

ผลของอุณหภูมิต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์และอะซิทัลดีไฮด์ในสาโท



นายพงศธร พูนพิพัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

ปีการศึกษา 2556

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตที่ส่งมาขึ้นทะเบียนวิทยานิพนธ์ที่ส่งมาของบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

EFFECTS OF FERMENTATION TEMPERATURE ON ISOAMYALCOHOL AND
ACETALDEHYDE IN SATO

Mr. Pongsatorn Poonpipat

The logo of Chulalongkorn University, featuring a central emblem with a sunburst and a tiered structure, set against a light background.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

| | |
|---------------------------------|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | ผลของอุณหภูมิหมักต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์และอะซิทล ดีไฮด์ในสาโท |
| โดย | นายพงศธร พูนพิพัฒน์ |
| สาขาวิชา | เทคโนโลยีชีวภาพ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิตพงศ์ ประดิษฐ์สุวรรณ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม | รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร |

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิตพงศ์ ประดิษฐ์สุวรรณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร)

.....กรรมการ
(ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทพปัญญา เจริญรัตน์)

พงศธร พูนพิพัฒน์ : ผลของอุณหภูมิหมักต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์และอะซิทัลดีไฮด์ในสาโท. (EFFECTS OF FERMENTATION TEMPERATURE ON ISOAMYALCOHOL AND ACETALDEHYDE IN SATO) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ชิตพงษ์ ประดิษฐ์สุวรรณ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.สุเมธ ต้นตระกูลเกียรติ, 81 หน้า.

สาโทเป็นสุราพื้นบ้านของไทยที่ได้จากการหมักข้าวเหนียวหุงสุกกับลูกแป้งสุรา ปัญหาหลักที่พบในการผลิตสาโทระดับอุตสาหกรรมคือความไม่สม่ำเสมอของคุณภาพระหว่างชุดผลิต อุณหภูมิหมักก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการพัฒนากระบวนการหมัก เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญต่อ จลศาสตร์การหมัก ในแง่ของระยะเวลาหมัก อัตราการหมัก และองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพสาโทที่ผลิตได้ งานวิจัยนี้ผลิตสาโทโดยใช้กล้าเชื้อลูกแป้ง สนใจศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิหมัก (หลังการผ่านน้ำ) โดยแปรผันอุณหภูมิหมัก 3 อุณหภูมิคือ 18 °C 30 °C และ 40 °C ตามลำดับ นำตัวอย่างสาโทที่ได้ระหว่างกระบวนการหมักเพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าปริมาณกรดโดยรวม น้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล ไฮเออร์แอลกอฮอล์ (ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์) และสารประกอบแอลดีไฮด์ (อะซิทัลดีไฮด์) ระหว่างอุณหภูมิหมัก 3 อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองพบว่าอุณหภูมิหมักที่ 40 °C ให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 5.51 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในวันที่ 16 ของการหมัก ในขณะที่อุณหภูมิหมักที่ 18 °C และ 30 °C ให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.64 และ 1.26 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าปริมาณเอทานอลสาโทมีระดับสูงสุดคือ 6.49 % ในวันที่ 12 ของการหมัก ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับสาโทที่ได้จากการหมักที่ 30 °C (5.86%) แต่สูงกว่าที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 18 °C (4.53%) ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 16) ที่อุณหภูมิหมัก 40 °C ระดับปริมาณของไอโซเอมิลแอลกอฮอล์จะสูงสุด (88.88 มิลลิกรัม/ลิตร) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับสาโทที่ได้จากการหมักที่ 30 °C (76.20 มิลลิกรัม/ลิตร) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสาโทที่ได้จากการหมักที่ 18 °C (43.96 มิลลิกรัม/ลิตร) ระดับอะซิทัลดีไฮด์ในสาโทที่ได้ในวันสุดท้ายของการหมักสูงสุดเมื่ออุณหภูมิหมัก 30 °C (147.58 มิลลิกรัม/ลิตร) นอกจากนี้ได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และ อะซิทัลดีไฮด์ ตลอดการหมัก 12 วัน พบว่าที่สภาวะหมัก 40 °C ให้ระดับของปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์สูงสุดตลอดช่วงการหมัก (41.93-56.96 มิลลิกรัม/ลิตร) และที่อุณหภูมิหมัก 18 °C ให้ระดับของปริมาณอะซิทัลดีไฮด์ต่ำสุดตลอดช่วงการหมักอยู่ที่ 32.96-75.44 มิลลิกรัม/ลิตร

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5372454823 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: FERMENTATION TEMPERATURE / CHEMICAL COMPOSITION / HIGHER ALCOHOL / ACETALDEHYDE

PONGSATORN POONPIPAT: EFFECTS OF FERMENTATION TEMPERATURE ON ISOAMYALCOHOL AND ACETALDEHYDE IN SATO. ADVISOR: ASST. PROF. DR.CHIDPHONG PRADISTSUWANA, CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. DR.SUMATE TANTRATIAN, 81 pp.

Sato is a traditional Thai alcoholic beverage product from fermentation of steamed glutinous rice mixed with Loogpang which is a starter culture. The main problem in commercial Sato production is the quality consistency between batches. In Sato brewery, fermentation temperature is one of the most important parameter for development of alcoholic fermentation since it affects kinetics of the process in term of duration, rate of fermentation and the final chemical composition of the wine. In this research, Sato was produced using the mixed culture starter. This study focused on the effect of fermentation temperature at 18 °C, 30 °C and 40 °C respectively. The Sato samples were taken during fermentation and determined for total acidity, reducing sugar, ethanol, higher alcohol (iso-amyl alcohol) and aldehyde compound. Among three different fermentation temperatures, the highest reducing sugar content (5.51 mg/ml) was found at 40 °C on day 16, while others fermentation temperatures at 18 °C and 30 °C gave the result of reducing sugar on day 16 (1.64 and 1.26 mg/ml, respectively). The highest ethanol level in SATO was 6.49 % on day 12 of fermentation, which was no significant difference ($P < 0.05$) from samples obtained at 30 °C (5.86%) but higher than those obtained at 18 °C (4.53%). On the final day of fermentation (day16), the highest of iso-amylalcohol level (88.88 mg/l) was obtained from fermentation temperature at 40 °C, which was no significant difference ($P < 0.05$) from those obtained at 30 °C (76.20 mg/l) but significant difference from samples obtained at 18 °C (43.96 mg/l). The acetaldehyde level at the final day of fermentation was highest (147.58 mg/l) when the fermentation was carried on at 30 °C. The investigations on changes of iso-amylalcohol and acetaldehyde during 12 days of Sato fermentation were done. It was found that fermentation at 40 °C has the highest level of iso-amylalcohol concentration (41.93-56.96 mg/l), and fermentation at 18 °C has the lowest level of acetaldehyde concentration (32.96-75.44 mg/l)

Field of Study: Biotechnology

Student's Signature

Academic Year: 2013

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชิตพงศ์ ประดิษฐสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษารองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเจียร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และ กรรมการผู้สอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ จากการวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ อ.ดร. ศรีนทิพ สุกใส อาจารย์สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือ แก๊สโครมาโทกราฟี และให้คำแนะนำในการใช้เครื่อง พีวาสนา มุสา นิสิตปริญญาเอก คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์

ขอขอบคุณบริษัทสาขาโทบางปลาม้า ตำบลสามชุก อำเภอสสามชุก จังหวัดสุพรรณบุรี ที่เอื้อเพื่อหัวเชื้อลูกแป้งสุราในการทดลองครั้งนี้

ขอขอบคุณครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และสนับสนุนในทุกๆด้านเสมอมา

ขอขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆ ที่คอยช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในทุกๆเรื่อง

หากมีสิ่งขาดตกบกพร่องประการใด ผู้เขียนขอภัยในความบกพร่องและความผิดพลาด ผู้เขียนหวังว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้คงเป็นประโยชน์ไม่มากนักน้อย สำหรับผู้ที่สนใจในงานวิจัยนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

หน้า

| | |
|---|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ..... | ช |
| สารบัญภาพ | ญ |
| สารบัญตาราง..... | ฎ |
| บทที่ 1 บทนำ | 14 |
| 1.1 ความสำคัญของปัญหา..... | 14 |
| 1.2 วัตถุประสงค์..... | 14 |
| บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร..... | 15 |
| 2.1 สาโท | 15 |
| 2.2 ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของสาโท | 16 |
| 2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโท | 16 |
| 2.3.1 ข้าว..... | 16 |
| 2.3.2 น้ำ | 18 |
| 2.3.3 ลูกแป้งสุรา | 19 |
| 2.4 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท | 21 |
| 2.4.1 รา..... | 21 |
| 2.4.2 ยีสต์..... | 22 |
| 2.4.3 แบคทีเรียที่เกี่ยวกับการผลิตสาโท..... | 23 |
| 2.4.3.1 แบคทีเรียกรดแลคติก..... | 23 |
| 2.4.3.2 แบคทีเรียกรดแอสिटิก..... | 23 |
| 2.5 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีที่สำคัญในการผลิตสาโท..... | 24 |
| 2.5.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยรา | 26 |
| 2.5.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยยีสต์ | 26 |
| 2.6 กระบวนการผลิตสาโท..... | 28 |
| 2.7 องค์ประกอบเคมีในสาโท..... | 29 |

| | |
|---|----|
| 2.8 สารประกอบให้กลิ่นรสในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ | 30 |
| 2.8.1 ไฮเออร์แอลกอฮอล์ หรือฟิวเซลอยล์..... | 31 |
| 2.8.2 สารประกอบเอสเทอร์..... | 35 |
| บทที่ 3 อุปกรณ์และขั้นตอนการทดลอง | 38 |
| 3.1 อุปกรณ์ | 38 |
| 3.1.1 วัสดุดิบ | 38 |
| 3.1.2 จุลินทรีย์..... | 38 |
| 3.1.3 เครื่องมือ | 38 |
| 3.1.4 สารเคมี..... | 38 |
| 3.1.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล | 39 |
| 3.2 ขั้นตอนการทดลองและวิธีดำเนินงานวิจัย | 39 |
| 3.2.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิหมักต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดโดยรวม และ แอลกอฮอล์ ระหว่างการหมักสาโท และ ต่อปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์และ สารประกอบ แอลดีไฮด์ในสาโทที่ได้ | 39 |
| 3.2.1.1 การหมักสาโท..... | 39 |
| 3.2.1.2 การเก็บตัวอย่าง | 40 |
| 3.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิหมักต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์และ สารประกอบแอลดีไฮด์ระหว่างกระบวนการหมักสาโท | 40 |
| 3.2.3 การติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์โดยวิธีหาน้ำหนักแห้ง (cell dry weight) ระหว่างการหมักสาโท | 41 |
| บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง | 42 |
| 4.1 ผลของอุณหภูมิหมักต่อองค์ประกอบทางเคมีของสาโทระหว่างกระบวนการหมัก | 42 |
| 4.1.1 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล ระหว่างการหมัก | 42 |
| 4.1.3 ผลการวิเคราะห์สารประกอบแอลดีไฮด์ และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ของสาโทที่หมักด้วย อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ณ วันสุดท้ายของการหมัก (วัน 16)..... | 46 |
| 4.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิหมักที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบแอลดีไฮด์ และไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ตลอดระยะเวลาหมักสาโท..... | 47 |
| 4.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ระหว่างกระบวนการหมักสาโท | 47 |
| 4.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อสารประกอบแอลดีไฮด์ระหว่างกระบวนการหมักสาโท | 48 |

| | |
|---|----|
| 4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเซลล์แห้งระหว่างการหมัก | 49 |
| บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ | 51 |
| รายการอ้างอิง | 52 |
| ภาคผนวก..... | 56 |
| ภาคผนวก ก วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไวน์ข้าว..... | 57 |
| ภาคผนวก ข วิเคราะห์ปริมาณ เอทานอล สารประกอบแอลดีไฮด์ และ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์... .. | 60 |
| ภาคผนวก ค วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักสาโทโดยวิธีการ อบแห้ง..... | 65 |
| ภาคผนวก ง ภาพอุปกรณ์การทำทดลอง..... | 66 |
| ภาคผนวก จ ตารางองค์ประกอบทางเคมีของข้าว และตาราง ANOVA..... | 68 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ | 81 |

สารบัญภาพ

หน้า

| | |
|--|----|
| ภาพที่ 2.1 แผนภูมิการผลิตลูกแป้งแบบภูมิปัญญาท้องถิ่น | 20 |
| ภาพที่ 2.2 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท | 22 |
| ภาพที่ 2.3 การเจริญของยีสต์ 2 ชนิด จากลูกแป้งจากผู้ผลิต 3 แห่ง ระหว่างการหมักสาโท..... | 22 |
| ภาพที่ 2.4 การย่อยแป้งด้วยแอมิโลไลติกเอนไซม์จากรา | 26 |
| ภาพที่ 2.5 ชีวเคมีของการเกิดเอทานอล..... | 26 |
| ภาพที่ 2.6 เมทาบอลิซึมของยีสต์ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ | 27 |
| ภาพที่ 2.7 กระบวนการผลิตไวน์ข้าวแบบเดิมจากภูมิปัญญาท้องถิ่น | 29 |
| ภาพที่ 2.8 การผลิตแอลกอฮอล์ ฟิวเซลอยด์ และเอทิลอะซิเตต ระหว่างกระบวนการหมัก | 32 |
| ภาพที่ 2.9 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดอะมิโนไปเป็นฟิวเซลแอลกอฮอล์ | 33 |
| ภาพที่ 2.10 ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ที่สังเคราะห์จากกรดอะมิโนลิซีนโดย Ehrlich pathway..... | 34 |
| ภาพที่ 2.11 ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ที่สังเคราะห์จากเซลยีสต์ | 35 |
| ภาพที่ 2.12 การเกิดเอสเทอร์ฟิเคชั่นระหว่างกรดและแอลกอฮอล์ โดยมีเอนไซม์เอสเทอร์เลส | 37 |
| ภาพที่ 2.13 การเกิดเอสเทอร์ฟิเคชั่นระหว่างการหมักโดยเอนไซม์แอลกอฮอล์อะซิetyltransferase และแอลกอฮอล์เอซิลtransferaseเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา | 37 |
| ภาพที่ 4.1 น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทที่อุณหภูมิ 18 °C, 30 °C และ 40 °C..... | 42 |
| ภาพที่ 4.2 ปริมาณเอทานอล (เปอร์เซ็นต์) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทที่อุณหภูมิ 18 °C, 30 °C และ 40 °C | 43 |
| ภาพที่ 4.3 ปริมาณกรด (เปอร์เซ็นต์) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทที่อุณหภูมิ 18°C, 30°C และ 40°C..... | 45 |
| ภาพที่ 4.4 ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (มิลลิกรัม/ลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทที่อุณหภูมิ 18 °C, 30 °C และ 40 °C..... | 48 |
| ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณอะซิetylไฮด (มิลลิกรัม/ลิตร) ในระหว่างการหมักสาโทที่อุณหภูมิ 18 °C, 30 °C และ 40 °C..... | 49 |
| ภาพที่ 4.6 น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ (กรัม/ลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทที่อุณหภูมิ 18 °C, 30 °C และ 40 °C..... | 50 |
| ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์..... | 58 |

ภาพที่ ข.1 โครมาโทแกรมของตัวอย่างสาโท แสดง retention time ของสารอะซีทัลดีไฮด์ และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (2.421, อะซีทัลดีไฮด์; 11.811, ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์)..... 61

ภาพที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มข้นของเอทานอล 62

ภาพที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มข้นของอะซีทัลดีไฮด์ 63

ภาพที่ ข.4 กราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มข้นของไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 64

ภาพที่ ง.1 น้ำหมักสาโทที่หมักด้วยอุณหภูมิต่างๆ ที่ผ่านการแยกกากข้าวเหนียวออกแล้ว.....66

ภาพที่ ง.2 ข้าวเหนียวหมักกับลูกแป้งสุราหลังการผ่านน้ำ 67

ภาพที่ ง.3 ตัวอย่างสาโทที่บรรจุลงขวด vial ที่ปิดสนิทด้วย crimber seals เพื่อรอวิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโทกราฟี..... 67

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 แบบคที่เรียกรดแลคติก และแบบคที่เรียกรดแอซิดิก ที่พบในสาโท 24

ตารางที่ 2.2 ชนิดและปริมาณสารประกอบสำคัญที่พบในไวน์ 25

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบและปริมาณของสารประกอบเอสเทอร์และฟิวเซลอยล์ที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แต่ละชนิด..... 31

ตารางที่ 2.4 กรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นในการสร้างฟิวเซลอยล์ชนิดต่างๆ..... 34

ตารางที่ 4.1 ผลของอุณหภูมิหมักต่อปริมาณ สารประกอบแอลดีไฮด์ และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในสาโท ณ วันสุดท้ายของ การหมัก..... 46

ตารางที่ ข.1 ความเข้มข้นของเอทานอล (เปอร์เซ็นต์) และพื้นที่ใต้กราฟเอทานอล..... 62

ตารางที่ ข.2 ความเข้มข้นของอะซีทัลดีไฮด์ (มิลลิกรัม/ลิตร) ความเข้มข้นของไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ พื้นที่ใต้กราฟของอะซีทัลดีไฮด์ และพื้นที่ใต้กราฟไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 63

ตารางที่ จ.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทด้วยอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ..... 69

ตารางที่ จ.2 ปริมาณเอทานอล (เปอร์เซ็นต์) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทด้วยอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ..... 70

ตารางที่ จ.3 ปริมาณกรดโดยรวม (เปอร์เซ็นต์) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทด้วยอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ..... 71

ตารางที่ จ.4 ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (มก./ลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทด้วยอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ..... 72

ตารางที่ จ.5 ปริมาณอะซีทัลดีไฮด์ (มก./ลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทด้วยอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ..... 73

ตารางที่ จ.6 น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทด้วยอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ..... 74

ตารางที่ จ.7 ตาราง ANOVA ปริมาณเอทานอลในสาโทที่หมักด้วยอุณหภูมิ 18, 30 และ 40 องศาเซลเซียส..... 75

ตารางที่ จ.8 ตาราง ANOVA ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และอะซีทัลดีไฮด์ในสาโทที่หมักด้วยอุณหภูมิ 18, 30 และ 40 องศาเซลเซียส ณ วันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 16)..... 76

ตารางที่ จ.9 ตาราง ANOVA ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในสาโทที่หมักด้วยอุณหภูมิ 18, 30 และ 40 องศาเซลเซียส (วันที่ 3-12 ของการหมัก)..... 77

ตารางที่ จ.10 ตาราง ANOVA ปริมาณอะซิทัลดีไฮด์ในสาโทที่หมักด้วยอุณหภูมิ 18, 30 และ 40 องศาเซลเซียส (วันที่ 3-12 ของการหมัก)..... 78

ตารางที่ จ.11 ค่าทางสถิติของปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (มก./ลิตร) ระหว่างการหมักสาโทด้วย อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ..... 79

ตารางที่ จ.12 ค่าทางสถิติของปริมาณอะซิทัลดีไฮด์ (มก./ลิตร) ระหว่างการหมักสาโทด้วยอุณหภูมิ แตกต่างกัน 3 ระดับ..... 80



