทิลคาพริเลท	5	1.0	0.08-0.1
เอทิลคาเพรท	10	0.24	-
เอทิลพีลาโกเนท	3	-	-
เอทิลลอเรท	2	-	-
เอทิลแลคเทต	2	4.0	0.1
ฟีนิลเอทิลอะซิเทต	8	3.5	0.1-0.17
แอลดีไฮด์ (มก. /ล.)			
อะซิทัลดีไฮด์	-	56.0	2.5-24.4
ฟูเซลออยล์ (มก. /ล.)			
โพรพานอล	120	18.5	7.7-16.2
ไอโซบิวทานอล	64	13.0	200

แอคทีฟเอมิลแอลกอฮอล์	-	29.0	7-23
ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	170	114	27-122
2 – ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์	75	-	5-7

ที่มา: Kodama และคณะ (1977), Delfini และ Formica, (2001) และ Berry และคณะ (1987)

ตารางที่ 2.2 แสดงองค์ประกอบและปริมาณของสารประกอบเอสเทอร์และฟูเซลออยล์ที่พบในสาโทต่างๆ

สารประกอบที่ให้กลิ่นรส	ชนิดของเครื่องดื่มแอลกอออล์		
	สาโท[ก]	สาโท[ข]	สาโท[ค]
สารประกอบเอสเทอร์ (มก./ล.)			
เอทิลอะซิเทต	69.4	430.10	19.86
ไอโซบิวทิลอะซิเทต	0.1	0.17	0.60
เอทิลบิวทิเรท	42.1	60.14	-
ไอโซเอมิลอะซิเทต	-	-	0.80
เอทิลคาโพรเอท	ND	ND	-
เอทิลคาพริเลท	0.8	ND	-
เอทิลคาเพรท	-	-	-
เอทิลลอเรท	0.7	1.65	-
เอทิลแลคเทต	0.9	ND	2.45
แอลดีไฮด์ (มก./ล.)			
อะซิทัลดีไฮด์	64.2	67.37	-
ฟูเซลออยล์ (มก./ล.)			
โพรพานอล	ND	ND	3.35
ไอโซบิวทานอล	65.6	71.18	11.61
ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	99.6	111.31	17.40
2 – ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์	23.6	28.17	-

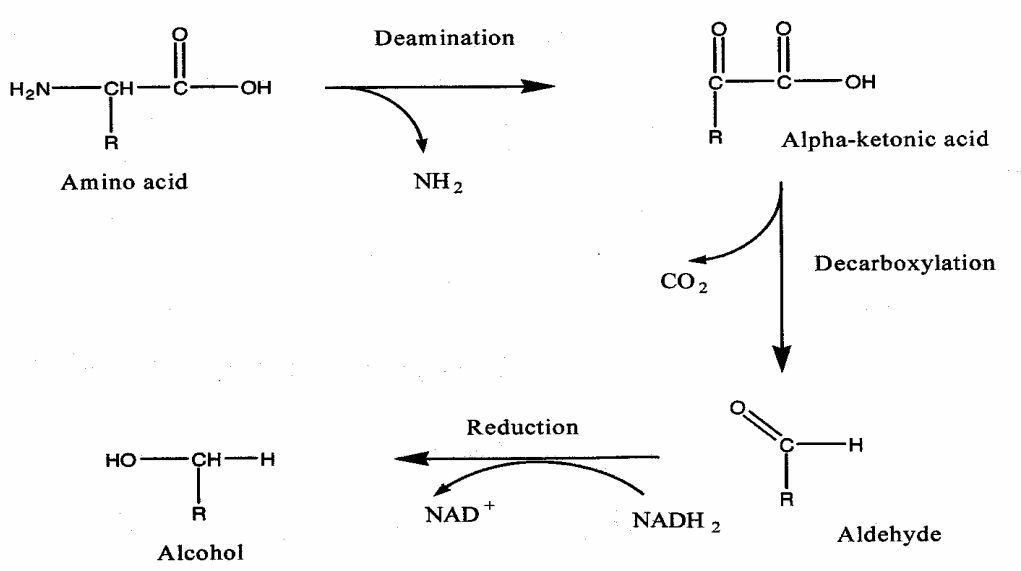
ที่มา: ก Sirisantimethakom และคณะ (2007) ข Sirisantimethakom และคณะ (2008) และ ค Chuenchomrat และคณะ (2008)

สารประกอบให้กลิ่นหลักในไวน์องุ่นทั่วไปคือ ฟูเซลแอลกอฮอล์ กรดระเหยง่าย และ เอสเทอร์ของกรดไขมัน โดยฟูเซลแอลกอฮอล์นั้นมีอยู่ประมาณ 50% ของ สารประกอบให้กลิ่นรส (Jackson, 2000)

ฟูเซลแอลกอฮอล์ (fusel alcohol)

ฟูเซลแอลกอฮอล์ เป็นกลุ่มแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอนอะตอมมากกว่า 2 อะตอม ซึ่งมีความสำคัญ เนื่องจากช่วยให้กลิ่นรสของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีความซับซ้อน ส่วนใหญ่ที่พบในไวน์องุ่นเกิดจากผลิตภัณฑ์พลอยได้ของกระบวนการหมักของยีสต์ ซึ่งการเกิดฟูเซลแอลกอฮอล์ถูกสร้างไปควบคู่กับการสร้างเอทานอล พบฟูเซลแอลกอฮอล์ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มากกว่า 40 ชนิด แต่มีเพียงบางตัวเท่านั้นที่มีความสำคัญต่อกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ ฟูเซลแอลกอฮอล์ที่สำคัญคือพวกแอลกอฮอล์สายตรง ได้แก่ โพรพานอล ไอโซบิวทานอล แอคทิฟเอมิลแอลกอฮอล์ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ แอโรมาติกแอลกอฮอล์ เฮกซานอล และ 2- ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ เป็นต้น ความเข้มข้นของฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีความสำคัญ โดยพบว่าที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 300 มก./ล. ช่วยทำให้เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดนั้นมีกลิ่นรสที่ซับซ้อน แต่ถ้ามากกว่า 300 มก./ล. ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี ฉุน และกลบกลิ่นรสที่ดีของสารตัวอื่น (พรพิมล ควรรณสุ, 2548) นอกจากนี้ฟูเซลแอลกอฮอล์ยังมีบทบาททางอ้อมในการพัฒนากลิ่นหอมของไวน์ โดยเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอินทรีย์ ทำให้เกิดเอสเทอร์ โดยในระหว่างกระบวนการหมักมีการสร้างเอสเทอร์อย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์จากยีสต์และมีการสร้างเอสเทอร์ต่อเนื่องไปในระหว่างการบ่มด้วย (Jackson, 2000)

การสังเคราะห์ฟูเซลแอลกอฮอล์นั้นเกิดโดยยีสต์สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ โดยโมเลกุลของกรดอะมิโนเกิดดีอะมิเนชัน (deamination) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ดึงเอาแอมโมเนียออกจากโมเลกุลของกรดอะมิโนได้เป็นกรดแอลฟาคีโตนิก (α-ketonic acid) จากนั้นเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิลเลชัน (decaboxylation) เอาคาร์บอนไดออกไซด์ออกได้เป็นแอลดีไฮด์ แล้วจึงเกิดปฏิกิริยารีดักชันของแอลดีไฮด์ได้เป็นแอลกอฮอล์ โดยปฏิกิริยาสุดท้ายมีการใช้ $NADH_2$ โดยเปลี่ยนไปเป็น NAD^+ ดังแสดงในภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดอะมิโนไปเป็นฟูเซลแอลกอฮอล์
ที่มา : Branco และคณะ, 2000

จากกระบวนการดังกล่าวข้างต้นทำให้ได้ชนิดและปริมาณของฟูเซลแอลกอฮอล์แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน ดังสรุปได้ในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 กรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นและฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในไวน์องุ่น (Branco และคณะ, 2000)

กรดอะมิโน	ฟูเซลแอลกอฮอล์	ความเข้มข้นในไวน์ (มก./ล.)
ลิวซีน	ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	80 – 300
วาลีน	ไอโซบิวทานอล	50 – 150
ไอโซลิวซีน	แอคทิฟเอมิลแอลกอฮอล์	30 – 100
2-ฟีนิลอลานีน	2- ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์	10 – 100
ทรีโอนีน	โพรพานอล	ไม่มีข้อมูล

กรด (Acids)

กรดในไวน์สามารถแยกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ กรดระเหยง่าย และ กรดระเหยยาก กรดระเหยหมายถึงกรดที่สามารถถูกดึงออกได้อย่างรวดเร็วโดยการกลั่น ส่วน กรดระเหยยาก นั้นเป็นกรดที่ไม่สามารถระเหยได้ ปริมาณกรดรวมหมายถึงผลรวมของกรดทั้ง 2 ชนิด กรดระเหยหลักในไวน์องุ่นคือกรดอะซิติก นอกจากนี้ยังรวมไปถึงพวกกรดคาร์บอกซิลิกอื่น เช่น กรดฟอร์มิก กรดบิวทิริก และ กรดโพรพิโอนิก ซึ่งกรดทุกตัวให้กลิ่นที่แตกต่างกัน เช่น กรดแอซิติก ให้กลิ่นน้ำส้มสายชู กรดโพรพิโอนิก ให้กลิ่น fatty กรดบิวทิริก ให้กลิ่นคล้ายเนยที่เหม็นหืน (rancid butter) ส่วนถ้ากรดคาร์บอกซิลิกที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 6 – 10 ขึ้นไปให้กลิ่น goaty odor แต่แม้ว่ากรดเหล่านี้เกิดขึ้นในไวน์ แต่สามารถตรวจพบได้เฉพาะในไวน์ที่เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นเท่านั้น เนื่องจากปกติ กรดแอซิติกเป็นกรดระเหยง่ายหลักในไวน์ โดยเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ของเมแทโบไลต์ของยีสต์และแบคทีเรีย ส่วนกรดระเหยยากหมายถึงกรดอินทรีย์ที่ไม่รวมกรดที่ระเหยได้ซึ่งทำหน้าที่ควบคุม pH ในไวน์ กรดทาร์ทาริกและกรดมาลิกซึ่งเป็นกรดระเหยยากหลักในไวน์ ถ้าในไวน์ที่เกิดกระบวนการหมักแบบมาโลแลคติก (malolactic fermentation) กรดมาลิกถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก กระบวนการหมักมีผลเล็กน้อยกับปริมาณกรดรวม แต่สามารถเพิ่มชนิดของกรด ซึ่งการเพิ่มชนิดของกรดอาจมีบทบาทรองในการเกิดสารให้กลิ่นระหว่างการบ่มไวน์ (Jackson, 2000) กรดอินทรีย์อื่นๆ เช่น กรดซิตริก กรดไอโซซิตริก กรดฟูมาริก และ กรดแอลฟาคีโตกลูตาริก ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ (intermediate) ใน TCA cycle ของกระบวนการเมแทโบลิซึมของยีสต์ กรดเหล่านี้เกิดจากการย่อยสลายน้ำตาล กรดอะมิโน และกรดไขมัน กรดเหล่านี้ส่วนใหญ่พบได้น้อยและไม่พบว่ามีผลทางการทดสอบประสาทสัมผัส (sensory) ในไวน์

กรดอินทรีย์ในไวน์มีความสำคัญเท่าๆ กับแอลกอฮอล์ กรดไม่เพียงแต่ทำหน้าที่ให้รสชาติที่สดชื่น(refreshing taste) แต่กรดยังช่วยเพิ่มรสชาติในปากอีกด้วย บทบาทหลักของกรดคือช่วยคง pH ให้อยู่ในระดับต่ำ ซึ่งมีความสำคัญต่อความคงตัวของสีในไวน์แดง ในไวน์ที่มีค่า pH สูงๆ นั้นทำให้ง่ายต่อการเกิดออกซิเดชัน และทำให้สูญเสียกลิ่นหอมและสีเปลี่ยนได้ นอกจากนี้ที่ค่า pH ต่ำยังมีประโยนช์ในการป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นด้วย เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ใน pH ต่ำ (Jackson, 2000)

กรดแอซิติกมีประโยชน์เมื่อมีอยู่ในผลิตภัณฑ์ในปริมาณน้อยๆ ถ้าปริมาณกรดคาร์บอกซิลิก เกินกว่าระดับ threshold จะให้ผลในทางลบต่อกลิ่นรสของไวน์ ในระหว่างกระบวนการหมักและบ่ม กรดมีผลต่อปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์ ซึ่งมีความสำคัญต่อกลิ่นรสผลไม้ของไวน์ นอกจากนี้อิทธิพลของความเป็นกรดยังมีผลในระหว่างการบ่ม ที่ pH ต่ำทำให้เกิดการย่อยสลายพวก

ไดแซ็กคาไรด์ เช่น ทรีฮาโลส และพอลิแซ็กคาไรด์อื่นๆ ซึ่งเป็นการเพิ่มน้ำตาลในไวน์ในระหว่างการบ่มด้วย (Jackson, 2000)

กรดไพรูวิก

กรดไพรูวิก เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการไกลโคลิซิสโดย 1 โมเลกุลของกลูโคสถูกย่อยสลายได้ 2 โมเลกุลของกรดไพรูวิกและพลังงาน และกรดไพรูวิก สามารถถูกเปลี่ยนไปเป็นสารตัวอื่นใน 2 ภาวะ คือ ถ้าใน ภาวะที่มีอากาศ กรดไพรูวิก ถูกเปลี่ยนเป็น อะซิติลโคเอนไซม์ เอ และเข้าสู่วัฏจักร TCA ซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์จากเมแทบอไลต์มากมาย หลายชนิด เช่น กรดซัคซินิก กรดแอซิติก และ 2,3 บิวเทนไดออล เป็นต้น หรือในภาวะ ที่ไม่มีอากาศ กรดไพรูวิกจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกโดยเอนไซม์ แลคเทตดีไฮโดรจีเนส และ โคเอนไซม์ NADH ในกระบวนการหมักแลคเทต หรือ จะถูกเปลี่ยนไปเป็น อะเซทัลดีไฮด์ และ เปลี่ยนต่อไปเป็นเอทานอลในที่สุด ของกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ กรดไพรูวิกจึงเป็นสารตัวกลางที่สำคัญ ของกระบวนการเมแทบอลิซึม (Delfini และ Formica, 2001)

กรดซิตริก (Citric acid)

กรดซิตริกในองุ่นมีปริมาณน้อยมากเพียง 5% ของกรดทั้งหมดคล้ายกับกรดมาลิก กรดซิตริกสามารถถูกเปลี่ยนเป็นสารอื่นได้ง่ายโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในไวน์องุ่น ตัวอย่างเช่น กรดซิตริกสามารถถูกหมักให้เป็นกรดแลคติกได้และแลคติกแบคทีเรียบางชนิดสามารถหมักกรดซิตริกให้เป็นกรดแอซิติกได้เช่นกัน แต่ปริมาณกรดแอซิติกที่มากเกินไปก็ไม่เป็นที่พึงประสงค์ในไวน์ ดังนั้นการที่กรดซิตริกเปลี่ยนไปเป็นกรดแอซิติกจึงประสบปัญหามาก ทำให้ไม่ค่อยพบการนำกรดซิตริกไปปรับน้ำองุ่นให้เป็นกรดมากขึ้นก่อนนำไปสู่กระบวนการหมักไวน์ แต่หลังจากกระบวนการหมักไวน์สิ้นสุดมีการเติมกรดซิตริกลงไปในไวน์เล็กน้อยเพื่อเพิ่มรสและสีในไวน์ทำให้ไวน์มีสีแดงขึ้น แต่ไม่นิยมใช้ในไวน์แดง (โชคชัย วนภู และคณะ, 2546) นอกจากนี้ปริมาณกรดมีความสำคัญ ต่อกระบวนการหมักและคุณภาพของไวน์ คือ

- ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ
- มีสมบัติเป็นตัวป้องกันการเกิดออกซิเดชันของซัลเฟอร์ไดออกไซด์
- ทำให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ต้องการเพิ่มขึ้น
- ทำให้ไวน์ใสขึ้น
- ช่วยปรับภาวะสมดุลของไวน์

กรดแอซิติก

ในระหว่างกระบวนการหมักไวน์ ยีสต์ช่วยสร้างกรดแอซิติกได้ในปริมาณน้อย ระดับปกติที่พบในไวน์คือ น้อยกว่า 300 มก./ล. กรดแอซิติกสามารถช่วยเพิ่มความซับซ้อนให้กับกลิ่นรสที่ดี

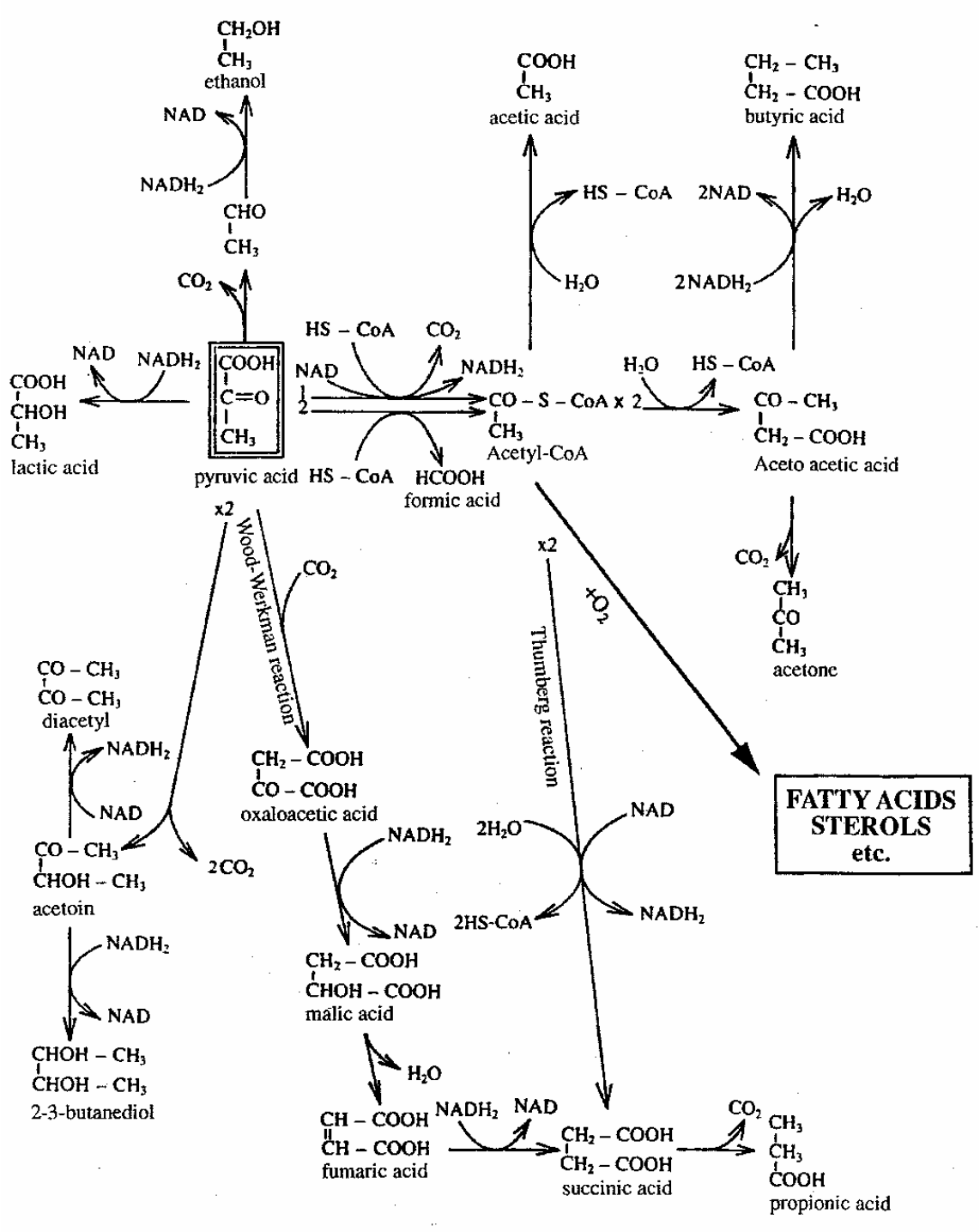
ในไวน์ได้ มีความสำคัญในการสร้างสารในกลุ่มแอซิเทตเอสเทอร์ซึ่งให้กลิ่นผลไม้ในไวน์ แต่ถ้ามีมากเกิน 300 มก./ล. จะให้เกิดรสเปรี้ยวและกลิ่นที่ไม่ดีกับไวน์ ซึ่งถ้ามีปริมาณกรดแอซิติกมากแสดงว่าอาจเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียกรดแอซิติกหรือกรดแลคติกได้ (Jackson, 2000)

กรดแลคติก

ในระหว่างกระบวนการหมักไวน์ ยีสต์สร้างกรดแลคติกได้ในปริมาณน้อย คือประมาณ 0.1 – 0.6 กรัมต่อลิตร (Delfini และ Formica, 2001) ถ้ามีปริมาณกรดแลคติกมากในไวน์แสดงว่าเกิดจากเมแทบอไลต์ของแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งผลิตเอนไซม์ในการเปลี่ยนกรดมาลิกเป็นกรดแลคติกซึ่งเรียกว่าเกิดการหมักแบบมาโลแลคติก โดยมากกระบวนการหมักดังกล่าว พบได้ในการผลิตไวน์แดง ในการเกิดการหมักแบบมาโลแลคติกจะช่วยเปลี่ยนรสชาติที่รุนแรงของกรดมาลิกเป็นรสชาติที่นุ่มนวลขึ้นของกรดแลคติกได้ (Jackson, 2000) กรดแลคติกช่วยเพิ่มความเป็นกรดในไวน์แต่ไม่เพิ่มรสชาติของความเป็นกรด ยีสต์ที่สามารถสร้างกรดแลคติกได้ดีนั้นจึงจัดเป็นยีสต์ที่ดี (Delfini และ Formica, 2001)

กรดซัคซินิก

เป็นกรดที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by product) หนึ่งของเมแทบอลิซึมของยีสต์ ในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์กรดซัคซินิกถูกสร้างขึ้นประมาณ 0.5– 1.5 กรัมต่อลิตร (Delfini และ Formica, 2001) กรดซัคซินิกเป็นกรดที่คงตัวในไวน์ ทำให้เกิดรสขมเล็กน้อยในไวน์ ปริมาณจะเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก และเป็นกรดที่มีความสำคัญเป็นอันดับที่สองในไวน์ชนิด Noble muscadine (Lamikanra, 1997) ยีสต์ที่สามารถสร้างกรดซัคซินิกได้ ได้แก่ *Saccharomyces* spp*, Torulopsis* spp และ *Hensenula* spp เป็นต้น (Delfini และ Formica, 2001)



ภาพที่ 2.6 การสร้างสารประกอบทุติยภูมิของกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ที่มีกรดไพรูวิกเป็นสารตั้งต้น

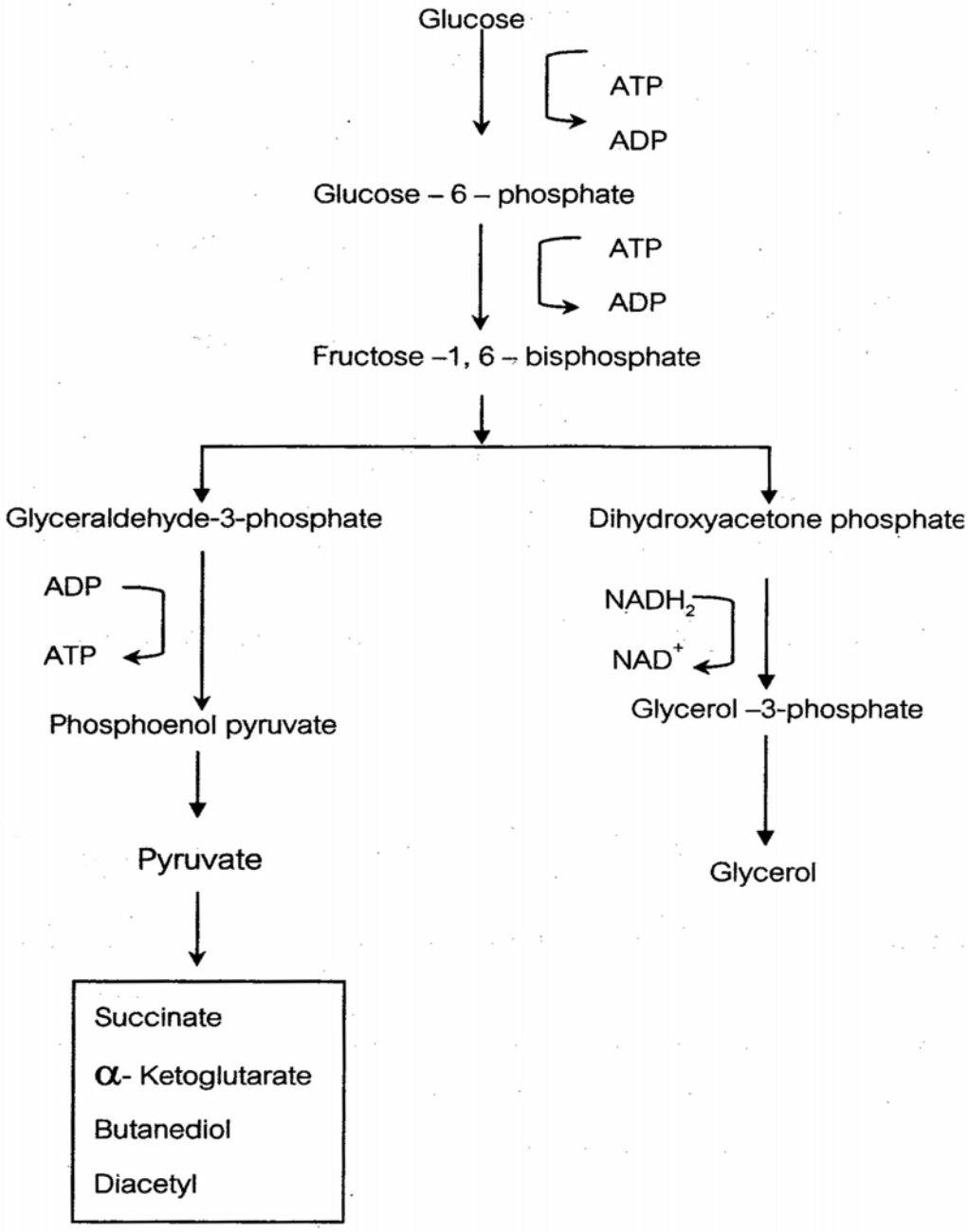
ที่มา : Delfini และ Formica, 2001

กลีเซอรอล

เป็นสารในกลุ่มพอลิออลซึ่งถูกสร้างโดยยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ พบได้ในความเข้มข้นระหว่าง 3 - 11 กรัมต่อลิตร กลีเซอรอลมีความเกี่ยวข้องกับบอดี้ของไวน์ ให้ความรู้สึกกลมกล่อมของไวน์ในปาก (Delfini และ Formica, 2001) มีรายงานว่าเป็นสารที่มีความสำคัญต่อการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส ในไวน์ไม่หวาน (dry wine) จะพบว่ามีปริมาณ กลีเซอรอลอยู่มากนอกเหนือจากน้ำและเอทานอล กลีเซอรอลมีรสหวานเล็กน้อยแต่ไม่ได้เป็นที่น่าสังเกตในไวน์หวาน (sweet wine) มันมีบทบาทรองในไวน์ไม่หวานซึ่งมีปริมาณของกลีเซอรอลมากกว่า threshold สำหรับความหวาน (มากกว่า 5 กรัมต่อลิตร) กลีเซอรอลเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญของ flor yeast ในการผลิตไวน์เชอรี่ในระหว่างกระบวนหมักปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต กลีเซอรอลได้แก่ สายพันธุ์ของยีสต์ อุณหภูมิ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และค่า pH (Jackson, 2000)

ชีวเคมีของการเกิดกลีเซลรอล (ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย และพัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2548)

นอกจากยีสต์จะเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นเอทานอลในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแล้ว ยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้ทำไวน์ยังสามารถเปลี่ยนกลูโคสโดยวิถีการหมักกลีเซอโรไพรูวิก (glyceropyruvic fermentation) ให้ได้กลีเซลรอล และไพรูเวต โดยการเกิดกลีเซลรอลนั้นส่วนใหญ่จะเกิดในระยะเริ่มต้นของกระบวนการหมัก ซึ่งการผลิตกลีเซลรอลจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์และปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์เริ่มต้นที่มีอยู่ในน้ำผลไม้ก่อนหมัก เพราะซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะไปทำปฏิกิริยากับอะเซทัลดีไฮด์ ทำให้อะเซทัลดีไฮด์ไม่สามารถรีดิวซ์ต่อไปเป็นเอทานอลได้ เป็นผลให้วิถีการผลิตเอทานอลหยุดลง โดยทั่วไปร้อยละ 8 ของกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นกลีเซลรอล อีกร้อยละ 92 ของกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล ส่วนไพรูเวตสามารถเปลี่ยนต่อไปเป็นสารประกอบอื่นๆ ได้ดังภาพที่ 2.7 ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ล้วนมีผลต่อกลิ่นและรสชาติของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์



ภาพที่ 2.7 แสดงวิถีการย่อยสลายกลูโคสเป็นกลีเซอรอล ซัคซิเนตและสารประกอบอื่นๆ โดยยีสต์ ในภาวะที่ไม่ใช้อากาศ

ที่มา : Zoecklein และคณะ, 1989

เอสเทอร์ (Esters)

เอสเทอร์เป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก เกิดจากการรวมกันระหว่างกลุ่มคาร์บอกซิลิก ของกรดอินทรีย์และกลุ่มไฮดรอกซิลของแอลกอฮอล์หรือฟีนอล ตัวอย่างได้แก่ การเกิดเอทิลแอซิเทตซึ่งเกิดจากกรดแอซิติกและเอทานอล เป็นต้น ซึ่งเอสเทอร์ เป็นสารให้กลิ่นที่ดีในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เอทิลแอซิเทต ให้กลิ่นผลไม้ เอทิลแคโพรเอตให้กลิ่นแอปเปิ้ล ไอโซเอมิลแอซิเทตให้กลิ่นกล้วยหอมและแอปเปิ้ล ไอโซบิวทิลแอซิเทตให้กลิ่นผลไม้ และ 2 ฟีนิลเอทิลแอซิเทตให้กลิ่นกุหลาบ น้ำผึ้ง และ แอปเปิ้ล เป็นต้น ในไวน์สามารถพบเอสเทอร์ได้หลากหลายมีทั้งที่สามารถระบุได้ และมีทั้งที่มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถระบุได้ ซึ่งเอสเทอร์ที่มีปริมาณเท่ากับหรือมากกว่าระดับ threshold นั้นจะให้กลิ่นผลไม้ แสดงให้เห็นว่าปริมาณของเอสเทอร์มีความสำคัญยิ่งต่อกลิ่นรสของไวน์ (พรพิมล ควรรณสุ, 2548)

เอสเทอร์สามารถแบ่งได้เป็น อะลิฟาติกเอสเทอร์ และฟีโนลิกเอสเทอร์ แต่ในกลุ่มของฟีโนลิกเอสเทอร์ส่วนใหญ่สามารถตรวจพบได้ต่ำกว่าระดับ threshold เนื่องจากระเหยได้ยาก และมีปริมาณน้อย เอสเทอร์ กลุ่มนี้จึงมีอิทธิพลต่อกลิ่นรสของไวน์น้อย ดังนั้นเอสเทอร์ในกลุ่มของอะลิฟาติก เอสเทอร์จึงเป็นเอสเทอร์หลักที่พบในไวน์ ซึ่งในกลุ่มนี้สามารถแยกย่อยได้อีกเป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่

1. โมโนคาร์บอกซิลิกแอซิดเอสเทอร์ ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลเพียงหมู่เดียว
2. ไดหรือไตรคาร์บอกซิลิกแอซิดเอสเทอร์ ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิล 2 หรือ 3 หมู่
3. ไฮดรอกซิลและออกโซแอซิดเอสเทอร์ ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซีหรือหมู่คีโตน

โดยใน 3 กลุ่มย่อยนี้ มีเฉพาะโมโนคาร์บอกซิลิกแอซิดเอสเทอร์ เท่านั้นที่ถูกเชื่อว่ามีความสำคัญทางด้านกลิ่นรส ซึ่งขึ้นอยู่กับ เอทานอลและกรดไขมันอิ่มตัว เช่น กรดเฮกซาโนอิก (แคโพรอิก) กรดออกทาโนอิก (แคพริริก) และ กรดเดคาโนอิก (แคพริก) และขึ้นกับกรดแอซิติก และฟูเซลล์แอลกอฮอล์ เช่น ไอโซเอมิล และ ไอโซบิวทิล แอลกอฮอล์ ซึ่งในกลุ่มนี้พบว่าให้กลิ่นรสในไวน์มาก เอสเทอร์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำเหล่านี้จะถูกเรียกว่า เอสเทอร์ผลไม้ (fruit ester) เนื่องจากส่วนใหญ่ให้กลิ่นผลไม้ เช่น ไอโซเอมิลแอซิเทต ให้กลิ่นกล้วย (banana like odor) และ เบนซิลแอซิเทต ให้กลิ่นแอ๊ปเปิ้ล (apple like odor) เป็นต้น เมื่อความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนเพิ่มขึ้นกลิ่นจะเปลี่ยนจากกลิ่นผลไม้ไปสู่กลิ่นสบู่ (soap like odor) และสุดท้ายเมื่อกรดไขมันมีคาร์บอน 16 ถึง 18 ให้กลิ่นน้ำมันหมู (lard like odor) ส่วนในกลุ่มของไดหรือไตรคาร์บอกซิลิกแอซิดเอสเทอร์ นั้นปกติปริมาณที่จะมีเกิดขึ้นในไวน์จะประมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 1 มก./ล. โดยเฉพาะเอทิลแลคเทต ซึ่งเกิดจากกระบวนการหมักแบบมาโลแลคติก แต่สารในกลุ่มนี้มีกลิ่นอ่อนจึงไม่มีผลต่อกลิ่นรส

ของไวน์อย่างโดดเด่น แต่ในทางตรงข้ามการเกิดของ เมทาโนลิก และ เอทาโนลิก เอสเทอร์ ของกรดซัคซินิกให้กลิ่นในไวน์ Muscadine ตัวอย่างอื่นๆ คือ เอสเทอร์ที่ขึ้นกับ กรดมาลิก กรดทาร์ทาริก และกรดซิตริก ในกลุ่มของ ไฮดรอกซิลและออกโซแอซิดเอสเทอร์นั้น เกิดการระเหยได้ยาก และพบว่ามีบทบาททางประสาทสัมผัสด้านการชิมเล็กน้อย เอสเทอร์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับกรดแลคติก ส่วนเอทิลและเมทิลเอสเทอร์ของกรดอะมิโนจะเกิดในระดับ มก./ล. และสมบัติทางประสาทสัมผัสด้านการชิมยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Jackson, 2000)

มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการเกิดเอสเทอร์ในระหว่างกระบวนการหมัก เช่น กิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรส (Esterase) ในยีสต์ที่ต่างสายพันธุ์ อุณหภูมิในระหว่างการหมัก ถ้าหมักที่อุณหภูมิต่ำ (~ 10° C) จะสนับสนุนการสังเคราะห์ของเอสเทอร์ผลไม้ เช่น ไอโซเอมิล ไอโซบิวทิล และ เฮกซิลแอซิเทต เป็นต้น แต่ถ้าหมักที่อุณหภูมิสูงจะสนับสนุนการเกิดของเอสเทอร์ที่มีมวลโมเลกุลสูงๆ เช่น พวกเอทิลออกทาโนเอต เอทิลเดกแคโนเอต และ ฟีเนทิลแอซิเทต เป็นต้น ระดับของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ระดับต่ำ และปริมาณออกซิเจนระหว่างกระบวนการหมักของยีสต์ ช่วยเพิ่มการเกิดเอสเทอร์ได้ (Querol และ Fleet, 2006)

เอทิลแอซิเทต เป็นเอสเทอร์ที่สำคัญ ในไวน์ปริมาณเอทิลแอซิเทตต้องต่ำกว่า 50– 100 มก./ล. ที่ระดับต่ำ (น้อยกว่า 50 มก./ล.) จึงจะให้กลิ่นที่เหมาะสมและซับซ้อนแก่ไวน์ แต่ถ้ามากเกินกว่า 150 มก./ล. จะให้กลิ่นเหมือนน้ำส้มสายชู ซึ่งเป็นกลิ่นที่ไม่ดีแก่ไวน์ การที่ไวน์มีปริมาณเอทิลอะซิเทตสูงอาจเกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนของไวน์โดยแบคทีเรียกรดอะซิติกได้ (สุมัลลิกา โมรากุล, 2545)

การเกิดสารประกอบเอสเทอร์ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เกิดได้จาก 2 กระบวนการ คือ

1. ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ในระหว่างการเก็บบ่ม ปฏิกิริยานี้เป็นการเกิดเอสเทอริฟิเคชันระหว่าง แอลกอฮอล์กับกรดอินทรีย์ ที่มีในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทำให้เกิดสารประกอบพวกเอสเทอร์ขึ้น กระบวนการนี้เกิดขึ้นอย่างช้าๆ ในระหว่างการหมักบ่มโดยมีเอนไซม์เอสเทอร์เรส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการแสดงในภาพที่ 2.8

$$\text{กรดแอซิติก} + \text{ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์} \xrightarrow{\text{เอสเทอเรส}} \text{ไอโซเอมิลแอซิเทต} + \text{น้ำ}$$

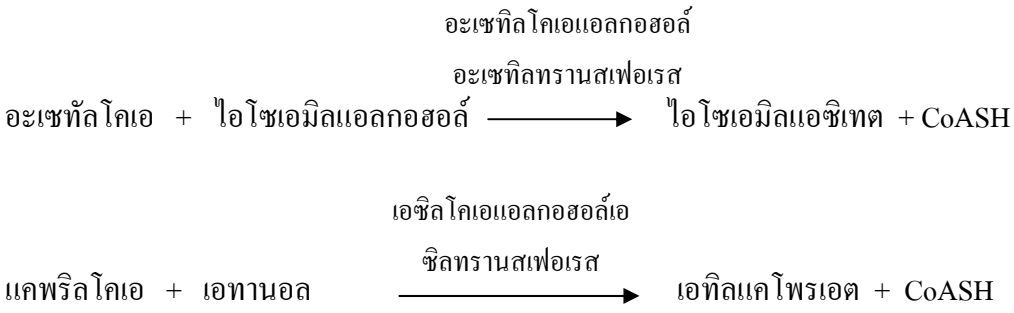
$$\text{กรดแคโพรอิก} + \text{เอทานอล} \xrightarrow{\text{เอสเทอเรส}} \text{เอทิลแคโพรเอต} + \text{น้ำ}$$

ภาพที่ 2.8 การเกิดเอสเทอริฟิเคชันระหว่างกรดและแอลกอฮอล์ โดยมีเอนไซม์เอสเทอเรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ที่มา : สุมัลลิกา โมรากุล, 2545

2. เอสเทอริฟิเคชันโดยเอนไซม์ระหว่างการหมัก

เกิดช่วงหลังของการหมักโดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แอลกอฮอล์อะเซทิลทรานสเฟอเรส และ แอลกอฮอล์เอซิลทรานสเฟอเรส ทำให้เกิดเอสเทอร์ดังสมการที่แสดงในภาพที่ 2.9



ภาพที่ 2.9 การเกิดเอสเทอริฟิเคชันระหว่างการหมักโดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลกอฮอล์อะเซทิลทรานสเฟอเรส และ แอลกอฮอล์เอซิลทรานสเฟอเรส

ที่มา : สุมัลลิกา โมรากุล, 2545

ปริมาณสารประกอบเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น สายพันธุ์ของยีสต์ อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก ออกซิเจน และกรดไขมันไม่อิ่มตัว สารประกอบเอสเทอร์ที่มีความสำคัญในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ มี 2 กลุ่ม คือ เอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid ethyl ester) กับ แอซิเทตเอสเทอร์ (acetate ester) ซึ่งสารประกอบพวกนี้ให้กลิ่นดอกไม้หรือผลไม้ซึ่งเป็นกลิ่นที่ดีและเป็นที่ยอมรับ ตัวอย่าง เอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ได้แก่ เอทิลบิวทาโนเอต เอทิลเฮกซาโนเอต เอทิลออกทาโนเอต ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอลกอฮอล์และสารประกอบที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายหรือการสร้างกรดไขมันของเซลล์ยีสต์

Rajas และคณะ (2003) ทำการศึกษาผลของการใช้ยีสต์ในกลุ่ม Non-*Saccharomyces* 2 ชนิด คือ *Hanseniaspora guilliermondii* 11104 และ *Pichia anomala* 10590 ผลิตไวน์ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ทางการค้า ที่มีต่อปริมาณของอะซิเทตเอสเทอร์ ในไวน์ พบว่าไวน์ที่ผลิตจากหัวเชื้อร่วม(mixed culture) มีปริมาณอะซิเทตเอสเทอร์สูงกว่าไวน์ที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ของ *S. cerevisiae*

ดังนั้น งานวิจัยนี้มุ่งหมายที่จะเปรียบเทียบการหมักสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้ NP1 เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมของ รา ยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากลูกแป้งสุรา NP1 โดยติดตามชนิดและการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารควบคู่กับวิธี PCR-DGGE ตลอดจนเปรียบเทียบคุณภาพสาโทที่ได้ในด้านการทดสอบทางประสาทสัมผัสและรูปแบบสารให้กลิ่น ข้อมูลที่ได้นั้นจะเป็นองค์ความรู้เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาการใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมแทนการใช้ลูกแป้งเพื่อการผลิตสาโทในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany.
2. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
3. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA.
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland.
6. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น MylabTH Thermo-Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
7. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
8. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น GenieII G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
9. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท SANYO, Japan.
10. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 2600 ของบริษัท Denvelle, Germany.
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น NST 2000 ของบริษัท EYELA, Japan.
12. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France.
13. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
14. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดความกว้างรู 0.22 ไมโครเมตร Restek,Thailand
15. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
    Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 ของบริษัท
    Bio-Rad, USA.
16. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)
    Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-ex, Japan.
17. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA. และ รุ่น MJ Mini^{TM} Personal Thermal Cycler บริษัท Biorad, USA

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
3. น้ำตาลกลูโคสของบริษัท Difco Laboratories, USA.
4. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท Prondisa
5. Triton-x 100 ของบริษัท Research organic, USA.
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
8. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France.
9. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Merck, Germany.
10. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA.
11. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$. $2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.
12. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
13. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [($C_{16}H_{32}N(CH_3)_3$)Br] ของบริษัท Bio-basic, Canada.
14. เอนไซม์ตัดจำเพาะทุกชนิดของบริษัท New England Biolab, UK.
15. 1 kb DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, UK.
16. 100 bp DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, UK.
17. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท New England Biolabs, USA.
18. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท New England Biolabs, UK.
19. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA.
20. Proteinase K ของบริษัท Sigma, USA.
21. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส QIAquick PCR purification Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.
22. Formamide (Deionized) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
23. 40% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1 (2.6% C) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
24. Urea ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
25. Ammonium persulfate ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
26. TEMED (N,N,N′,N′-Tetra-methyl-ethylenediamine) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
27. 50xTAE ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.

28. Dye solution ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
29. Ethidium bromide solution เข้มข้น 10 มก./มล. ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
30. แอลกอฮอล์สัมบูรณ์ ของบริษัท Merck, Germany.
31. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland.
32. กรดแอซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท Merck, Germany.
33. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany.
34. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France.
35. กรดซัคซินิก ของบริษัท May & Baker Ltd., England.
36. กรดซิตริก ของบริษัท Merck, Germany.
37. กรดไพรูวิก ของบริษัท Sigma, USA.
38. กรดแลคติก ของบริษัท Sigma, USA.
39. สารมาตรฐานสารประกอบให้กลิ่นรวม (Custom mix Standard) ของบริษัท Sigma, USA.
40. โบรโมครีซอล เพอร์เพิล (Bromocresol purple) ของบริษัท Fluka, Switzerland.
41. นิสทาทิน ของบริษัท Biobasic inc, Canada.

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง

แหล่งลูกแป้งสุรา

นำลูกแป้งสุราที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่า เมื่อนำไปผลิตสาโทแล้วได้รสชาติดี เป็นที่ยอมรับจากส่วนวิทยานิพนธ์ของนางสาว อภิชญา เตชะวสัญญู และ นางสาวนริสา ตรีเนตร นิสิตปริญญาโท ที่ดำเนินการวิจัยใน พ.ศ. 2548 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คือ ลูกแป้งสุราจากจังหวัดนครพนม (NP1)

แปรผันปริมาณลูกแป้งและปริมาณน้ำที่เติมในวันที่สาม (ผ่าน้ำ) ในการหมักสาโทเพื่อให้ได้คุณภาพด้านรสที่ดี

นำลูกแป้งที่คัดเลือกได้แล้ว (NP1) มาแปรผันปริมาณเริ่มต้นที่ใช้ในการหมักสาโท โดยแปรผันปริมาณลูกแป้งที่ 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 และ 5.0% ตามลำดับ คลุกกับข้าวเหนียวนึ่งและนำมาหมักสาโทจนครบ 13 วัน หลังจากนั้นแยกส่วนใสของสาโทมาบ่มต่อที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน นำสาโทที่ได้มาทดสอบด้านประสาทสัมผัสโดยผู้เชี่ยวชาญ เพื่อเลือกปริมาณลูกแป้งเริ่มต้นที่ใช้ในการหมักเพื่อให้ได้สาโทที่มีรสที่ดี

นำลูกแป้งดังกล่าว ปริมาณ 2.0 2.5 และ 3.0% ตามลำดับ คลุกกับข้าวเหนียวนึ่ง หมักจนครบสามวัน แปรผันปริมาณน้ำที่เติมในวันที่สาม (ผ่าน้ำ) ของการหมักสาโท โดยแปรผันปริมาณน้ำเป็นสองเท่าของปริมาณข้าวเหนียวดิบและสองเท่าของปริมาณข้าวเหนียวนึ่ง นำมาหมักสาโทจนครบ 13 วัน หลังจากนั้นแยกส่วนใสของสาโทมาบ่มต่อที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน นำสาโทที่ได้มาทดสอบด้านประสาทสัมผัส เพื่อเลือกปริมาณน้ำที่ใช้ในการหมักเพื่อให้ได้สาโทที่มีรสที่ดี

การแยกยีสต์และรา จากลูกแป้งสุรา

ราและยีสต์บริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดลอง ทำการแยกโดยนางสาว อภิชญา เตชะวสัญญู นิสิตปริญญาโท ที่ดำเนินการวิจัยใน พ.ศ. 2548 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยสายพันธุ์ของราและยีสต์ ที่แยกได้จากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกแล้ว (NP1) คือ รา 2 สายพันธุ์ *Mucor racemosus, Rhizopus oligosporus* และยีสต์ 3 สายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomycopsis fibuligera* และ *Pichia anomala*

การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก จากลูกแป้งสุรา

นำลูกแป้งสุรา NP 1 มาบดละเอียด จากนั้นชั่ง 1 กรัม ละลายในโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร เจือจางในระดับต่างๆ จากนั้นเกลี่ยสารละลายที่เจือจางในระดับต่างๆ ปริมาตร 0.1 มล. ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่เติมนิสแททินความเข้มข้น 0.004% และโบรโมครีซอล เพอร์เพิล ความเข้มข้น 0.004 % บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็น

เวลา 2 วัน จัดกลุ่มโดยวิธี Polymerase Chain Reaction - Randomly Amplified Polymorphic DNA (PCR-RAPD) นำตัวแทนกลุ่มทำ PCR และส่งวิเคราะห์ลำดับเบสเทียบกับฐานข้อมูล

3.3.1 ผลิตสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมของ รา ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1

3.3.1.1 การหมักสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุรา

บดตัวอย่างลูกแป้งสุรา NP1 4 กรัม ใส่ลงในข้าวเหนียวนึ่ง 200 กรัม ที่บรรจุขวดขนาด 500มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน เติมน้ำในช่วงการหมักวันที่ 3 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างน้ำหมักวันที่ 0 1 2 3 4 5 6 7 9 11และ 13 เพื่อนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น การทดสอบทางประสาทสัมผัส และการติดตามประชากรของจุลินทรีย์ในสาโท

3.3.1.2 การหมักสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ใช้สายพันธุ์บริสุทธิ์ของรา 2 ชนิด คือ *Mucor racemosus* และ *Rhizopus oligosporus* ยีสต์ 3 สายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Pichia anomala* ซึ่งได้รับจากอภิชญา เตชะวสัญญ (2550) และ แบคทีเรียกรดแลคติกโดยคัดแยกบนอาหาร MRS agar จัดกลุ่มโดยวิธี PCR-RAPD นำตัวแทนกลุ่มทำ PCR และวิเคราะห์ลำดับเบสเทียบกับฐานข้อมูลใน Gen Bank

3.3.1.2.1 หาปริมาณ ยีสต์ รา และ แบคทีเรียกรดแลคติกจากลูกแป้งสุรา NP1 ในวันที่ 0 โดยนำลูกแป้งสุรา NP1 มาเจือจาง แล้วเกลี่ยบนอาหาร Yeast malt agar (YM) และ Lysine medium สำหรับยีสต์ Rose bengal สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ รา และ MRS สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก เพื่อนำปริมาณที่ได้มาเป็นปริมาณเริ่มต้นในการหมักสาโทจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม

3.3.1.2.2 หมักสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 โดยให้มีปริมาณ ยีสต์ ราและแบคทีเรียกรดแลคติกเริ่มต้นเท่ากับปริมาณในลูกแป้งวันที่ 0 ตามข้อ 3.3.1.2.1 หมักและเก็บตัวอย่างตามข้อ 3.3.1.1โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมแทนลูกแป้ง เพื่อนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น การทดสอบทางประสาทสัมผัส และการติดตามประชากรของจุลินทรีย์ในสาโท

3.3.1.2.3 หมักสาโทเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.2 โดยแปรผันปริมาณรา ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติก โดยให้มีสัดส่วนของรา ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติก ในปริมาณเพิ่มขึ้นและลดลง 10 เท่าจากปริมาณเริ่มต้นในวันที่ 0 ตามข้อ 3.3.1.2.1 หมักและเก็บตัวอย่างตามข้อ

3.3.1.1 เพื่อนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นและทดสอบทางประสาทสัมผัส ในสาโท

3.3.2 ศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ในสาโทโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี PCR – DGGE

3.3.2.1 ศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ในสาโทโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ

ศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ในน้ำหมักโดยใช้วิธี viable plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะ โดยนำตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการหมักสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุรา NP1 จากข้อ 3.3.1.1 และ ตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการหมักสาโทโดยเชื้อบริสุทธิ์ผสมของ รา ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1จากข้อ 3.3.1.2.2 ไปเจือจางและนำตัวอย่างที่เจือจางแล้วไปเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ ดังนี้

การเพาะเลี้ยงยีสต์และรา

หยดตัวอย่างที่เจือจางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Rose bengal สำหรับตรวจหาปริมาณรา Yeast malt agar (YM) สำหรับตรวจหาปริมาณยีสต์ และ Lysine medium สำหรับตรวจหาปริมาณยีสต์ชนิด non-*Saccharomyces* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนเชื้อ และคำนวณหาปริมาณของราและยีสต์ในน้ำหมัก (หน่วย CFU ต่อมิลลิลิตรน้ำหมัก)

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก

หยดตัวอย่างที่เจือจางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่เติมนิสแททินความเข้มข้น 0.004% และ โบรโมครีซอล เพอร์เพิล ความเข้มข้น 0.004% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนเชื้อและคำนวณหาปริมาณของแบคทีเรียในน้ำหมัก (หน่วย CFU ต่อมิลลิลิตรน้ำหมัก)

3.3.2.2 ศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ในสาโทโดยวิธี PCR – DGGE

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในช่วง 16S rDNA ของแบคทีเรียและ 26S rDNAของยีสต์และรา ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

3.3.2.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB (CTAB DNA extraction method)

นำน้ำหมักที่ได้จากข้อ 3.3.1.1 และ 3.3.1.2.2 มาใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วล้างเซลล์โดยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 500 ไมโครลิตร ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB (Arlorio และคณะ 1999) ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้ ปั่นแยกเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที อีกครั้ง ทิ้งส่วนน้ำใส เติม 600 ไมโครลิตร ของสารละลาย Lysis buffer (สารละลาย Lysis buffer ประกอบด้วย 2% CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris pH 8.0 และ 25 mM EDTA) และ 10 ไมโครลิตรของ Proteinase K (10 mg/ml) ลงในตะกอนเซลล์ เขย่าเบาๆและบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่น

8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ แล้วจึงเติม 600 ไมโครลิตร TE บัฟเฟอร์ และ 1,200 ไมโครลิตร Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25/24/1) เขย่าขึ้นลงเบาๆ 60 ครั้ง และ ปั่น 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ และเติม 600 ไมโครลิตร Phenol/Chloroform/ Isoamyl alcohol (25/24/1) อีกครั้ง เขย่าขึ้นลง 60 ครั้ง ปั่น 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ จากนั้นจึงเติม 1 มิลลิลิตร ของ Isopropanol เขย่าเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาล้างด้วย 70% เอทานอล 500 ไมโครลิตร ปั่น 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วจึงละลายตะกอนด้วย 20 ไมโครลิตร ของ TE บัฟเฟอร์

3.3.2.2.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในช่วง 16S rDNA ของแบคทีเรียและ 26S rDNA ของยีสต์และรา ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ไพรเมอร์ 338f ซึ่งมี GC-clamp เชื่อมต่อบริเวณปลายด้าน5’ (5’-ACTCCTACGGGAGGCAGCA G-3’) และ ไพรเมอร์ 518r (5’-ATTACCGCGGCTGCTGG-3’) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Lee และคณะ, 2005 และเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 26S rDNA ยีสต์และรา โดยใช้ไพรเมอร์ NL1 (5’- GCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3’) ซึ่งมี GC-clamp เชื่อมต่อบริเวณปลายด้าน 5’ และ ไพรเมอร์ LS2 (5’- ATTCCCAAACAACTCGACTC-3’) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Cocolin และคณะ, 2002

3.3.2.2.3 การวิเคราะห์โดยวิธี PCR – DGGE

ใช้อุปกรณ์ของ DCode™ system (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) ในการวิเคราะห์ DGGE โดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจล ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 40 – 60% สำหรับราและยีสต์ และ 50 – 60% สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก ย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที นำไปดูด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One (Bio-Rad, USA.)