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

สาโทจัดเป็นสุราแช่ ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านของไทย ผลิตจากข้าวเหนียวหนึ่ง นำมาคั่วกับเปลือกข้าวเปลือกแห้ง จัดเป็นสุราแช่ที่ไม่ผ่านการกลั่นและมีแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (จรรยา เดชกฤษกร และดวงฤทัย อารังโชติ, 2546) การหมักสาโทใช้วิธีดั้งเดิมที่ถ่ายทอดสืบต่อกันมา จึงทำให้สาโทในแต่ละท้องถิ่นมีลักษณะกลิ่นและรสชาติที่เฉพาะ แต่ในปัจจุบันได้มีการผลิตสาโทที่มีกลิ่นรสหลากหลายมากขึ้นเช่น สาโทเสาวรส สาโทมะตูม สาโทลูกเดือย ซึ่งเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เนื่องจากสาโทมีความต้องการในท้องตลาดมากขึ้นทำให้ชาวบ้านมีการเปลี่ยนวิธีการหมักบ่มและเก็บรักษา ในอดีตสาโทเป็นไวน์ข้าวพื้นบ้านที่หมักในไหทำให้มีการถ่ายเทความร้อนได้ดี ลดการเจริญของแบคทีเรียกรดน้ำส้ม สาโทที่ผลิตได้จึงเก็บไว้ได้นานแต่ในปัจจุบันชาวบ้านนิยมหมักสาโทในถังพลาสติกกันมากขึ้นเนื่องจากสะดวก และขนย้ายได้ง่าย การหมักสาโทในถังพลาสติกอาจทำให้เกิดความร้อนสะสมระหว่างการหมักเนื่องจากคุณสมบัติในการระบายความร้อนของพลาสติกนั้นไม่ดีเท่าที่หมักในไหเซรามิก อุณหภูมิในการหมักจึงสูงขึ้น ทำให้สาโทอาจเกิดการเน่าเสียหรือมีความแรงแอลกอฮอล์ กลิ่นรสที่เปลี่ยนแปลงไป

1.2 วัตถุประสงค์

ทราบอิทธิพลของอุณหภูมิหมัก ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีในสาโท ซึ่งได้แก่ น้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดโดยรวม เอทานอล รวมไปถึง อะซิทัลดีไฮด์ และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาด้านกลิ่นรสและเลือกอุณหภูมิหมักที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตสาโทต่อไป

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

2.1 สาโท

สาโท เป็นเครื่องดื่มประเภทสุราแช่เนื่องจากไม่ได้ผ่านการกลั่นและมีความแรงแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรี สาโททำมาจากข้าวเหนียว มีอยู่ในภาคเหนือ อีสาน และภาคกลาง โดยนำข้าวเหนียวหนึ่งมาคลูกกับลูกแป้งสุราซึ่งมีส่วนผสมของ รา ยีสต์ และแบคทีเรีย หลังหมักได้ 3 วันจะได้น้ำต้อย (จริยา เดชกุญชร และดวงฤทัย อารังโชติ, 2546) การหมักสาโทมักนิยมหมักในโอ่งหรือภาชนะดิน ซึ่งในแต่ละท้องถิ่นจะมีกรรมวิธีผลิตที่แตกต่างกันออกไป

ในทวีปเอเชียได้มีการผลิตไวน์ข้าวมาเป็นระยะเวลาช้านาน โดยในแต่ละแหล่งจะมีกระบวนการผลิตหัวเชื้อที่แตกต่างกันออกไปทั้งในเรื่องของ วัตถุดิบ ส่วนผสม และ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต โดยในแต่ละท้องถิ่นที่มีชื่อเรียกหัวเชื้อไวน์ข้าวที่แตกต่างกัน เช่น ญี่ปุ่นเรียกว่าโคจิ (Koji) จีนเรียกว่าชู (Chou) เกาหลีเรียกว่านุรุก (Nuruk) อินโดนีเซียเรียกว่ารากิ (Ragi) (Haruta *et al.*, 2006) และไทยเรียกว่าลูกแป้งสุรา (Loogpang) เป็นต้น

Yoshizawa (1985) ได้แบ่งไวน์ข้าวตามลักษณะความใสออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1. Alcoholic beverage เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีลักษณะใส ได้แก่ สาเก (Sake) และ เซาซิงจู้ย (Shao Shin Chu)
2. Miscellaneous alcohol drinks เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีลักษณะขุ่น อันเนื่องมาจากของแข็งและจุลินทรีย์ที่ยังตกค้างอยู่ เนื่องจากไม่ได้ผ่านการกลั่น หรือกระบวนการทำให้ใส ได้แก่ ทาเป (Tapay) ทาไป (Tapuy) และสาโท (Sato)

ในประเทศไทยลูกแป้งสุราในแต่ละท้องถิ่นจะมีเอกลักษณ์ที่แตกต่างกันออกไปทั้งในเรื่องของอัตราส่วนผสม และองค์ประกอบภายใน เช่น ชนิดของสมุนไพรที่นำมาเป็นองค์ประกอบตามวัตถุประสงค์และสรรพคุณของสมุนไพรเป็นต้น ในแต่ละท้องถิ่นจะมีสูตรลับเฉพาะในการผสมซึ่งถ่ายทอดกันภายในเท่านั้น สมุนไพรที่ใช้เป็นองค์ประกอบในการทำหัวเชื้อหลักๆได้แก่ กระเทียม ดีปลี ข่า พริกแดง เป็นต้น ในการผสมลูกแป้งนั้นจะนำสมุนไพรต่างๆมาบดรวมกับแป้งข้าวเหนียวและมีการนำลูกแป้งสุราเก่าที่มียีสต์และรามาบดรวมด้วย (นภา โล่ห์ทอง, 2535)

สาโท หรือไวน์ข้าวพื้นบ้านในประเทศไทยมีกระบวนการผลิตคือ นำข้าวเหนียวหรือข้าวเจ้ามาคลูกเคล้ากับหัวเชื้อที่เรียกว่า ลูกแป้งสุรา ที่มีองค์ประกอบของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ รา ยีสต์ และแบคทีเรีย (นภา โล่ห์ทอง, 2535) เพื่อให้เกิดการหมัก โดยในการผลิตนิยมหมักด้วยลูกแป้งประมาณ 3-4 วัน จากนั้นเติมน้ำลงไป (ขั้นตอนการผ่านน้ำ) หมักต่ออีก 7-14 วัน ก็จะได้สาโท ในอดีตสาโทยังไม่เป็นที่แพร่หลาย แต่ในปี พ.ศ. 2543 รัฐบาลได้เปิดเสรีเกี่ยวกับการผลิตและจัดจำหน่ายสุรา การผลิตสาโทจึงเริ่มแพร่หลายมากขึ้นทั้งในระดับครัวเรือน และระดับอุตสาหกรรม แต่ปัญหาที่พบคือ

สาโทที่ได้มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอระหว่างชุดผลิต ในการผลิตสุราแช่พื้นบ้านนั้นมักนิยมผลิตในโรง หรือ ไหดินเผา สาโทเป็นสุราแช่ที่ไม่ผ่านการกลั่น นิยมผลิตตามครัวเรือนบริเวณภาคเหนือ และภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ กลิ่นรสของสาโทจะมีเอกลักษณ์แตกต่างกันตามชนิดของข้าวที่ใช้ในการผลิต เช่น หากใช้ข้าวเหนียวดำ จะมีกลิ่นหอม รสดี หรือหากใช้ข้าวเหนียวจะได้รสชาติที่ดีกว่าการใช้ข้าว เจ้า เป็นต้น (สุพัฒน์ กุมพิทักษ์ และกำพล กาหลง, 2545)

การผลิตสาโทกลั่นและรสชาติถือเป็นสิ่งที่บอกถึงคุณภาพของสาโทที่ผลิตได้ พูเชล แอลกอฮอล์จัดเป็นองค์ประกอบสำคัญด้านกลิ่นของสาโท นอกจากนี้พูเชลแอลกอฮอล์ยังเป็นสารตั้ง ต้นในการผลิตสารให้กลิ่นที่สำคัญคือ เอสเทอร์ ในสาขาของประเทศญี่ปุ่นมีการศึกษาอย่างมาก เกี่ยวกับอิทธิพลของปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อปริมาณสารให้กลิ่นในสาเก ปริมาณของสารให้กลิ่นเหล่านี้ จะมากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณกรดอะมิโน สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ และอุณหภูมิที่หมัก เมื่อหมักไว้นานข้าว ด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกันพบว่า ปริมาณของสารให้กลิ่นต่างๆจะเปลี่ยนแปลงไปด้วยดังนั้นอุณหภูมิที่ ใช้หมักจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อกระบวนการผลิต (Ueda *et al.*, 1991)

2.2 ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของสาโท

1. ภาวะในกระบวนการหมัก เช่น อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก มีส่วนสำคัญต่อคุณภาพของสาโท ที่ผลิตได้ เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อ การเจริญของยีสต์ การเจริญของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ต่างๆระหว่างกระบวนการหมัก อีกด้วย
2. การเก็บรักษาหลังการหมัก หากเก็บสาโทที่ผลิตได้ในภาชนะที่ไม่เหมาะสมหรือมีการ ปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อันไม่พึงประสงค์ อาจทำให้สาโทที่ได้มีกลิ่นรสที่เปลี่ยนไป
3. วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโท วัตถุดิบที่ใช้ผลิตหลักๆได้แก่ ข้าว น้ำ และลูกแป้งสุรา ซึ่ง วัตถุดิบแต่ละอย่างมีความสำคัญมากกับคุณภาพของสาโทที่ผลิตได้ซึ่งจะกล่าวรายละเอียด ต่อไปในหัวข้อ 2.3

2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโท

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโทเป็นปัจจัยหนึ่งส่งผลต่อคุณภาพของสาโทที่ผลิตได้

2.3.1 ข้าว

เป็นวัตถุดิบหลักที่ใช้ในการผลิตสาโท มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Oryza sativa* ในประเทศไทยมีการปลูกข้าวในกลุ่มประเภท Indica โดยแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ ข้าวเจ้า (Rice หรือ Ordinary rice) และข้าวเหนียว (Gelatinous rice หรือ Sticky rice) เมล็ดเรียวยาว องค์ประกอบของข้าว ประกอบด้วยส่วนที่เป็นแป้ง (Starch) และส่วนที่ไม่ใช่แป้ง (Non-starch constituents) ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เกลือแร่ และวิตามินต่างๆ

ส่วนที่เป็นแป้งที่พบมากที่สุดจะอยู่ในรูปของเม็ดแป้ง (Starch granule) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาล และน้ำตาลจะเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ในกระบวนการหมัก แป้งจัดเป็นคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่มีสูตรทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ มีค่า n ไม่ต่ำกว่า 1000 แป้งส่วนใหญ่เป็นสาร Heterogenous ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของกลูโคส ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ แอมีโลส (Amylose) และแอมีโลแพคติน (Amylopectin) เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งมีโครงสร้างเคมีต่างกัันดังนี้

แอมีโลส เป็นโพลิเมอร์สายตรงสายตรงประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 70 - 2100 หน่วยต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ α -1, 4 glycosidic linkage ในแป้งทั่วไปพบพันธะนี้เกือบทั้งหมด

แอมีโลแพคติน เป็นโพลิเมอร์ที่มีการแตกแขนง ส่วนที่เป็นแขนงต่อกันด้วยพันธะ α -1, 6 glycosidic linkage ส่วนหน่วยอื่นๆจะต่อกันด้วยพันธะ α -1, 4 glycosidic linkage

ในข้าวมีคาร์โบไฮเดรตอยู่ถึงร้อยละ 70-80 โดยอยู่ในส่วนของแป้งทั้งหมด ในข้าวแต่ละชนิดจะมีอัตราส่วนของแอมีโลส และแอมีโลแพคตินแตกต่างกัน โดยในข้าวเหนียวจะประกอบไปด้วยแอมีโลแพคตินกว่า 95% และมีแอมีโลสน้อยมาก ส่วนข้าวเจ้าจะมีแอมีโลสอยู่ประมาณ 7 - 35% โดยปริมาณแอมีโลสนั้นส่งผลต่อการแทงเส้นใยของราเข้าสู่เมล็ดข้าว โดยข้าวที่มีแอมีโลสต่ำเมื่อนึ่งเสร็จแล้วข้าวจะอ่อนนุ่มทำให้เชื้อราแทงเส้นใยเข้าไปได้ง่ายและเจริญได้ดี ส่งผลให้กลิ่นและรสชาติของสาโทที่ผลิตจากข้าวต่างสายพันธุ์กันมีความแตกต่างกัน (สุภมาส ไขคำ, 2544)

โปรตีน (Protein) ข้าวมีองค์ประกอบเป็นโปรตีนเฉลี่ยประมาณร้อยละ 6.5 - 12 โดยน้ำหนักแห้ง โปรตีนในข้าวจะรวมอยู่เป็นกลุ่มและแทรกอยู่ระหว่างเมล็ดข้าว (Juliano, 1972) โปรตีนในข้าวจะถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์ โดยเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อราในลูกแป้ง และกรดอะมิโนบางส่วนจะถูกยีสต์นำไปใช้ในการสังเคราะห์ไฮเออร์แอลกอฮอล์ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นที่สำคัญ ไฮเออร์แอลกอฮอล์แต่ละชนิดจะสังเคราะห์จากกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ทำให้สาโทมีรสชาติเฉพาะ แต่หากในข้าวมีปริมาณโปรตีนมากไปจะทำให้สาโทเสื่อมเสียคุณภาพและจะทำให้กลิ่นรสที่ได้เปลี่ยนไป กรดอะมิโนจะถูกเปลี่ยนเป็นฟลูเชลลอลอยล์โดยยีสต์ เช่น ลิวซีน (Leucine) ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) และวาเลีน (Valine) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็น ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Isoamyl alcohol) 2-ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ (2-Phenylethyl alcohol) และไอโซบิวทานอล (Isobutanol) ตามลำดับ ซึ่งฟลูเชลลอลอยล์ หรือไฮเออร์แอลกอฮอล์แต่ละชนิดจะส่งผลให้สาโทที่ได้มีกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะแตกต่างกัน (Rose, 1977)

ไขมัน (Lipid) ปกติของเมล็ดข้าวจะมีคาร์โบไฮเดรตเป็นแกนกลางและมีโปรตีนและไขมันล้อมรอบ ไขมันอยู่ในส่วนของจมูกข้าวมีอยู่ร้อยละ 0 - 2 การออกซิเดชันของไขมันจะส่งผลให้เกิดการเหม็นหืนในสาเก (Yoshioka and Hashimoto, 1983) การขัดสีข้าวจะทำให้ไขมันลดลง ดังนั้นการขัดสีข้าวจึงมีส่วนสำคัญต่อกลิ่นและรสชาติของสาโทที่ได้ ข้าวที่มีการขัดสีชั้นของไขมันออกไปจะให้กลิ่นและรสที่ดีกว่า (Yoshioka and Hashimoto, 1983)

นอกจากนี้ในข้าวยังมีสารที่มีสมบัติเป็นแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant) ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและลดคลอโรเฟลลอรอล ในเส้นเลือด ข้าวยังเป็นแหล่งของเส้นใยอาหาร เกลือแร่และวิตามินต่างๆ ซึ่งในข้าวแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบแตกต่างกัน

สาโทที่ผลิตจากข้าวต่างสายพันธุ์จะให้กลิ่นรสที่แตกต่างกันออกไป นุขรี อ่อนพร้อม (2547) ได้ทำการศึกษาการหมักสาโทจากข้าวเหนียวดำ ข้าวหอมนิล และข้าวเหนียวขาวแล้วนำน้ำหมักมาวิเคราะห์สารให้กลิ่นด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมตรี พบว่ารูปแบบของสารให้กลิ่นของสาโททั้งสามชุดการทดลองนั้นมีความแตกต่างกัน ซึ่งสารระเหยส่วนใหญ่ที่ให้กลิ่นที่ดี สารระเหยเหล่านี้ได้แก่ เอทิลโพรพิโนเนต เอทิลบิวทิเรต และ โทลูอิน ซึ่งให้กลิ่นคล้ายผลไม้ สารเหล่านี้พบในน้ำหมักสาโทจากข้าวเหนียวดำและข้าวหอมนิล แต่ไม่พบในข้าวเหนียวขาว นอกจากนี้การทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าผู้ทดสอบส่วนใหญ่พึงพอใจกับสาโทที่ผลิตจากข้าวเหนียวดำมากกว่าข้าวเหนียวขาว คณะผู้วิจัยได้รายงานไว้ว่า กลิ่นและรสของสาโทที่ได้แตกต่างกันนั้นนอกจากเกิดจากการหมักสาโทจากข้าวที่ต่างสายพันธุ์กันแล้ว ยังเกิดจากความสามารถในการย่อยองค์ประกอบแป้งของจุลินทรีย์ในลูกแป้งสุราอีกด้วย

พรพิมล ควรรณสุ (2548) ศึกษาผลของพันธุ์และระดับการขัดสีข้าวต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีระหว่างการหมักไวน์ข้าว โดยเปรียบเทียบการหมักสาโทระหว่างข้าวสามสายพันธุ์ได้แก่ ข้าวพันธุ์ลอย กข 6 และ ขาวดอกมะลิ 105 และเปรียบเทียบระดับการขัดสีข้าวสามระดับคือ ระดับการขัดสีข้าวที่ 0 หรือไม่ผ่านการขัดสี ระดับการขัดสีที่ 1 (อัตราการขัดสีระหว่าง 86 - 84%) และระดับการขัดสีที่ 2 (อัตราการขัดสีระหว่าง 82 - 80%) และจุลินทรีย์ที่ใช้ได้แก่ *Amylomyces rouxii* TISTR 3128 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049 และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆระหว่างการหมัก ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Total soluble solid) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ความเป็นกรด - เบส (pH) ปริมาณกรด (Total acidity) ปริมาณแอลกอฮอล์ สารประกอบเอสเทอร์ และฟูเซลอยด์ และประมาณการทดสอบทางประสาทสัมผัสและการยอมรับ ผลการทดลองพบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่าของแข็งที่ละลายได้จะลดลงตามระยะเวลาหมัก ส่วนปริมาณแอลกอฮอล์จะสูงขึ้นตามระยะเวลาหมัก ระดับการขัดสีข้าวที่ 0 (ไม่ผ่านการขัดสี) ให้อัตราการผลิตแอลกอฮอล์สูงกว่าที่ระดับการขัดสีที่มากขึ้น ส่วนปริมาณเอสเทอร์และฟูเซลอยด์พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับการขัดสีข้าว