3.3.2.2.4 ตัดแถบดีเอ็นเอที่สนใจบนเจลจาก DGGE ไปศึกษาหาลำดับเบสโดยเทียบกับฐานข้อมูลใน Gen Bank

3. 3.3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆของสาโทที่ได้

น้ำหมักที่ได้จากข้อ 3.3.1.1 และ 3.3.1.2.2 มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังนี้

3.3.3.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด – เบส

วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยเครื่อง pH meter

3.3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity, TA) (Amerinec และคณะ, 1979)

นำตัวอย่างมา 5 ml เติมน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส 50 ml แล้วหยด Phenopthalene 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับ NaOH 0.1 นอร์แมล จนสารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู อ่านค่าปริมาตร NaOH ที่ได้ แล้วนำไปคำนวณ %TA

$$\%TA = \frac{V(Titrated) \times N(NaOH) \times MW(lactic\ acid) \times 100}{1000 \times v(Sample)}$$

V = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรากไซด์เป็นนอร์แมล (N)

v = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

MW (กรดแลคติก) = 90

3.3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNSA) (Miller, 1959)

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที ทิ้งให้เย็น เติมน้ำ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบและคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับกราฟของสารมาตรฐาน

3.3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ปริมาณกรดอินทรีย์ และ ปริมาณกลีเซอรอล โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ เอทานอล กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดซิตริก กรดทาร์ทาริก กรดไพรูวิก กรดมาลิก กรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดแอซิติก กรดไอโซบิวไทริก กรดไอโซวาลีอิก และ กลีเซอรอล ตามวิธีที่แสดงในภาคผนวก ข

นำสาโทที่ได้ในวันสุดท้าย มากรองผ่านเซลลูโลสแอซิเทต pore size ขนาด 0.22 ไมโครเมตร วิเคราะห์ตัวอย่างสาโทโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) คำนวณและหาปริมาณโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ที่ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์:	Animex HPX-87H Ion Exclusion 300x7.8 mm
ตัวทำละลายเคลื่อนที่:	H_2SO_4 0.02 มิลลิโมลาร์
อัตราการไหล (flow rate):	0.6 มิลลิลิตรต่อนาที
อุณหภูมิคอลัมน์:	55 องศาเซลเซียส
ชนิดของ detector:	Refractive Index (RI)
ปริมาตรฉีด:	100 ไมโครลิตร

3.3.4 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น (Volatile compounds) ในสาโทที่ได้

นำสาโทที่ได้ในวันสุดท้าย จากข้อ 3.3.1.1 3.3.1.2.2 และ 3.3.1.2.3 มา 10 มิลลิลิตร ใส่ใน vial ที่ปราศจากเชื้อ ขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิทด้วย Crimper 20 mm Seals จากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐาน ที่ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์ :	HP-624, Capillary Column, Agilent 19091v-402 (25.0 m x 0.2 mm id x 1.12 µm film thickness)
Injector :	Split (20:1)
อุณหภูมิของ Injector :	200 องศาเซลเซียส
ปริมาตรฉีด :	1 ไมโครลิตร
Carrier gas :	ฮีเลี่ยม
Carrier gas flow rate :	1 มล./นาที
อุณหภูมิของ Oven :	40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที 40 องศาเซลเซียส ถึง 220 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 15 องศาเซลเซียส/นาที 220 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
Run Time :	20 นาที
ชนิดของ Detector :	Mass spectometer (MS)
Detector gas :	ฮีเลี่ยม
อุณหภูมิของ Detector :	280 องศาเซลเซียส
Headspace Device :	Agilent G1888 Headspace Sampler
อุณหภูมิของ Oven :	80 องศาเซลเซียส
Vial equilibration time :	20 นาที

3.3.5 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory taste) ในสาโท

นำสาโทที่ได้ในวันสุดท้าย จากข้อ 3.3.1.1 3.3.1.2.2 และ 3.3.1.2.3 มาทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยผู้ทดสอบที่มีความเชี่ยวชาญและคุ้นเคยกับการดื่มไวน์และสาโท จำนวน 10 คน ทำการชิมและให้คะแนนในใบให้คะแนน (ภาคผนวก ค) และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ทางสถิติโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16.0

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การแปรผันปริมาณลูกแป้งสุรา และ น้ำที่เติมในวันที่สาม (ผ่าน้ำ) ของการหมักสาโทที่ให้คุณภาพด้านรสที่ดี

เนื่องจากสูตรในการหมักสาโทมีหลากหลายซึ่งมีความแตกต่างกันในปริมาณลูกแป้งสุรา และ น้ำที่เติมในวันที่สาม (ผ่าน้ำ) ของการหมักสาโท ดังนั้น จึงต้องทำการทดลองเพื่อให้ทราบถึงปริมาณลูกแป้งสุรา และ น้ำที่เติมในวันที่สาม (ผ่าน้ำ) ของการหมักสาโทที่ให้คุณภาพด้านรสที่ดี

ผู้เชี่ยวชาญได้เลือกปริมาณลูกแป้งสุราที่ 2.0% ทำให้ได้สาโทที่มีรสชาติดีและมีความกลมกล่อมมากที่สุด เนื่องมาจากปริมาณลูกแป้งสุราที่ 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 และ 5.0% มีปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นในกระบวนการหมักมากไป อาจสร้างสารเมตาบอไลท์ต่างๆมากตามไปด้วย จึงส่งผลต่อรสชาติของสาโท ทำให้สาโทที่ได้ไม่มีความกลมกล่อม ส่วนปริมาณลูกแป้งสุราที่ 1.5% ได้สาโทที่มีความเจือจางมากไป ซึ่งปริมาณลูกแป้งสุราที่ 2.0% เป็นปริมาณลูกแป้งที่นิยมใช้ในการผลิตสาโทโดยทั่วไปด้วย

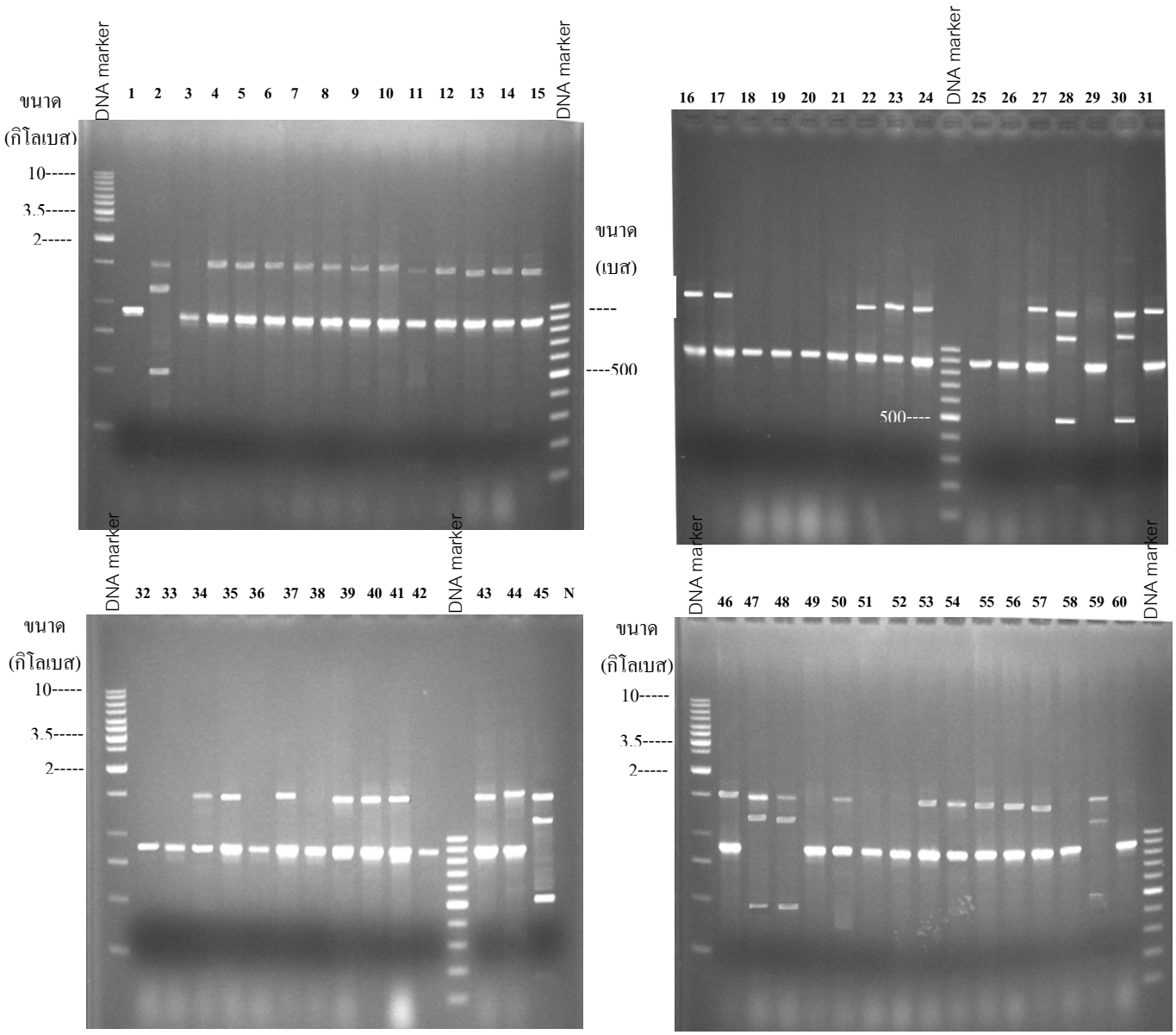
เมื่อนำสาโทที่ได้มาทดสอบด้านประสาทสัมผัสโดยผู้เชี่ยวชาญ เพื่อเลือกปริมาณน้ำที่เติมในวันที่สาม (ผ่าน้ำ) ของการหมักสาโท ผู้เชี่ยวชาญได้เลือกปริมาณน้ำเป็นสองเท่าของปริมาณข้าวเหนียวดิบเพื่อเติมในวันที่สาม (ผ่าน้ำ) ของการหมักสาโทเพื่อให้ได้สาโทที่มีรสที่ดี เนื่องจากปริมาณน้ำเป็นสองเท่าของปริมาณข้าวเหนียวนึ่งนั้น ทำให้ได้สาโทที่มีความเจือจางมากไป

4.1 ผลิตสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมของ รา ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1

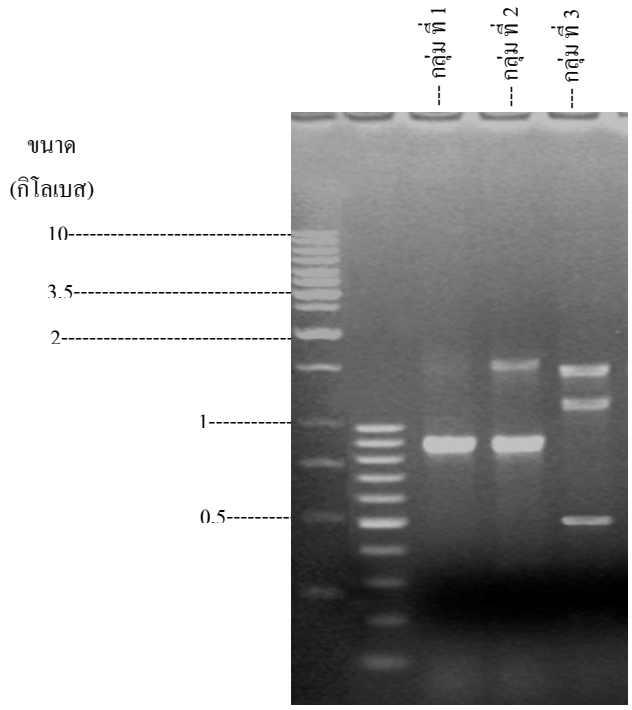
4.1.1 การหมักสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1

4.1.1.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 บนอาหาร MRS agar จัดกลุ่มโดยวิธี PCR-RAPD นำตัวแทนกลุ่มทำ PCR และส่งวิเคราะห์ลำดับเบสเทียบกับฐานข้อมูล

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลูกแป้งสุรา NP1 บนอาหาร MRS agar ได้ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด $6.0x10^3$ CFU/g หลังจากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่คัดแยกได้มาสกัดดีเอนเอ นำดีเอนเอที่ได้มาจัดกลุ่มโดยวิธี PCR-RAPD โดยใช้ไพร์เมอร์แบบสุ่ม (10-mers) ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'- AGC AGC GTG G - 3' (Cocconcelli และคณะ 1995)



ภาพที่ 4.1 แสดงการแบ่งกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด ที่แยกได้บนอาหาร MRS agar โดยแบ่งได้ตามรูปแบบชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอ โดยวิธี PCR-RAPD โดยใช้ไพร์เมอร์แบบสุ่ม (10-mers) ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'- AGC AGC GTG G - 3' (Cocconcelli และคณะ 1995)



ภาพที่ 4.2 แสดงตัวแทนกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกได้ตามรูปแบบชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอ โดยวิธี PCR-RAPD

จากผลการแบ่งกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด $6.0x10^3$ CFU/g ที่แยกได้บนอาหาร MRS agar เมื่อนำมาสกัด ดีเอนเอ และแบ่งกลุ่มตามรูปแบบชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอ โดยวิธี PCR-RAPD สามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติก ได้ออกเป็น 3 กลุ่ม โดยแบคทีเรียกรดแลคติก กลุ่มที่ 1 2 และ 3 มีจำนวน 19 34 และ 7 ไอโซเลต ตามลำดับ หลังจากนั้น นำตัวแทนแต่ละกลุ่มเพิ่มชิ้นส่วนดีเอนเอ โดยใช้ไพรเมอร์ในช่วง 16S rDNA ของแบคทีเรีย คือ ไพรเมอร์ 338f (5'-ACTCCTACGGGAGGC AGCA G-3') และ ไพรเมอร์ 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') และวิเคราะห์ลำดับเบสเทียบกับฐานข้อมูล

ตารางที่ 4.1 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันในฐานข้อมูลใน GenBank

กลุ่มที่	Closest relative	% identity*
1	*Pediococcus pentosaceus*	100
2	*Pediococcus pentosaceus*	100
3	*Pediococcus pentosaceus*	100

* % identity = ร้อยละความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันในฐานข้อมูล GenBank

จากตารางที่ 4.1 พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์16S ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ กับตัวแทนในแต่ละกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีร้อยละของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกับ *Pediococcus pentosaceus* ในฐานข้อมูลเป็น 100% ทั้ง 3 กลุ่ม

4.1.1.2 หาปริมาณ ยีสต์ รา และ แบคทีเรียกรดแลคติกจากลูกแป้งสุรา NP1 ในวันที่ 0

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณ ยีสต์ รา และ แบคทีเรียกรดแลคติกจากลูกแป้งสุรา NP1 ในวันที่ 0

ชนิดจุลินทรีย์		ปริมาณจุลินทรีย์ (ค่าเฉลี่ย± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) CFU/g
ยีสต์	*S. cerevisiae*	$(3.4\pm0.1)\times10^{6}$
	Sm. fibuligera	$(8.5\pm0.3)\times10^{3}$
	P. anomala	$(8.4\pm0.2)\times10^{4}$
รา	*R. oligosporus*	$(3.5\pm0.1)\times10^{3}$
	M. racemosus	$(2.8\pm0.2)\times10^{3}$
แบคทีเรีย	*P. pentosaceus*	$(6.8\pm0.3)\times10^{3}$

จากผลการทดลองหาปริมาณ ยีสต์ รา และ แบคทีเรียกรดแลคติกจากลูกแป้งสุรา NP1 ในวันที่ 0 เพื่อให้ทราบปริมาณเริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตสาโท โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 พบว่า มีปริมาณเฉลี่ยของยีสต์ *S. cerevisiae Sm. fibuligera* และ *P. anomala* เท่ากับ $(3.4\pm0.1)\times10^{6}$ $(8.5\pm0.3)\times10^{3}$ และ $(8.4\pm0.2)\times10^{4}$ CFU/g ตามลำดับ มีปริมาณเฉลี่ยของรา *R. oligosporus* และ *M.racemosus* เท่ากับ $(3.5\pm0.1)\times10^{3}$ และ $(2.8\pm0.2)\times10^{3}$ CFU/g ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกจากลูกแป้งสุรา NP1 คือ *P. pentosaceus* มีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ $(6.8\pm0.3)\times10^{3}$ CFU/g

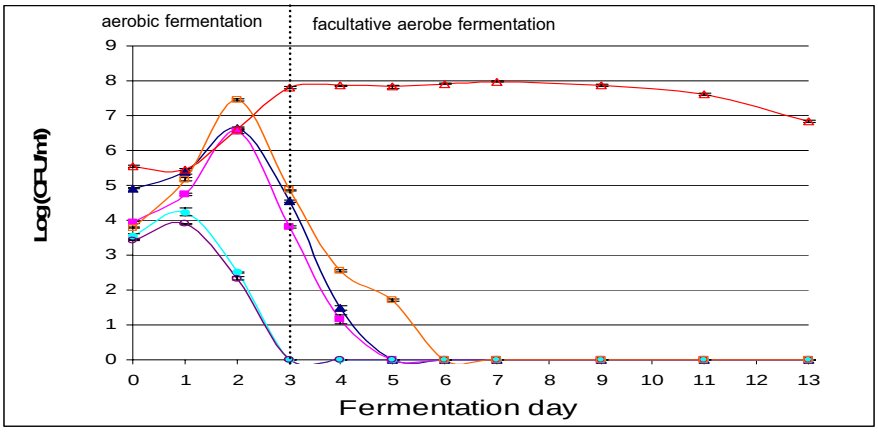
4.2 ติดตามประชากรของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักสาโทโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อควบคู่กับวิธี PCR – DGGE

4.2.1 ศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ในสาโทโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ

การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1

ตารางที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1

Fermented day	ปริมาณจุลินทรีย์ (ค่าเฉลี่ย± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) CFU/g					
	ยีสต์			รา		แบคทีเรีย
	S. cerevisiae	*Sm. fibuligera*	*P. anomala*	*R. oligosporus*	*M .racemosus*	*P. pentosaceus*
D0	$(3.6\pm0.3)\times10^{5}$	$(8.6\pm0.4)\times10^{3}$	$(8.2\pm0.3)\times10^{4}$	$(3.4\pm0.3)\times10^{3}$	$(2.7\pm0.3)\times10^{3}$	$(6.1\pm0.3)\times10^{3}$
D1	$(2.8\pm0.2)\times10^{5}$	$(5.6\pm0.3)\times10^{4}$	$(2.5\pm0.4)\times10^{5}$	$(1.7\pm0.3)\times10^{4}$	$(7.9\pm0.1)\times10^{3}$	$(1.5\pm0.3)\times10^{5}$
D2	$(4.2\pm0.2)\times10^{6}$	$(3.4\pm0.4)\times10^{6}$	$(4.3\pm0.3)\times10^{6}$	$(3.2\pm0.0)\times10^{2}$	$(2.1\pm0.0)\times10^{2}$	$(2.8\pm0.1)\times10^{7}$
D3	$(6.5\pm0.2)\times10^{7}$	$(3.6\pm0.3)\times10^{3}$	$(3.5\pm0.2)\times10^{4}$	0	0	$(7.3\pm0.2)\times10^{4}$
D4	$(7.2\pm0.4)\times10^{7}$	$(1.5\pm0.0)\times10^{1}$	$(3.1\pm0.0)\times10^{1}$	0	0	$(3.5\pm0.0)\times10^{2}$
D5	$(6.7\pm0.4)\times10^{7}$	0	0	0	0	$(5.1\pm0.0)\times10^{1}$
D6	$(8.3\pm0.3)\times10^{7}$	0	0	0	0	0
D7	$(9.6\pm0.3)\times10^{7}$	0	0	0	0	0
D9	$(7.4\pm0.3)\times10^{7}$	0	0	0	0	0
D11	$(4.1\pm0.3)\times10^{7}$	0	0	0	0	0
D13	$(6.7\pm0.2)\times10^{6}$	0	0	0	0	0



ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1

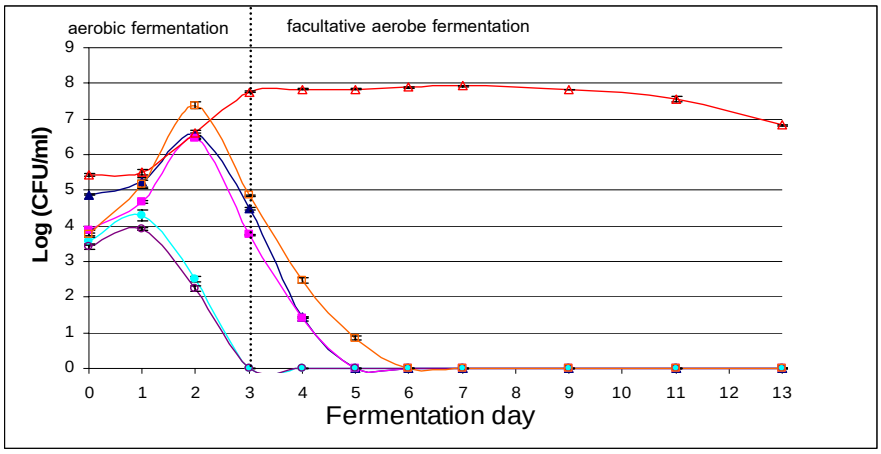
△ *S. cerevisiae*; ▲ *P. anomala*; ■ *Sm. fibuligera*; ● *R. oligosporus* ○ *M. racemosus*

□ *P. pentosaceus*

การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1

ตารางที่ 4.4 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1

Fermented day	**ปริมาณจุลินทรีย์ (ค่าเฉลี่ย± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) CFU/g**					
	ยีสต์			**รา**		**แบคทีเรีย**
	S. cerevisiae	***Sm. fibuligera***	***P. anomala***	***R. oligosporus***	***M .racemosus***	***P. pentosaceus***
D0	$(2.7\pm0.3)\times10^{5}$	$(7.7\pm0.4)\times10^{3}$	$(7.3\pm0.4)\times10^{4}$	$(3.7\pm0.3)\times10^{3}$	$(2.6\pm0.3)\times10^{3}$	$(5.7\pm0.3)\times10^{3}$
D1	$(3.2\pm0.4)\times10^{5}$	$(4.8\pm0.4)\times10^{4}$	$(1.7\pm0.3)\times10^{5}$	$(2.0\pm0.4)\times10^{4}$	$(8.4\pm0.1)\times10^{3}$	$(1.4\pm0.3)\times10^{5}$
D2	$(4.0\pm0.2)\times10^{6}$	$(2.8\pm0.2)\times10^{6}$	$(3.8\pm0.2)\times10^{6}$	$(3.1\pm0.0)\times10^{2}$	$(1.8\pm0.0)\times10^{2}$	$(2.4\pm0.3)\times10^{7}$
D3	$(5.8\pm0.2)\times10^{7}$	$(5.6\pm0.2)\times10^{3}$	$(2.9\pm0.1)\times10^{4}$	0	0	$(7.2\pm0.5)\times10^{4}$
D4	$(6.8\pm0.4)\times10^{7}$	$(2.5\pm0.0)\times10^{1}$	$(2.6\pm0.0)\times10^{1}$	0	0	$(2.9\pm0.0)\times10^{2}$
D5	$(6.8\pm0.4)\times10^{7}$	0	0	0	0	$(4.7\pm0.0)\times10^{1}$
D6	$(7.6\pm0.5)\times10^{7}$	0	0	0	0	0
D7	$(8.4\pm0.2)\times10^{7}$	0	0	0	0	0
D9	$(6.6\pm0.4)\times10^{7}$	0	0	0	0	0
D11	$(3.6\pm0.2)\times10^{7}$	0	0	0	0	0
D13	$(6.7\pm0.2)\times10^{6}$	0	0	0	0	0



ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1

△ *S. cerevisiae*; ▲ *P. anomala*; ■ *Sm. fibuligera*; ● *R. oligosporus* ○ *M. racemosus*

□ *P. pentosaceus*

จากผลการทดลอง การติดตามประชากรของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักสาโทโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ จะเห็นว่ารูปแบบการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 (ภาพที่ 4.3) เหมือนกับเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 (ภาพที่ 4.4) รา สองสายพันธุ์ คือ *R. oligosporus* และ *M. racemosus* ซึ่งสามารถพบได้ตั้งแต่วันที่ 0 ของการหมัก โดย *R. oligosporus* และ *M. racemosus* มีปริมาณเฉลี่ย 10^3 CFU/g และจะลดปริมาณลงในวันที่ 2 ของการหมัก โดยมีปริมาณเฉลี่ย 10^4 และ 10^3 CFU/g ตามลำดับ จนไม่สามารถพบได้ในวันที่ 3 ในขณะที่วันที่ 0 ของการหมักจะพบยีสต์ชนิด non-*Saccharomyces* ได้สองสายพันธุ์ คือ *P. anomala* และ *Sm. fibuligera* ซึ่งมีปริมาณเฉลี่ย 10^4 CFU/g และ 10^3 CFU/g ตามลำดับ โดยยีสต์ดังกล่าวจะค่อยๆเพิ่มมากขึ้นจนมีปริมาณมากที่สุดในวันที่ 2 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณจะเริ่มลดลงโดยวันที่ 3 ของการหมักจะพบ *P. anomala*และ *Sm. Fibuligera* ในปริมาณเฉลี่ย 10^4และ 10^3CFU/g ตามลำดับ จนสุดท้าย ไม่สามารถตรวจพบยีสต์ชนิด non-*Saccharomyces* ได้ในวันที่ 5 ของการหมัก สำหรับยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถตรวจพบได้ตลอดช่วงเวลาในการหมัก โดยสามารถพบได้ตั้งแต่วันที่ 0 ของการหมักโดยมีปริมาณเฉลี่ย 10^5 CFU/g และมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 ของการหมัก โดยมีปริมาณเฉลี่ย 10^7 CFU/g และหลังจากนั้นปริมาณจะลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก โดยมีปริมาณเฉลี่ยเป็น 10^6 CFU/g