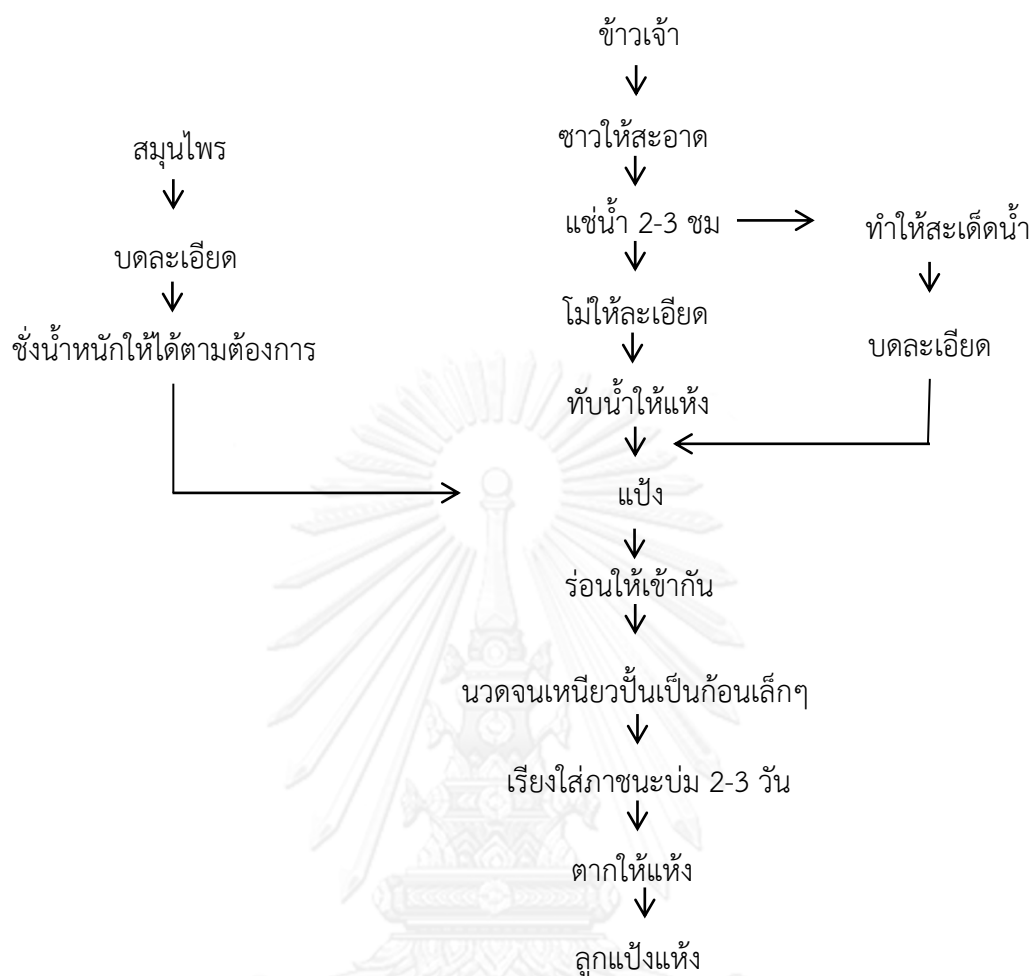
2.3.2 น้ำ

น้ำถือเป็นวัตถุดิบหนึ่งที่มีความสำคัญต่อคุณภาพสาโทที่ได้ ถือเป็นองค์ประกอบหลักในสาโท การผลิตสาโทจึงต้องคำนึงถึงคุณภาพน้ำเป็นพิเศษ น้ำที่นำมาผลิตควรมีมาตรฐานใกล้เคียงกับน้ำที่ใช้ดื่มคือ ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่มีรสชาติ สะอาด และปราศจากเชื้อก่อโรค ไม่มีสนิมเหล็ก และไม่มีคลอรีน เพราะคลอรีนอาจจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ได้ เช่น ยีสต์ ทำให้การหมักอาจเกิดช้าลง นอกจากนี้หากมีคลอรีนในน้ำที่ใช้ผลิต อาจทำให้สาโทที่ได้มีกลิ่นและรสชาติที่ผิดไปจากเดิม (กฤษณวลี ไกรธรรมจิตกุล, 2547)

2.3.3 ลูกแป้งสุรา

ลูกแป้งสุราเป็นกล้าเชื้อผสม (Mixed culture) ที่มีส่วนประกอบของจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนแป้งในข้าวให้กลายเป็นน้ำตาลหรือแอลกอฮอล์ (กฤษฎา ขุนแหลม, 2542) ในการผลิตลูกแป้งในแต่ละท้องถิ่นนั้นจะมีความแตกต่างกันออกไป จัดเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือน โดยมีกรรมวิธีในการผลิตที่คล้ายคลึงกันคือ ผลิตโดยนำแป้งข้าวเจ้า ลูกแป้งเก่า และสมุนไพรต่างๆมาร่อนให้เข้ากันแล้วปั้นเป็นลูกแป้ง (ภาพที่ 2.1) แต่จะแตกต่างกันเพียงองค์ประกอบและวัตถุดิบ เช่น ขนาด รูปร่าง ตลอดจนสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบ (มนตรี เชาวร์สังเกต, 2521) องค์ประกอบหลักในการผลิตลูกแป้งคือ ปลายข้าว อาจเป็นข้าวเหนียวหรือข้าวเจ้า นำมาคลุกเคล้ากับเครื่องเทศและสมุนไพรต่างๆ ทั้งข้าวและเครื่องเทศมีผลต่อคุณภาพของลูกแป้งที่ผลิตได้ (พรพิมล ควรรณสุ, 2548)

ลักษณะที่ดีทั่วไปของลูกแป้งคือ มีน้ำหนักเบา โปร่ง สีขาวนวล มีรูพรุน ซึ่งเกิดจากการฟูของแป้งขณะบ่ม ไม่มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว เมื่อขยี้จะละเอียดเป็นผง ลูกแป้งที่ผลิตได้ในแต่ละที่จะมีประสิทธิภาพในการหมักที่แตกต่างกัน (นภา โล่ห์ทอง, 2535) โดยลูกแป้งที่นำมาผลิตสาโทนั้นเป็นลูกแป้งสุรา



ภาพที่ 2.1 แผนภูมิการผลิตลูกแป้งแบบภูมิปัญญาท้องถิ่น (นภา โสฬ์ทอง, 2535)

จุลินทรีย์ในลูกแป้งมีทั้งเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547) ซึ่งเชื้อราจะมีหน้าที่ผลิตเอนไซม์เปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล ในกลุ่ม แอมิโลส และกลูโคแอมิโลส ส่วนยีสต์จะผลิตเอนไซม์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก และกลุ่มแบคทีเรียปนเปื้อนที่ไม่ต้องการในกระบวนการหมัก ได้แก่ แบคทีเรียกรดน้ำส้มที่ผลิต กรดน้ำส้มสายชูทำให้เกิดรสเปรี้ยวและการเสื่อมเสียในสาโท ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่พบในลูกแป้งมีดังนี้

เชื้อราที่ตรวจพบได้ในลูกแป้ง จากทุกแหล่งที่มีการศึกษาในงานวิจัย ได้แก่ *Mucor hiemalis*, *M. racemosus*, *M. Indicus*, *Rhizopus oligosporus* และ *R. oryzae* (อภิขญา เตชะสวัสดิ์, 2550) ส่วนในกลุ่มของ *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus spp.* ปริมาณเชื้อที่พบมากน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดลูกแป้ง

ยีสต์ที่มักพบในลูกแป้งสุราคือ *Saccharomyces cerevisiae* ในปริมาณมากกว่า *Endomycopsis* spp. นอกจากนี้ในลูกแป้งในแต่ละแหล่งผลิตยังพบยีสต์ที่แตกต่างกันออกไป ได้แก่ *Candida* spp. และ *Torulopsis* spp. ส่วน อภิขญา เตชะวณิชย์ (2550) ตรวจพบ *Saccharomycopsis fibuligera*, *Pichia anomala*, *Issatchenkia orientalis*, *Tolulasporea delbrueckii* และ *Candida glabrata* ในลูกแป้งจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย

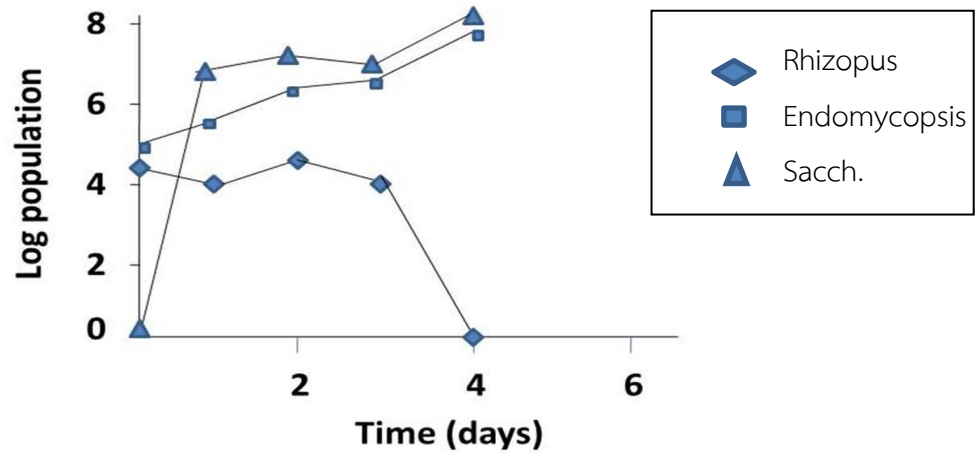
ในกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกที่ตรวจพบส่วนใหญ่ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* และ อาจพบ *Lactobacillus* spp. (นภา โล่ห์ทอง, 2535)

ขั้นตอนในการผลิตสาโทนั้นถือเป็นภูมิปัญญาชาวบ้าน ในทุกขั้นตอนการผลิตมีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่จำเป็นต่อการหมัก ตั้งแต่ลูกแป้ง ข้าวเหนียว ภาชนะที่ใช้ในการหมัก การคลุกเคล้า การเก็บรักษาหลังการหมัก ตลอดจนไม่มีกระบวนการควบคุมการผลิต ไม่มีสูตรและกระบวนการผลิตที่แน่นอน อุณหภูมิหมักไม่คงที่ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพของสาโทที่ผลิตได้ เมื่อเปรียบเทียบกับสาเก ซึ่งเป็นเครื่องดื่มประจำชาติญี่ปุ่น ซึ่งมีกระบวนการผลิตที่เป็นมาตรฐาน โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วของยีสต์และราในการผลิต โดยจะใช้รา *Aspergillus oryzae* ในการเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นน้ำตาล และน้ำตาลจะถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์ *Saccharomyces sake* ข้อดีของการเลือกใช้เชื้อบริสุทธิ์คือ ลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้ยังใช้อุณหภูมิหมักที่ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาหมัก ทำให้คุณภาพสาโทที่ได้ค่อนข้างคงที่ (อภิขญา เตชะวณิชย์, 2550)

2.4 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท

2.4.1 รา

ในกระบวนการหมักราจะสามารถเจริญได้ดีใน 2 - 3 วันแรกของการหมัก แต่เมื่อหมักจนเกิดน้ำเชื่อมข้าว (น้ำต้อย) ขึ้นและมีการผ่านน้ำ ยีสต์จะเข้ามามีบทบาททำให้การเปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นแอลกอฮอล์ในสภาพไร้อากาศ และยีสต์จะปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ทำให้ราตายไป (เจริญ เจริญชัย และคณะ, 2546) ภาพที่ 2.2 แสดงการเจริญของยีสต์ และราระหว่างการหมักสาโท

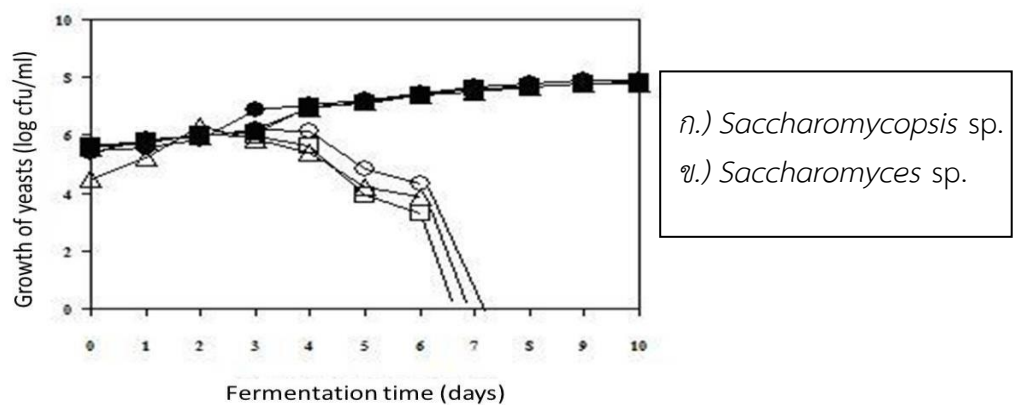


ภาพที่ 2.2 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท

ที่มา: เจริญ เจริญชัย และคณะ, 2546

2.4.2 ยีสต์

ในช่วงแรกของการหมัก ในลูกแป้งจะสามารถพบยีสต์ชนิด *Saccharomycopsis* sp. ได้เพียงปริมาณเล็กน้อยเท่านั้นอาจน้อยจนไม่สามารถตรวจพบในลูกแป้งสุราได้ เมื่อระยะเวลาผ่านไปยีสต์ชนิดนี้จะเจริญอย่างรวดเร็วและเพิ่มจำนวนขึ้น และยีสต์นี้จะเจริญระยะเวลาหนึ่งเท่านั้นและตายไปและจะมียีสต์ *Saccharomyces* sp. ทำหน้าที่ในการหมักแทน เนื่องจากยีสต์ *Saccharomyces* sp. มีความสามารถทนแอลกอฮอล์ได้สูงกว่า ดังกราฟในภาพที่ 2.3 (เจริญ เจริญชัย และคณะ, 2546)



ภาพที่ 2.3 การเจริญของยีสต์ 2 ชนิด จากลูกแป้งจากผู้ผลิต 3 แห่ง ระหว่างการหมักสาโท

ที่มา: เจริญ เจริญชัย และคณะ, 2546

ในช่วงแรกของการหมักจะผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลเกือบทั้งหมด แต่ยังมีแป้งบางส่วนที่คงเหลือในระบบเนื่องจากเอนไซม์จากราไม่สามารถย่อยได้ทั้งหมด และราอาจตายไปหลังจากการหมักเพียง 3 วัน จึงต้องอาศัยเอนไซม์จากยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. เข้ามาช่วยเปลี่ยนแป้งที่เหลือให้กลายเป็นน้ำตาลเพื่อที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์ต่อไป โดยช่วงอุณหภูมิที่ *Saccharomycopsis fibuligera* มีกิจกรรมสูงสุด (Maximal activity) อยู่ในช่วง 40-50 °C (Gašperik, Kováč and Mináriková, 1991) โดยอะไมเลสที่ผลิตจาก *S. fibuligera* จะสามารถเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็น ทรีฮาโลส กลูโคส มอลโตส และ เด็กซ์ตริน ซึ่งทรีฮาโลสเป็นสารประกอบที่ประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุลต่อกัน จัดเป็นสารประกอบ Highly efficient protectant ช่วยเพิ่มความสามารถในการต่อต้านสิ่งแวดล้อมที่เป็น against condition (อุณหภูมิสูง, ความเข้มข้นแอลกอฮอล์สูง) ให้กับเซลล์ยีสต์อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า *S. fibuligera* สามารถสร้างแอลฟา-แอมิเลสนอกเซลล์ได้และเปลี่ยนแป้งจำนวนมากให้กลายเป็นกลูโคส ในขณะที่ *Saccharomyces cerevisiae* ไม่สามารถทำได้ (Chi et al, 2009)

2.4.3 แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสาโท

2.4.3.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกถือเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทมากต่อการผลิตสาโท เนื่องจากมีบทบาท 2 ประการคือ มีส่วนช่วยให้เกิดกลิ่นรสที่เฉพาะของสาโท และ มีส่วนทำให้สาโทเกิดการเสื่อมเสีย

2.4.3.2 แบคทีเรียกรดแอซิดิก

แบคทีเรียกรดแอซิดิก หรือที่เรียกว่า แบคทีเรียกรดน้ำส้ม จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง และมีความสามารถในการออกซิไดซ์เอทานอลให้กลายเป็นกรดแอซิดิก (กรดน้ำส้มสายชู) แบ่งออกเป็น 2 genera คือ *Acetobacter* sp. และ *Gluconobacter* sp. ซึ่งกรดน้ำส้มสายชูที่สร้างจะส่งผลให้เกิดการเสื่อมเสียของสาโท อีกทั้งยังมีผลต่อค่าความเป็นกรดในระบบ อันมีผลต่อการเจริญของยีสต์ในแต่ละสายพันธุ์ซึ่งมีช่วงการเจริญสูงสุดในแต่ละช่วงพีเอชแตกต่างกัน ชนิดของแบคทีเรียกรดแอซิดิก และแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถพบได้ในสาโทนั้น แสดงในตารางที่ 2.1 (นภา โล่ห์ทอง, 2535)

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก และแบคทีเรียกรดแอซิติก ที่พบในสาโท

| ชนิดของแบคทีเรีย | สปีชีส์ |
|---------------------|---|
| แบคทีเรียกรดแลคติก | <i>Leuconostoc onenos</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>P. parvulus</i> , <i>P. damnosus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. trichodes</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. fructivorans</i> |
| แบคทีเรียกรดแอซิติก | <i>Gluconobacter oxydans</i> , <i>Acetobacter aceti</i> , <i>A. pasteurianus</i> |

ที่มา: นภา โล่ห์ทอง, 2535

2.5 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีที่สำคัญในการผลิตสาโท (ไพบูลย์ ด้านวิรุฑัย และพัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2548)

ในกระบวนการผลิตสาโทนั้น กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีระหว่างกระบวนการหมักถือว่ามีผลสำคัญอย่างมากต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ได้ เนื่องจากทั้งวัตถุดิบที่ใช้รวมถึงกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีจะส่งผลต่อ สี กลิ่น รสและเนื้อสัมผัส ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์นั้นๆ นอกจากนี้กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีระหว่างกระบวนการหมักยังส่งผลต่อชนิดและปริมาณของสารประกอบสำคัญต่างๆในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์อีกด้วย ตารางที่ 2.2 แสดงชนิดและปริมาณสารประกอบสำคัญที่พบในไวน์

ปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยรายงานเกี่ยวกับปริมาณสารประกอบให้กลิ่นและรสชาติในสาโทมากนัก แต่ได้พบรายงานดังกล่าวเป็นจำนวนมากในไวน์ และสาเกของประเทศญี่ปุ่น ซึ่งองค์ประกอบให้กลิ่นรสเหล่านี้จะมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นกับทั้งวัตถุดิบที่ใช้ผลิต สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ หัวเชื้อกระบวนการผลิต รวมไปถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักด้วย

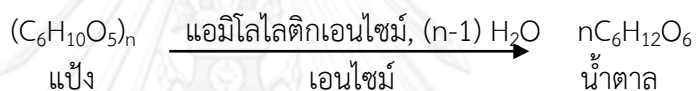
ตารางที่ 2.2 ชนิดและปริมาณสารประกอบสำคัญที่พบในไวน์

| สารประกอบ | ความเข้มข้น |
|----------------------|-----------------------|
| แอลกอฮอล์ | |
| เอทานอล | 80-130 กรัม/ลิตร |
| กลีเซอรอล | 2-10 กรัม/ลิตร |
| ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ | 20-350 มิลลิกรัม/ลิตร |
| แอกทีฟเอมิลแอลกอฮอล์ | 1-300 มิลลิกรัม/ลิตร |
| ไอโซบิวทานอล | 2-150 มิลลิกรัม/ลิตร |
| โพรพานอล | 10-125 มิลลิกรัม/ลิตร |
| 2 - ฟีนิลแอลกอฮอล์ | 15-200 มิลลิกรัม/ลิตร |
| เอสเทอร์ | |
| เอทิลแอซิเตต | 5-200 มิลลิกรัม/ลิตร |
| เอทิลแลคเตต | 1-50 มิลลิกรัม/ลิตร |
| ฟีนิลเอทิลแอซิเตต | 0.1-10 มิลลิกรัม/ลิตร |
| ไอโซเอมิลแอซิเตต | 0.1-8 มิลลิกรัม/ลิตร |
| ไอโซเอมิลออกตาโนเอต | 0.1-2 มิลลิกรัม/ลิตร |
| กรด | |
| ทาร์ทาริก | 0.5-7 กรัม/ลิตร |
| มาลิก | 0.05-5 กรัม/ลิตร |
| ซักซินิก | 0.05-2 กรัม/ลิตร |
| แลคติก | 0.01-5 กรัม/ลิตร |
| แอซิติก | 0.02-2 กรัม/ลิตร |
| ซิตริก | 0.05-1 กรัม/ลิตร |

ที่มา: Jackson, 2000

2.5.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยรา

การเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการผลิตโดยใช้แป้งเป็นวัตถุดิบ ภาที่ เกี่ยวข้องนั้นเป็นในกลุ่มที่สามารถสร้างแอมิโลไลติกเอนไซม์ (Amylolytic enzyme) เช่น *Mucor hiemalis*, *M. racemosus* และ *Rhizopus oryzae* เป็นต้น (อภิขญา เตชะวส์ญญ, 2550) โดย เอนไซม์เหล่านี้จะถูกผลิตออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายแป้ง แอมิโลไลติกเอนไซม์ ได้แก่ แอลฟาอะ ไมเลส (α -amylase) และกลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) หรืออะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase) จะย่อยพันธะ แอลฟา - 1, 4 และพันธะ แอลฟา - 1, 6 ไกลโคซิดิก (α -1, 4- และ α -1, 6-glycosidic) ในสายพอลิเมอร์ของแป้งทั้งที่มีโครงสร้างเป็นแอมิโลส หรือแอมิโลแพก ทินแล้วเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ดังภาพที่ 2.4 นอกจากราจะเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลแล้วยังมี บทบาทในการสร้างสารให้กลิ่นและรสชาติในสาโทอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีสต์ *Sacharomycopsis fibuligera* สามารถสร้างเอนไซม์เปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลได้ด้วย (อภิขญา เต ชะวส์ญญ, 2550)

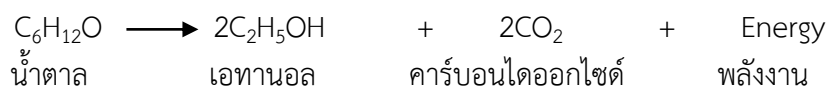


ภาพที่ 2.4 การย่อยแป้งด้วยแอมิโลไลติกเอนไซม์จากรา

ที่มา: Boulton *et al.*, 1996

2.5.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยยีสต์

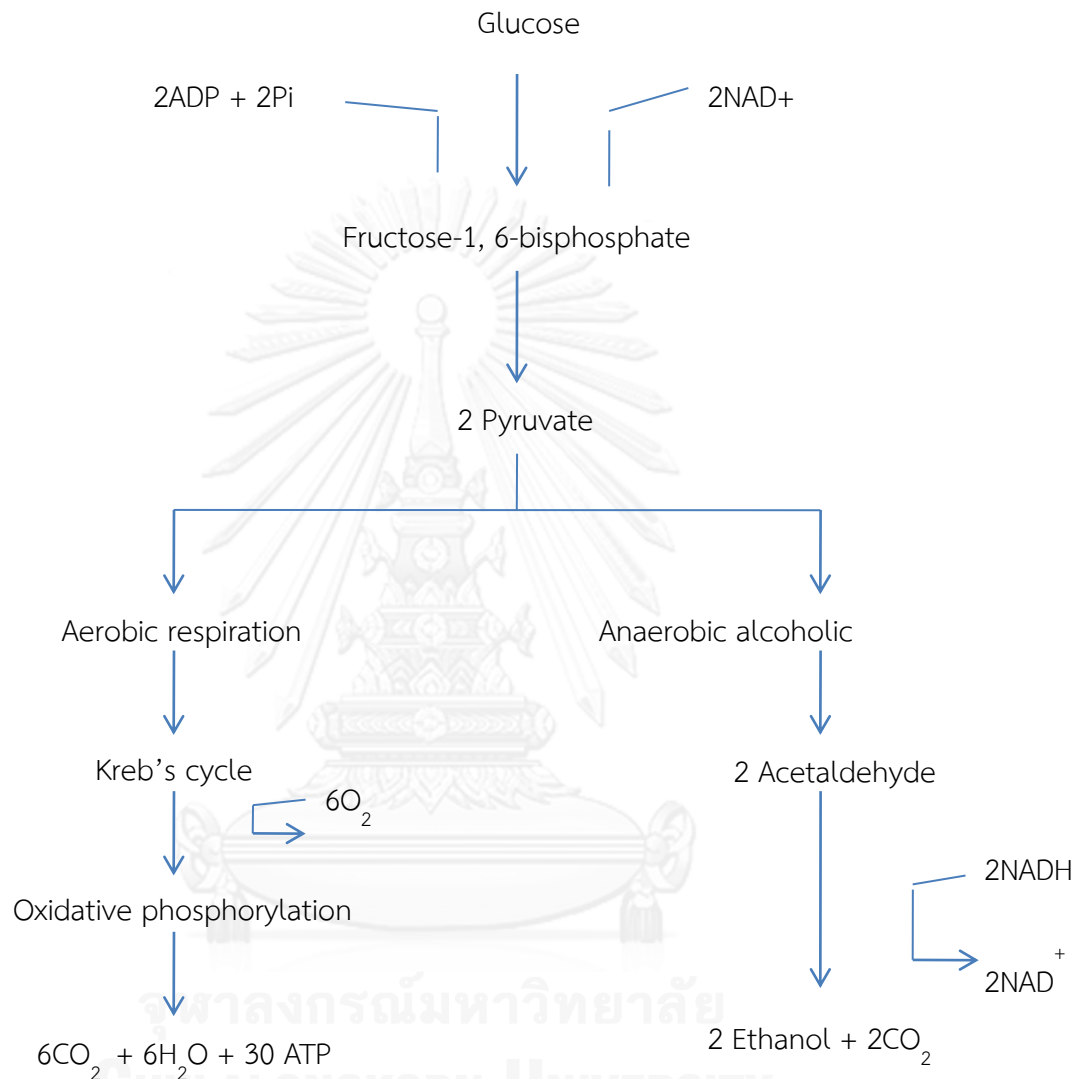
ยีสต์ที่นำมาใช้ผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์นั้นจะต้องมีความสามารถผลิตแอลกอฮอล์ และ ทนทานต่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ได้ดี นอกจากนี้จะต้องตกตะกอนออกได้ง่ายหลังการหมัก เสร็จสิ้น โดยยีสต์มีบทบาทในการบวนการหมักคือเปลี่ยนน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายแป้งโดยราให้ กลายเป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ ได้แก่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยจะ เปลี่ยนน้ำตาล 1 โมเลกุลให้ได้เป็นเอทานอล 2 โมเลกุล คาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล และพลังงาน 2 ATP (ภาพที่ 2.5) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทุกชนิด นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์ Non-Saccharomyces เช่น *Hanseniaspora guilliermondii* และ *Pichia anomala* มีบทบาทใน การสร้างสารให้กลิ่นในไวน์องุ่นอีกด้วย (Rojas *et al.*, 2001)



ภาพที่ 2.5 ชีวเคมีของการเกิดเอทานอล

ที่มา: Boulton *et al.*, 1996

การผลิตเอทานอลในกระบวนการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของยีสต์ในกระบวนการหมักแบบอลิซิมที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งในภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงสรุปได้ดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 เมทาบอลิซึมของยีสต์ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ

ที่มา: ไพบูลย์ ด้านวิรุฑัย และพัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2548

ขั้นแรก ยีสต์จะย่อยสลายน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งอาหารผ่านวิถีไกลโคไลซิส (Glycolytic partway) โดยการเปลี่ยนกลูโคส 1 โมเลกุลให้กลายเป็นไพรูเวท 2 โมเลกุล และได้พลังงาน ATP 2 โมเลกุล NADH_2 2 โมเลกุล ในขั้นตอนนี้สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน โดยยีสต์

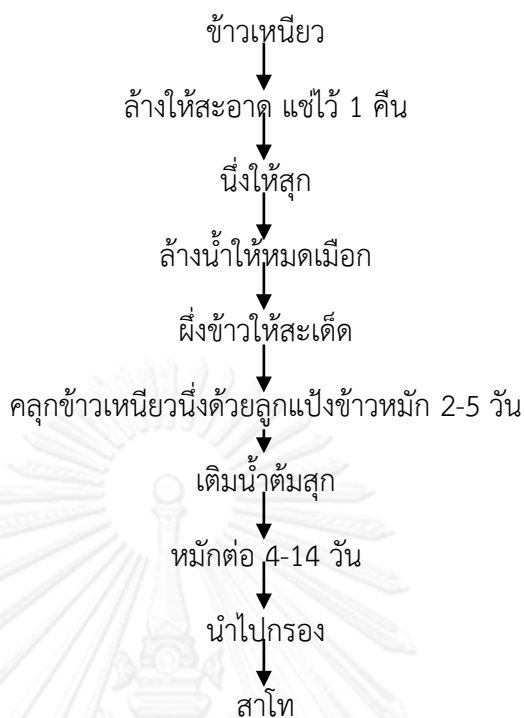
ขั้นตอนต่อมาไพรูเวทซึ่งเป็นสารตัวกลางสามารถที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้อย่างหลากหลายตามชนิดของยีสต์ และสภาวะแวดล้อมในกระบวนการหมัก โดยการเปลี่ยนแปลงแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. ออกซิเดทีฟเมทาบอลิซึม (Aerobic respiration) เกิดขึ้นในสภาวะที่มีออกซิเจน ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้กลายเป็นสารตัวกลางคือไพรูเวท และไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนต่อโดยผ่านวัฏจักรเครบ (Kreb's cycle) และวิถีการหายใจ (Oxidative respiration) ให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และได้พลังงานรวมทั้งสิ้น 36 - 38 ATP โดยขั้นตอนแรกให้พลังงาน 6 - 8 ATP (2 ATP รวมกับ 4 - 6 ATP ที่ได้จากการเปลี่ยน NADH_2 2 โมเลกุล) และในวิถีการหายใจจะให้พลังงาน 30 ATP

2. เฟอเมนเททีฟเมแทบอลิซึม (Anaerobic fermentation) จะเกิดในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงโดยไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์เรียกภาวะนี้ว่า “กระบวนการหมัก” ในภาวะนี้ไพรูเวทหรือสารตัวกลางจะถูกเปลี่ยนเป็น อะซีทิลดีไฮด์และเอทิลแอลกอฮอล์ต่อไปจนกลายเป็นเอทานอลและได้พลังงานสุทธิ 2 ATP ส่วน 2 NADH_2 ที่ได้จากขั้นตอนแรกจะถูกเปลี่ยนกลับไปเป็น 2 NAD^+ เพื่อนำกลับไปใช้ในการสังเคราะห์ 2 ATP ต่อไป ทำให้วิถีการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนสามารถดำเนินต่อไปได้โดยใช้แค่ 2 NAD^+ ในการเกิดกระบวนการ

2.6 กระบวนการผลิตสาโท

การผลิตไวน์ข้าวแบบดั้งเดิมนั้นมีหลายขั้นตอนแสดงดังภาพที่ 2.7 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547) ซึ่งแต่ละขั้นตอนอาจเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อันไม่พึงประสงค์ เช่น หากแช่ข้าวนานเกินไปจะเป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์อันไม่พึงประสงค์ และข้าวที่ได้มีกลิ่นไม่ดี การล้างเมือกข้าวอาจเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อในอากาศโดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียกรดน้ำส้ม การนึ่งข้าวอาจช่วยฆ่าจุลินทรีย์ส่วนหนึ่งแต่ไม่ทั้งหมด ในลูกแป้งเก่าก็อาจพบจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้เช่นกัน ทางสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจึงได้พยายามปรับปรุงกระบวนการผลิตสาโทเพื่อลดการปนเปื้อนให้ได้มากที่สุด เช่น การแช่ข้าวไม่ควรแช่นานเกิน 6 ชั่วโมง ไม่ล้างเมือกข้าวและไม่ผึ่งข้าวแต่ใช้น้ำต้มสุกเพื่อให้ข้าวกระจายตัวออกแทนเพื่อง่ายต่อการคลุกข้าวกับหัวเชื้อ ส่วนลูกแป้งเชื้อที่เป็นองค์ประกอบจะต้องผ่านการคัดเลือกแล้ว (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547)



ภาพที่ 2.7 กระบวนการผลิตไวน์ข้าวแบบเดิมจากภูมิปัญญาท้องถิ่น

ที่มา: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547

2.7 องค์ประกอบเคมีในสาโท

องค์ประกอบทางเคมีในสาโทที่ผลิตในแต่ละแหล่งอาจมีปริมาณขององค์ประกอบเคมีต่างๆ แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิต สภาพะในการหมัก สายพันธุ์ของข้าวที่ใช้ผลิต เป็นต้น โดย มนตรี เชาวน์สังเกต (2521) ได้ทำการวิเคราะห์สาโทในขณะที่ยังมีปฏิกริยาการหมัก จาก 11 แหล่งในประเทศ พบว่ามีลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีดังนี้

| | |
|---|---------------|
| ค่าความเป็นกรดเบส | 3.40 - 4.70 |
| ปริมาณกรดทั้งหมด (%กรดแลคติก) | 0.29 - 0.93 |
| กรดระเหยง่าย (%กรดแอสติค) | 0.001 - 0.061 |
| ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ($^{\circ}$ Brix) | 5.2 - 13.8 |
| น้ำตาลรีดิวซ์ (%) | 0.15 - 5.95 |
| แอลกอฮอล์ (%) | 3.0 - 11.0 |

และในการวิเคราะห์ตัวอย่างสาโทจากลูกแบ่งแหล่งต่างๆ 5 ตัวอย่าง และปล่อยให้เกิดการหมักจนสมบูรณ์ ปรากฏว่าได้สาโทที่มีองค์ประกอบทางการภาพและองค์ประกอบทางเคมีดังนี้

| | |
|---|--------------|
| ค่าความเป็นกรดเบส | 3.71 - 4.00 |
| ปริมาณกรดทั้งหมด (%กรดแลคติก) | 1.18 - 4.23 |
| กรดระเหยง่าย (%กรดแอสติค) | 0.026 - 2.43 |
| ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ($^{\circ}$ Brix) | 7.8 - 15.6 |
| น้ำตาลรีดิวซ์ (%) | 0.0 - 7.3 |
| แอลกอฮอล์ (%) | 6.8 - 14.8 |

2.8 สารประกอบให้กลิ่นรสในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

สารประกอบให้กลิ่นรสในไวน์ขาวนั้นมีความคล้ายคลึงกับสารประกอบให้กลิ่นรสต่างๆที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดอื่น โดยสารประกอบให้กลิ่นรสเป็นผลพลอยได้ (By product) ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักของยีสต์ เช่น ฟูเซลอยล์ เอสเทอร์ หรือสารประกอบแอลดีไฮด์ เป็นต้น (Berry, Russell and Stewart, 1987) ซึ่งมีปริมาณน้อยและให้กลิ่นรสที่ดี ทำให้เครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีกลิ่นรสที่ซับซ้อนยิ่งขึ้น สารประกอบให้กลิ่นในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แต่ละประเภทจะมีปริมาณที่แตกต่างกันออกไปขึ้นกับวัตถุดิบ สายพันธุ์จุลินทรีย์ และกระบวนการผลิต ตารางที่ 2.3 แสดงปริมาณและประเภทของสารประกอบให้กลิ่นชนิดต่างๆที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แต่ละชนิด โดยสารประกอบให้กลิ่นหลักๆที่พบในไวน์องุ่นคือ ไฮเออร์แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ของกรดไขมัน และกรดระเหยง่าย (Jackson, 2000)

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบและปริมาณของสารประกอบเอสเทอร์และฟูเซลอยล์ที่พบในเครื่องต้มแอลกอฮอล์แต่ละชนิด

| สารประกอบให้กลิ่นรส | ชนิดของเครื่องต้มแอลกอฮอล์ | | | |
|---------------------------------|----------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| | ไวน์ ^ก | เปียร์ ^ข | สาโท ^ค | สาเก ^ง |
| สารประกอบเอสเทอร์ (mg/l) | | | | |
| เอทิลอะซิเตต | 33.5 | 8.2-47.6 | 69.4 | 20-30 |
| ไอโซบิวทิลอะซิเตต | 0.02 | 0.03-0.25 | 1.6 | 0.2-0.5 |
| เอทิลบิวทิเรต | 0.13 | 0.09 | 1.6 | 0.5 |
| ไอโซเอมิลอะซิเตต | 2.2 | 0.23 | 1.3 | 2 |
| เอทิลคาโพรเอท | 0.71 | - | - | 2 |
| เอทิลคาพริเลท | 1.0 | 0.08-0.1 | 0.6 | 5 |
| เอทิลคาเพรท | 0.24 | - | 0.5 | 10 |
| เอทิลฟีลาโกเนท | - | - | - | 3 |
| เอทิลลอเรท | - | - | 0.9 | 2 |
| 4เอทิลแลคเตต | 4.0 | 0.1 | 0.7 | 2 |
| ฟีนิลเอทิลอะซิเตต | 3.5 | 0.1-0.17 | 0.6 | 8 |
| แอลดีไฮด์ (mg/l) | | | | |
| อะซีทัลดีไฮด์ | 56.0 | 2.5-24.4 | 64.2 | - |
| ฟูเซลอยล์ (mg/l) | | | | |
| โพรพานอล | 18.5 | 7.7—16.2 | - | 120 |
| ไอโซบิวทานอล | 13.0 | 200 | 65.6 | 64 |
| แอกทีฟเอมิลแอลกอฮอล์ | 29.0 | 7-23 | - | - |
| ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ | 114 | 27-122 | 99.6 | 170 |
| 2-ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ | - | 5-7 | 23.6 | 65 |