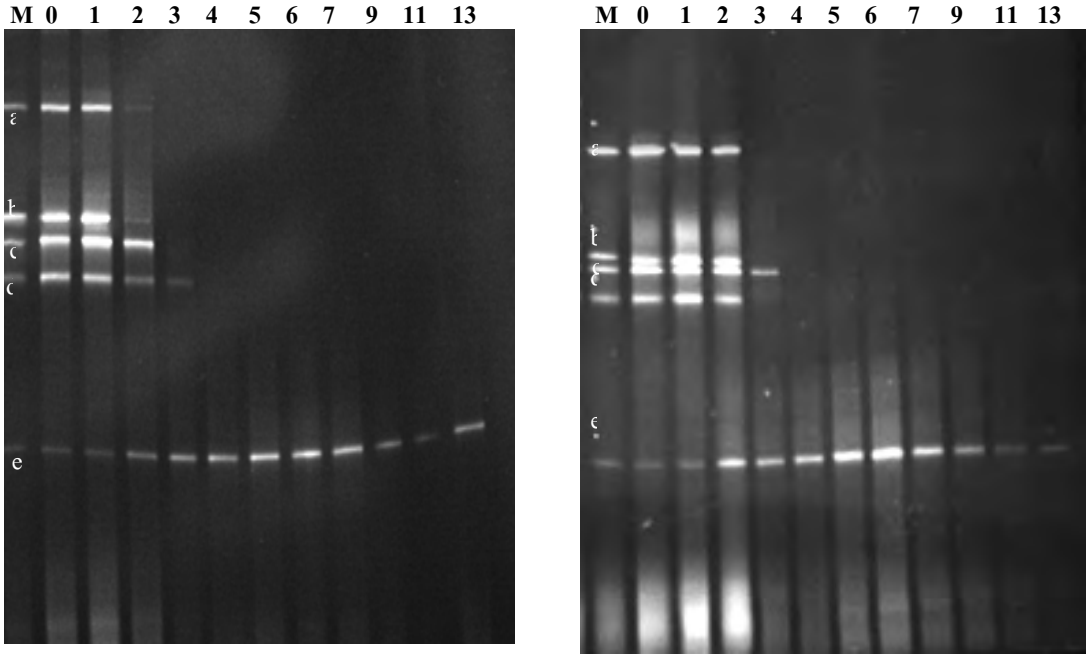
สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบได้ในลูกแป้งสุรา NP1 คือ *P. pentosaceus* สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 0 ของการหมักโดยมีปริมาณเฉลี่ย 10^3 CFU/g และมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก ซึ่งมีปริมาณเฉลี่ย 10^7 CFU/g หลังจากนั้น *P. pentosaceus* จะมีปริมาณลดลงจนไม่สามารถพบได้ในวันที่ 6 ของการหมัก

4.2.2 ศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ในสาโทโดยวิธี PCR – DGGE

นำจีโนมิกดีเอ็นเอจากน้ำหมักของสาโท ในวันที่ 0 1 2 3 4 5 6 7 9 11 และ 13 โดยวิธี CTAB มาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในช่วง 16S rDNA ของแบคทีเรีย โดยใช้ไพรเมอร์ 338f 5’ (5’-ACTCCTACGGGAGGCAGCA G-3’) ซึ่งมี GC-clamp เชื่อมต่อบริเวณปลายด้าน 5’ และ ไพรเมอร์ 518r (5’-ATTACCGCGGCTGCTGG-3’) และ เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในช่วง 26S rDNA ของยีสต์และรา โดยใช้ไพรเมอร์ NL1 (5’- GCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3’) ซึ่งมี GC-clamp เชื่อมต่อบริเวณปลายด้าน 5’ และ ไพรเมอร์ LS2 (5’- ATTCCCAAACAACTCGACTC -3’) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

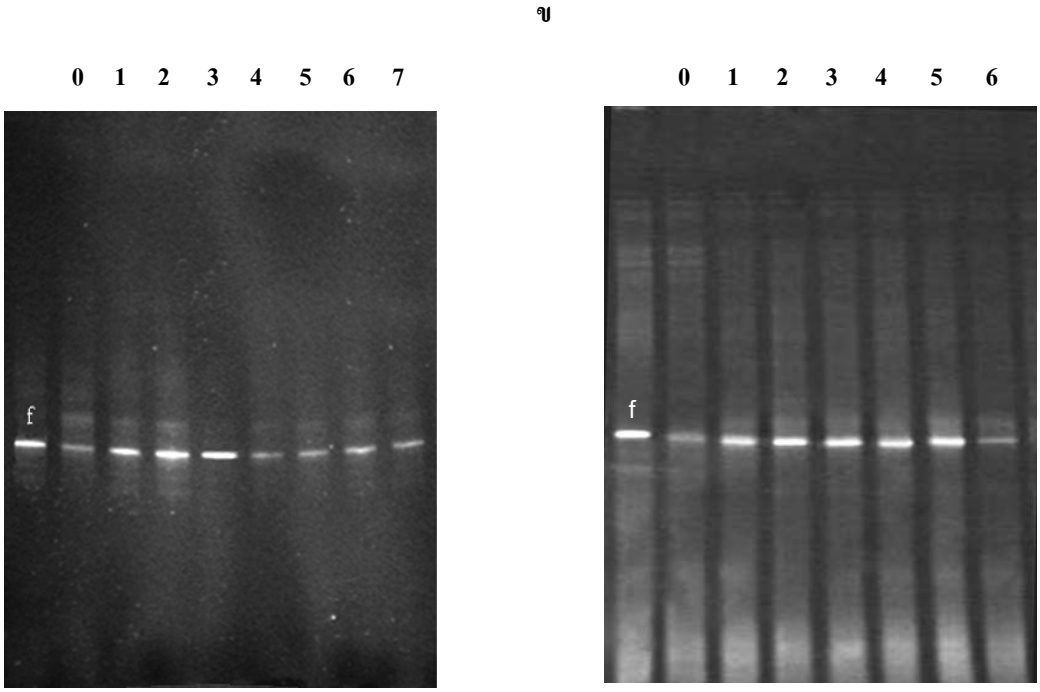
4.2.2.1 วิเคราะห์โดยวิธี PCR – DGGE

แถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในช่วง 26S rDNAของยีสต์และรา โดยใช้ไพรเมอร์ NL1ซึ่งมี GC-clamp เชื่อมต่อบริเวณปลายด้าน 5’ และ ไพรเมอร์ LS2 ของน้ำหมักในวันที่ 0 1 2 3 4 5 6 7 9 11 และ 13 นำมาวิเคราะห์โดยวิธี PCR – DGGE



ภาพที่ 4.5 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีสต์และราจากน้ำหมักในวันที่ 0 1 2 3 4 5 6 7 9 11 และ 13 โดยวิธี PCR – DGGE M คือ ราและยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ นำมาสร้างเป็น DNA marker ประกอบด้วย a = *Sm. fibuligera*, b = *R. oligosporus*, c = *M. racemosus*, d = *P. anomala*, e = *S. cerevisiae* ก) สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ข) สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1

แถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในช่วง 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ไพรเมอร์ 338f ซึ่งมี GC-clamp เชื่อมต่อบริเวณปลายด้าน 5' และ ไพรเมอร์ 518r ของน้ำหมักในวันที่ 0 1 2 3 4 5 6 7 9 11 และ 13 นำมาวิเคราะห์โดยวิธี PCR – DGGE



ภาพที่ 4.6 แสดงแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำหมักในวันต่างๆโดยวิธี PCR – DGGE M คือ แบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ นำมาสร้างเป็น DNA marker f = *P. pentosaceus* ก) สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ข) สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1

4.2.2.2 ตัดแถบดีเอ็นเอที่สนใจบนเจลจาก DGGE ไปศึกษาหาลำดับเบสโดยเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank

ตารางที่ 4.5 การจำแนกชนิดของรา ยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 26S และ16S ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ตามลำดับ เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันในฐานข้อมูลใน GenBank

DGGE	Band*	Closest relative	% identity**
Fungi	a	*Sm. fibuligera*	100
	b	*R. oligosporus*	100
	c	*M. racemosus*	100
	d	*P. anomala*	100
	e	*S. cerevisiae*	100
Bacteria	f	*P. pentosaceus*	100

* แถบดีเอนเอ จากเจล DGGE ที่แสดงในภาพที่ 4.5 และ 4.6

** % identity = ร้อยละความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 26S ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ของรา และยีสต์ และบริเวณ 16S ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ของแบคทีเรีย เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดียวกันในฐานข้อมูล GenBank

จากผลการทดลอง การติดตามประชากรของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักสาโทโดยวิธี PCR – DGGE จะเห็นว่ารูปแบบการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 (ภาพที่ 4.5 ก และ ภาพที่ 4.6 ก) เหมือนกับเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 (ภาพที่ 4.5 ข และ ภาพที่ 4.6 ข) จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCR – DGGE ของราและยีสต์ (ภาพที่ 4.5 ก และ ข) สามารถพบแถบดีเอนเอ 5 แถบ (ภาพที่ 4.5, a–e) ซึ่ง แถบดีเอนเอ a, b, c, d และ e คือ *Sm. fibuligera*, *R. oligosporus, M. racemosus*, *P. anomala* และ *S. cerevisiae* ตามลำดับ ส่วนแถบดีเอนเอ จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCR – DGGE ของแบคทีเรียกรดแลคติกพบได้เพียง 1 แถบดีเอนเอเท่านั้น (ภาพที่ 4.6 ก และ ข) ซึ่ง แถบดีเอนเอ f คือ *P. pentosaceus*

รา สองสายพันธุ์ คือแถบดีเอนเอ b และ c สามารถพบได้ตั้งแต่วันที่ 0 ของการหมัก โดยความเข้มของแถบดีเอนเอมีความเข้มที่สุดในวันที่ 2 ของการหมัก หลังจากนั้นความเข้มของแถบดีเอนเอจางลง จนไม่สามารถเห็นแถบดีเอนเอได้ในวันที่ 4 ของการหมัก ในขณะที่ยีสต์ non-*Saccharomyces* สองสายพันธุ์ *Sm. fibuligera* และ *P.anomala* คือ แถบดีเอนเอ a และ d สามารถพบได้ตั้งแต่วันที่ 0 ของการหมัก โดยความเข้มของแถบดีเอนเอเข้มที่สุดในวันที่ 2 ของการหมัก หลังจากนั้นความเข้มของแถบดีเอนเอจางลง จนไม่สามารถเห็นแถบดีเอนเอได้ในวันที่ 4 ของการ

หมัก สำหรับยีสต์ *S. cerevisiae* คือ แถบดีเอนเอ e สามารถพบได้ตลอดช่วงเวลาในการหมัก ซึ่งในช่วงแรกของการหมักความเข้มของแถบดีเอนเอจางและเข้มขึ้นมากที่สุดประมาณวันที่ 6 ของการหมัก หลังจากนั้นความเข้มของแถบดีเอนเอจางลงในวันสุดท้ายของการหมัก สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในลูกแป้งสุรา NP1 คือ *P. pentosaceus* แถบดีเอนเอ f สามารถพบได้ตั้งแต่วันที่ 0 ของการหมักจนกระทั่งวันที่ 3 ของการหมักแถบดีเอนเอมีความเข้มมากที่สุด หลังจากนั้นจึงจางลง จนไม่สามารถพบได้ในวันที่ 6-7 ของการหมัก

4.3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆของสาโทที่ได้

น้ำหมักที่ได้จากสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ข้อ 3.1.1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ข้อ 3.1.2.2 มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ได้ผลแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1

วันที่หมัก	องค์ประกอบทางเคมี							
	กรด – เบส (pH)		ปริมาณกรดรวม (%TA)		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก. /มล.)		ร้อยละเอทานอล (v/v)	
	NP1	Mixed	NP1	Mixed	NP1	Mixed	NP1	Mixed
D3	3.33±0.21	2.98±0.14	0.56±0.15	0.73±0.12	99.58±3.50	78.85±14.34	5.90±0.30	5.27±0.45
D4	3.47±0.18	3.04±0.16	0.49±0.17	0.66±0.11	52.00±4.36	38.32±7.11	9.37±0.97	7.13±0.70
D5	3.59±0.19	3.15±0.21	0.41±0.08	0.58±0.08	34.64±4.09	25.14±3.01	10.77±0.70	10.00±0.36
D6	3.67±0.16	3.19±0.09	0.36±0.05	0.49±0.04	22.55±2.96	15.96±3.26	11.77±0.55	10.90±0.62
D7	3.73±0.14	3.45±0.05	0.32±0.06	0.41±0.05	6.13±2.53	8.09±3.98	12.73±0.55	11.93±0.93
D9	3.78±0.11	3.59±0.09	0.30±0.06	0.35±0.05	5.18±2.62	4.61±2.84	13.70±0.92	12.30±0.79
D11	3.84±0.10	3.66±0.06	0.27±0.05	0.32±0.05	4.58±2.62	3.67±2.21	14.03±0.90	12.80±0.46
D13	3.92±0.10	3.75±0.04	0.23±0.04	0.31±0.05	4.10±2.26	3.41±2.01	14.57±0.87	13.40±0.62

4.3.1 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) และปริมาณกรดรวม (Total acidity)

ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ในสาโทมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยค่า pH ของสาโทจะมีค่าต่ำเมื่อสาโทมีปริมาณกรดรวมมาก โดย มนตรี เชาวน์สังเกต (2521) ได้ทำการวิเคราะห์สาโทที่เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์พบว่า ค่า pH และค่าปริมาณกรดรวม ในสาโท มีค่าอยู่ระหว่าง 3.40 – 4.70 และ 0.29 – 0.93% ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณค่ากรด-เบส (pH) และปริมาณกรดรวมเป็นไปในแนวทางเดียวกัน คือในการหมักสาโทช่วงแรกจะมีค่า pH ต่ำและมีปริมาณกรดรวมสูง แต่เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักสาโท พบว่ามีค่า pH ที่สูงขึ้นและมีปริมาณกรดรวมลดลง โดยค่า pH ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ในการหมักช่วงแรก เท่ากับ 3.33±0.21 หลังจากนั้นสูงขึ้นเรื่อยๆ จนมีค่า pH เท่ากับ 3.92±0.10 ในวันสุดท้ายของการหมัก ส่วนปริมาณกรดรวมมีค่า 0.56±0.15% ในช่วงแรกของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณลดต่ำลงมาอยู่ที่ 0.23±0.04% ในวันสุดท้ายของการหมัก สำหรับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 มีค่า pH ในการหมักช่วงแรกเท่ากับ 2.98±0.14 และสูงขึ้นถึง 3.75±0.04 ในวันสุดท้ายของการหมัก ส่วนปริมาณกรดรวมมีค่า 0.73±0.12% ในช่วงแรกของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณลดต่ำลงมาอยู่ที่ 0.31±0.05% ในวันสุดท้ายของการหมัก

4.3.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) และปริมาณร้อยละเอทานอล

น้ำตาลรีดิวซ์เกิดจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ α-อะไมเลส และ อะไมโลกลูโคซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตมาจากรา หลังจากทำการเติมน้ำในวันที่สามของการหมักเกิดกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ไปเป็นแอลกอฮอล์ โดยเกิดจากการทำงานของยีสต์ เมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มมากขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จะค่อยๆลดลง แต่ปริมาณแอลกอฮอล์จะค่อยๆเพิ่มขึ้น จากการทดลองจะเห็นการว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณร้อยละเอทานอล ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1มีค่าการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบเดียวกัน คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมักและลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ปริมาณร้อยละ เอทานอลค่อยๆเพิ่มขึ้นหลังจากการผ่าน้ำ (วันที่ 3) และสูงสุดในวันสุดท้ายของการหมัก

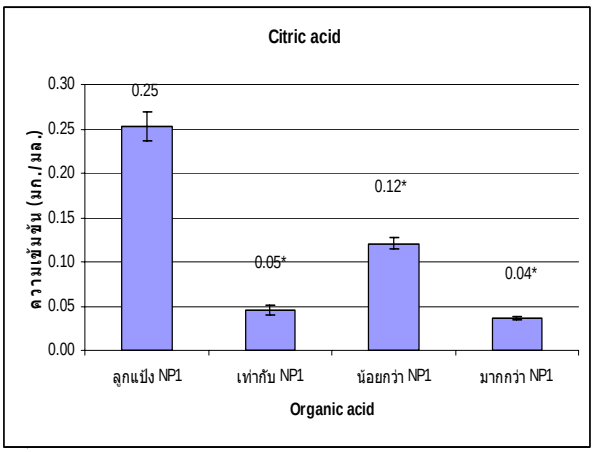
จากการทดลองพบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 3 ของการหมัก คือ 99.58±3.50 มก./มล. และลดลงเหลือ 4.10±2.26 มก./มล. ในวันสุดท้ายของการหมัก ซึ่งแปรผันตรงกับปริมาณร้อยละเอทานอลที่มีค่า 5.90±0.30 ในวันที่ 3 ของการหมักและเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องถึง ร้อยละ 14.57±0.87 ในวันสุดท้ายของการหมัก ส่วนสาโทที่ผลิตจากเชื้อ

บริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 3 ของการหมัก คือ 78.85±14.34 มก./มล. และลดลงเหลือ 3.41±2.01 มก./มล. ในวันสุดท้ายของการหมักซึ่งแปรผันตรงกับปริมาณร้อยละเอทานอลที่มีค่า 5.27±0.45 ในวันที่ 3 ของการหมักและเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องถึงร้อยละ 13.40±0.62 ในวันสุดท้ายของการหมัก

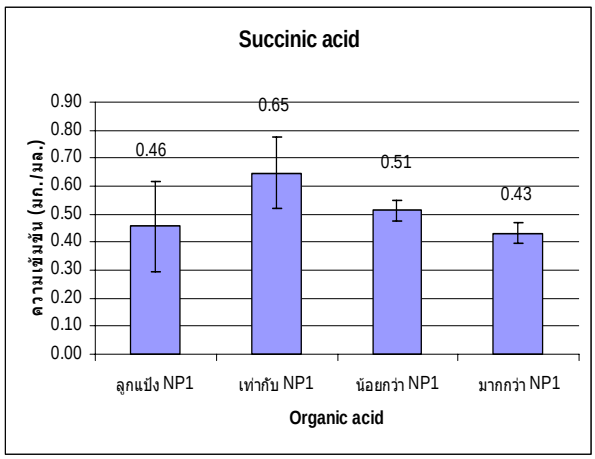
4.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ และ ปริมาณกลีเซอรอล โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จากการทดลองเมื่อทำการวิเคราะห์น้ำหมักสาโทพบว่า ทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน พบกรดซิตริก กรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดแอซิติก และกลีเซอรอลเหมือนกัน แต่ปริมาณที่พบแตกต่างกัน ตามภาพที่ 4.7

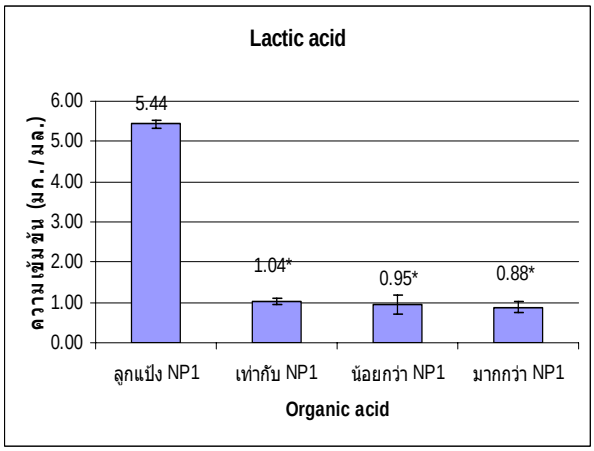
ก)

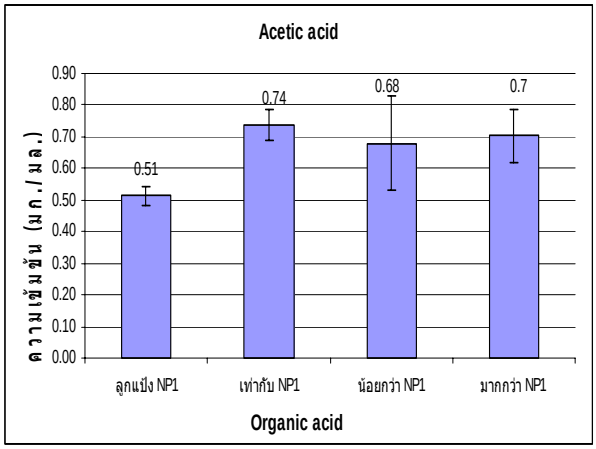


ข)

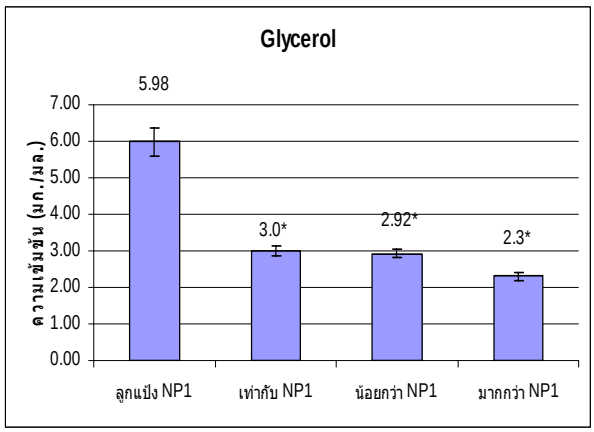


ง)





จ)



* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ($p<0.05$)

ภาพที่ 4.7 แสดงปริมาณของ กรดซิตริก กรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดแอซิติก และกลีเซอรอล ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนต่างๆ โดย เท่ากับ NP1 หมายถึง ปริมาณรา ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติก เท่ากับปริมาณที่พบในลูกแป้งสุรา NP1 น้อยกว่า NP1 หมายถึง ปริมาณรา ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติก น้อยกว่าปริมาณที่พบในลูกแป้งสุรา NP1 10 เท่า มากกว่า NP1 หมายถึง ปริมาณรา ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่าปริมาณที่พบในลูกแป้งสุรา NP1 10 เท่า

จากการทดลองเมื่อทำการวิเคราะห์น้ำหมักสาโทพบว่า ทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน พบกรดซิตริก กรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดแอซิติก และกลีเซอรอลเหมือนกัน แต่ปริมาณที่พบแตกต่างกัน โดยปริมาณกรดซัคซินิกและกรดแอซิติกที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน ($p<0.05$) ส่วนปริมาณ กรดซิตริก กรดแลคติกและกลีเซอรอล ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน ($p<0.05$)

โดย ปริมาณกรดซิตริก พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 0.25 มก./มล. พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วน เท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่า ลูกแป้ง 0.05 0.12 และ 0.04 มก./มล.ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดซิตริก ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน

กรดซัคซินิกเป็นกรดที่ถูกสร้างโดยยีสต์ในช่วงต้นของการหมักและจะหยุดเมื่อยีสต์สร้างแอลกอฮอล์เสร็จสิ้นแล้ว Lamikanra (1997) รายงานว่ากรดซัคซินิกเป็นกรดที่มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอินทรีย์อื่นในไวน์องุ่น เป็นผลให้

Muscadine wine ซึ่งมีปริมาณกรดซัคซินิกสูง ถูกตรวจพบเมทิลซัคซิเนตได้สูง ซึ่งสารดังกล่าวเป็นเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกให้กลิ่นผลไม้ (fruit odor) ทำให้เป็นกลิ่นที่มีความโดดเด่นใน Muscadine wine (Lamikanra และคณะ, 1995)

ปริมาณกรดซัคซินิก พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 0.46 มก./มล. พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วน เท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่า ลูกแป้ง 0.65 0.51 และ 0.43 มก./มล.ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดซัคซินิกที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน

กรดแลคติกเป็นกรดที่ยีสต์สร้างได้ในปริมาณน้อย คือประมาณ 0.1 – 0.6 กรัมต่อลิตร ยีสต์ที่สามารถสร้างกรดแลคติกได้ดีนั้น จัดเป็นยีสต์ที่ดี เนื่องจากกรดแลคติก เป็นกรดที่เพิ่มความเป็นกรดในไวน์แต่ไม่เพิ่มรสชาติความเป็นกรด กรดแลกติกเป็นสารตั้งต้นของสารประกอบให้กลิ่นได้แก่ เอทิลลอเรต (Delfini และ Formica, 2001)

จากการทดลองพบว่าปริมาณกรดแลคติกพบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 5.44 มก./มล. พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วน เท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่า ลูกแป้ง 1.04 0.95 และ 0.88 มก./มล.ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน

จากการทดลองพบว่าปริมาณกรดแอซิติกพบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 0.51 มก./มล. พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วน เท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่า ลูกแป้ง 0.74 0.68 และ 0.70 มก./มล.ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดแอซิติกที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน จากรายงานของ Sirisantimethakom และคณะ (2007) พบว่าปริมาณค่าเฉลี่ยของกรดแอซิติกที่พบในสาโท จาก 26 แหล่ง เท่ากับ 1.16 มก./มล. ซึ่งปริมาณที่พบในการศึกษานี้มีค่าต่ำกว่า แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานที่มากพอเกี่ยวกับปริมาณกรดแอซิติกที่พบในสาโท

กรดแอซิติก เป็นกรดระเหยง่าย เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ของเมแทโบไลต์ของยีสต์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ โดยยีสต์สร้างได้ในปริมาณน้อย (Jackson, 2000) กรดแอซิติกสามารถเพิ่มความซับซ้อนให้กับกลิ่นรสที่ดีในไวน์ (Delfini และ Formica, 2001) เป็นสารตั้งต้นของสารในกลุ่มแอซิเทตเอสเทอร์ เช่น เอทิลแอซิเทต เป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรดแอซิติกและเอทานอล ซึ่งให้กลิ่นผลไม้ และ ไอโซเอมิลแอซิเทต ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรดแอซิติกและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ซึ่งให้กลิ่นกล้วย (สุมัลลิกา โมรากุล, 2545) Sujiya และคณะ (2004) ได้รายงานว่า ปริมาณไอโซเอมิลแอซิเทตใน เบรม (brem) ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

พื้นบ้านของประเทศอินโดนีเซียเพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณกรดแอซิติกในน้ำหมัก ทาเป (tape) ที่ได้จากการหมักโดยยีสต์มีปริมาณลดลง

กลีเซอรอล เป็นสารประกอบที่ไม่มีผลต่อกลิ่น เป็นสารในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีแอลกอฮอล์ ซึ่งถูกสร้างโดยยีสต์ระหว่าง กระบวนการหมัก มีค่าอยู่ในช่วง 3 – 11 กรัมต่อลิตร (Delfini และ Formica, 2001) กลีเซอรอลมีบทบาทสำคัญทาง ประสาทสัมผัสด้านการชิมเนื่องจากเป็น organoleptic properties มีรสหวาน sweetness (Noble และ Bursick, 1984) และมีความเป็น oiliness (Amerine และคณะ, 1972) จึงมีความเกี่ยวข้องกับบอดี้ของไวน์และการให้ความรู้สึกกลมกล่อมของไวน์ในปาก มีหลายปัจจัยเกี่ยวข้องในกระบวน การผลิตกลีเซอรอล รวมถึง สายพันธุ์ของยีสต์ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ใช้ในการหมัก (Siegriest, 1985) กลีเซอรอลผลิตระหว่างกระบวนการหมัก กลีเซอโรไพรูวิก ในช่วงต้นของการเกิดการหมักแอลกอฮอล์ การผลิตกลีเซอรอลสามารถกระตุ้นได้โดย ค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูง (Adrian และคณะ, 2004 และ Lubbers และคณะ, 2001) ในกระบวนการหมัก แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณของกลีเซอรอลไม่ได้มีผลต่อสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของแอลกอฮอล์ (Lubbers และคณะ, 2001)

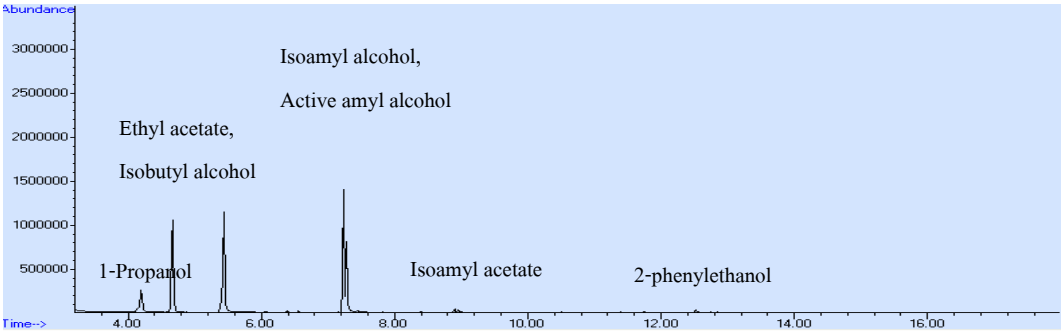
จากการทดลองพบว่าปริมาณกลีเซอรอลที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน ($p<0.05$) โดยปริมาณกลีเซอรอลในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน น้อยกว่าที่พบในไวน์ทั่วไป คือน้อยกว่า 10 มก./มล. จากการทดลองพบว่าปริมาณกลีเซอรอลพบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 5.98 มก./มล. พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วน เท่ากับน้อยกว่าและมากกว่า ลูกแป้ง 3.00 2.92 และ 2.30 มก./มล.ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกลีเซอรอลที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน Sirisantimethakom และคณะ (2007) พบว่าปริมาณค่าเฉลี่ยของกลีเซอรอลที่พบในสาโทจาก 26 แหล่ง เท่ากับ 10.30 มก./มล.