ที่มา: ^กDelfini and Formica, 2001

^ขBerry *et al.*, 1987

^คSirisantimethakom *et al.*, 2005

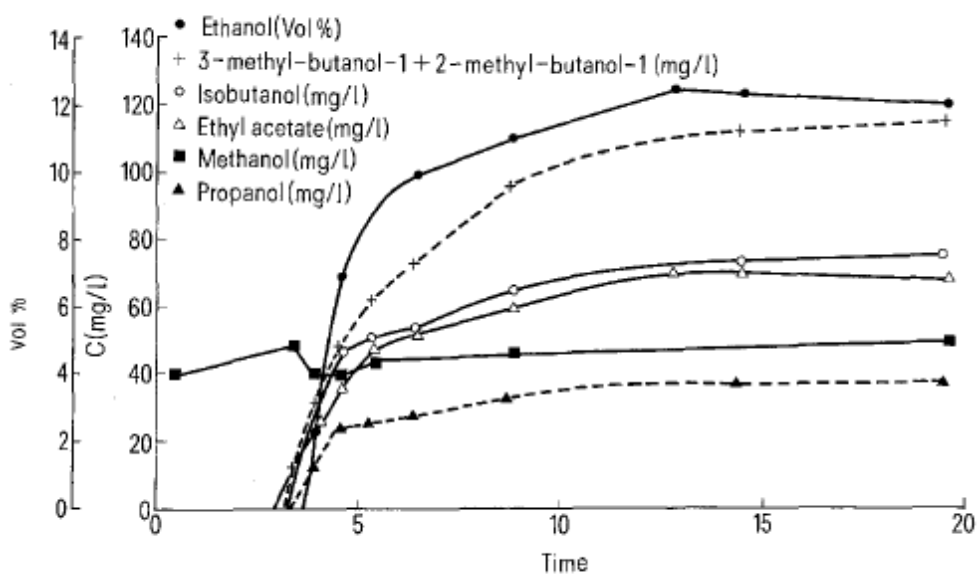
^งRose, 1977

2.8.1 ไฮเออร์แอลกอฮอล์ หรือฟูเซลอยล์

ฟูเซลอยล์ เป็นกลุ่มของแอลกอฮอล์โมเลกุลสูงที่มีคาร์บอนมากกว่า 2 อะตอม ฟูเซลอยล์มีบทบาทสำคัญคือทำให้เครื่องต้มแอลกอฮอล์มีกลิ่นรสที่ซับซ้อนขึ้น ฟูเซลอยล์ในเครื่องต้ม

แอลกอฮอล์นั้นมีมากกว่า 40 ชนิดแต่มีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีความสำคัญต่อกลิ่นรสของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เช่น โพรพานอล ไอโซบิวทานอล (2-เมทิล-1-โพรพานอล) แอคทีฟเอมีลแอลกอฮอล์ (2-เมทิล-1-บิวทานอล) ไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ (3-เมทิล-1-บิวทานอล) แอโรมาติกแอลกอฮอล์ เฮกซานอล และ 2-ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ เป็นต้น นอกจากนี้ความเข้มข้นของฟิวเซลอยล์ก็มีผลต่อกลิ่นและรสของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์คือ หากมีปริมาณน้อยกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร จะช่วยให้เครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีกลิ่นรสที่ซับซ้อนขึ้น แต่หากมีปริมาณมากกว่า 400 มิลลิกรัมต่อลิตรจะเกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี กลิ่นฉุน และกลบกลิ่นรสที่ดีของสารตัวอื่น (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000) ในสาขาจะมีปริมาณของฟิวเซลอยล์แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ภาพที่ 2.8 แสดงตัวอย่างสารประกอบฟิวเซลอยล์และเอทิลอะซิเตตที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก พบว่าการเกิดฟิวเซลอยล์นั้นสัมพันธ์กับการเกิดแอลกอฮอล์ เมื่อมีการสร้างแอลกอฮอล์สูงก็จะมีสารประกอบฟิวเซลอยล์ในปริมาณที่สูงขึ้นด้วย ซึ่งฟิวเซลอยล์และเอทิลอะซิเตตจะมีการสร้างในอัตราที่สูงในช่วงแรกของการหมัก จากนั้นอัตราการสร้างจะต่ำลงในช่วงท้ายของการหมัก



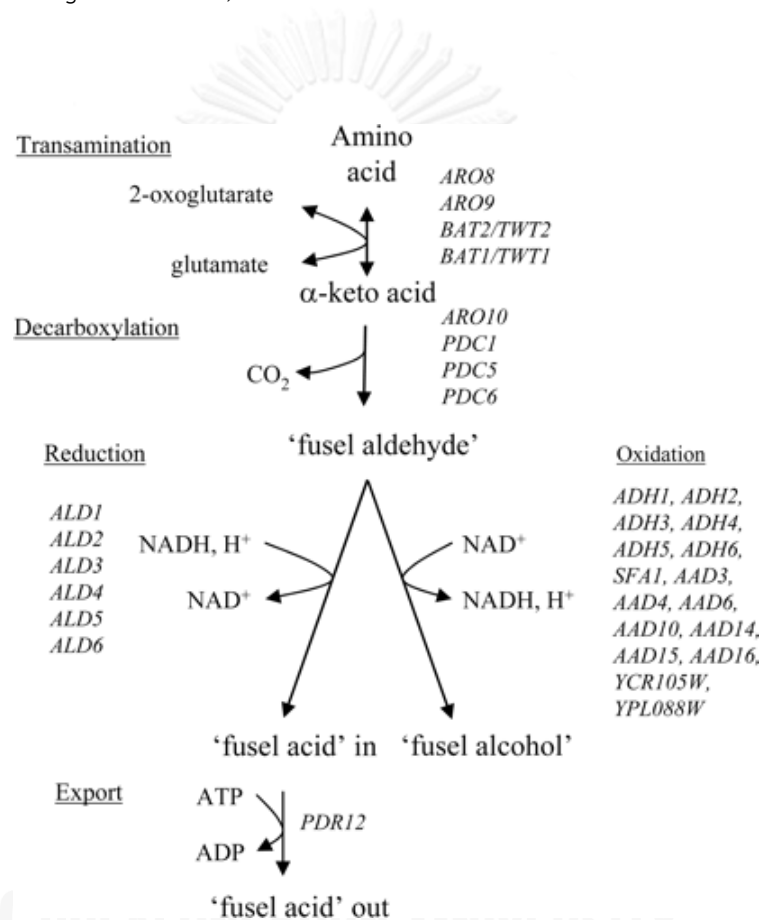
ภาพที่ 2.8 การผลิตแอลกอฮอล์ ฟิวเซลอยล์ และเอทิลอะซิเตต ระหว่างกระบวนการหมัก

ที่มา: Rapp and Mandery, 1986

การสังเคราะห์ฟิวเซลอยล์หรือฟิวเซลแอลกอฮอล์นั้นเกิดจากยีสต์เปลี่ยนกรดอะมิโนไปเป็นฟิวเซลแอลกอฮอล์ คือ โดยปฏิกิริยาเอริค (Erich reaction) คือ ขั้นแรกกรดอะมิโนจะถูกดึงเอาแอมโมเนียออกเรียกว่า ดีอะมิเนชัน (Deamination) ได้เป็นกรดแอลฟาคีโตนิก (α -ketonic) จากนั้นจะถูกดึงเอาคาร์บอนไดออกไซด์ออกเรียกว่า ดีคาร์บอกซิเลชัน (Decarboxylation) ได้เป็น

แอลดีไฮด์ (Aldehyde) แล้วจึงเกิดปฏิกิริยารีดักชันของแอลดีไฮด์ได้เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ ดังภาพที่ 2.9

การสังเคราะห์ฟูเซลอยล์จาก Erlich pathway นั้นพบว่าฟูเซลอยล์แต่ละชนิดเกิดจากการสังเคราะห์ขึ้นจากกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.4 แต่ก็มีฟูเซลอยล์บางชนิด เช่น โพรพานอล และ บิวทานอล เป็นต้น ที่ไม่ได้สร้างขึ้นจากกรดอะมิโน แต่สังเคราะห์ขึ้นจากเซลล์ยีสต์ (Reed and Nagodawithana, 1991)



ภาพที่ 2.9 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดอะมิโนไปเป็นฟูเซลแอลกอฮอล์

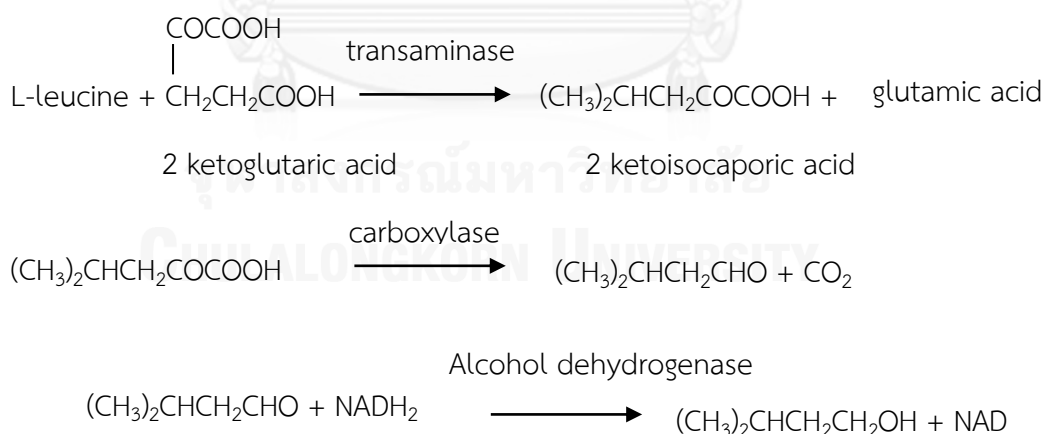
ที่มา: Hazelwood *et al.*, 2008

ตารางที่ 2.4 กรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นในการสร้างฟูเซลอยล์ชนิดต่างๆ

| ไฮเออร์แอลกอฮอล์ | ความเข้มข้นในไวน์ (มก./ล) | กรดอะมิโน |
|----------------------|---------------------------|-------------------------|
| ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ | 80 – 300 | ลิวซีน |
| แอกทีฟเอมิลแอลกอฮอล์ | 30 – 100 | ไอโซลิวซีน |
| ไอโซบิวทิลแอลกอฮอล์ | 50 – 150 | วาลีน |
| ฟีนิลเอทานอล | 20 – 30 | เพนนิลอลานีน |
| ไทโรซอล | 10 – 50 | ไทโรซีน |
| โพรเพน- 1- ออล | 1 – 10 | ยังไม่ทราบชนิดกรดอะมิโน |
| บิวเทน-1-ออล | - | ยังไม่ทราบชนิดกรดอะมิโน |
| ทริบโทพอล | 0 – 1 | ทริบโทพาน |

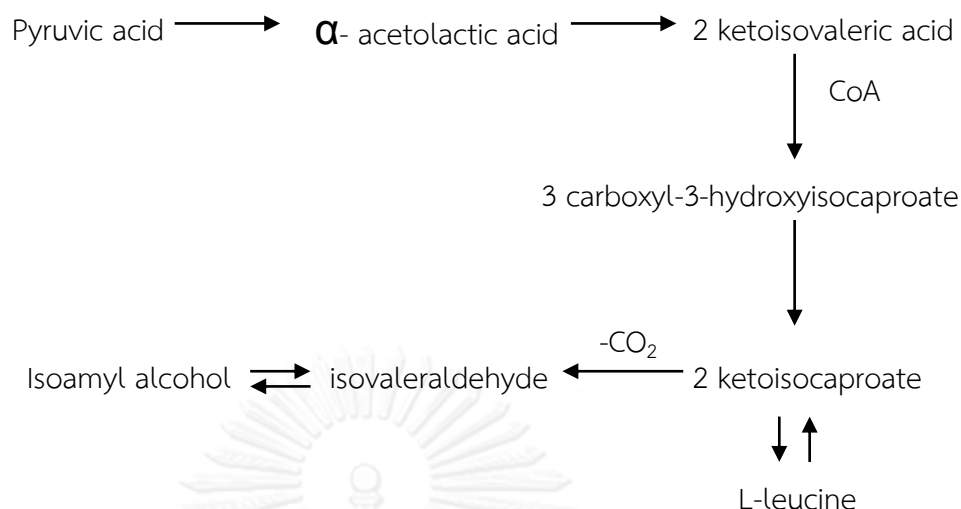
ที่มา: Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000

การสังเคราะห์ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์จากกรดอะมิโนลิวซีน และจากเซลล์ยีสต์ แสดงในภาพที่ 2.10 และ 2.11 ตามลำดับ ทั้งสองกระบวนการมี 2-คีโตไอโซคาโปเรท (2-keto acid) เป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยา โดย 2 - คีโตไอโซคาโปเรท เกิดได้จากกระบวนการ deamination ของกรดอะมิโนลิวซีน และเกิดได้จากกรดไพรูเวท



ภาพที่ 2.10 ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ที่สังเคราะห์จากกรดอะมิโนลิวซีนโดย Ehrlich pathway

ที่มา: Reed and Nagodawithana, 1991



ภาพที่ 2.11 ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ที่สังเคราะห์จากเซลล์ยีสต์

ที่มา: Reed and Nagodawithana, 1991

2.8.2 สารประกอบเอสเทอร์

สารประกอบเอสเทอร์เป็นสารประกอบให้กลิ่นที่สำคัญในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ รวมไปถึงสาโทด้วย สารประกอบเอสเทอร์เกิดขึ้นระหว่างการหมัก เกิดจากการรวมกันระหว่างกลุ่มคาร์บอกซิลิกของกรดอินทรีย์ และกลุ่มไฮดรอกซิลของแอลกอฮอล์หรือฟีนอล ตัวอย่างเช่นการเกิดเอทิลอะซิเตตจากกรดแอสติกและเอทานอล สารกลุ่มนี้ให้กลิ่นรสที่ดีแก่เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เอสเทอร์แต่ละชนิดจะให้กลิ่นรสที่แตกต่างกันออกไป เช่น เอทิลอะซิเตตให้กลิ่นผลไม้ เอทิลคาโพรเตให้กลิ่นแอปเปิ้ล ไอโซเอมิลอะซิเตตให้กลิ่นกล้วยหอมและแอปเปิ้ล ไอโซบิวทิลอะซิเตตให้กลิ่นผลไม้ และ 2-ฟีนิลเอทิลอะซิเตตให้กลิ่นกุหลาบ น้ำผึ้งและแอปเปิ้ล เป็นต้น ซึ่งเราสามารถพบเอสเทอร์ได้หลากหลายในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทั้งชนิดที่สามารถตรวจพบได้และชนิดที่มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบได้ ซึ่งหากเอสเทอร์อยู่ในปริมาณที่เท่ากับหรือมากกว่า threshold นั้นจะให้กลิ่นผลไม้ ความแตกต่างในระดับความเข้มข้นเพียงเล็กน้อยของสารประกอบเอสเทอร์นั้นมีอิทธิพลอย่างมากต่อคุณภาพของไวน์ที่ได้จะเห็นได้ว่าเอสเทอร์มีความสำคัญอย่างมากต่อกลิ่นรสของไวน์ (Saerens *et al.*, 2010)

เอสเทอร์สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ อะลิฟาติกเอสเทอร์ และฟีนอลิกเอสเทอร์ แต่เนื่องจากฟีนอลิกเอสเทอร์นั้นเป็นสารกลุ่มระเหยยาก อีกทั้งยังพบปริมาณน้อยในไวน์ส่วนใหญ่จะพบได้ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า threshold ดังนั้นอะลิฟาติกเอสเทอร์จึงเป็นเอสเทอร์หลักที่พบในไวน์ และอะลิฟาติกเอสเทอร์สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่

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

3. ไฮดรอกซิลและออกซิแอซิเตสเทอร์ ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซีหรือหมู่คีโตน

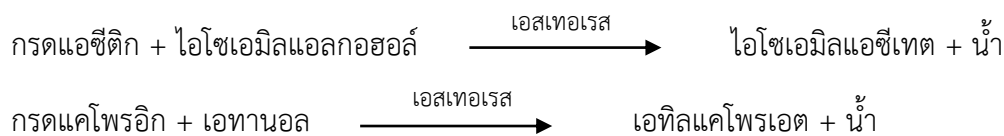
ซึ่งใน 3 กลุ่มย่อยนี้เชื่อว่าไม่มีเพียงโมโนคาร์บอกซิลิกแอซิเตสเทอร์เท่านั้นที่มีบทบาทต่อกลิ่นรสของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ซึ่งขึ้นอยู่กับ เอทานอลและกรดไขมันอิ่มตัว เช่น กรดออกทานอิก (แคพริก) กรดเฮกซานอิก (แคพริก) และกรดเดคาโนอิก (แคพริก) นอกจากนี้ยังขึ้นกับกรดแอซิติกและฟูเซลล์แอลกอฮอล์ เช่น ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และไอโซบิวทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งเอสเทอร์โมเลกุลต่ำเหล่านี้ให้กลิ่นรสในไวน์มาก จึงถูกเรียกว่าเอสเทอร์ผลไม้ (Fruit ester) ส่วนในกลุ่มของไดหรือไตรคาร์บอกซิลิกเอสเทอร์นั้นปกติในไวน์จะพบปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเฉพาะเอทิลแลคเตต ซึ่งเกิดจากกระบวนการหมักแบบมาโลแลคติก แต่สารกลุ่มนี้ให้กลิ่นอ่อนจึงไม่มีผลต่อกลิ่นรสของไวน์อย่างเด่นชัด (Jackson, 2000)

สารประกอบเอสเทอร์ที่มีความสำคัญในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีอยู่ 2 กลุ่ม คือ เอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid ethyl ester) กับแอซิเตสเทอร์ (Acetate ester) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ให้กลิ่นที่ดีกับเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น กลิ่นดอกไม้ กลิ่นผลไม้ เป็นต้น

อุณหภูมิระหว่างการหมักเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อสารประกอบเอสเทอร์ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่นถ้าหากหมักที่อุณหภูมิต่ำ (ประมาณ 10 °C) จะสนับสนุนการสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน เช่น เอทิลออกทานอเอต เอทิลเดกแคโนเอต เป็นต้น แต่ถ้าหมักที่อุณหภูมิสูงจะสนับสนุนการเกิดของเอสเทอร์โมเลกุลสูงๆ เช่น เอทิลออกทานอเอต และ ฟีนีลแอซิเตต เป็นต้น (Killian and Ough, 1979)

การเกิดสารประกอบเอสเทอร์ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เกิดได้ 2 กระบวนการ คือ

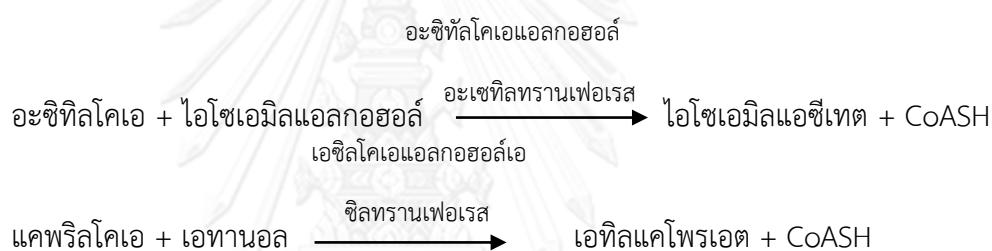
1. การเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (Esterification) เกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอลกอฮอล์ กับ กรดอินทรีย์ในระหว่างการบ่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ กระบวนการนี้จะเกิดซ้ำๆ ระหว่างการบ่ม โดยมีเอนไซม์เอสเทอร์เรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังแสดงในภาพที่ 2.12



ภาพที่ 2.12 การเกิดเอสเทอร์รีฟิเคชันระหว่างกรดและแอลกอฮอล์ โดยมีเอนไซม์เอสเทอร์สเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ที่มา: สุมลลิกา โมรากุล, 2545

2. เอสเทอร์ฟิเคชันโดยเอนไซม์ระหว่างการหมัก เป็นการเกิดเอสเทอร์ฟิเคชันในช่วงหลังของการหมัก โดยมีเอนไซม์ แอลกอฮอล์อะซิetyltransferase และ แอลกอฮอล์เอซิลtransferase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดเอสเทอร์ดังสมการแสดงในภาพที่ 2.13



ภาพที่ 2.13 การเกิดเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างการหมักโดยเอนไซม์แอลกอฮอล์อะซีetyltransferase และแอลกอฮอล์เอซิลtransferase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ที่มา: สุมลลิกา โมรากุล, 2545

อุณหภูมิหมักเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อผลิตภัณฑ์สาโทที่ได้เนื่องจากมีผลต่อการเจริญของยีสต์และระยะเวลาหมัก และปฏิกิริยาทางชีวเคมีของยีสต์ที่อาจส่งผลถึงองค์ประกอบเคมี กลิ่น และรสชาติของสาโท นอกจากนี้การหมักที่อุณหภูมิสูงๆอาจมีผลต่อสารระเหยให้กลิ่นรสสาโทอีกด้วย การจากศึกษาที่ผ่านมาพบว่าไวน์ที่หมักอุณหภูมิต่ำจะมีการผลิตแอลกอฮอล์โมเลกุลสูงในปริมาณที่ลดลง แต่จะมีการผลิตสารประกอบจำพวกเอสเทอร์ในปริมาณที่สูงมากขึ้น (Querol and Fleet, 2006) ดังนั้นไวน์ขาวที่ต้องการกลิ่นรสจากการหมักจึงนิยมหมักที่อุณหภูมิต่ำ ส่วนไวน์แดงจะหมักที่อุณหภูมิสูงกว่าไวน์ขาวเพื่อทำให้เกิดการสกัดสีจากเปลือกองุ่น สาโทจัดเป็นไวน์ประเภทหนึ่งที่มีกรรมวิธีการผลิตคล้ายกับไวน์องุ่นเพียงแต่เปลี่ยนวัตถุดิบที่ใช้เป็นข้าวแทน ในปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยรายงานถึงผลของอุณหภูมิต่อองค์ประกอบทางเคมีต่างๆในสาโทอย่างแน่ชัด งานวิจัยนี้จึงสนใจบทบาทของอุณหภูมิหมักที่ส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีต่างๆในสาโท เพื่อเป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพกระบวนการผลิตสาโทให้ดียิ่งขึ้น สามารถเลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักสาโทให้ได้ลักษณะตามที่ต้องการ ตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค ตลอดจนเป็นแนวทางในการผลิตสาโทในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

3.1.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

คอมพิวเตอร์

โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Package for the social sciences (SPSS) version 10 for window (SPSS Inc., USA)

3.2 ขั้นตอนการทดลองและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิหมักต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดโดยรวม และ แอลกอฮอล์ ระหว่างการหมักสาโท และ ต่อปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์และสารประกอบ แอลดีไฮด์ในสาโทที่ได้

3.2.1.1 การหมักสาโท

หมักสาโทด้วยลูกแป้งสุราจากผู้ประกอบการผลิตสาโทบางม้า ตำบลบางปลาหมอ จังหวัด สุพรรณบุรี โดยนำข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงูมาแช่น้ำนาน 6-8 ชั่วโมงเพื่อล้างเมือกออก แล้วนำไปนึ่ง 30 นาที จากนั้นนำมาผึ่งในภาชนะปิดให้แห้งพอประมาณ จากนั้นนำมาคลุกเคล้ากับลูกแป้งให้เข้ากัน ในอัตราส่วนข้าวเหนียวหนึ่ง 140 กรัมต่อลูกแป้งสุรา 7 กรัม บรรจุข้าวเหนียวหนึ่งที่ผ่านการคลุกเคล้ากับ ลูกแป้งสุราแล้วลงขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มิลลิลิตร และนำไปต้มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30 °C นาน 2 วัน (วันที่ 2 ของการหมัก) หลังจากหมักเป็นระยะเวลา 2 วันพบน้ำต้อยในปริมาณเล็กน้อย น้ำต้อย เป็นของเหลวที่ได้จากการย่อยสลายข้าวของแอลฟาเอมีเลส กลูโคเอมีเลส และโปรตีเอส แล้วจึงเติมน้ำลงไป 210 มิลลิลิตร (ขั้นตอนผ่านน้ำ) เขย่าให้เข้ากันให้สารละลายคลุกเคล้าจนทั่วข้าวเหนียวเพื่อชะล้างให้แป้ง และน้ำตาลที่ติดอยู่ตามเมล็ดข้าวลงมายังสารละลายให้หมด แล้วแยกกากข้าวเหนียวออก โดยนำผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วคั้นน้ำหมักออกจากเมล็ดข้าวให้หมด ทำการปรับ °Brix ของน้ำหมักให้น้ำหมักในทุกๆชุดทดลอง มี °Brix ใกล้เคียงกัน (ประมาณ 7 °Brix) จากนั้นจึงนำน้ำหมักที่ได้ไปฆ่าเชื้อโดย autoclave (121 °C) เพื่อกำจัดเชื้อปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นในช่วงก่อนกระบวนการผ่านน้ำ แล้วจึงโรยหัวเชื้อลูกแป้งสุรา 7 กรัม เขย่าให้เข้ากันทั่วน้ำหมัก แล้วนำไปหมักต่อโดยควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ 3 ระดับ ได้แก่

- ระดับที่ 1 คือ หมักสาโทด้วยอุณหภูมิคงที่ที่ 18 °C ทำการหมักสาโทในตู้เย็นขนาดเล็กที่มีการตัดแปลงนำอุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิภายในตู้มาติดไว้ เพื่อคุมอุณหภูมิให้คงที่
- ระดับที่ 2 คือ หมักสาโทด้วยอุณหภูมิคงที่ที่ 30 °C ทำการหมักสาโทในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิคงที่ 30 °C
- ระดับที่ 3 คือ หมักสาโทด้วยอุณหภูมิคงที่ที่ 40 °C ทำการหมักสาโทในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิคงที่ 40 °C

โดยในแต่ละระดับอุณหภูมิทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.1.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ได้ปริมาณ 7 มิลลิลิตร ณ วันที่ 3, 5, 8, 12 และ 16 ของการหมัก โดยใช้ไมโครปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่างน้ำหมักจากแต่ละ batch นำตัวอย่างน้ำหมักไปแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วหมุนเหวี่ยง 5000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที บรรจุส่วนใสที่ได้ลงขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่ปิดฝาสนิทด้วย crimper seals เพื่อแยกเก็บวิเคราะห์ ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และสารประกอบแอลดีไฮด์ ส่วนที่เหลือบรรจุลงขวดพลาสติกที่พันปากขวดด้วยพาราฟินเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดโดยรวม น้ำตาลรีดิวิซ์ และเอทานอลระหว่างการหมัก แล้วนำทั้ง vial และขวดพลาสติกไปแช่เย็นที่ 4 °C เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีต่างๆต่อไป ดังนี้

- ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ระหว่างการหมัก ด้วยวิธี DNS- method (Miller, 1959)

โดยนำตัวอย่างสาโทไปทำปฏิกิริยากับ สารละลาย DNS และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร เทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคส เพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ (ดูวิธีการตามภาคผนวก ก.1)

- ปริมาณกรดโดยรวม (total acidity) ระหว่างการหมัก วิเคราะห์ตามวิธีของ Amerine และ Ough, 1979 โดยนำตัวอย่างสาโทมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.1 นอร์มัล) และนำปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรตจนถึงจุดสมมูล ไปคำนวณหาปริมาณกรดโดยรวม (ดูวิธีการตามภาคผนวก ก.2)

- ปริมาณแอลกอฮอล์ ระหว่างการหมัก

วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในตัวอย่างสาโทระหว่างการหมัก โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เฟลมไอโอไนเซชัน ใช้ HP-Innowax column ที่มี packing material คือ polyethylene glycol ปริมาณฉีด 1 ไมโครลิตร (ดูวิธีการตามภาคผนวก ข)

- ปริมาณของไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และสารประกอบแอลดีไฮด์

วิเคราะห์ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และสารประกอบแอลดีไฮด์ ในตัวอย่างสาโทที่ได้เมื่อสิ้นสุดการหมัก (ตัวอย่างวันที่ 16 ของการหมัก) ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เฟลมไอโอไนเซชัน ใช้ HP-Innowax column ที่มี packing material คือ polyethylene glycol ปริมาณฉีดของสารตัวอย่างเท่ากับ 1 ไมโครลิตร (Sirisantimethakom *et al.*, 2005) (ดูวิธีการตามภาคผนวก ข.)

3.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิหมักต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์และสารประกอบแอลดีไฮด์ระหว่างกระบวนการหมักสาโท

ใช้วิธีการหมักสาโทเหมือนที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 3.2.1.1 แต่เพิ่มปริมาณวัตถุดิบที่ใช้หมักเป็นข้าวเหนียวหนึ่ง 280 กรัมต่อลูกแป้งสุรา 14 กรัม และผ่านน้ำด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 420 มิลลิลิตร

(สัดส่วนระหว่างข้าว : ลูกแป้ง : น้ำ ยังคงเช่นเดียวกับ 3.2.1) หมักในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 2000 มิลลิลิตร ทั้งนี้ในการทดลองเพิ่มปริมาตรหมักเนื่องจากจะเก็บตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณ จุลินทรีย์แบบหาน้ำหนักแห้งด้วย โดยเก็บตัวอย่างสาโทปริมาตร 1 มิลลิลิตร ณ วันที่ 3, 5, 8 และ 12 ของการหมักลงในบรรจุส่วนใสที่ได้ลงขวด vial ขนาด 2 มล. ที่ปิดฝาสนิทด้วย Crimper Seals ทันที เพื่อป้องกันการระเหยออกของสารให้กลิ่น แล้วนำไปแช่เย็นที่ 4 °C เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป (Sirisantimethakom *et al.*, 2005) (คู่มือการตามภาคผนวก ข.)

3.2.3 การติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์โดยวิธีหาน้ำหนักแห้ง (cell dry weight) ระหว่างการหมักสาโท

ใช้ตะกอนที่ได้จากการแยกน้ำสาโทในหัวข้อ 3.2.2 โดยเก็บตัวอย่างตะกอน ณ วันที่ 3, 5, 8, 12 และ 16 ของการหมัก ทั้งนี้ในการทดลองเพิ่มปริมาตรหมัก และปริมาตรการเก็บตัวอย่างเพื่อให้ ตะกอนน้ำหนักแห้งหลังทำการอบแห้งเพื่อไล่ความชื้นออกแล้ว มีน้ำหนักมากพอในการตรวจวัด นำ ตัวอย่างสาโทไปแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วหมุนเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จำนวน 3 รอบ จากนั้นนำตะกอนที่ได้วางบนกระดาษกรอง และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 101 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในตู้อบจนตะกอนแห้ง แล้วจึงนำตะกอนไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง น้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (เทพปัญญา เจริญรัตน์, 2554) (คู่มือการตามภาคผนวก ค.)

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

บทที่ 4

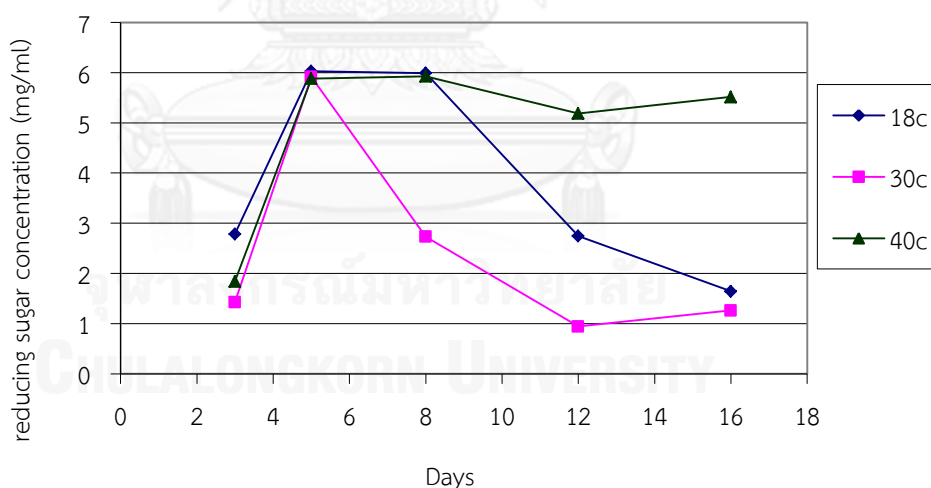
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของอุณหภูมิหมักต่อองค์ประกอบทางเคมีของสาโทระหว่างกระบวนการหมัก

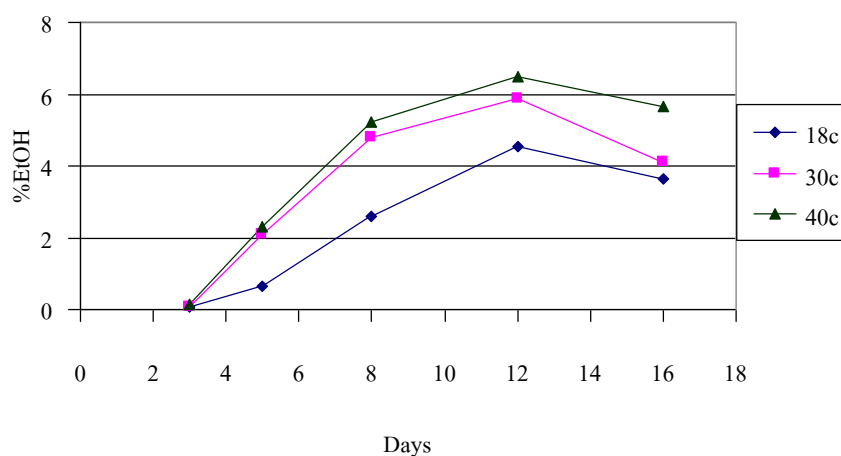
ในงานวิจัยนี้ได้ผลิตสาโทโดยเลือกใช้วัตถุดิบเป็นข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยววงมาหมักกับลูกแป้งสุรา ซึ่งผลิตจากผู้ประกอบการผลิตสาโทบางปลาหมอ โดยแปรระดับอุณหภูมิหมัก 3 ระดับคือ 18 °C 30 °C และ 40 °C จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล ปริมาณกรดโดยรวม อะซิทลดีไฮด์ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และติดตามการเปลี่ยนแปลง น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ ในสาโทระหว่างกระบวนการหมักเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิหมักที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบโดยมีผลการทดลองดังนี้

4.1.1 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล ระหว่างการหมัก

จากผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำตาลรีดิวซ์ และเอทานอล ที่มีอยู่ในสาโทระหว่างการหมักที่ภาวะอุณหภูมิหมัก 3 ระดับ คือ 18 °C, 30 °C และ 40 °C ได้ผลดังรูปที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ โดยติดตามปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปความเข้มข้นแสดงด้วยหน่วยมิลลิกรัม น้ำตาลรีดิวซ์ต่อปริมาตรสาโท 1 มิลลิลิตร (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และติดตามเอทานอลในรูปความเข้มข้นแสดงด้วยหน่วยร้อยละโดยปริมาตร (%)



ภาพที่ 4.1 น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทที่อุณหภูมิ 18 °C, 30 °C และ 40 °C



ภาพที่ 4.2 ปริมาณเอทานอล (เปอร์เซ็นต์) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทที่อุณหภูมิ 18 °C, 30 °C และ 40 °C

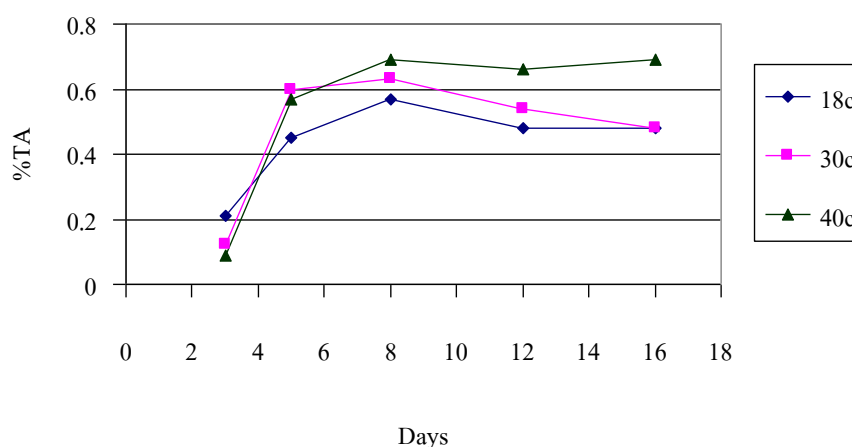
จากภาพที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าในช่วงวันที่ 3 – 5 วันแรกที่สภาวะอุณหภูมิหมักที่แตกต่างกัน ทั้ง 3 ระดับให้ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใกล้เคียงกัน โดยถึงแม้ว่าน้ำตาลในระบบที่เกิดในการทดลองนี้จากเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นจากราในช่วงหมักน้ำต้อยจะถูกทำลายจากการให้ความร้อนด้วย autoclave ไปจนหมดแล้วก็ตาม แต่หลังจากนั้นมีการใส่ลูกแป้งลงไปใหม่ตั้งนั้นยีสต์ในกลุ่ม *Saccharomyces fibuligera* ซึ่งมีอยู่ในลูกแป้งที่ใช้ในการทดลอง (อภิขญา เตชะวสุญญ, 2550) จะสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม amylolytic enzyme เพื่อย่อยแป้งสายสั้น ๆ ที่หลงเหลืออยู่ในน้ำหมักที่แยกออกจากข้าวออกไปแล้ว เอนไซม์ในกลุ่ม amylolytic enzyme นี้จะเปลี่ยนแป้งที่หลงเหลือดังกล่าวนี้ให้เป็นน้ำตาล ดังนั้นจึงมีการสร้างน้ำตาลอย่างต่อเนื่องระหว่างการหมัก การที่ในช่วงแรกทั้ง 3 อุณหภูมิหมักมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกันทั้งๆที่งานวิจัยของ Chi และคณะ (2009) และ Gašperik และคณะ (1991) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ α -amylase จาก *S. fibuligera* อยู่ที่อุณหภูมิสูงช่วง 40 °C – 50 °C ซึ่งควรที่จะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิต่ำกว่ามีค่าที่ต่ำกว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิสูงกว่า แต่อย่างไรก็ตามเมื่อคำนึงถึงขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ด้วยแล้วอุณหภูมิหมักที่ต่ำกว่าจะให้อัตราการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์จะต่ำกว่า ดังเช่นผลการตรวจวัดอัตราการหมักของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ Torija และคณะ (2003) ที่ได้รายงานว่าการหมักที่ 35 °C มีอัตราดังกล่าวที่สูงที่สุดและต่ำสุดที่ 15 °C อีกทั้งยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำ ส่งผลให้ที่อุณหภูมิต่ำจะมีอัตราการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ต่ำกว่าที่อุณหภูมิสูง จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าในช่วงวันที่ 3 - 5 วันแรกของการหมัก อัตราการเกิดแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 18 °C เท่ากับ 0.19 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ต่ำกว่าค่าที่อุณหภูมิ 30 °C และ 40 °C ที่มีอัตราการเกิดแอลกอฮอล์ เท่ากับ 0.68 และ 0.72 ตามลำดับโดยอัตราการเกิดแอลกอฮอล์เป็นค่าที่คำนวณจากความชันจากกราฟในภาพที่ 4.2 ระหว่างช่วง 3-5 วันแรกของการหมัก ส่งผลให้ที่อุณหภูมิ 18 °C มีการใช้ไปของน้ำตาลในระบบน้อยที่สุด จึงทำให้ถึงแม้ว่าจะมีการสร้างน้ำตาลใน