4. 4 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น (Volatile compounds) ในสาโทที่ได้

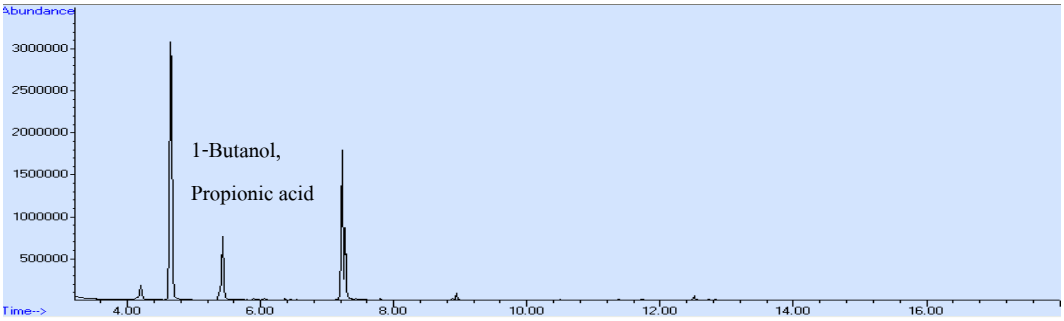
สารประกอบให้กลิ่นที่มีบทบาทสำคัญในไวน์องุ่นได้แก่ สารในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์และเอสเทอร์ ซึ่งถูกสร้างในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ปริมาณการเกิดของสารเหล่านี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ภาวะในการหมัก สายพันธุ์ของยีสต์ องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหมักและอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก เป็นต้น (Valero และคณะ, 2002)

จากการทดลองเมื่อทำการวิเคราะห์น้ำหมักสาโทโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) พบว่า ทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน พบว่ารูปแบบของสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของฟูเซลแอลกอฮอล์และในกลุ่มของเอสเทอร์คล้ายกัน แต่ปริมาณที่พบแตกต่างกัน ตามภาพที่ 4.8 ก ข ค และ ง

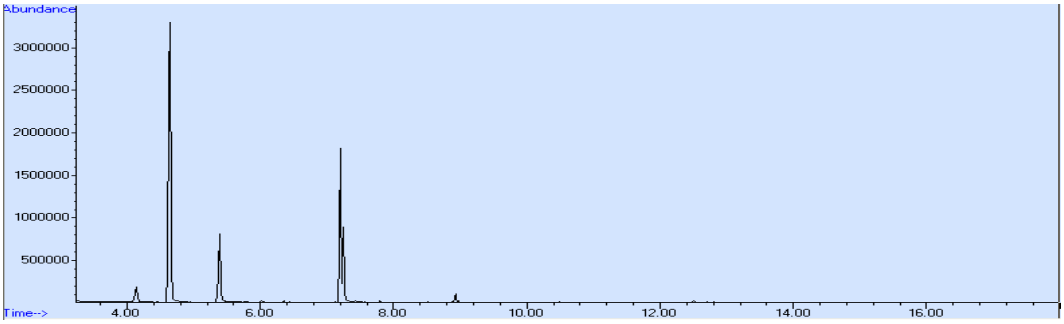
ก) รูปแบบของสารประกอบให้กลิ่นในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1



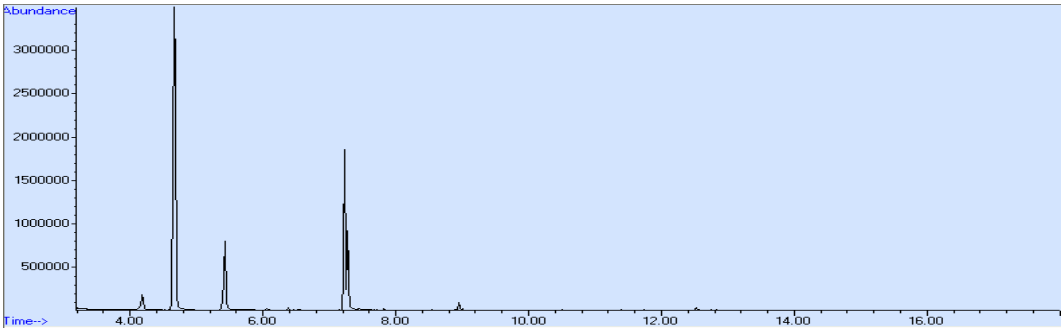
ข) รูปแบบของสารประกอบให้กลิ่นในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนน้อยกว่าลูกแป้งสุรา NP1



ค) รูปแบบของสารประกอบให้กลิ่นในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนเท่ากับลูกแป้งสุรา NP1



ง) รูปแบบของสารประกอบให้กลิ่นในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนมากกว่าลูกแป้งสุรา NP1



ภาพที่ 4.8 แสดงรูปแบบของสารประกอบให้กลิ่นในสาโทโดยวิธี GC-MS โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) ก) สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ข) สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ในอัตราส่วนน้อยกว่าลูกแป้งสุรา NP1 ค) สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ในอัตราส่วนเท่ากับลูกแป้งสุรา NP1 ง) สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ในอัตราส่วนมากกว่าลูกแป้งสุรา NP1

จากภาพที่ 4.8 พบว่ารูปแบบของสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของฟูเซลแอลกอฮอล์และในกลุ่มของเอสเทอร์คล้ายกัน แต่ปริมาณที่พบแตกต่างกัน ดังค่าที่แสดงในตารางที่ 4.7 สำหรับสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของฟูเซลแอลกอฮอล์ และ ตารางที่ 4.8 สำหรับสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของเอสเทอร์

ปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์

ความเข้มข้นของฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีความสำคัญโดยพบว่าที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 300 มก./ ล. จะช่วยทำให้เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดนั้นมีกลิ่นรสที่ ซับซ้อน แต่ถ้ามากกว่า 300 มก./ล. จะทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี ฉุน และกลบกลิ่นรสที่ดี ของสารชนิดอื่น (พรพิมล ควรรณสุ, 2548) นอกจากนี้ฟูเซลแอลกอฮอล์ยังมีบทบาททางอ้อม ในการพัฒนากลิ่นหอมของไวน์โดยจะเกิดปฏิกิริยา กับกรดอินทรีย์ ซึ่งจะทำให้เกิดเอสเทอร์ โดยในระหว่างกระบวนการ

หมัก จะมีการสร้างเอสเทอร์อย่างรวดเร็วภายใต้การควบคุม ของเอนไซม์จากยีสต์และจะเกิดต่อเนื่องไปใน ระหว่างการบ่มด้วย (Jackson, 2000)

จากการทดลองเมื่อทำการวิเคราะห์น้ำหมักสาโทโดยวิธี GC-MS โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) พบว่า ทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน พบสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของฟูเซลแอลกอฮอล์ ได้แก่ 1-propanol Isobutyl alcohol 1-butanol Isoamyl alcohol Active amyl alcohol และ Phenethyl alcohol ดังค่าที่แสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณของสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของฟูเซลแอลกอฮอล์ ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนเท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่าลูกแป้ง NP1 ที่วิเคราะห์โดยวิธี GC-MSโดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่น บริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐาน

สารประกอบที่ให้กลิ่น (มก./ล.)	ลูกแป้งสุรา NP1	เชื้อบริสุทธิ์ผสม			Odor threshold (มก./ล.)
		เท่ากับ	น้อยกว่า	มากกว่า	
1-Propanol	57.11± 2.21	34.77±1.28*	38.86±6.64*	33.99±5.65*	306[b]
Isobutyl alcohol	91.05± 6.51	58.08±0.88*	60.17±5.48*	55.42±3.63*	40[a]
1-Butanol	2.88 ±0.74	1.83±0.30	3.90±1.30	4.11±0.41	150[a]
Isoamyl alcohol	96.92±2.87	83.44±1.26*	131.14±12.70*	124.40±6.29*	60[b]
Active amyl alcohol	1.06± 0.34	1.36±0.32	1.38±0.27	1.41±0.58	-
2-phenylethanol	26.32±0.33	22.23± 3.65	41.80± 4.21	44.97±2.43	200[b]

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ($p<0.05$)

a = Swiegers และคณะ (2005) b = Peinado และคณะ (2004)

1-โพรพานอล เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ ที่ให้กลิ่นแอลกอฮอล์และกลิ่นผลไม้สุก (Peinado และคณะ 2004) มีความสำคัญเนื่องจากเป็นตัวทำละลายสารที่ให้กลิ่น และสารระเหยในไวน์ ถ้ามีปริมาณมากจะให้กลิ่นที่ไม่ดีแก่ไวน์ (Amerine และคณะ, 1979) ปริมาณที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไป คือ 10-125 มก./ล. จากการทดลองพบว่าปริมาณ 1-โพรพานอลที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน ($p<0.05$) โดยปริมาณ 1-โพรพานอล ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 เท่ากับ 57.11 มก./ล.พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วน เท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่า ลูกแป้ง 34.77 38.86 และ 33.99 มก./ล.

ตามลำดับซึ่งปริมาณที่พบนั้นต่ำกว่าปริมาณเฉลี่ยที่พบในสาเก คือ 120 มก./ล. ตามรายงานของ Kodama และคณะ (1977)

ไอโซบิวทานอล เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ที่ให้กลิ่นแอลกอฮอล์และกลิ่นน้ำยาทาเล็บ (Peinado และคณะ 2004) มีความสำคัญเนื่องจากเป็นตัวทำละลายสารที่ให้กลิ่นและสารระเหยในไวน์ (Amerine และคณะ, 1979) ปริมาณที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไป คือ 2-150 มก./ล. จากการทดลองพบว่าปริมาณ ไอโซบิวทานอล ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน ($p<0.05$) โดยปริมาณ ไอโซบิวทานอล ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 เท่ากับ 91.05 มก./ล.พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนเท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่า ลูกแป้ง 58.08 60.17 และ 55.42 มก./ล. ตามลำดับซึ่งปริมาณที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1สูงกว่าปริมาณเฉลี่ยที่พบในสาเก คือ 64 มก./ล. ตามรายงานของ Kodama และคณะ (1977)

1-บิวทานอล เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ที่ให้กลิ่นแอลกอฮล์และกลิ่นฉุน (Fan และคณะ 2005) ปริมาณที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไปคือไม่เกิน 150 มก./ล. และจากการทดลองพบว่าปริมาณ 1-บิวทานอล ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน ($p<0.05$) โดยปริมาณ 1-บิวทานอล ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 เท่ากับ 2.88 มก./ล.พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วน เท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่า ลูกแป้ง 1.83 3.90 และ 4.11 มก./ล. ตามลำดับ

ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ที่ให้กลิ่นตัวทำละลายและกลิ่นน้ำยาทาเล็บ (Fan และคณะ 2005) ปริมาณที่พบในไวน์องุ่นทั่วไปคือ 20-350 มก./ล. จากการทดลองพบว่าปริมาณ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน ($p<0.05$) โดยปริมาณ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 เท่ากับ 96.92 มก./ล.พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนเท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่า ลูกแป้ง 83.44 131.14 และ 124.40 มก./ล. ตามลำดับซึ่งปริมาณที่พบนั้นต่ำกว่าปริมาณเฉลี่ยที่พบในสาเก คือ 170 มก./ล. ตามรายงานของ Kodama และคณะ (1977)

แอกทีฟเอมิลแอลกอฮอล์ เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ที่ให้กลิ่นมอลต์ (Fan และคณะ 2005) ปริมาณที่พบในไวน์องุ่นทั่วไปคือ 1-300 มก./ล. จากการทดลองพบว่าปริมาณ แอกทีฟเอมิลแอลกอฮอล์ ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน ($p<0.05$) โดยปริมาณ แอกทีฟเอมิลแอลกอฮอล์ ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 เท่ากับ 1.06 มก./ล.พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วน เท่ากับน้อยกว่าและมากกว่า ลูกแป้ง 1.36 1.38 และ 1.41 มก./ล. ตามลำดับ

ฟีนิลเอทิล แอลกอฮอล์ เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ที่ให้กลิ่นดอกไม้ กุหลาบและน้ำผึ้ง (Peinado และคณะ 2004) ปริมาณที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไปคือ 15-200 มก./ล. จากการทดลองพบว่าปริมาณฟีนิลเอทิล แอลกอฮอล์ ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน ($p<0.05$) โดยปริมาณ ฟีนิลเอทิล แอลกอฮอล์ ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 เท่ากับ 26.32 มก./ล.พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนเท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่า ลูกแป้ง 22.23 41.8 และ 44.97 มก./ล. ตามลำดับซึ่งปริมาณที่พบนั้นต่ำกว่าปริมาณเฉลี่ยที่พบในสาเก คือ 75 มก./ล. ตามรายงานของ Kodama และคณะ (1977)

ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานถึงปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ที่กำหนดในสาโท แต่จากงานวิจัยของ สุมัลลิกา โมรากุล (2545) ซึ่งทำการศึกษาสารประกอบให้กลิ่นโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี รายงานปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ 3 ชนิดได้แก่ 1-โพรพานอล, ไอโซบิวทานอล และ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราว่ามีปริมาณ 71.61 172.81 และ 183.35 มก./ล. ตามลำดับ (สุมัลลิกา โมรากุล, 2545) ซึ่งพบว่ามีปริมาณสูงกว่าที่พบในงานวิจัยนี้

ประดิษฐ์ ครุวัณณา (2546) รายงานปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในสาเกซึ่งเป็นไวน์ข้าวเช่นเดียวกับสาโท พบว่า มีปริมาณ 1-โพรพานอล ไอโซบิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ 120 64 170 และ 75 มก./ล. ตามลำดับ ซึ่งฟูเซลแอลกอฮอล์เหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญทางด้านกลิ่นของสาเก การสร้างจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณกรดอะมิโนอุณหภูมิที่หมัก และสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ (ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2546)

Sirisantimathakom และคณะ (2007) ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในสาโท 26 ตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รายงานว่า มีปริมาณ ไอโซบิวทานอล เฉลี่ย 65.6 มก./ล. ปริมาณ 1-บิวทานอลเฉลี่ย 2.7 มก./ล. ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เฉลี่ย 99.6 มก./ล. และ ปริมาณฟีนิลเอทิล แอลกอฮอล์เฉลี่ย 23.6 มก./ล. ซึ่งไม่พบ 1-โพรพานอล และ แอกทีฟเอมิลแอลกอฮอล์

Chuenchomrat และคณะ (2008) ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในสาโท 10 ตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รายงานว่ามีปริมาณ 1-โพรพานอล เฉลี่ย 3.35 มก./ล. ปริมาณ ไอโซบิวทานอล เฉลี่ย 11.61 มก./ล. และ ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เฉลี่ย 17.4 มก./ล. ซึ่งไม่พบ 1-บิวทานอล ฟีนิลเอทิล แอลกอฮอล์ และ แอกทีฟเอมิลแอลกอฮอล์

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดฟูเซลแอลกอฮอล์นั้นมีหลายปัจจัย เช่น กระบวนการหมัก ลูกแป้งสุราที่ใช้ในการผลิตซึ่งมีจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันออกไป และข้าวซึ่งเป็นวัตถุดิบในการหมัก เป็นต้น

Swiegers และคณะ (2005) รายงานว่าฟูเซลแอลกอฮอล์ไม่ควรเกินกว่า 400 มก./ล. ซึ่งจากการทดลองพบว่าปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์รวมของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่

ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมมีปริมาณอยู่ในช่วง 1.06 – 131.14 มก./ล. ซึ่งไม่เกินกว่าปริมาณที่กำหนด ฟูเซลแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจึงไม่น่าให้กลิ่นที่ไม่ดีแก่สาโท

ปริมาณเอสเทอร์

เอสเทอร์ เป็นสารที่มีความสำคัญในการให้กลิ่นรสที่ดีในไวน์ เป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ ที่ถูกสร้างโดยยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ในไวน์ประกอบด้วยเอสเทอร์หลายชนิด เช่น แอซิเทตเอสเทอร์ ได้แก่ เอทิลแอซิเทต ไอโซเอมิลแอซิเทต และไอโซบิวทิลแอซิเทต เป็นต้น เอทิลเอสเทอร์ได้แก่ เอทิลแคโพรเอต เอทิลแคพริเรต และ เอทิลแคเพรต เป็นต้น ซึ่งเอสเทอร์เหล่านี้ให้กลิ่นผลไม้ ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเอสเทอร์มีหลายปัจจัย ได้แก่ วัตถุดิบที่ใช้และสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการหมัก (Rojas และคณะ, 2003) เอสเทอร์สามารถถูกตรวจพบในไวน์ได้หลากหลาย มีทั้งที่สามารถระบุชนิดได้และมีทั้งที่มีปริมาณ น้อยมากจนไม่สามารถระบุได้ ซึ่งเอสเทอร์ที่มีปริมาณเท่ากับหรือมากกว่าระดับ threshold นั้นจะให้กลิ่นผลไม้ซึ่งมีความสำคัญยิ่งต่อกลิ่นรส ของไวน์

จากการทดลองเมื่อทำการวิเคราะห์น้ำหมักสาโทโดยวิธี GC-MS โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่าง เหนือสาร (headspace) พบว่า ทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน พบสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของเอสเทอร์ ได้แก่ เอทิลแอซิเทต ไอโซเอมิลแอซิเทตและ โพรพิโนอิก แอซิด เอสทิลเอสเทอร์ ดังค่าที่แสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงปริมาณของสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของเอสเทอร์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนเท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่าลูกแป้ง NP1 ที่วิเคราะห์โดยวิธี GC-MSโดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่น บริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐาน

สารประกอบที่ให้กลิ่น (มก./ล.)	ลูกแป้งสุรา NP1	เชื้อบริสุทธิ์ผสม			Odor threshold (มก./ล.)
		เท่ากับ	น้อยกว่า	มากกว่า	
Ethyl acetate	26.90±2.27	90.75±4.06*	73.44±7.85*	90.02±4.91*	12[a]
Isoamyl acetate	0.14±0.01	0.25±0.02*	0.32±0.01*	0.37±0.04*	0.16[a]
Propionic acid ethyl ester	0.12±0.00	0.11±0.00	0.15±0.05	0.12±0.02	-

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ($p<0.05$)

a = Peinado และคณะ (2004)

เอทิลแอซิเทต เป็นเอสเทอร์ ที่ให้กลิ่นที่สำคัญของไวน์ โดยให้กลิ่นผลไม้ กลิ่นสับปะรด (Peinado และคณะ 2004) สารกลุ่มนี้เกิดจากเอนไซม์จากยีสต์หรือแบคทีเรีย ได้แก่ เอนไซม์เอสเทอเรส ในไวน์ที่เพิ่งหมักเสร็จจะเกิดปฏิกิริยา เอสเทอริฟิเคชั่น และ ทรานเอสเทอริฟิเคชั่น ซึ่งถ้ามีในปริมาณที่ต่ำกว่า 200 มก./ล. จะให้กลิ่นที่น่าพอใจ แต่ถ้าปริมาณสูงกว่านี้จะให้กลิ่นน้ำส้มสายชูซึ่งเป็นกลิ่นที่ไม่ดี (Amerine และคณะ, 1979) จากการทดลองพบว่าปริมาณ เอทิลแอซิเทต ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน ($p<0.05$) โดยปริมาณ เอทิลแอซิเทต ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 เท่ากับ 26.90 มก./ล.พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วน เท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่า ลูกแป้ง 90.75 73.44 และ 90.02 มก./ล. ตามลำดับ

ไอโซเอมิลแอซิเทต เป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้ กลิ่นกล้วย กลิ่นที่หอมหวาน (Peinado และคณะ 2004) ปริมาณที่พบได้ทั่วไปในไวน์องุ่นคือ 0.1 - 8 มก./ล.จากการทดลองพบว่าปริมาณไอโซเอมิลแอซิเทต ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน ($p<0.05$) โดยปริมาณ ไอโซเอมิลแอซิเทต ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 เท่ากับ 0.14 มก./ล.พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วน เท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่า ลูกแป้ง 0.25 0.32 และ 0.37 มก./ล. ตามลำดับ

โพรพิโนอิก แอซิด เอสทิลเอสเทอร์ เป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้ กลิ่นกรด กลิ่นหวาน คล้ายสบู่ (Rocha และคณะ 2004) ปริมาณที่พบได้ทั่วไปในไวน์องุ่นคือ 0.1 – 3 มก./ล. จากการทดลองพบว่าปริมาณ โพรพิโนอิก แอซิด เอสทิลเอสเทอร์ ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนมากกว่าลูกแป้ง ($p<0.05$) โดยปริมาณ โพรพิโนอิก แอซิด เอสทิลเอสเทอร์ ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP 1 เท่ากับ 0.12 มก./ล.พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วน เท่ากับ น้อยกว่าและมากกว่า ลูกแป้ง 0.11 0.15 และ 0.08 มก./ล. ตามลำดับ

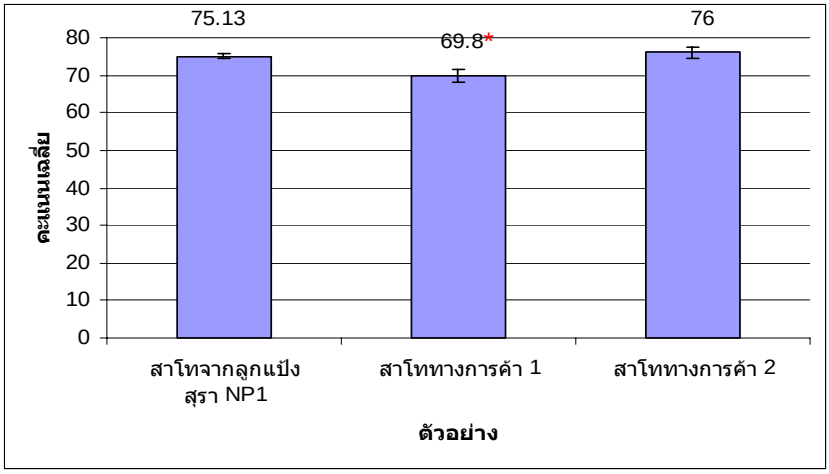
Chuenchomrat และคณะ (2008) ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในสาโท 10 ตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รายงานว่า มีปริมาณ เอทิลแอซิเทต เฉลี่ย 19.86 มก./ล., ปริมาณ ไอโซเอมิลแอซิเทต เฉลี่ย 0.8 มก./ล. ซึ่งไม่พบ โพรพิโนอิก แอซิด เอสทิลเอสเทอร์

ประดิษฐ์ ครุวัณณา (2546) รายงานปริมาณเอสเทอร์ที่พบในสาเกซึ่งเป็นไวน์ข้าวของประเทศญี่ปุ่น พบว่า มีปริมาณ เอทิลแอซิเทต, ไอโซเอมิลแอซิเทต และเอทิลบิวทิเรต 20-30 2 และ 0.5 มก./ล. ตามลำดับ ซึ่งเอสเทอร์เหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญทางด้านกลิ่นของสาเก (ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2546) ซึ่งจากการทดลองพบว่าทั้งในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า

สามารถพบปริมาณของเอสเทอร์ที่สำคัญเช่นเดียวกับที่พบในสาเก แต่เนื่องจากกระบวนการผลิต อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตและสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ มีความแตกต่างกันจึงทำให้ปริมาณที่ได้แตกต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงเสนอว่า เพื่อให้ได้สาโทที่มีคุณภาพคงที่ในการผลิตแต่ละครั้งและให้ได้สาโทที่มีกลิ่นรสที่ดี จึงควรมีการศึกษาเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่จำเป็นต่อการหมักจากลูกแป้งสุราและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในรูปของเชื้อบริสุทธิ์ผสม เพื่อเตรียมเป็นกล้าเชื้อใช้ในการผลิตไวน์ข้าวแทนการใช้ลูกแป้งสุรา เพื่อให้ได้สาโทที่มีคุณภาพดีและสม่ำเสมอในการผลิต