อัตราที่ต่ำกว่าแต่เมื่อเป็นภาวะที่มีการใช้น้ำตาลที่ต่ำด้วยแล้วปริมาณน้ำตาลที่สะสมในระบบ (สาโท) ก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงด้วยค่าใกล้เคียงกันได้กับภาวะที่มีการสร้างน้ำตาลที่สูงกว่าแต่มีการใช้น้ำตาลที่สูงกว่า แต่หลังจากวันที่ 5 ของการหมักปริมาณน้ำตาลที่อยู่ในระบบที่อุณหภูมิหมัก 30 °C ลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีการใช้น้ำตาลในระบบไปกับการเจริญของเชื้อ (ที่อุณหภูมิ 30 °C ยีสต์เจริญได้ดีที่สุด) (Berry *et al.*, 1987) แตกต่างจากการหมักที่อุณหภูมิ 40 °C ที่น้ำตาลในระบบค่อนข้างคงที่ไปตลอด 16 วันของการทดลอง (ภาพที่ 4.1) และแตกต่างจากการหมักที่อุณหภูมิหมัก 30 °C ที่ระดับปริมาณน้ำตาลจะคงที่ต่อไปจนถึงวันที่ 8 ของการหมักแล้วจึงลดลงอย่างรวดเร็วอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 16 ของการหมัก ในขณะที่ปริมาณเอทานอลในสาโทซึ่งหมักที่อุณหภูมิหมัก 30 °C และ 40 °C เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในอัตราใกล้เคียงกับอัตราการผลิตแอลกอฮอล์ในช่วง 3-5 วันแรกของการหมักจนถึงวันที่ 8 ของการหมักแล้วสูงขึ้นไปสู่ค่าปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดด้วยอัตราการผลิตแอลกอฮอล์ที่ต่ำลงจนถึงวันที่ 12 ของการหมักได้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงที่สุดคือปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงที่สุดคือ 5.86, 6.49% ตามลำดับ แต่หลังจากวันที่ 12 ของการหมักอุณหภูมิ 30 °C และ 40 °C ปริมาณแอลกอฮอล์ในสาโทลดต่ำลง การที่ภาวะอุณหภูมิหมักที่ 30 °C และ 40 °C ให้ปริมาณแอลกอฮอล์ไม่แตกต่างกันในช่วง 3-8 วันแรก (ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ดูภาคผนวก จ.) แต่การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกันอย่างมากนั้น คาดว่าเมื่อระดับแอลกอฮอล์สูงขึ้นยีสต์ในกลุ่ม *S. fibuligera* ที่มีความสามารถทนต่อความเข้มข้นแอลกอฮอล์ที่ต่ำจะเริ่มตายลง (เจริญ เจริญชัย และคณะ, 2546) อัตราการสร้างเอนไซม์กลุ่ม Amylolytic enzyme จึงเริ่มเข้าสู่ภาวะคงตัว แต่ที่อุณหภูมิหมัก 30 °C เป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ (Reddy and Reddy, 2011) ยีสต์มีการใช้แหล่งพลังงาน (น้ำตาลรีดิวซ์) ไปกับการเจริญ และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสาโทที่หมักที่อุณหภูมิ 30 °C ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 5 ของการหมักแตกต่างไปจากการหมักที่อุณหภูมิ 40 °C ที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงที่

สำหรับที่อุณหภูมิ 18 °C ซึ่งเป็นภาวะที่มีอัตราการผลิตน้ำตาล แอลกอฮอล์ และการเพิ่มจำนวนของเซลล์จุลินทรีย์ต่ำ ระยะเวลาหมักที่ค่าความเข้มข้นแอลกอฮอล์สูงขึ้นจนถึงระดับที่คาดว่าจะทำให้ยีสต์ในกลุ่ม *S. fibuligera* เริ่มตายลง (ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์) คือวันที่ 8 ของการหมัก (นานกว่าระยะเวลาที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิหมัก 30 °C และ 40 °C ซึ่งอยู่ ณ วันที่ 5 ของการหมัก) จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลเริ่มลดต่ำลงในวันที่ 8 ของการหมัก และการที่ปริมาณแอลกอฮอล์ลดลงในช่วงท้ายของการหมักนั้นเนื่องจากแอลกอฮอล์ถูกใช้ไปสร้าง สารประกอบต่างๆเป็นองค์ประกอบของสาโท เช่น อะซิทัลดีไฮด์ และอะซิติกเอซิด เป็นต้น สารประกอบเหล่านี้เกิดจากการออกซิไดซ์เอทานอลโดยแบคทีเรียกรดน้ำส้ม นอกจากนี้เอซิติกเอซิดก็ยังสามารถถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นไฮเออร์แอลกอฮอล์ได้เช่นกัน โดยผ่าน Carbohydrate metabolism (Pietruszka, Pielech-Przybylska and Szopa, 2010) ซึ่งจะได้อธิบายละเอียดต่อไปในหัวข้อที่ 4.1.2 และ 4.1.3

4.1.2 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรด (Total acidity) ระหว่างการหมัก (เทียบในรูปของแลคติก)

ติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดโดยรวมในรูปของกรดแลคติก จากภาพที่ 4.4 จะเห็นว่าในช่วงแรกของการหมักระหว่างวันที่ 3 - 5 ปริมาณกรดโดยรวมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในทุก ๆ อุณหภูมิหมักและหลังจากนั้นเข้าสู่สภาวะคงตัว เนื่องจากว่าในช่วงแรกของการหมักจะมีการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียต่างๆที่ปนเปื้อนอยู่ในลูกแป้ง ซึ่งรวมถึงกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) ซึ่งจะสร้างกรดแลคติก และกรดต่างๆ เช่น กรดซิตริก กรดแอสติค เป็นต้น ทำให้ค่า pH ของระบบลดต่ำลงและเมื่อค่า pH ลดถึงระดับที่เหมาะสมต่อการทำงานของยีสต์ *S. cerevisiae* ประชากรของยีสต์ดังกล่าวนี้จะเพิ่มขึ้นและความเข้มข้นของเอทานอลในระบบจะสูงขึ้นซึ่งจะเป็นสภาวะที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก (Guillamón and Mas, 2011) จึงทำให้ค่า pH คงที่ นอกจากนี้พบว่าที่อุณหภูมิ 40°C มีปริมาณกรดโดยรวมสูงที่สุดคือ 0.69% และที่อุณหภูมิ 18°C มีปริมาณกรดโดยรวมต่ำที่สุดคือ 0.57% ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ueda และคณะ (1991) ที่ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิหมักต่อองค์ประกอบทางเคมีต่างๆใน red rice wine พบว่าปริมาณกรดโดยรวมจะสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิหมักสูงขึ้น และ Torija และคณะ (2003) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิหมักต่อองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ระหว่างการหมักไวน์องุ่นพบว่าที่อุณหภูมิหมักสูงขึ้นปริมาณกรดโดยรวมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 4.3 ปริมาณกรด (เปอร์เซ็นต์) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทที่อุณหภูมิ 18°C, 30°C และ 40°C

4.1.3 ผลการวิเคราะห์สารประกอบแอลดีไฮด์ และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ของสาโทที่หมักด้วย อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ณ วันสุดท้ายของการหมัก (วัน 16)

ณ วันสุดท้ายของการหมักที่อุณหภูมิหมัก 40 °C ให้ปริมาณของไอโซเอมิลแอลกอฮอล์สูงที่สุดคือ 88.88 มิลลิกรัม/ลิตร แตกต่างกับค่าที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 18 °C (44.07 มิลลิกรัม/ลิตร) แต่ไม่แตกต่างกับค่าที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 30 °C (76.20 มิลลิกรัม/ลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ปกติแล้วการสังเคราะห์ไฮเออร์แอลกอฮอล์โดยยีสต์จะเกิดประมาณ 0.1-0.7 % จากปริมาณเอทานอลที่ผลิตทั้งหมดและ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็นไฮเออร์แอลกอฮอล์ชนิดที่พบมากที่สุดในกลุ่มไฮเออร์แอลกอฮอล์ทั้งหมดที่พบในไวน์ คิดเป็นสัดส่วนมากถึงประมาณ 60-80 % ของไฮเออร์แอลกอฮอล์ในไวน์ (Lachenmeier *et al.*, 2008) สำหรับปริมาณของอะซีทัลดีไฮด์ที่พบในสาโทที่หมักด้วยอุณหภูมิหมักต่าง ๆ กันพบว่า ณ วันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 16) ที่อุณหภูมิหมัก 18 °C มีปริมาณของอะซีทัลดีไฮด์ต่ำที่สุด คือ 80.39 มิลลิกรัม/ลิตร แตกต่างกับค่าที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 30 °C (147.60 มิลลิกรัม/ลิตร) แต่ไม่แตกต่างกับค่าที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 40 °C (99.64 มิลลิกรัม/ลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาผลของอุณหภูมิ (ระหว่างช่วง 15 °C - 35 °C) ที่มีต่อปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ แล อะซีทัลดีไฮด์ในไวน์แดงพบว่า ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิต่ำคือ 15 °C นั้นมีปริมาณน้อยกว่าไวน์แดงที่หมักที่อุณหภูมิ 30 °C และ 35 °C ในขณะที่ปริมาณอะซีทัลดีไฮด์ที่อุณหภูมิ 30 °C นั้นสูงที่สุด (Ueda *et al.*, 1991) นอกจากนี้ Murray และคณะ (1990) พบว่าที่อุณหภูมิ 30 °C ยีสต์กลุ่ม Methylotrophic yeast ที่สามารถใช้แอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอนและผลิตสารกลุ่มอะซีทัลดีไฮด์ได้จะมีอัตราการสร้างอะซีทัลดีไฮด์ที่สูงกว่าการหมักที่ 40 °C สำหรับผลการทดลองที่อุณหภูมิหมักที่ 18 °C มีอะซีทัลดีไฮด์ในปริมาณที่ต่ำกว่าทุกอุณหภูมิหมักนั้นเนื่องจากที่อุณหภูมิหมักที่ 18 °C มีปริมาณเอทานอลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนของยีสต์กลุ่ม Methylotrophic yeast ต่ำที่สุด แต่อย่างไรก็ตามสาโทที่ผลิตได้จากทั้ง 3 อุณหภูมิหมักนั้นยังคงมีปริมาณของอะซีทัลดีไฮด์อยู่ในมาตรฐานของกฎหมายกำหนด (มอก. 2089-2554) คือไม่เกิน 160 มิลลิกรัม/ลิตร (ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย และ พัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2548)

ตารางที่ 4.1 ผลของอุณหภูมิหมักต่อปริมาณ สารประกอบแอลดีไฮด์ และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในสาโท ณ วันสุดท้ายของ การหมัก

| อุณหภูมิหมัก | อะซีทัลดีไฮด์ (มก./ล.) | ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (มก./ล.) |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 18 °C | 80.39 ^b ± 13.08 | 44.07 ^b ± 6.31 |
| 30 °C | 147.58 ^a ± 13.96 | 76.20 ^a ± 12.90 |
| 40 °C | 99.63 ^b ± 17.53 | 88.88 ^a ± 4.61 |

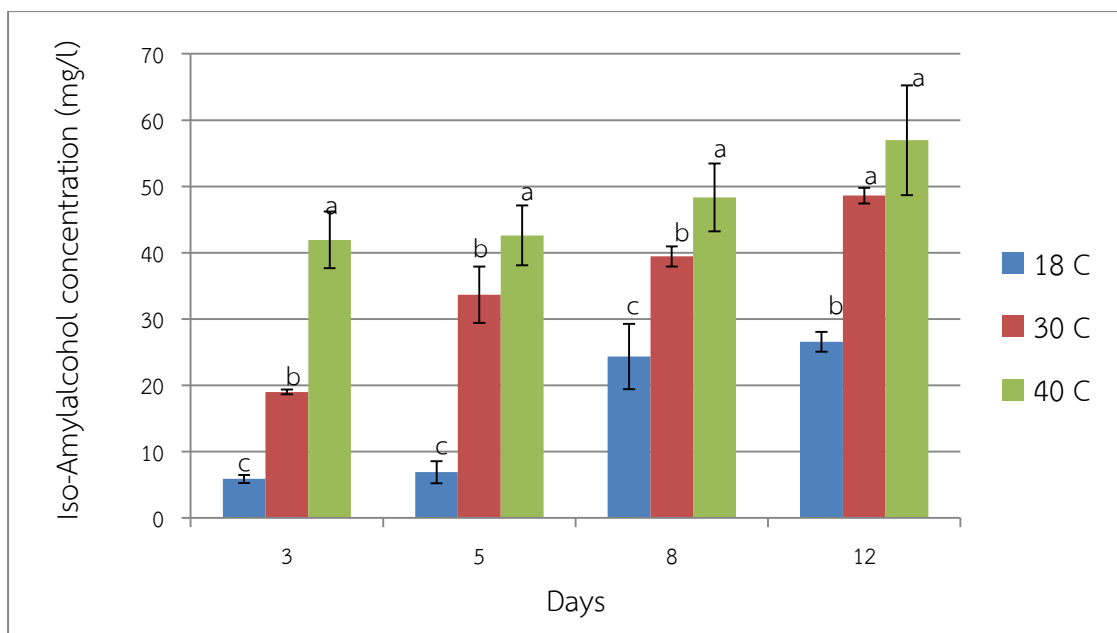
หมายเหตุ: a,b,...ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวแนวนอนตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

4.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิหมักที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบแอลดีไฮด์ และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ตลอดระยะเวลาหมักสาโท

ในการหมักสาโทเพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาในหัวข้อนี้ได้ใช้วิธีการหมักเช่นเดียวกับที่ปฏิบัติในหัวข้อ 4.1 แต่ได้เปลี่ยนปริมาณของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเป็นใช้ข้าวเหนียวหนึ่ง 280 กรัม ต่อลูกแป้งสุรา 14 กรัม ผ่านน้ำปริมาตร 420 มิลลิลิตร และเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณสาโทเพียงพอต่อการนำไปหาความเข้มข้นสารประกอบแอลดีไฮด์ และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ รวมถึงนำไปใช้หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในหัวข้อ 4.3

4.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ระหว่างกระบวนการหมักสาโท

จากภาพที่ 4.5 ผลการทดลองการหมักเป็นเวลา 3-8 วัน พบว่า การหมักที่อุณหภูมิ 40°C มีอัตราการสร้างไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ที่สูงและมีปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) มีค่าอยู่ระหว่าง 41.93 – 48.36 มิลลิกรัม/ลิตร ตามด้วยการหมักที่อุณหภูมิ 30°C ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 18.99 – 39.44 มิลลิกรัม/ลิตร และ 18°C ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 5.88 – 24.34 มิลลิกรัม/ลิตรตามลำดับ ส่วนการหมักเป็นเวลา 12 วันพบว่า การหมักที่อุณหภูมิ 40°C มีปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์สูงที่สุด (56.96 มิลลิกรัม/ลิตร) แต่ไม่แตกต่างกับการหมักที่อุณหภูมิ 30°C (48.61 มิลลิกรัม/ลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ส่วนการหมักที่อุณหภูมิ 18°C มีปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ต่ำที่สุด (26.56 มิลลิกรัม/ลิตร) จะเห็นได้ว่าการหมักที่อุณหภูมิ 40°C ให้ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์สูงที่สุด นอกจากนี้ยังให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดด้วย ดังภาพที่ 4.2 โดยผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lachenmeier และคณะ (2008) ที่รายงานว่า การสร้างไฮเออร์แอลกอฮอล์จะเกิดควบคู่ไปกับการสร้างเอทานอลโดยยีสต์ และมักจะมีรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงปริมาณความเข้มข้นไปในทิศทางเดียวกัน



ภาพที่ 4.4 ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (มิลลิกรัม/ลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทที่อุณหภูมิ 18 °C, 30 °C และ 40 °C

หมายเหตุ: a,b,c...ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวแนวนั่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

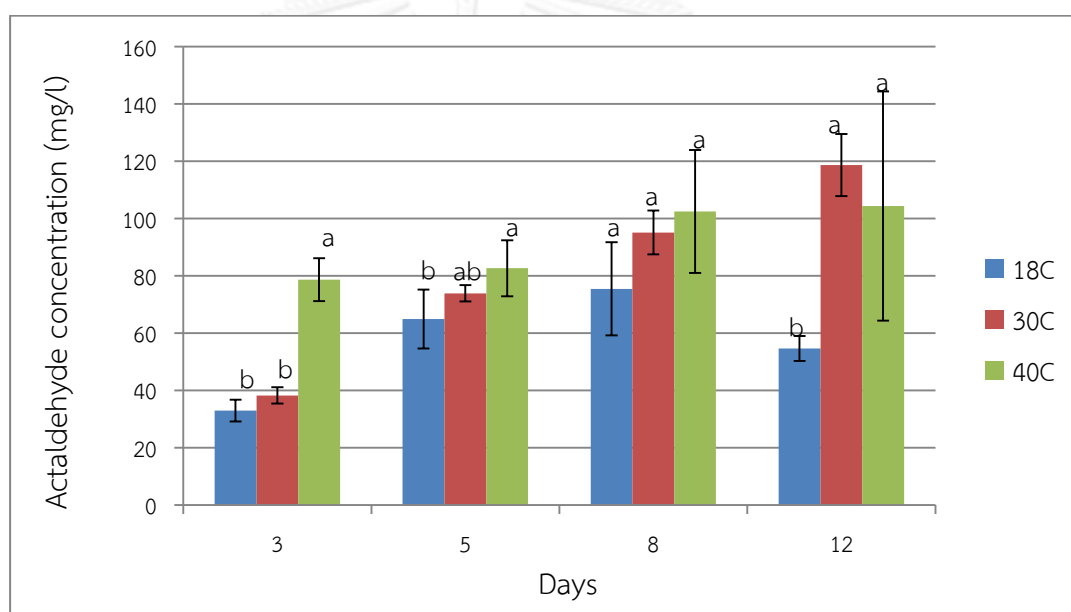
4.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการประกอบแอลดีไฮด์ระหว่างกระบวนการหมักสาโท

จากผลการทดลองดังภาพที่ 4.6 พบว่าการหมักตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 12 ของการหมักที่อุณหภูมิ 18 °C, 30 °C และ 40 °C ให้ปริมาณอะซีทัลดีไฮด์อยู่ในช่วง 32.96 – 75.44, 38.23 – 118.63 และ 78.65 – 104.33 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยการหมักเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 18 °C และ 30 °C ให้ปริมาณอะซีทัลดีไฮด์ต่ำสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการหมักที่อุณหภูมิ 40 °C ($P \leq 0.05$) เมื่อทำการหมักต่อเป็นเวลา 5 วัน พบว่าการหมักที่อุณหภูมิ 18 °C ยังคงให้ปริมาณอะซีทัลดีไฮด์ต่ำที่สุดแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 °C ($P > 0.05$) และการหมักที่อุณหภูมิ 40 °C ให้ปริมาณอะซีทัลดีไฮด์สูงสุด ส่วนการหมักเป็นเวลา 8 วัน พบว่าการหมักที่อุณหภูมิ 18 °C ให้ปริมาณอะซีทัลดีไฮด์ต่ำสุดแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 °C และ 40 °C และการหมักเป็นเวลา 12 วัน ที่อุณหภูมิ 18 °C ยังคงให้ปริมาณอะซีทัลดีไฮด์ต่ำสุดเช่นกัน จะเห็นได้ว่าตลอดระยะเวลาที่ทำการหมักนั้น การหมักที่อุณหภูมิต่ำทำให้ได้ปริมาณอะซีทัลดีไฮด์ต่ำไปด้วย