4.5 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory taste) ในสาโท

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้โดย อภิชญา เตชะวสัญญ และคณะ, (2550) ทำการคัดเลือกลูกแป้งสุราจากทั่วประเทศได้ 6 แหล่งซึ่งเป็นลูกแป้งสุราที่ผลิตสาโทแล้วให้สาโทที่มีกลิ่นและรสที่ดี จากจำนวนลูกแป้งทั้งหมด 114 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมมาจาก 42 จังหวัดทั่วประเทศไทย (อภิชญา เตชะวสัญญ, 2550) นริสา ตรีเนตร (2550) นำลูกแป้งสุราที่ผลิตสาโทแล้วได้สาโทที่มีคุณภาพด้านกลิ่นรสดีที่สุด จำนวน 3 แหล่งได้แก่ ลูกแป้งสุราจากจังหวัดนครพนม (NP1) ลูกแป้งสุราจากจังหวัดน่าน (NN6) และลูกแป้งสุราจากจังหวัดหนองคาย (NK2) มาผลิตสาโท และนำมาทดสอบทางประสาทสัมผัส สามารถคัดเลือกได้ลูกแป้งสุราจากจังหวัดนครพนม (NP1) ให้คุณภาพด้านกลิ่น รส ดีที่สุด ดังนั้นจึงนำลูกแป้งสุรา NP1 เปรียบเทียบกับสาโททางการค้าที่ได้รับความนิยมในท้องตลาดและได้รับรางวัลหนึ่งตำบล หนึ่งผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ สาโททางการค้าชนิดที่ 1 และสาโททางการค้าชนิดที่ 2 มาทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบที่มีความคุ้นเคยและเชี่ยวชาญทางด้านการชิมไวน์และสาโทในระดับชาติ จำนวน 10 ท่าน เปรียบเทียบคุณภาพด้านกลิ่น รส นำคะแนนที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16.0

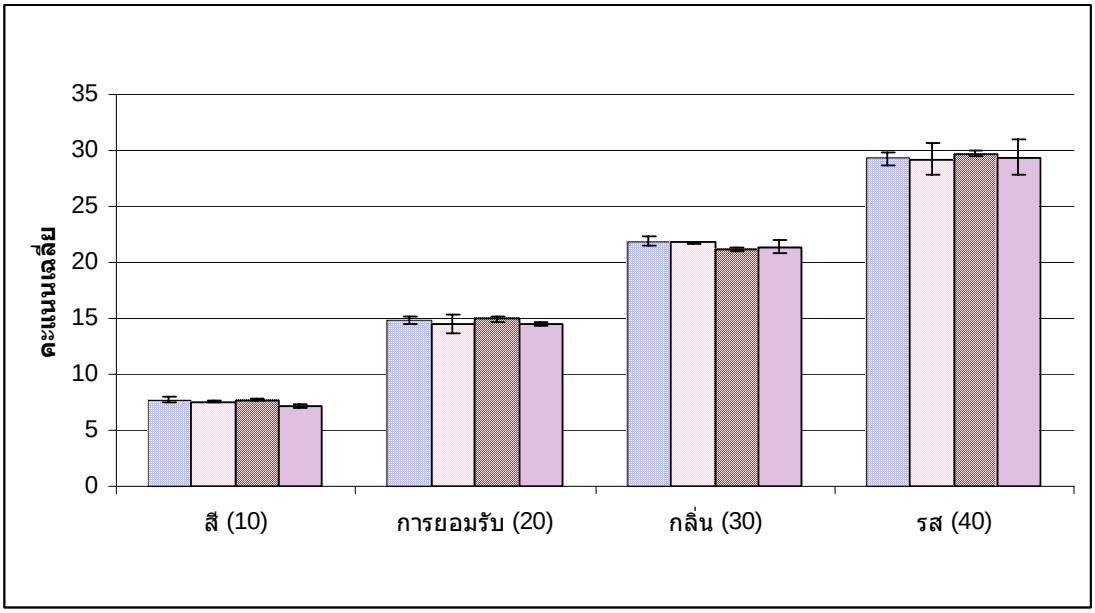


* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ($p<0.05$)

ภาพที่ 4.9 แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (sensory taste) ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโททางการค้าชนิดที่ 1 และ สาโททางการค้าชนิดที่ 2

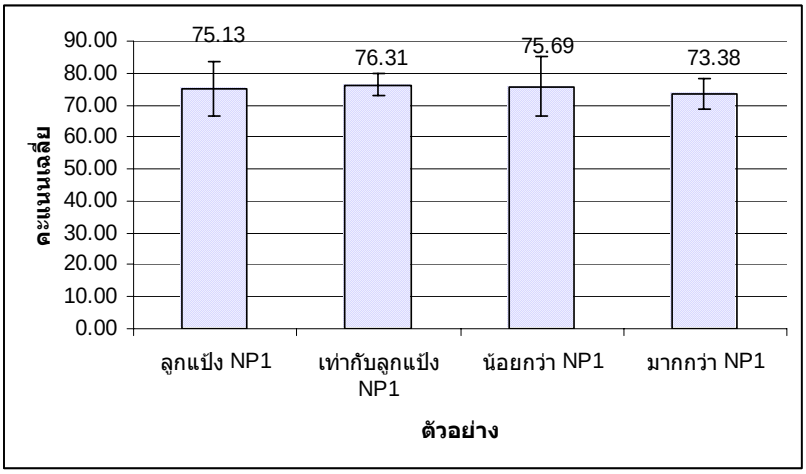
จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (sensory taste) พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีคะแนนใกล้เคียงกับสาโททางการค้าชนิดที่ 2 และมีคะแนนสูงกว่าสาโททางการค้าชนิดที่ 1 โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีรสชาติที่ดี ใกล้เคียงกับสาโททางการค้าที่ได้รับความนิยมในท้องตลาดและได้รับรางวัลหนึ่งตำบล หนึ่งผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าลูกแป้งสุรา NP1 เป็นแหล่งหัวเชื้อที่ดี เหมาะสำหรับการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในลูกแป้งมาใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสมแทนลูกแป้งสุรา เพื่อการผลิตสาโทที่มีคุณภาพดี และมีคุณภาพที่คงที่ในทุกชุดการผลิต

หลังจากนั้นจึงนำลูกแป้งสุรา NP1 เปรียบเทียบกับ และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ในอัตราส่วนต่างๆ มาทำการหมักและนำสาโทที่ได้ในวันสุดท้ายมาทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบที่มีความคุ้นเคยและเชี่ยวชาญทางด้านการชิมไวน์และสาโทในระดับชาติ จำนวน 10 ท่าน เปรียบเทียบคุณภาพด้านกลิ่น รส นำคะแนนที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16.0



ภาพที่ 4.10 แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (sensory taste) ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ในอัตราส่วนต่างๆ (ลูกแป้งสุรา NP1 เชื้อบริสุทธิ์ผสมเท่ากับลูกแป้งสุรา NP1 เชื้อบริสุทธิ์ผสมน้อยกว่าลูกแป้งสุรา NP1 เชื้อบริสุทธิ์ผสมมากกว่าลูกแป้งสุรา NP1) โดยแบ่งออกเป็น สี 10 คะแนน การยอมรับ 20 คะแนน กลิ่น 30 คะแนน และรส 40 คะแนน

จาก ภาพที่ 4.10 พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) กับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ในทุกอัตราส่วน โดยแบ่งออกเป็น คะแนนของสี 10 คะแนน คะแนนการยอมรับ 20 คะแนน คะแนนของกลิ่น 30 คะแนน และคะแนนของรสชาติ 40 คะแนน



ภาพที่ 4.11 แสดงผลคะแนนเฉลี่ยของการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (sensory taste) ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ในอัตราส่วนต่างๆ

จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (sensory taste) พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) กับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ในทุกอัตราส่วน โดยสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีคะแนนเฉลี่ย 75.13 คะแนน เชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนเท่ากับลูกแป้ง น้อยกว่าลูกแป้ง และมากกว่าลูกแป้ง มีคะแนนเฉลี่ย 76.31 75.69 และ 73.38 คะแนนตามลำดับ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมให้คุณภาพที่ดีเท่ากับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้ง สามารถใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมเป็นหัวเชื้อในการผลิตสาโทแทนการใช้ลูกแป้ง เพื่อให้ได้สาโทที่มีคุณภาพที่ดี สม่ำเสมอกันในทุกๆครั้งการผลิต

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 ผลิตสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมของ รา ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลูกแป้งสุรา NP1

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลูกแป้งสุรา NP1บนอาหาร MRS agar จัดกลุ่มโดยวิธี PCR-RAPD นำตัวแทนกลุ่มทำ PCR และส่งวิเคราะห์ลำดับเบสเทียบกับฐานข้อมูล

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลูกแป้งสุรา NP1 บนอาหาร MRS agar ได้ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด $6.0x10^3$ CFU/g หลังจากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่คัดแยกได้มาสกัดดีเอนเอ นำดีเอนเอที่ได้มาจัดกลุ่มโดยวิธี PCR-RAPD ซึ่งสามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติก ได้ออกเป็น 3 กลุ่มด้วยกันหลังจากนั้น นำตัวแทนแต่ละกลุ่มทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ในช่วง 16S rDNA ของแบคทีเรีย คือ 338f และ ไพรเมอร์ 518r แล้วจึงส่งลำดับเบสเทียบกับฐานข้อมูล พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ กับตัวแทนในแต่ละกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีร้อยละของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกับ *P. pentosaceus* ในฐานข้อมูลเป็น 100% ทั้ง 3 กลุ่ม สาเหตุเนื่องมาจาก *P. pentosaceus* ทั้งสามกลุ่มนี้ มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ 338 ถึง 518 เหมือนกันทุกตัว แต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนส์อื่นแตกต่างกัน จึงทำให้ได้รูปแบบบน PCR-RAPD แตกต่างกัน เพราะว่า PCR-RAPD อาศัยการสุ่มจับของไพรเมอร์สั้นๆ ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ กับโครโมโซมอลดีเอนเอ

จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 บน MRS agar พบเพียงชนิดเดียวเท่านั้น คือ *P. pentosaceus* แสดงให้เห็นว่าไม่มีความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียในลูกแป้งสุรา NP1 อาจเป็นผลมาจากสมุนไพรที่ผสมอยู่ในลูกแป้งสุรานี้เป็นตัวคัดเลือกจุลินทรีย์ที่จำเป็นกับการหมัก ซึ่งผลการทดลองที่ได้นั้นสอดคล้องกับผลการทดลองของ Rittiplang และคณะ (2007) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลูกแป้งสุรา 17 ตัวอย่าง ใน 10 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ซึ่งพบ *Pediococcus* spp. *Lactobacillus* spp. และ *Lactococcus* spp. เป็นส่วนใหญ่ และพบ *P. pentosaceus* เพียงชนิดเดียวในลูกแป้งสุรา 8 ตัวอย่างจากลูกแป้งสุราทั้งหมด 17 ตัวอย่าง

5.2 ติดตามประชากรของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักสาโทโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อควบคู่กับวิธี PCR – DGGE

5.2.1 ศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ในสาโทโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ

การติดตามประชากรของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักสาโทโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ จะเห็นว่ารูปแบบการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 (ภาพที่ 4.3) เหมือนกับเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 (ภาพที่ 4.4) รา สองสายพันธุ์ คือ *R. oligosporus* และ *M. racemosus* สามารถพบได้ตั้งแต่วันที่ 0 ของการหมัก มีค่าประมาณ 10^3 CFU/g และลดลงเรื่อยๆจนไม่สามารถพบได้ในวันที่ 3 ในขณะที่พบยีสต์ชนิด non- *Saccharomyces* สองสายพันธุ์ คือ *P. anomala* และ *Sm. fibuligera* ยีสต์ดังกล่าวมีปริมาณเพิ่มขึ้นมากที่สุดในวันที่ 2 ของการหมักและไม่สามารถพบได้ในวันที่ 5 ของการหมัก สำหรับยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถพบได้ตลอดช่วงเวลาในการหมัก โดยพบได้ตั้งแต่วันที่ 0 ของการหมักและเพิ่มสูงสุดในวันที่ 7 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก คือ *P. pentosaceus* สามารถพบได้ตั้งแต่วันที่ 0 ของการหมักและเพิ่มสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณลดลงจนไม่สามารถพบได้ในวันที่ 6 ของการหมัก

ในช่วงแรกของการหมัก รา และยีสต์ non- *Saccharomyces* บางสายพันธุ์ เช่น *Sm. fibuligera* จะปล่อยเอนไซม์ในกลุ่ม amylase และ glucoamylase เพื่อย่อยแป้งในข้าวให้กลายเป็นน้ำตาล ซึ่งบทบาทสำคัญของราในอาหารหมักก็คือการสร้างเอนไซม์สำหรับย่อยแป้ง (Shrestha และคณะ 2002) Tsuyoshi และคณะ 2005 รายงานว่ายีสต์ *Sm. fibuligera* สร้างและปล่อยเอนไซม์ amylolytic เพื่อย่อยแป้งให้เป็นของเหลว ราทั้งสองชนิดคือ *R. oligosporus* และ *M. racemosus* ไม่สามารถพบได้ในวันที่ 3 ของการหมักในขณะที่ *S. cerevisiae* เพิ่มขึ้นซึ่งเคยมีรายงานว่ายีสต์สร้าง 1,3-β-glucanases ซึ่งทำลายผนังเซลล์ของรา(Walker และคณะ 1995) Hayashida และคณะ (1974) พบความเป็นไปได้ที่ราจะถูกฆ่าโดยสารพิษ (toxins) หรือเอทานอลที่สร้างขึ้นโดยยีสต์ สารเมตาบอไลท์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งอาจไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดก็ได้ เอทานอลที่ผลิตโดยยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นปัจจัยหลักที่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ non- *Saccharomyces* ในระหว่างการหมัก เนื่องจากยีสต์ non- *Saccharomyces* ไม่สามารถทนปริมาณร้อยละเอทานอลได้เกิน 5–7 (Heard และคณะ 1988) ในขณะที่แบคทีเรียกรดแลคติกไม่สามารถทนปริมาณร้อยละเอทานอลได้เกิน 9 (Lisdiyanti และคณะ 2001)

5.2.2 ศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ในสาโทโดยวิธี PCR – DGGE

จากผลการทดลอง การติดตามประชากรของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักสาโทโดยวิธี PCR – DGGE จะเห็นว่ารูปแบบการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 (ภาพที่ 4.5 ก และ ภาพที่ 4.6 ก) เหมือนกับเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 (ภาพที่ 4.5 ข และ ภาพที่ 4.6 ข) จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCR – DGGE ของราและยีสต์ (ภาพที่ 4.5 ก และ ข) สามารถพบ 5 แถบดีเอนเอ (ภาพที่ 4.5, a–e) ซึ่ง แถบดีเอนเอ a, b, c, d และ e คือ *Sm. fibuligera*, *R. oligosporus, M. racemosus*, *P. anomala* และ *S. cerevisiae* ตามลำดับ ส่วนแถบดีเอนเอ จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCR – DGGE ของแบคทีเรียกรดแลคติกพบได้เพียง 1 แถบดีเอนเอเท่านั้น (ภาพที่ 4.6 ก และ ข) ซึ่ง แถบดีเอนเอ f คือ *P. pentosaceus* ซึ่ง แถบดีเอนเอ a, b, c และ d คือ *Sm. fibuligera*, *R. oligosporus, M. racemosus* และ *P. anomala* ตามลำดับ สามารถพบได้ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 3 ของการหมัก แถบดีเอนเอ e คือ *S. cerevisiae* สามารถพบได้ตลอดช่วงเวลาของการหมัก ซึ่งในช่วงแรกของการหมักความเข้มของแถบดีเอนเอจางและเข้มขึ้นมากที่สุดประมาณวันที่ 6 ของการหมัก หลังจากนั้นความเข้มของแถบดีเอนเอจางลงในวันสุดท้ายของการหมัก แบคทีเรียที่พบในลูกแป้งสุรา NP1 คือ *P. pentosaceus* แถบดีเอนเอ f สามารถพบได้ตั้งแต่วันที่ 0 ของการหมักจนกระทั่งวันที่ 3 ของการหมักแถบดีเอนเอมีความเข้มมากที่สุด หลังจากนั้นจึงจางลงจนไม่สามารถพบได้ในวันที่ 6-7 ของการหมัก ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับในงานวิจัยของ Rittiplang และคณะ (2007) รายงานถึงแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในลูกแป้ง 17 แหล่งจาก 10 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย มีค่าอยู่ระหว่าง 10^4-10^5 cfu/g. แบคทีเรียที่พบได้แก่ *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus brevis* ในจำนวน 8 แหล่งจาก 17 แหล่งพบ *P. pentosaceus* เป็นแบคทีเรียเด่นในลูกแป้ง ซึ่งจากการทดลองนี้ลูกแป้งจากจังหวัดนครพนมที่ถูกคัดเลือกมา (NP1) แบคทีเรียเด่นที่พบในลูกแป้ง คือ *P. pentosaceus* เช่นกัน

รูปแบบการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์โดยวิธี PCR – DGGE ให้ผลการทดลองคล้ายคลึงกับผลรูปแบบการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ผลของการศึกษาลำดับเบสของเจล DGGE อยู่ในตารางที่ 4.5 จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าไม่มีจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในลูกแป้งสุรา NP1 เนื่องจากลูกแป้งที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีเพียงลูกแป้งจากแหล่งเดียวที่ถูกคัดเลือกมา จึงทำให้ไม่สามารถเห็นถึงความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ทั้ง ยีสต์ รา และแบคทีเรีย อีกทั้งยังไม่พบจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งในงานวิจัยอื่นๆ ที่ติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ ในอาหารหมักแบบดั้งเดิม มีดังนี้ Baradei และคณะ (2008) ได้จำแนกความหลากหลายของแบคทีเรียในนมหมักแบบดั้งเดิมของอียิปต์ (Zabady) พบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม streptococcal และ lactococcal เป็นประชากรส่วนใหญ่ ส่วน lactobacilli เป็นประชากร

ส่วนน้อย ในงานวิจัยนี้ไม่พบจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยง Hurata และคณะ (2006) ติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากข้าว (rice vinegar) พบว่าในช่วงแรกของการหมัก *Aspergillus oryzae* จะถูกแทนที่ด้วย *Saccharomyces* sp. และหลังจากนั้นจะเกิดการเจริญร่วมกันระหว่าง *Saccharomyces* sp. และ แบคทีเรียกรดแลคติก ในงานวิจัยนี้ไม่พบจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยง Lee และคณะ (2005) ติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรแบคทีเรียในกิมจิ (ผักดองแบบดั้งเดิมของเกาหลี) พบแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นประชากรส่วนใหญ่และยังพบจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้

วิธีทางชีววิทยาโมเลกุล Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) ซึ่งเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งที่ช่วยในการศึกษาและติดตามประชากรจุลินทรีย์ในอาหารหมักหลายๆชนิด โดยไม่ต้องเพาะเลี้ยงเชื้อก่อน ซึ่งเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือและรวดเร็วที่จะตรวจติดตามประชากรจุลินทรีย์ในอาหารหมัก ในการตรวจติดตามประชากรจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักสาโท ได้ใช้ทั้งวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อควบคู่กับวิธี PCR – DGGE ผลการทดลองของทั้งสองวิธีนี้มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน ทำให้ผลการทดลองที่ได้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

5.3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆของสาโทที่ได้

เมื่อนำน้ำหมักที่ได้จากสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ได้ผลดังนี้

5.3.1 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) และปริมาณกรดรวม (Total acidity)

จากการทดลองพบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณค่ากรด-เบส (pH) และปริมาณกรดรวมเป็นไปในแนวทางเดียวกัน คือในการหมักสาโทช่วงแรกจะมีค่า pH ต่ำและมีปริมาณกรดรวมสูง แต่เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักสาโท พบว่ามีค่า pH ที่สูงขึ้นและมีปริมาณกรดรวมลดลง โดยสาเหตุที่ทำให้ค่า pH สูงขึ้นและมีปริมาณกรดรวมลดลงในช่วงท้ายของการหมัก เนื่องมาจากระหว่างกระบวนการหมักนั้น ยีสต์และแบคทีเรีย ใช้และย่อยน้ำตาลให้เปลี่ยนเป็น กรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก และเนื่องจากการของความเข้มข้นของกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้น จึงทำให้ค่าความเป็นกรด – ด่างลดลงในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Sreeramulu และคณะ (2000)

5.3.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) และปริมาณร้อยละเอทานอล

จากการทดลองจะเห็นการว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณร้อยละเอทานอล ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1มีค่าการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบเดียวกัน คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

และสูงสุดที่วันที่ 3 ของการหมักและลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ปริมาณร้อยละเอทานอลค่อยๆเพิ่มขึ้นหลังจากการผ่าน้ำ (วันที่ 3) และสูงสุดในวันสุดท้ายของการหมัก

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีในระหว่างกระบวนการหมักสาโทสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ โดยในช่วงแรกของการหมัก รา (*Rhizopus oligosporus* และ *Mucor racemosus*) และยีสต์ non-*Saccharomyces* (*Saccharomycopsis fibuligera*) สามารถเปลี่ยนแป้งในข้าวให้กลายเป็นน้ำตาล (saccharification step) จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงแรกของการหมักมีสูง หลังจากการผ่าน้ำในภาวะไร้อากาศ ยีสต์ จะเปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นแอลกอฮอล์ (ethanol fermentation step) จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างต่อเนื่อง ปริมาณร้อยละเอทานอลจึงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งผลการทดลองที่ได้นั้นสอดคล้องกับ Tsuyoshi และคณะ (2005) และ Shrestha และคณะ (2002)

5.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ และ ปริมาณกลีเซอรอล โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จากการทดลองเมื่อทำการวิเคราะห์น้ำหมักสาโทพบว่า ทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน พบกรดซิติก กรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดแอซิติก และกลีเซอรอลเหมือนกัน แต่ปริมาณที่พบแตกต่างกันโดยปริมาณกรดซัคซินิกและกรดแอซิติกที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน ($p<0.05$) ส่วนปริมาณกรดซิติก กรดแลคติกและกลีเซอรอล ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน ($p<0.05$)

Siegriest, 1985 รายงานว่ามีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องในกระบวน การผลิตกลีเซอรอล รวมถึงสายพันธุ์ของยีสต์ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ใช้ในการหมัก กลีเซอรอลผลิตระหว่างกระบวนการหมัก กลีเซอโรไพรูวิก ในช่วงต้นของการเกิดการหมักแอลกอฮอล์ การผลิตกลีเซอรอลสามารถกระตุ้นได้โดย ค่าความเป็นกรด – ด่างที่สูง (Adrian และคณะ, 2004 และ Lubbers และคณะ, 2001) ในกระบวนการหมัก แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณของกลีเซอรอลไม่ได้มีผลต่อสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของแอลกอฮอล์ (Lubbers และคณะ, 2001) จากการทดลองปริมาณกลีเซอรอลของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีค่า 5.98 มก./มล. ซึ่งมากกว่าปริมาณกลีเซอรอลของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม ที่มีปริมาณเฉลี่ย 2.74 มก./มล. อาจเนื่องมาจากค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ใช้ในการหมักของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มากกว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม

5.4 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น (Volatile compounds) ในสาโทที่ได้

จากการทดลองเมื่อทำการวิเคราะห์น้ำหมักสาโทโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) พบว่า ทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วน พบสารประกอบให้กลิ่นทั้งในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์และเอสเทอร์ โดยฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบ ได้แก่ 1-propanol Isobutyl alcohol 1-butanol Isoamyl alcohol Active amyl alcohol และ Phenethyl alcohol จากรายงานของ Swiegers และคณะ (2005) กล่าวว่าความเข้มข้นของฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีความสำคัญโดยพบว่าฟูเซลแอลกอฮอล์ไม่ควรมีเกินกว่า 400 มก./ล. ในไวน์องุ่น (Swiegers และคณะ, 2005) แต่ถ้ามากกว่า นี้ จะทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี ฉุน และกลบกลิ่นรสที่ดี ของสารชนิดอื่น ซึ่งจากการทดลองพบว่าปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกอัตราส่วนมีค่าต่ำกว่า 400 มก./ล. ไม่เกินกว่าปริมาณที่กำหนดจึงทำให้สาโทที่ได้มีกลิ่นรสที่ดี

ส่วนสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของเอสเทอร์ที่พบในสาโท ได้แก่ เอทิลแอซิเทต ไอโซเอมิลแอซิเทต โพรพิโนอิก แอซิด เอสทิลเอสเทอร์ ซึ่งเป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้ จากการทดลองพบว่าทั้งในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา สามารถพบปริมาณของเอสเทอร์ที่สำคัญเช่นเดียวกับที่พบในสาเก ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไวน์ข้าวของประเทศญี่ปุ่น แต่เนื่องจากกระบวนการผลิต อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตและสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ มีความแตกต่างกันจึงทำให้ปริมาณที่ได้แตกต่างกัน

5.5 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory taste) ในสาโท

จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (sensory taste) พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) กับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ในทุกอัตราส่วน โดยสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีคะแนนเฉลี่ย 75.13 คะแนน เชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนเท่ากับลูกแป้งน้อยกว่าลูกแป้ง และมากกว่าลูกแป้ง มีคะแนนเฉลี่ย 76.31 75.69 และ 73.38 คะแนนตามลำดับ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมให้คุณภาพที่ดีเท่ากับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้ง สามารถใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมเป็นหัวเชื้อในการผลิตสาโทแทนการใช้ลูกแป้ง เพื่อให้ได้สาโทที่มีคุณภาพที่ดี สม่ำเสมอกันในทุกๆครั้งการผลิต

จากผลการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณ กรดอินทรีย์ กลีเซอรอล และสารประกอบให้กลิ่น (Volatile compounds) ในสาโท พบว่าปริมาณ กรดอินทรีย์ กลีเซอรอล และสารประกอบให้กลิ่นบางตัวในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาโทที่

ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) กับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 แต่จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (sensory taste) พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) กับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 อาจเนื่องมาจาก ปริมาณของกรดอินทรีย์ กลีเซอรอล สารประกอบให้กลิ่นนั้น แตกต่างกันไม่มากถึงระดับที่ประสาทสัมผัสของผู้ทำการทดสอบสามารถแยกออกจากกันได้ รวมถึงสารประกอบให้กลิ่นหลายตัวทั้งในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม มีค่าในแนวทางเดียวกัน คือ มากกว่าค่า threshold หรือ น้อยกว่าค่า threshold จึงทำให้การทดสอบทางประสาทสัมผัส ไม่สามารถแยกความแตกต่างออกจากกันได้ ดังเช่น 1-บิวทานอล ปริมาณที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 เท่ากับ 2.88 มก./ล. และปริมาณที่พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วน เท่ากับ น้อยกว่า และมากกว่า คือ 1.83 3.90 และ 4.11 ตามลำดับ ซึ่ง 1-บิวทานอล มีค่า threshold เท่ากับ 150 มก./ล. จะเห็นว่าปริมาณ 1-บิวทานอลที่พบในสาโททั้งหมด มีค่าต่ำกว่าค่า threshold จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่การทดสอบทางประสาทสัมผัสไม่สามารถแยกความแตกต่างออกจากกันได้ ประกอบกับรายงานทางด้านปริมาณ กรดอินทรีย์ กลีเซอรอล สารประกอบให้กลิ่นในสาโทยังมีไม่มากพอ รวมถึงระดับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ประสาทสัมผัสของมนุษย์จะตรวจสอบได้ (threshold) ของปริมาณ กรดอินทรีย์ กลีเซอรอล สารประกอบให้กลิ่น ในสาโทยังมีรายงานน้อยอยู่ ดังเช่น ผลการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ และ ปริมาณกลีเซอรอล โดยวิธี HPLC พบว่าปริมาณ กลีเซอรอล จากสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม (2.3-3.0 มก./มล.) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 (5.98 มก./มล.) แต่ผลการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ เนื่องจากว่าปริมาณกลีเซอรอลมีความแตกต่างกันไม่มาก สอดคล้องกับรายงานของ Lubbers และคณะ, (2001) ที่เติมปริมาณกลีเซอรอลลงใน Chardonnay ไวน์ ความเข้มข้น 6 และ 12 มก./มล. พบว่าผู้ทดสอบไม่สามารถแยกความแตกต่างได้

ดังนั้นจะเห็นว่า การวิเคราะห์คุณภาพของสาโทจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น กรดอินทรีย์และกลีเซอรอล ควบคู่กับการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (sensory taste) เนื่องจากแต่ละวิธีต่างมีข้อจำกัด กล่าวคือ ข้อจำกัดของเครื่องมือสามารถบอกปริมาณได้แต่ไม่สามารถบอกถึงลักษณะเฉพาะของความเป็นสาโทได้ รวมถึงไม่สามารถบอกถึงความกลมกล่อมของรสชาติได้ ข้อจำกัดของการทดสอบทางประสาทสัมผัส คือ หากปริมาณสารประกอบให้กลิ่นมีค่าใกล้เคียงกันมาก ก็ไม่สามารถแยกความแตกต่างออกจากกัน

ได้ ดังนั้นในการวิเคราะห์คุณภาพของสาโทจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้การวิเคราะห์หลายๆด้าน ดังที่ได้กล่าวไปแล้วควบคู่กัน

ในการควบคุมคุณภาพของการผลิตไวน์ ส่วนใหญ่จะใช้ *S. cerevisiae* ที่คัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีมาเพียงชนิดเดียวในการหมักไวน์เพื่อให้คุณภาพคงที่ หรือ สามารถควบคุมคุณภาพได้ และง่ายต่อการทำนายคุณภาพของไวน์ แต่จากรายงานของ Romano และคณะ (1993) จะเห็นว่า ยีสต์ชนิด non- *Saccharomyces* สามารถสร้างสารประกอบให้กลิ่นที่ดีในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ได้หลายชนิด ฉะนั้นการใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* เพียงชนิดเดียว อาจทำให้ความซับซ้อนและความกลมกล่อมของกลิ่นรสในไวน์ไม่ดีเท่าการใช้ยีสต์ชนิด *S. cerevisiae* และ non- *Saccharomyces* ร่วมกันในการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้เป็นการใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ทั้งรา ยีสต์ชนิด *S. cerevisiae* non- *Saccharomyces* และแบคทีเรียกรดแลคติก นำมาหมักสาโท สาโทที่ได้จึงน่าจะมีความซับซ้อนและความกลมกล่อมของกลิ่นรสที่ดี

ดังที่ได้กล่าวไปข้างต้นแล้วว่า การผลิตลูกแป้งสุรา ยังใช้วิธีการต่อยอดจากลูกแป้งเก่า อาจทำให้เกิดการสูญหายของจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่จำเป็นต่อกระบวนการหมักสาโท กระบวนการผลิตทุกขั้นตอนยังทำในระบบเปิด อาจนำไปสู่การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่จำเป็นต่อกระบวนการหมัก หรือปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียได้ ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในลูกแป้งสุรานั้น เป็นปัจจัยสำคัญที่นำมาสู่ปัญหาหลักของการผลิตสาโทในระดับครัวเรือนถึงระดับอุตสาหกรรม คือ ความไม่คงที่ของคุณภาพในแต่ละชุดการผลิต รสชาติของสาโทที่ได้ในแต่ละชุดการผลิตนั้นไม่เหมือนกัน ดังนั้นการใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ผสมที่ผ่านการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีมาแล้ว แทนการใช้ลูกแป้งสุรา เพื่อให้ได้สาโทที่มีคุณภาพที่ดี สม่ำเสมอกันในทุกๆครั้งการผลิต

จากการทดสอบทั้งทางด้านการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ ในระหว่างกระบวนการหมักสาโท และ การวิเคราะห์คุณภาพของสาโท ซึ่งประกอบด้วยการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ กลีเซอรอล สารประกอบให้กลิ่น (Volatile compounds) และทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสในสาโทที่ได้จากลูกแป้งสุรา NP1และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมได้จากลูกแป้งสุรา NP1 พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ทั้งการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์และคุณภาพของสาโท จึงสามารถสรุปได้ว่า สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมให้คุณภาพที่ดีเท่ากับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา สามารถใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมเป็นหัวเชื้อในการผลิตสาโทแทนการใช้ลูกแป้งสุรา เพื่อให้ได้สาโทที่มีคุณภาพที่ดี สม่ำเสมอกันในทุกๆครั้งการผลิต ซึ่งแนวทางนี้จะเป็นการนำไปสู่การแก้ไขปัญหาของคุณภาพสาโทที่ไม่คงที่ในแต่ละชุดการผลิต ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เจริญ เจริญชัย และคณะ . 2545. เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตรการผลิตสุราพื้นบ้านสำหรับผู้ประกอบการ, ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมและเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล จ.ปทุมธานี และสมาคมผู้ผลิตไวน์ผลไม้และสุราพื้นบ้านไทย.

โชคชัย วนภู และคณะ . 2546 . คนทำไวน์ : Winemaker I . พิมพ์ครั้งที่1 . กรุงเทพฯ: ซีเอ็ด ยูเคชั่น.

นภา โล่ห์ทอง . 2535 . กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต . กรุงเทพฯ: พันนี พัลลิชชิ่ง.

นริสา ตรีเนตร. 2550. ผลของยีสต์และราบางชนิดต่อสารให้กลิ่นในสาโท. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประดิษฐ์ ครุวัณณา. 2546. ไวน์ : ศาสตร์และศิลป์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 52-64.

พรพิมล ควรรณสุ. 2548. ผลของพันธุ์และระดับการขัดสีข้าวต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีระหว่างการหมักไวน์ข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ไพบูลย์ ด่านวิรุทัยและพัฒนา เหล่าไพบูลย์. 2548. ไวน์ผลไม้และสาโท ผลิตด้วยความมั่นใจได้อย่างไร. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา, หน้า 8 – 263.

มนตรี เชาวน์สังเกต. 2521. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และราเพื่อใช้ผลิตไวน์ข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยุพกนิษฐ์ พ่วงวีระกุล. 2545. กระบวนการผลิตสาโทและจุลชีววิทยาของสาโท. วารสารสถาบันอาหาร (NFI Journal) ปีที่ 5 ฉบับที่ 28: 64-80.

วรรัตน์ โชติวรรณพร. 2539. การผลิตไวน์ข้าวเหนียวดำโดยการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพัฒน์ กุมพิทักษ์ และกำพล กาหลง . 2545 . กรรมวิธีการผลิต อุ สาโท น้ำตาลเมา และเหล้ากลั่น. เกษตรกรรมธรรมชาติ. ฉบับที่ 8/2545, กรุงเทพฯ: ฐานการพิมพ์ : 15.

สุมัลลิกา โมรากุล. 2545. การพัฒนากรรมวิธีการผลิตไวน์ข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภมาส ไข่คำ . 2544 . การศึกษาคุณภาพของสุรากลั่นพื้นบ้านที่ผลิตในเขตภาคเหนือตอนบน. วิทยานิพนธ์ปริญญา ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สุหัทยา นำชัยสี่วัฒนา. 2549. ผลของสมุนไพรและเครื่องเทศต่อสารให้กลิ่นในไวน์ข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อภิชญา เตชะวสัญญ. 2550. การแยก จำแนก และลักษณะสมบัติของยีสต์และราในลูกแป้งสุราเพื่อการผลิตสาโท. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Adrian D. Coulter, Peter W. Godden and Isak S. Pretorius. 2004. How is it formed, what is its effect on titratable acidity, and what factors influence its concentration in wine? AWRI and the Australian and New Zealand Wine Industry Journal.

Aidoo, K.E., Nout, M.J. and Sarkar, P.K. (2006) Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermentation. FEMS Yeast Research **6**: 30-39.

Amerine, M.A., Ough, G.S., and Singleton, V.L. 1979. The technology of wine making. 4th ed. Westport Connecticut : AVI.

Ampe, F., Omar, N.ben, Moizan, C., Wacher, C., Guyot, J.-P., 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. Applied and Environmental Microbiology **65**: 5464– 5473.

Aquilanti, L., Santarelli, S., Silvestri, G., Osimani, A., Petruzzelli, A., Clementi, F. 2007. The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. International Journal of Food Microbiology **120**: 136 - 145.

Arlorio, M., Coïsson, J.D., Martelli, A., 1999. Identification of Saccharomyces cerevisiae in bakery products by PCR amplification of the ITS region of ribosomal DNA. European Food Research and Technology **209** :185–191

Baradei, G.E., Buchet, A.D., Ogier J.C. 2008. Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. International Journal of Food Microbiology **121**: 295–301.

Bosch-Fuste, J., Riu-Aumatell, M., Guadayol, J.M., Caixach, J., Lopez-Tamames, E., Buxaderas, S. 2007. Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis. Food Chemistry **105**: 428–435.

Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A. 2000. Direct profling of the yeast dynamics in wine fermentations. FEMS Microbiology Letter **189**: 81-87.

Cocolin, L., Heisey, A., Mills, D.A., 2001. Direct identification of the indigenous yeasts in commercial wine fermentations. Amercan Journal of Enology and Viticulture **52**: 49–53.

Chuenchomrat, P., Assavanig, A., and Lertsiri., S. 2008. Volatile flavour compounds analysis of solid state fermented Thai rice wine (*Ou*). ScienceAsia **34**: 199–206.

Duthoit, F., Godon, J.J., Montel, M.C., 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. Applied and Environmental Microbiology **69**: 3840–3848.

Ercolini, D., Mauriello, G., Blaiotta, G., Moschetti, G., Coppola, S., 2004. PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during amanufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. Journal of Applied Microbiology **96**: 263–270.

Fan, W., Qian, M.C. 2005. Headspace solid phase microextraction and gas chromatography-olfactometry dilution analysis of young and aged chinese "yanghe daqu" liquors. Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**: 7931-7938.

Fleet, G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. International Journal of Food Microbiology **86**: 11 – 22.

Florez, A.B. and Mayo, B. 2006. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. International Journal of Food Microbiology **110**: 165–171.

Fuleki, T., Pelayo, E., and Palabay, R. 1993. Carboxylic acid composition of authentic varietal and commercial grape juices. Journal of AOAC International **76**: 591–600.

Haruta, S., Shintaro, U., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M., Igarashi, Y. 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. International Journal of Food Microbiology **109**: 79–87.

Hayashida, S., Feng, D.D., Hongo, M. 1974. Function of the high concentration alcohol pro ducing factor. Agricultural Biology and Chemistry **38**: 2001- 2006.

Heard, G.M., Fleet, G.H., 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. Journal of Applied Bacteriology **65**: 23–28.

Lee, J.S., Heo, G.Y., Lee, J.W., Oh, Y.J., Park, J.A., Park, Y.H., Pyunb, Y.R., Ahn, J.S. 2005. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. International Journal of Food Microbiology **102**: 143– 150.

Limtong, S., Sintara, S., Suwanarit, P., Lotong, N., 2002. Yeast diversity in Thai traditional fermentation starter (Loog pang). Kasetsart Journal (Natural Science) **2**: 149-158.

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K., 2001. Identification of Acetobacter strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. Journal of General and Applied Microbiology **47**: 119–131.

Lubbers, S., Verret, C., and Voilley, A. 2001. The effect of glycerol on the perceived aroma of model wine and a white wine. Lebensm Wiss u Technol., **34**: 262-265

Maro, E.D., Ercolini, D., Coppola, S. 2007. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. International Journal of Food Microbiology **117**: 201–210.

Meroth, C.B., Hammes, W.P., Hertel, C., 2004. Characterization of the microbiota of rice sourdoughs and description of *Lactobacillus spicheri* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology **27**: 151–159.

Miller, G.L., 1959. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry **31**: 420–428.

Mills, D.A., Johannsen, E.A., Cocolin, L., 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. Applied and Environmental Microbiology **68**: 4884–4893.

Nyanga, L.K., Nout, M.J.R., Gadaga, T.H., Theelen, B., Boekhout, T., Zwietering, M.H. 2007. Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (Ziziphus mauritiana) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe. International Journal of Food Microbiology **120**: 159-166.

Nykanen, L.; Suomalainen, H. 1983. Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages. Reidel Publish. Co: Dordrecht, The Netherlands.

Omar, N.ben, Ampe, F., 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. Applied and Environmental Microbiology **66**: 3664–3673.

Querol, A. and Fleet, G. 2006. Yeast in Food and Beverages. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, Germany.

Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E. Moreno, J. A. Mauricio, J. C. 2004. Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. Food Chemistry **84**: 585–590**.**

Rafael A. Peinado., Jose A. Moreno., Munoz, D., Medina, M., and Moreno, J. 2004. Gas chromatographic quantification of major volatile compounds and polyols in wine by direct injection. Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**: 6389-6393.

Rittiplang, J., Laopaiboon, P., Vichitpan, K., Danvirutai, P. 2007. Lactic acid bacteria from indigeneous Loogpang samples of Northeastern Thailand and their lactic acid production ability. Thai Journal of Biotechnology. 44-48.

Rocha, S, M., Rodrigues, F., Coutinho, P., Delgadillo, I., Coimbra, M, A. 2004. Volatile composition of Baga red wine assessment of the identification of the would-be impact odourants. Analytica Chimica Acta **513**: 257–262.

Romero, E. G., & Munoz, G. S. 1993. Determination of organic acids in grape musts, wines and vinegars by high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography **655**: 111–117.

Shrestha H, Nand K & Rati ER (2002) Microbiological profile of murcha starters and physico-chemical characteristics of poko, a rice based traditional fermented food product of Nepal. Food Biotechnology **16**: 1–15.

Sirisantimethakom, L., Laopaiboon, L., Danvirutai, P., and Laopaiboon, P., 2008. Volatile compounds of a traditional Thai rice wine. Asian Network for Scientific Information. **7**: 505-513.

Sirisantimethakom, L., Laopaiboon, L., Thanonkeo, P., Danvirutai, P., and Laopaiboon, P., 2007. Volatile, acid and glycerol components of Sato. Thai Journal of Biotechnology. 21-26

Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W. 2000. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**: 2589-2594.

Tamang, J.P., Dewan, S., tamang, B., Rai, A., Schillingerr, U. and Holzapfel, W.H. 2007. Lactic acid bacteria in hamei and Marcha of North East India. Indian Journal of Microbiology **47**: 119-125.

Tsuyoshi, N., Fudou, R., Yamanaka, S., Kozaki, M., Tamang, N., Thapa, S., Tamang, JP. 2005. Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amylolytic fermentation. International Journal of Food Microbiology **99**: 135–146.

Valero, E., Moyano, L., Millan, M. C., Medina, M., Ortega, J. M. 2002. Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*: Influence of the initial oxygenation of the grape must. Food Chemistry **78**: 57-61.

Walker, G.M., McLeod, A.H., Hogson, V.J., 1995. Interaction between killer yeasts and pathogenic fungi. FEMS Microbiology Letter **127**: 213–222.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato dextrose agar (PDA)

Potato starch	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์แมล เป็น 4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Yeast malt extract agar (YM)

Yeast extract	3	กรัม
malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายสารสี่ชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์แมล เป็น 4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Rose bengal agar

peptone	5	กรัม
glucose	10	กรัม
potassium dihydrogen phosphate	1	กรัม
magnesium sulfate	0.5	กรัม
Rose Bengal	0.05	กรัม
Agar	20	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

L-lysine medium

Glucose	44.5	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.78	กรัม
Magnesium sulphate	0.89	กรัม
Calcium chloride	0.178	กรัม
Sodium chloride	0.089	กรัม
Adenine	0.00178	กรัม
DL-methionine	0.000891	กรัม
L-histidine	0.000891	กรัม
DL-tryptophane	0.000891	กรัม
Boric acid	0.0000089	กรัม
Zinc sulphate	0.0000356	กรัม
Ammonium molybdate	0.0000178	กรัม
Manganese sulphate	0.0000356	กรัม
Ferrous sulphate	0.0002225	กรัม
Lysine	1.0	กรัม
Inositol	0.02	กรัม
Calcium pantothenate	0.002	กรัม
Aneurine	0.0004	กรัม
Pyridoxine	0.0004	กรัม
p-aminobenzoic acid	0.0002	กรัม
Nicotinic acid	0.0004	กรัม
Riboflavin	0.0002	กรัม
Biotin	0.000002	กรัม
Folic acid	0.000001	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายกรดแลคติกเข้มข้นร้อยละ 10 ให้มีความเป็นกรดเบสเป็น 4.8 แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

MRS Medium

Peptone	10	กรัม
Meat extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Dipotassium phosphate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Diammonium citrate	2	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์แมล ให้มีความเป็นกรดเบสในช่วง 6.2 – 6.5 แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสาโท

1. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Titration Acidity) (Amerine et al., 1979)

การเตรียมสารละลาย Phenopthalene

ละลาย Phenopthalene 0.1 กรัม ใน Absolute Ethanol 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 50 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Titration Acidity) (Amerinec และคณะ, 1979)

นำตัวอย่างมา 5 ml เติมน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส 50 ml แล้วหยด Phenopthalene 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับ NaOH 0.1 นอร์แมล จนสารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู อ่านค่าปริมาตร NaOH ที่ได้ แล้วนำไปคำนวณ %TA

$$\%TA = \frac{V(Titrated) \times N(NaOH) \times MW(lactic\ acid) \times 100}{1000 \times v(Sample)}$$

V = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรากไซด์เป็นนอร์แมล (N)

v = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

MW (กรดแลคติก) = 90

2. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid(DNSA) (Miller, 1959)

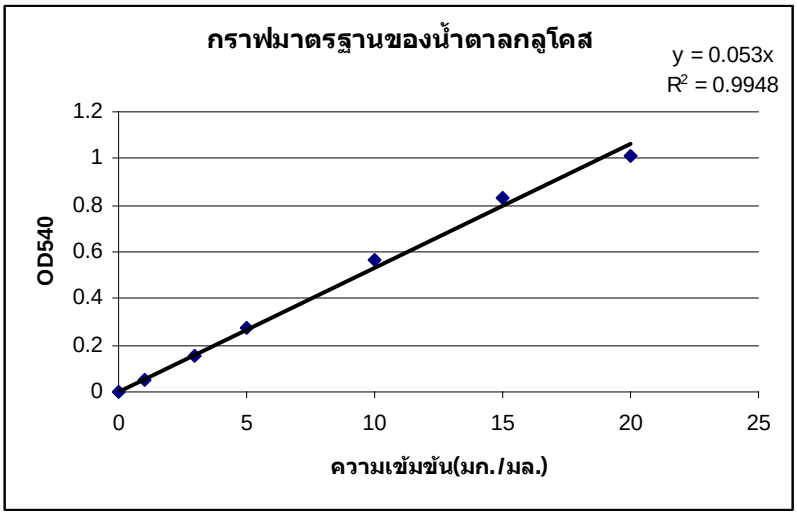
การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก (Dinitrosalicylic acid, DNSA)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ จำนวน 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโปตัสเซียมทาเทรต ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) 30 กรัม ทำปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที ทิ้งให้เย็น เติมน้ำ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0.1 1 3 5 10 15 และ 20 มก./มล. และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ (blank) แล้วเขียนกราฟระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร



รูปที่ ข1 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของกลูโคส

3. การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์, กรดอินทรีย์ และกลีเซอรอล โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ กลีเซอรอล และเอทานอล

เตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดซิตริก กรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดแอซิติก และ กลีเซอรอล โดยชั่งกรดซิตริก กรดซัคซินิก กรดแลคติก และกลีเซอรอล ตัวอย่างละ 50 มก. ส่วนกรดแอซิติกซึ่งเป็นของเหลวเตรียมโดยปิเปตต์สารละลายเข้มข้นของกรดแอซิติกมา 48 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครเซนตริฟิวทิวบ์ แยกกันแล้วเติมน้ำกลั่น 1 มล. เพื่อให้ได้สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 50 มก./มล.จากนั้นเตรียม สารมาตรฐานรวมของกรดอินทรีย์ กลีเซอรอล และเอทานอล โดยปิเปตต์สารมาตรฐานที่เตรียมไว้ผสมรวมกันที่ความเข้มข้น ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ ข1

ตารางที่ ข1 แสดงความเข้มข้นของสารมาตรฐานรวมของกรดอินทรีย์ กลีเซอรอล และเอทานอล

	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (มก./มล.)				
กรดซิตริก	0.5	0.3	0.1	0.5	1.2
กรดทาร์ทาริก	0.5	0.1	0.3	3	4
กรดไพรูวิก	1.1	0.5	0.8	3	4
กรดมาลิก	1.1	0.5	0.8	5	5
กรดซัคซินิก	0.5	0.25	0.2	0.1	0.5
กรดแลคติก	9	7	1	0.5	0.3
กลีเซอรอล	9	11	5	1	2
กรดแอซิติก	0.25	3	5	0.25	0.5
กรดไอโซบิวไทริก	0.5	0.6	1.6	0.2	0.5
เอทานอล	7	12	10	12	10
กรดไอโซวาลิอิก	0.5	1.2	1.6	0.2	0.5

ทำการกรองตัวอย่างสารละลายมาตรฐานที่ได้ผ่านเซลลูโลสแอซิเทต pore size ขนาด 0.22 ไมโครเมตร และฉีดตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์: Animex HPX-87H Ion Exclusion 300x7.8 mm

ตัวทำละลายเคลื่อนที่: 0.02 mM H_2SO_4

อัตราการไหล (flow rate): 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที

อุณหภูมิคอลัมน์: 55 องศาเซลเซียส

ชนิดของ detector: Refragtive Index (RI)

ปริมาตรฉีด: 100 ไมโครลิตร

3.2 การเตรียมตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase)

โดยทำการเตรียมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์น้ำหนักโมเลกุลของกรดซัลฟิวริก (MW) = 98.07 กรัม , ค่าความถ่วงจำเพาะ (D) = 1.84

วิธีการเตรียม

$$\text{Mol} = \text{g/MW}$$

$$0.002\ \text{M} = \text{g}/98.07$$

$$\text{g} = 0.196\ \text{g}$$

$$\text{D} = \text{M/V}$$

$$1.84 = 0.196 / \text{V}$$

$$\text{V} = 0.106\ \text{ml}$$

ปิเปตสารละลายเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก มา 0.106 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จะได้ 2 มิลลิโมลาร์ของกรดซัลฟิวริก

ภาคผนวก ค

ใบให้คะแนนการชิมสาโท

ชื่อผู้ทดสอบ……..……....วันที่ทดสอบ……

รหัสตัวอย่าง	สี 10 คะแนน	กลิ่น 30 คะแนน	รส 40 คะแนน	ความยอมรับหรือประทับใจ 20 คะแนน	รวม 100 คะแนน	ข้อดีและหรือข้อบกพร่อง

หมายเหตุ

คะแนนที่บ่งชั้นคุณภาพไวน์:	ยอดเยี่ยมมาก	91 – 100 คะแนน
	ยอดเยี่ยม	81 – 90 คะแนน
	ดี	71 – 80 คะแนน
	พอใช้	61 – 70 คะแนน
	ระดับจำหน่ายได้	51 – 60 คะแนน
	มีปัญหาในคุณภาพ	ต่ำกว่า 50 คะแนน

ที่มา: ประดิษฐ์ ครุวัณณา. ไวน์ : ศาสตร์และศิลป์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 2546. 153.

วิธีการให้คะแนน

สี **คะแนนเต็ม 10 คะแนน**

สีดีมาก ชอบมาก	8 – 10 คะแนน
สีดี ชอบ	7 – 8 คะแนน
ไม่ดี สีอ่อนหรือเข้มเกินไป	5 – 6 คะแนน
ไม่ชอบมาก มีข้อบกพร่อง (defect) กลิ่นไม่ดีด้วย	3 – 4 คะแนน

กลิ่น **คะแนนเต็ม 30 คะแนน**

กลิ่นผลไม้หรือวัตถุดิบในสาโทแรงมาก	
ชอบ บอกได้ทันที	26 – 30 คะแนน
กลิ่นผลไม้หรือวัตถุดิบในสาโทแรง	
ชอบ บอกได้โดยดมหลายครั้ง	22 – 25 คะแนน
กลิ่นผลไม้หรือวัตถุดิบในสาโทแรง	
พอบอกได้ ชอบกลิ่น	18 – 21 คะแนน
กลิ่นผลไม้หรือวัตถุดิบในสาโทอ่อน	
บอกไม่ได้ แต่ชอบ	15 – 17 คะแนน
กลิ่นผลไม้หรือวัตถุดิบในสาโทอ่อนหรือแรงเกินไป	
ไม่ชอบกลิ่น	10 – 14 คะแนน
กลิ่นผลไม้หรือวัตถุดิบในสาโทอ่อน	
บอกไม่ได้และบกพร่อง	ต่ำกว่า 10 คะแนน

รส **คะแนนเต็ม 40 คะแนน**

รสดีมาก	ชอบมาก	36 – 40 คะแนน
รสดี	ชอบ	31 – 35 คะแนน
รสพอใช้	ชอบ	26 – 30 คะแนน
รสพอใช้	ชอบเล็กน้อย	21 – 25 คะแนน
รสไม่ดี	ไม่ชอบ	15 – 20 คะแนน
รสไม่ดี	ไม่ชอบมาก	ต่ำกว่า 15 คะแนน

การยอมรับ **คะแนนเต็ม 20 คะแนน** (ความประทับใจในคุณภาพ)

ยอมรับมาก	18 – 20 คะแนน
ยอมรับ	14 -16 คะแนน
พอใช้	10 – 12 คะแนน
ไม่ชอบ	6 – 8 คะแนน
ไม่ชอบมาก	ต่ำกว่า 6 คะแนน

ที่มา: ประดิษฐ์ ครุวัณณา. ไวน์ : ศาสตร์และศิลป์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 2546. 154 -155.

ภาคผนวก ง

ตารางที่ ง1 แสดงค่าคะแนนรวมเฉลี่ยของผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโททางการค้าชนิดที่ 1 และ 2

สาโท	คะแนนรวมเฉลี่ย
สาโทจากลูกแป้งสุรา NP1	75.13± 8.56
สาโททางการค้า 1	72.31±9.90
สาโททางการค้า 2	76.13±10.44

ตารางที่ ง2 แสดงค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสทั้ง สี, กลิ่น, รส และการยอมรับของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1

สาโท	สี (10)	การยอมรับ (20)	กลิ่น (30)	รส (40)
สาโทจากลูกแป้งสุรา NP1	7.8± 0.2	14.9± 0.3	21.9± 0.4	29.3± 0.6
สาโทจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมเท่ากับลูกแป้ง NP1	7.5±0.1	14.5±0.8	21.8±0.1	29.3±1.4
สาโทจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมน้อยกว่า NP1	7.73±0.13	14.97±0.25	21.22±0.14	29.75±0.23
สาโทจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมมากกว่า NP1	7.2±0.18	14.46±0.17	21.4± 0.52	29.39±1.54

ภาคผนวก จ

ตารางที่ จ1 วิเคราะห์ผล Organic acid และ Glycerol ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ในอัตราส่วนต่างๆกัน ด้วย SPSS v16.0

Taste of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Citric	2.561	3	6	.151
Succinic	3.976	3	7	.060
Lactic	2.722	3	7	.124
Acetic	4.108	3	6	.067
Glycerol	1.550	3	7	.284

ANOVA

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Citric	Between Groups	.084	3	.028	289.899	.000
	Within Groups	.001	6	.000		
	Total	.084	9			
Succinic	Between Groups	.077	3	.026	2.004	.202
	Within Groups	.090	7	.013		
	Total	.167	10			
Lactic	Between Groups	43.655	3	14.552	661.590	.000
	Within Groups	.154	7	.022		
	Total	43.809	10			
Acetic	Between Groups	.199	3	.066	1.724	.261
	Within Groups	.231	6	.038		
	Total	.429	9			
Glycerol	Between Groups	22.789	3	7.596	147.927	.000
	Within Groups	.359	7	.051		
	Total	23.148	10			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Citric	1	2	.20763*	.00801	.000	.1799	.2354
		3	.13203*	.00895	.000	.1010	.1630
		4	.21628*	.00895	.000	.1853	.2473
	2	1	-.20763*	.00801	.000	-.2354	-.1799
		3	-.07560*	.00895	.001	-.1066	-.0446
		4	.00865	.00895	.773	-.0223	.0396
	3	1	-.13203*	.00895	.000	-.1630	-.1010
		2	.07560*	.00895	.001	.0446	.1066
		4	.08425*	.00981	.001	.0503	.1182
	4	1	-.21628*	.00895	.000	-.2473	-.1853
		2	-.00865	.00895	.773	-.0396	.0223
		3	-.08425*	.00981	.001	-.1182	-.0503
Succinic	1	2	-.19217	.09242	.248	-.4981	.1138
		3	-.05803	.09242	.920	-.3640	.2479
		4	.02357	.10333	.995	-.3185	.3656
	2	1	.19217	.09242	.248	-.1138	.4981
		3	.13413	.09242	.510	-.1718	.4401
		4	.21573	.10333	.245	-.1263	.5578
	3	1	.05803	.09242	.920	-.2479	.3640
		2	-.13413	.09242	.510	-.4401	.1718
		4	.08160	.10333	.857	-.2604	.4236
	4	1	-.02357	.10333	.995	-.3656	.3185
		2	-.21573	.10333	.245	-.5578	.1263
		3	-.08160	.10333	.857	-.4236	.2604
Lactic	1	2	4.39793*	.12109	.000	3.9971	4.7988
		3	4.49013*	.12109	.000	4.0893	4.8910
		4	4.55388*	.13538	.000	4.1057	5.0020
	2	1	-4.39793*	.12109	.000	-4.7988	-3.9971

		3	.09220	.12109	.869	-.3086	.4930
		4	.15595	.13538	.672	-.2922	.6041
	3	1	-4.49013*	.12109	.000	-4.8910	-4.0893
		2	-.09220	.12109	.869	-.4930	.3086
		4	.06375	.13538	.963	-.3844	.5119
	4	1	-4.55388*	.13538	.000	-5.0020	-4.1057
		2	-.15595	.13538	.672	-.6041	.2922
		3	-.06375	.13538	.963	-.5119	.3844
Acetic	1	2	-.39620	.17896	.222	-1.0157	.2233
		3	-.16557	.17896	.793	-.7851	.4540
		4	-.19090	.19605	.769	-.8696	.4878
	2	1	.39620	.17896	.222	-.2233	1.0157
		3	.23063	.16007	.522	-.3235	.7848
		4	.20530	.17896	.677	-.4142	.8248
	3	1	.16557	.17896	.793	-.4540	.7851
		2	-.23063	.16007	.522	-.7848	.3235
		4	-.02533	.17896	.999	-.6449	.5942
	4	1	.19090	.19605	.769	-.4878	.8696
		2	-.20530	.17896	.677	-.8248	.4142
		3	.02533	.17896	.999	-.5942	.6449
Glycerol	1	2	2.98017*	.18503	.000	2.3677	3.5926
		3	3.06210*	.18503	.000	2.4496	3.6746
		4	3.67685*	.20686	.000	2.9921	4.3616
	2	1	-2.98017*	.18503	.000	-3.5926	-2.3677
		3	.08193	.18503	.969	-.5305	.6944
		4	.69668*	.20686	.046	.0119	1.3814
	3	1	-3.06210*	.18503	.000	-3.6746	-2.4496
		2	-.08193	.18503	.969	-.6944	.5305
		4	.61475	.20686	.078	-.0700	1.2995
	4	1	-3.67685*	.20686	.000	-4.3616	-2.9921
		2	-.69668*	.20686	.046	-1.3814	-.0119
		3	-.61475	.20686	.078	-1.2995	.0700

ตารางที่ จ2 วิเคราะห์ผล Volatile compounds ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ในอัตราส่วนต่างๆกัน ด้วย SPSS v16.0

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Propanal	2.979	3	8	.096
IsobutylAlcohol	2.429	3	7	.150
nButanol	3.578	3	6	.086
IsoamylAlcohol	5.223	3	7	.033
PhanethylAlcohol	4.320	3	7	.051
MethylButanol	1.759	3	8	.233
EthylAcetate	.693	3	7	.585
PropionicAcid	2.843	3	7	.115
IsoamylAcetate	6.124	3	7	.023

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Propanal	Between Groups	1055.636	3	351.879	17.054	.001
	Within Groups	165.068	8	20.634		
	Total	1220.704	11			
IsobutylAlcohol	Between Groups	2436.786	3	812.262	33.083	.000
	Within Groups	171.867	7	24.552		
	Total	2608.653	10			
nButanol	Between Groups	3.492	3	1.164	1.604	.285
	Within Groups	4.355	6	.726		
	Total	7.846	9			
IsoamylAlcohol	Between Groups	2067.720	3	689.240	11.493	.004
	Within Groups	419.777	7	59.968		
	Total	2487.497	10			
PhanethylAlcohol	Between Groups	779.359	3	259.786	1.764	.241
	Within Groups	1031.140	7	147.306		
	Total	1810.499	10			

MethylButanol	Between Groups	.236	3	.079	.507	.688
	Within Groups	1.239	8	.155		
	Total	1.475	11			
EthylAcetate	Between Groups	8040.123	3	2680.041	90.212	.000
	Within Groups	207.957	7	29.708		
	Total	8248.080	10			
PropionicAcid	Between Groups	.013	3	.004	5.073	.035
	Within Groups	.006	7	.001		
	Total	.019	10			
IsoamylAcetate	Between Groups	.106	3	.035	66.951	.000
	Within Groups	.004	7	.001		
	Total	.110	10			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Propanal	1	2	22.33733*	3.70887	.001	10.4602	34.2144
		3	18.24575*	3.70887	.005	6.3687	30.1228
		4	23.12008*	3.70887	.001	11.2430	34.9972
	2	1	-22.33733*	3.70887	.001	-34.2144	-10.4602
		3	-4.09158	3.70887	.698	-15.9687	7.7855
		4	.78275	3.70887	.996	-11.0943	12.6598
	3	1	-18.24575*	3.70887	.005	-30.1228	-6.3687
		2	4.09158	3.70887	.698	-7.7855	15.9687
		4	4.87433	3.70887	.580	-7.0028	16.7514
	4	1	-23.12008*	3.70887	.001	-34.9972	-11.2430
		2	-.78275	3.70887	.996	-12.6598	11.0943
		3	-4.87433	3.70887	.580	-16.7514	7.0028
IsobutylAlcohol	1	2	32.97283*	4.52331	.001	17.9999	47.9457
		3	30.88107*	4.04577	.001	17.4889	44.2732

		4	35.63208*	4.04577	.000	22.2399	49.0242
	2	1	-32.97283*	4.52331	.001	-47.9457	-17.9999
		3	-2.09176	4.52331	.965	-17.0647	12.8811
		4	2.65925	4.52331	.933	-12.3136	17.6321
	3	1	-30.88107*	4.04577	.001	-44.2732	-17.4889
		2	2.09176	4.52331	.965	-12.8811	17.0647
		4	4.75101	4.04577	.660	-8.6412	18.1432
	4	1	-35.63208*	4.04577	.000	-49.0242	-22.2399
		2	-2.65925	4.52331	.933	-17.6321	12.3136
		3	-4.75101	4.04577	.660	-18.1432	8.6412
nButanol	1	2	.13228	.85192	.999	-2.8168	3.0814
		3	-1.01790	.77769	.590	-3.7100	1.6742
		4	-1.23222	.77769	.451	-3.9244	1.4599
	2	1	-.13228	.85192	.999	-3.0814	2.8168
		3	-1.15018	.77769	.502	-3.8423	1.5420
		4	-1.36450	.77769	.376	-4.0566	1.3276
	3	1	1.01790	.77769	.590	-1.6742	3.7100
		2	1.15018	.77769	.502	-1.5420	3.8423
		4	-.21432	.69559	.989	-2.6222	2.1936
	4	1	1.23222	.77769	.451	-1.4599	3.9244
		2	1.36450	.77769	.376	-1.3276	4.0566
		3	.21432	.69559	.989	-2.1936	2.6222
IsoamylAlcohol	1	2	-28.23230*	7.06919	.021	-51.6325	-4.8321
		3	-34.21947*	6.32287	.004	-55.1492	-13.2897
		4	-27.48052*	6.32287	.014	-48.4103	-6.5508
	2	1	28.23230*	7.06919	.021	4.8321	51.6325
		3	-5.98716	7.06919	.831	-29.3873	17.4130
		4	.75179	7.06919	1.000	-22.6484	24.1519
	3	1	34.21947*	6.32287	.004	13.2897	55.1492
		2	5.98716	7.06919	.831	-17.4130	29.3873
		4	6.73895	6.32287	.719	-14.1908	27.6687
	4	1	27.48052*	6.32287	.014	6.5508	48.4103

		2	-.75179	7.06919	1.000	-24.1519	22.6484
		3	-6.73895	6.32287	.719	-27.6687	14.1908
PhanethylAlcohol	1	2	9.35149	11.07947	.832	-27.3234	46.0263
		3	-10.22227	9.90978	.738	-43.0253	22.5807
		4	-13.39352	9.90978	.563	-46.1965	19.4095
	2	1	-9.35149	11.07947	.832	-46.0263	27.3234
		3	-19.57376	11.07947	.361	-56.2486	17.1011
		4	-22.74500	11.07947	.256	-59.4199	13.9298
	3	1	10.22227	9.90978	.738	-22.5807	43.0253
		2	19.57376	11.07947	.361	-17.1011	56.2486
		4	-3.17124	9.90978	.988	-35.9742	29.6317
	4	1	13.39352	9.90978	.563	-19.4095	46.1965
		2	22.74500	11.07947	.256	-13.9298	59.4199
		3	3.17124	9.90978	.988	-29.6317	35.9742
MethylButanol	1	2	-.29878	.32135	.790	-1.3279	.7303
		3	-.32061	.32135	.755	-1.3497	.7085
		4	-.34476	.32135	.714	-1.3738	.6843
	2	1	.29878	.32135	.790	-.7303	1.3279
		3	-.02183	.32135	1.000	-1.0509	1.0072
		4	-.04598	.32135	.999	-1.0751	.9831
	3	1	.32061	.32135	.755	-.7085	1.3497
		2	.02183	.32135	1.000	-1.0072	1.0509
		4	-.02415	.32135	1.000	-1.0532	1.0049
	4	1	.34476	.32135	.714	-.6843	1.3738
		2	.04598	.32135	.999	-.9831	1.0751
		3	.02415	.32135	1.000	-1.0049	1.0532
EthylAcetate	1	2	-65.41990*	4.97562	.000	-81.8900	-48.9498
		3	-48.11150*	4.45033	.000	-62.8428	-33.3802
		4	-64.68509*	4.45033	.000	-79.4164	-49.9538
	2	1	65.41990*	4.97562	.000	48.9498	81.8900
		3	17.30840*	4.97562	.040	.8383	33.7785
		4	.73480	4.97562	.999	-15.7353	17.2049

	3	1	48.11150*	4.45033	.000	33.3802	62.8428
		2	-17.30840*	4.97562	.040	-33.7785	-.8383
		4	-16.57360*	4.45033	.030	-31.3049	-1.8423
	4	1	64.68509*	4.45033	.000	49.9538	79.4164
		2	-.73480	4.97562	.999	-17.2049	15.7353
		3	16.57360*	4.45033	.030	1.8423	31.3049
PropionicAcid	1	2	-.04740	.02638	.349	-.1347	.0399
		3	-.02571	.02359	.706	-.1038	.0524
		4	-.08893*	.02359	.028	-.1670	-.0108
	2	1	.04740	.02638	.349	-.0399	.1347
		3	.02169	.02638	.842	-.0656	.1090
		4	-.04153	.02638	.448	-.1288	.0458
	3	1	.02571	.02359	.706	-.0524	.1038
		2	-.02169	.02638	.842	-.1090	.0656
		4	-.06323	.02359	.114	-.1413	.0149
	4	1	.08893*	.02359	.028	.0108	.1670
		2	.04153	.02638	.448	-.0458	.1288
		3	.06323	.02359	.114	-.0149	.1413
IsoamylAcetate	1	2	-.23303*	.02100	.000	-.3025	-.1635
		3	-.18084*	.01878	.000	-.2430	-.1187
		4	-.23677*	.01878	.000	-.2989	-.1746
	2	1	.23303*	.02100	.000	.1635	.3025
		3	.05219	.02100	.147	-.0173	.1217
		4	-.00374	.02100	.998	-.0733	.0658
	3	1	.18084*	.01878	.000	.1187	.2430
		2	-.05219	.02100	.147	-.1217	.0173
		4	-.05593	.01878	.077	-.1181	.0062
	4	1	.23677*	.01878	.000	.1746	.2989
		2	.00374	.02100	.998	-.0658	.0733
		3	.05593	.01878	.077	-.0062	.1181

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ จ3 วิเคราะห์ผล Sensory taste ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ในอัตราส่วนต่างๆกัน ด้วย SPSS v16.0

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Color	.404	3	8	.754
Odor	2.333	3	8	.150
Flavor	2.743	3	8	.113
Impression	1.968	3	8	.197
Total	3.103	3	8	.089

ANOVA

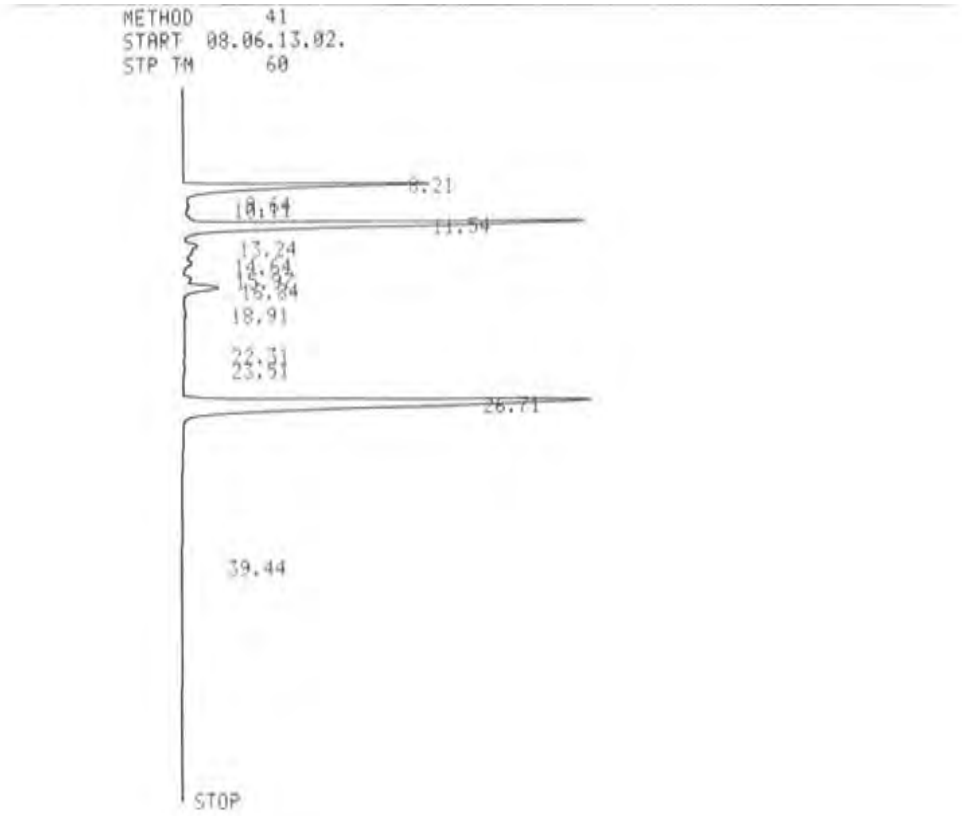
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Color	Between Groups	.582	3	.194	7.941	.009
	Within Groups	.195	8	.024		
	Total	.777	11			
Odor	Between Groups	.836	3	.279	2.390	.144
	Within Groups	.932	8	.117		
	Total	1.768	11			
Flavor	Between Groups	.460	3	.153	.132	.938
	Within Groups	9.281	8	1.160		
	Total	9.741	11			
Impression	Between Groups	.673	3	.224	1.038	.427
	Within Groups	1.730	8	.216		
	Total	2.403	11			
Total	Between Groups	3.468	3	1.156	.547	.664
	Within Groups	16.910	8	2.114		
	Total	20.378	11			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Sample	(J) Sample	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Color	1	2	.21667	.12761	.384	-.1920	.6253
		3	.01667	.12761	.999	-.3920	.4253
		4	.54667*	.12761	.011	.1380	.9553
	2	1	-.21667	.12761	.384	-.6253	.1920
		3	-.20000	.12761	.446	-.6086	.2086
		4	.33000	.12761	.119	-.0786	.7386
	3	1	-.01667	.12761	.999	-.4253	.3920
		2	.20000	.12761	.446	-.2086	.6086
		4	.53000*	.12761	.014	.1214	.9386
	4	1	-.54667*	.12761	.011	-.9553	-.1380
		2	-.33000	.12761	.119	-.7386	.0786
		3	-.53000*	.12761	.014	-.9386	-.1214
Odor	1	2	.06667	.27875	.995	-.8260	.9593
		3	.63333	.27875	.184	-.2593	1.5260
		4	.45333	.27875	.417	-.4393	1.3460
	2	1	-.06667	.27875	.995	-.9593	.8260
		3	.56667	.27875	.253	-.3260	1.4593
		4	.38667	.27875	.540	-.5060	1.2793
	3	1	-.63333	.27875	.184	-1.5260	.2593
		2	-.56667	.27875	.253	-1.4593	.3260
		4	-.18000	.27875	.914	-1.0726	.7126
	4	1	-.45333	.27875	.417	-1.3460	.4393
		2	-.38667	.27875	.540	-1.2793	.5060
		3	.18000	.27875	.914	-.7126	1.0726
Flavor	1	2	.05000	.87944	1.000	-2.7663	2.8663
		3	-.45000	.87944	.954	-3.2663	2.3663
		4	-.08667	.87944	1.000	-2.9030	2.7296
	2	1	-.05000	.87944	1.000	-2.8663	2.7663

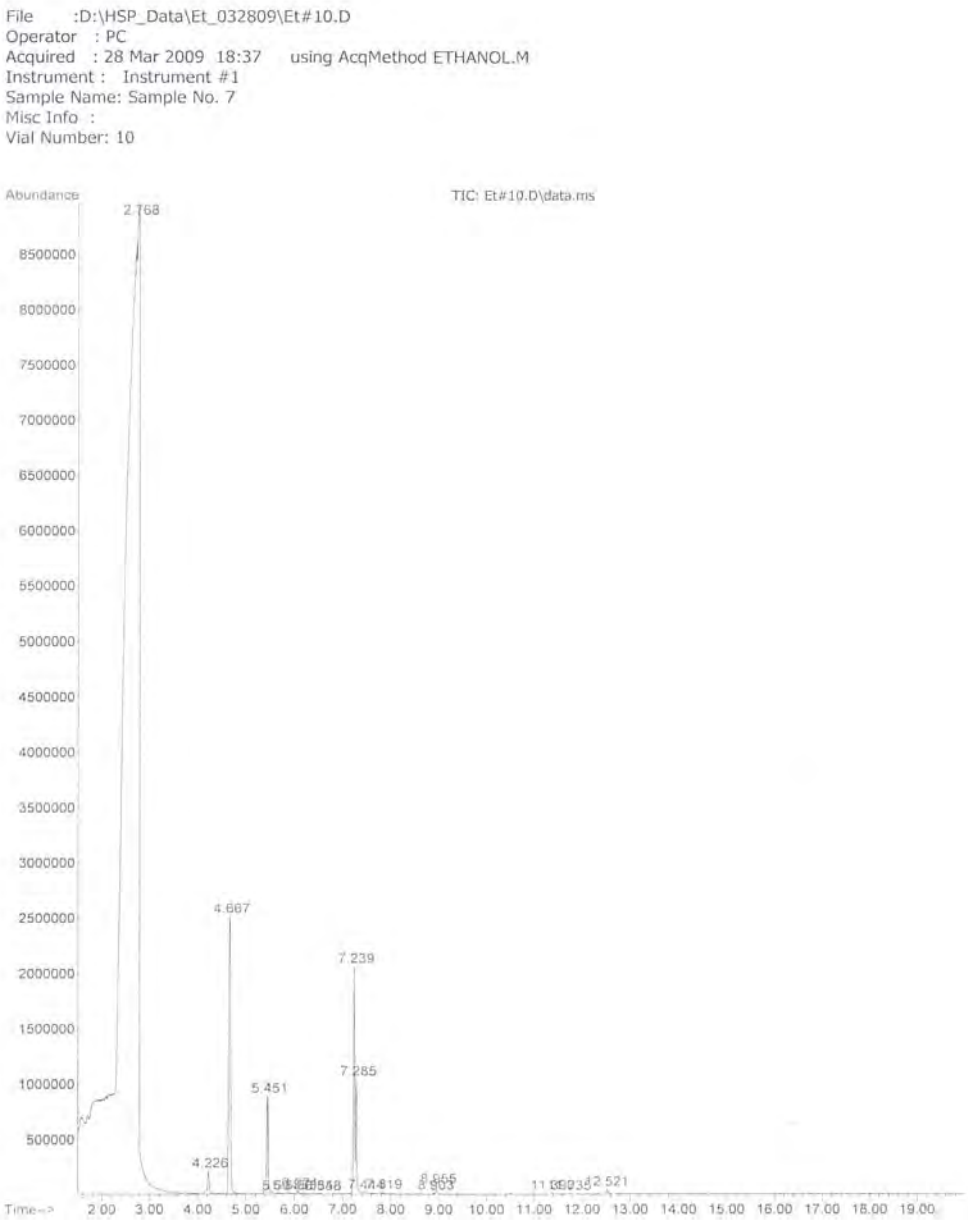
		3	-.50000	.87944	.939	-3.3163	2.3163
		4	-.13667	.87944	.999	-2.9530	2.6796
	3	1	.45000	.87944	.954	-2.3663	3.2663
		2	.50000	.87944	.939	-2.3163	3.3163
		4	.36333	.87944	.975	-2.4530	3.1796
	4	1	.08667	.87944	1.000	-2.7296	2.9030
		2	.13667	.87944	.999	-2.6796	2.9530
		3	-.36333	.87944	.975	-3.1796	2.4530
Impression	1	2	.43333	.37969	.676	-.7826	1.6492
		3	-.08333	.37969	.996	-1.2992	1.1326
		4	.42333	.37969	.691	-.7926	1.6392
	2	1	-.43333	.37969	.676	-1.6492	.7826
		3	-.51667	.37969	.554	-1.7326	.6992
		4	-.01000	.37969	1.000	-1.2259	1.2059
	3	1	.08333	.37969	.996	-1.1326	1.2992
		2	.51667	.37969	.554	-.6992	1.7326
		4	.50667	.37969	.569	-.7092	1.7226
	4	1	-.42333	.37969	.691	-1.6392	.7926
		2	.01000	.37969	1.000	-1.2059	1.2259
		3	-.50667	.37969	.569	-1.7226	.7092
Total	1	2	.76667	1.18709	.914	-3.0348	4.5681
		3	.11667	1.18709	1.000	-3.6848	3.9181
		4	1.33667	1.18709	.685	-2.4648	5.1381
	2	1	-.76667	1.18709	.914	-4.5681	3.0348
		3	-.65000	1.18709	.945	-4.4515	3.1515
		4	.57000	1.18709	.961	-3.2315	4.3715
	3	1	-.11667	1.18709	1.000	-3.9181	3.6848
		2	.65000	1.18709	.945	-3.1515	4.4515
		4	1.22000	1.18709	.739	-2.5815	5.0215
	4	1	-1.33667	1.18709	.685	-5.1381	2.4648
		2	-.57000	1.18709	.961	-4.3715	3.2315
		3	-1.22000	1.18709	.739	-5.0215	2.5815



C-R1A
SMPL # 00
FILE # 2
REPT # 2
METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		8.21	15.8869		175271
0		9.64	0.1216	T	1341
0		11.54	29.9188	V	330077
0		13.24	1.9666	V	21697
0		14.64	0.8468	V	9342
0		15.97	0.6938	V	7654
0		16.84	3.2044	V	35352
0		18.91	0.3438	V	3793
0		22.31	0.0926		1022
0		23.51	0.2607		2876
0		26.71	46.6635		514812
	TOTAL		100.		1103242

ภาพที่ จ1 แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมของกรดอินทรีย์และกลีเซอรอลที่ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)



ภาพที่ จ2 แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารประกอบให้กลิ่นที่วิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว อำภา หลวงคล้ายโพธิ์ เกิดเมื่อวันที่ 5 กรกฎาคม พ.ศ.2524 ที่จังหวัดสุพรรณบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ในปีการศึกษา 2547 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549