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ueda และคณะ (1991) ที่ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิหมักในช่วง 20-35 °C ต่อปริมาณอะซีทัลดีไฮด์ในไวน์แดง และพบว่าการหมักที่อุณหภูมิต่ำมีแนวโน้มของการสร้างอะซีทัลดีไฮด์ต่ำกว่าที่อุณหภูมิสูง

การหมักที่อุณหภูมิ 30 °C มีค่าเฉลี่ยของอัตราการสร้างอะซีทัลดีไฮด์ตลอดระยะเวลาหมักสูงที่สุดคือ 8.04 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน ซึ่งสูงกว่าที่อุณหภูมิ 40 °C คือ 2.57 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน และสูงกว่าที่ 18 °C คือ 7.08 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน (วันที่ 3-8) ตามลำดับโดยในวันที่ 3 ของการหมักมีปริมาณ

อะซีทัลดีไฮด์เริ่มต้นอยู่ในระดับเดียวกับค่าที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 18 °C และมีค่าต่ำกว่าการหมักที่อุณหภูมิ 40 °C และเมื่อทำการหมักเป็นเวลา 12 วันพบว่าปริมาณอัลดีไฮด์ที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 30 °C เพิ่มขึ้นจากการหมักที่อุณหภูมิ 18 °C และเพิ่มขึ้นสูงกว่าการหมักที่อุณหภูมิ 40 °C แต่อย่างไรก็ตาม ค่าที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 30 °C และ 40 °C ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ผลการทดลองที่ได้สนับสนุนงานวิจัยของ Murray และคณะ (1990) ที่พบว่า Methylophilic yeast ที่ผลิตสารกลุ่มอะซีทัลดีไฮด์ออกมาได้นั้น ที่ภาวะอุณหภูมิ 30 °C จะให้อัตราการสร้างอะซีทัลดีไฮด์สูงกว่าที่ภาวะอุณหภูมิ 40 °C เล็กน้อย และจากการติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารประกอบแอลดีไฮด์ในสาโทระหว่างกระบวนการหมักจากทั้ง 3 อุณหภูมิพบว่า ปริมาณของอะซีทัลดีไฮด์อยู่ในมาตรฐานของกฎหมาย (มอก. 2089-2554) ตลอดระยะเวลาการหมักคือไม่เกิน 160 มิลลิกรัม/ลิตร



ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณอะซีทัลดีไฮด์ (มิลลิกรัม/ลิตร) ในระหว่างการหมักสาโทที่อุณหภูมิ 18 °C, 30 °C และ 40 °C

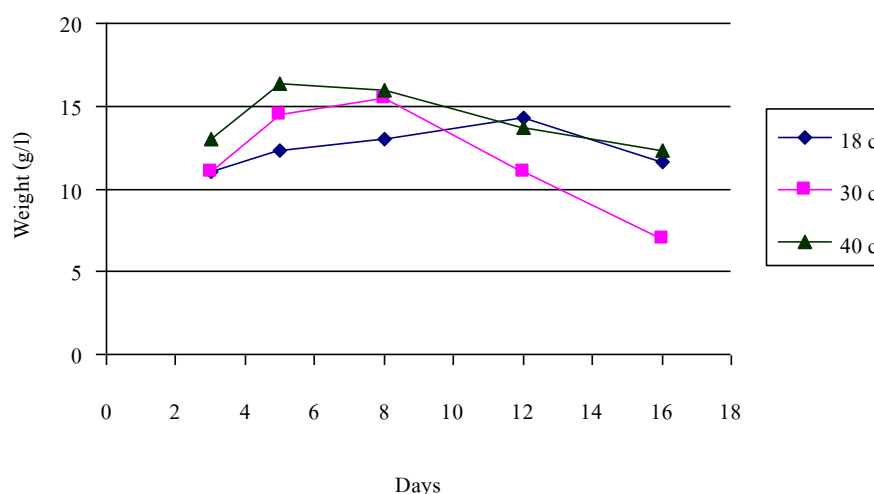
หมายเหตุ: a,b,c...ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวแนวนอนตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักรวมเซลล์แห้งระหว่างการหมัก

ติดตามน้ำหนักรวมเซลล์แห้งของจุลินทรีย์แสดงด้วยหน่วยกรัมเซลล์แห้งต่อปริมาตรสาโท 1 ลิตร (กรัม/ลิตร) จากภาพที่ 4.6 ที่อุณหภูมิหมัก 30 °C มีการเพิ่มของน้ำหนักรวมเซลล์อย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 3-8 ของการหมัก โดยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3-5 ของการหมักด้วยอัตราเท่ากับ 1.67 กรัม/ลิตร/วัน ซึ่งสูงกว่าการหมักที่อุณหภูมิหมัก 40 °C คือมีอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักรวมเซลล์แห้งเท่ากับ 1.1 กรัม/ลิตร/วัน แต่ที่ภาวะหมัก 30 °C การเพิ่มของน้ำหนักรวมเซลล์คงมีต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 8 ของการหมักและเริ่มลดลงอย่างรวดเร็วหลังวันที่ 8 ของการหมัก โดยระหว่างวันที่ 8-16 ของการหมักมีอัตราการลดลงของน้ำหนักรวมเซลล์แห้งสูงสุด คือเท่ากับ 0.94 กรัม/ลิตร/วัน แตกต่างจากการหมักที่

อุณหภูมิ 40 °C ที่น้ำตาลในระบบค่อยๆลดลงในอัตราที่ต่ำกว่า โดยมีอัตราการลดลงของน้ำหนักรเซลล์แห้งระหว่างวันที่ 8-16 ของการหมักเท่ากับ 0.41 กรัม/ลิตร/วัน แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 30 °C มีการใช้แหล่งพลังงาน (น้ำตาลรีดิวซ์) ไปกับการเจริญและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (ที่อุณหภูมิ 30 °C ยีสต์เจริญได้ดีที่สุด) (Berry *et al.*, 1987) เมื่อจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นจนน้ำตาลในระบบไม่เพียงพอ ประกอบกับปริมาณเอทานอลในระบบที่เพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 4.2) ส่งผลให้เซลล์เริ่มตายลงและน้ำหนักรเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 8-16 ของการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาพที่ 4.1) ที่อุณหภูมิ 30 °C ระหว่างวันที่ 3-12 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็ว

สำหรับที่อุณหภูมิ 18 °C ซึ่งเป็นภาวะที่มีอัตราการผลิตน้ำตาล แอลกอฮอล์ และการเพิ่มจำนวนของเซลล์จูลินทรีย์ต่ำ (ระหว่างวันที่ 3-5 ของการหมักมีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักรเซลล์แห้งอยู่ที่ 0.44 กรัม/ลิตร/วัน) ระยะเวลาหมักที่ค่าความเข้มข้นแอลกอฮอล์สูงขึ้นจนถึงระดับที่คาดว่าจะทำให้ยีสต์ในกลุ่ม *S. fibuligera* เริ่มตายลง (ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์) คือวันที่ 7 ของการหมัก (นานกว่าระยะเวลาที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิหมัก 30 °C และ 40 °C ซึ่งอยู่ ณ วันที่ 5 ของการหมัก) จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลเริ่มลดต่ำลงในวันที่ 8 ของการหมัก (ภาพที่ 4.1) แต่ที่น้ำหนักรเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 12 ของการหมักนั้น (ภาพที่ 4.6) เนื่องมาจากการเพิ่มของประชากรยีสต์กลุ่ม *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ผลิตแอลกอฮอล์ที่มีความทนต่อความเข้มข้นแอลกอฮอล์ที่สูงกว่า โดยที่ 18 °C ตั้งแต่วันที่ 12 ถึงวันที่ 16 ของการหมักมีอัตราการลดลงของน้ำหนักรเซลล์แห้งที่ 0.53 กรัม/ลิตร/วัน



ภาพที่ 4.6 น้ำหนักรเซลล์แห้งของจูลินทรีย์ (กรัม/ลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโท ที่อุณหภูมิ 18 °C, 30 °C และ 40 °C

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ลำดับอิทธิพลของอุณหภูมิหมักที่มีต่อการให้ปริมาณเอทานอลในสาโทโดยเรียงลำดับจากที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงไปต่ำ ณ วันที่ 12 ของการหมัก เป็นดังนี้คืออุณหภูมิหมักที่ 40 °C, 30 °C และ 18 °C ให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 6.49, 5.86 และ 4.53% ตามลำดับ และลำดับของอุณหภูมิหมักที่มีต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเรียงลำดับจากที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงไปต่ำ ณ วันที่ 16 ของการหมักคืออุณหภูมิหมักที่ 40, 18 และ 30 °C โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.51, 1.64 และ 1.26 มก./มล. ตามลำดับ ตลอดระยะเวลาหมัก 16 วันอุณหภูมิหมักที่ให้ปริมาณกรดโดยรวมในสาโทเรียงลำดับตามที่ให้ปริมาณกรดสูงไปต่ำได้ดังนี้คืออุณหภูมิหมักที่ 40, 30 และ 18 °C โดยให้ปริมาณกรดโดยรวมอยู่ในช่วง 0.09-0.69, 0.13-0.5 และ 0.23-0.53% ตามลำดับ ณ วันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 16) อุณหภูมิหมักที่ให้ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในสาโทสูงเรียงลำดับจากสูงไปต่ำคือ 40, 30 และ 18 °C โดยให้ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เท่ากับ 88.88, 76.20 และ 44.07 มก./ล. ตามลำดับ ส่วนอิทธิพลของอุณหภูมิหมักที่มีต่อการให้ปริมาณอะซิทิลไฮดริโนในสาโท ณ วันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 16) เรียงลำดับจากที่ให้ปริมาณปริมาณอะซิทิลไฮดริโนจากสูงไปต่ำคือ 30, 40 และ 18 °C โดยให้ปริมาณปริมาณอะซิทิลไฮดริโนเท่ากับ 147.58, 99.63 และ 80.39 มก./ล. ตามลำดับ และตลอดระยะเวลาหมัก 12 วันปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ที่ตรวจพบในสาโทที่หมักที่อุณหภูมิ 40 °C มีค่าสูงที่สุดอยู่ในช่วง 41.93-56.96 มก./ล. รองลงมาคือที่สาโทที่หมักที่อุณหภูมิ 30 °C มีปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์อยู่ในช่วงระหว่าง 18.99-48.61 มก./ล. และต่ำสุดที่อุณหภูมิหมัก 18 °C มีปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์อยู่ในช่วง 5.88-26.56 มก./ล. และสำหรับอิทธิพลของอุณหภูมิหมักที่มีผลต่อปริมาณอะซิทิลไฮดริโนตลอดระยะเวลาหมักสาโท พบว่าที่อุณหภูมิหมัก 30 °C มีค่าอัตราเฉลี่ยการสร้างอะซิทิลไฮดริโนตลอดระยะเวลาหมักสูงที่สุดคือคือ 8.04 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน โดยมีความเข้มข้นตลอดระยะเวลาหมักอยู่ในช่วง 38.23-118.63 มก./ล. และการหมักที่อุณหภูมิ 40 °C ได้ค่าความเข้มข้นอะซิทิลไฮดริโนในช่วง 78.65-104.33 มก./ล. และที่อุณหภูมิหมัก 18 °C ให้ค่าความเข้มข้น อะซิทิลไฮดริโนต่ำที่สุดอยู่ในช่วง 32.96-75.44 มก./ล. จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท พบว่าที่อุณหภูมิหมักที่ 30 °C ระหว่างวันที่ 3-5 ของการหมักให้อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 1.67 กรัม/ลิตร/วัน และให้อัตราการลดลงของน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดในช่วงระยะเวลาหมักระหว่างวันที่ 8-16 คือ 0.94 กรัม/ลิตร/วัน และในช่วงระยะเวลาหมักเดียวกันนี้คือระหว่างวันที่ 3-5 ของการหมักอุณหภูมิหมัก 40 °C ให้อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งรองลงมาคือ 1.1 กรัม/ลิตร/วัน และระหว่างวันที่ 8-16 ของการหมักอุณหภูมิหมัก 40 °C ให้อัตราการลดลงของน้ำหนักเซลล์แห้งรองลงมา คือ 0.41 กรัม/ลิตร/วัน และที่อุณหภูมิหมักที่ 18 °C ระหว่างวันที่ 3-5 ของการหมักให้อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้งต่ำที่สุดคือ 0.44 กรัม/ลิตร/วัน และเริ่มมีการลดลงของน้ำหนักเซลล์แห้งต่ำที่สุดคือน้ำหนักเซลล์แห้งจะเริ่มลดลงตั้งแต่วันที่ 12 และลดลงไปตลอดจนถึงวันที่ 16 ของการหมักโดยมีอัตราการลดลงของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ 0.53 กรัม/ลิตร/วัน

รายการอ้างอิง

- กฤษฎา ขุนแหลม. 2542. ปัญหาพิเศษเรื่องการศึกษาประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- กฤษณี ไกรธรรมจิตกุล. 2547. การศึกษาปัจจัยของสายพันธุ์ข้าวที่มีต่อกลิ่นและรสชาติของสาโทซึ่งผลิตจากข้าวเหนียวดำ เปรียบเทียบกับการผลิตจากข้าวเหนียวขาว. โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- จริยา เดชกฤษ และดวงฤทัย อ่างโชติ. 2546. สาโท. กรุงเทพฯ: บริษัทสยามการพิมพ์จำกัด. 120 น.
- เจริญ เจริญชัย และคณะ. 2546. เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตรการผลิตสุราพื้นบ้านสำหรับผู้ประกอบการ. ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมและเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล จ. ปทุมธานี และสมาคมผู้ผลิตไวน์ผลไม้และสุราพื้นบ้านไทย.
- เทพปัญญา เจริญรัตน์. 2554. Cell cultures and Bioreactors. ราชเทวี กรุงเทพฯ สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย: 269.
- นภา โล่ห์ทอง. 2535. กล้าเชื้อหมักและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพฯ: ฟีนีเพล็บิซซิ่ง.
- นุชรี อ่อนพร้อม. 2547. ปัจจัยของสายพันธุ์ข้าวที่มีต่อกลิ่นและรสชาติของสาโท ซึ่งผลิตจากข้าวหอมนิล เปรียบเทียบกับการผลิตจากข้าวเหนียวขาว. โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พรพิมล คงวรรณสุ. 2548. ผลของพันธุ์และระดับการขัดสีข้าวต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีระหว่างการหมักไวน์ข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ไพบุลย์ ด่านวิรุทัย และพัฒนา เหล่าไพบุลย์. 2548. ไวน์ผลไม้และสาโท ผลิตด้วยความมั่นใจได้อย่างไร. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา: 8-263.
- มนตรี เชาว์สังเกต. 2521. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และราเพื่อใช้ในการผลิตไวน์ข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2547. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่อง “การผลิตหัวเชื้อลูกแป้งสาโท” ณ ห้องประชุมชั้น 1 อาคารวิจัยและพัฒนา 1 เทคโนโลยีคลองห้า จ. ปทุมธานี วันที่ 30 พฤษภาคม 2547.
- สุพัฒน์ กุมพิทักษ์ และกำพล กาหลง. 2545. กรรมวิธีผลิต อู สาโท น้ำตาลเมา และเหล้ากลั่น, เกษตรกรรมธรรมชาติ, ฉบับที่ 8/2545. กรุงเทพฯ: ฐานการพิมพ์: 15.
- สุภมาส ไข่คำ. 2544. การศึกษาคุณภาพของสุรากลั่นพื้นบ้านที่ผลิตในเขตภาคเหนือตอนบน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่: 7-8, 18-19, 21, 23-26.
- สุมลลิกา โมรากุล. 2545. การพัฒนากรรมวิธีการผลิตไวน์ข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- อภิชนา เตชะวสีณูญ. 2550. การแยก จำแนก และลักษณะสมบัติของยีสต์และราในลูกแป้งสุรา เพื่อการผลิตสาโท. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Amerine, M. A., Ough, G. S., and Singleton, V. L. 1979. **The Technology of Wine Making 4th ed:** Westport Connecticut : AVI.
- Berry, D. R., Russell, I., and Stewart, G. G. 1987. **Yeast Biotechnology.** London: Allen and Urwin.
- Boulton, B. R., Singleton, L. V., Bisson, F. L., and Kunkee, E. R. 1996. **Principles and Practices of Winemaking.** New York: Chapman & Hall.
- Chi, Z., Liu, G., Wang, F., Ju, L., and Zhang, T. 2009. *Saccharomyces fibuligera* and its Applications in Biotechnology. **Journal of Biotechnology Advances**, 27(5): 423-431.
- Delfini, C., and Formica, J. V. 2001. **Wine Microbiology Science and Technology.** New York: Pekker.
- Gašperik, J., Kováč, L., and Mináriková, O. 1991. Purification and Characterization of the Amylolytic Enzymes of *Saccharomyces fibuligera*. **Journal of Biochemistry**, 23(1): 21-25.
- Guillamón, M. J., and Mas, A. 2011. **Molecular Wine Microbiology:** ELsevier, 227-250.
- Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M., and 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.
- Hazelwood, L. A., Daran, J.-M., van Maris, A. J., Pronk, J. T., and Dickinson, J. R. 2008. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, 74: 2259-2266.
- Jackson, R. S. 2000. **Wine Science: Principle, Practice, Perception. 2nd ed:** USA: Academic Press.
- Juliano, B. O. 1972. The Rice Caryopsis and its Composition. In D.F.Houston (ed.). **Rice chemistry and Technology.** American association of cereal Sci. **Today**, 16: 334-340.
- Killian, E., and Ough, C. 1979. Fermentation Esters—Formation and Retention as Affected by Fermentation Temperature. **American Journal of Enology and Viticulture**, 30: 301-305.

- Lachenmeier, D. W., Haupt, S., and Schulz, K. 2008. Defining Maximum Levels of Higher Alcohols in Alcoholic Beverages and Surrogate Alcohol Products. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 50: 313-321.
- Miller, G. L. 1959. Use of Dinitro Salicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, 31: 426-428.
- Murray, W. D., Duff, S. J., and Lanthier, P. H. 1990. Biological Upgrading of Dilute Ethanol Streams to Acetaldehyde for Low-Temperature Recovery. **Biomass**, 23: 229-239.
- Pietruszka, M., Pielech-Przybylska, K., and Szopa, S. J. 2010. Synthesis of Higher Alcohol during Alcoholic Fermentation of Rye Marshes. **Food Chemistry and Biotechnology**, 74(1081): 51-64.
- Querol, A., and Fleet, G. 2006. **Yeast in Food and Beverages 2nd ed.** Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Rapp, A., and Mandery, H. 1986. Wine aroma. **Experientia**, 42: 873-884.
- Reddy, L., and Reddy, O. 2011. Effect of Fermentation Conditions on Yeast Growth and Volatile Composition of Wine produced from Mango (*Mangifera indica* L.) Fruit Juice. **Food and Bioproducts Processing**, 89: 487-491.
- Reed, G., and Nagodawithana, T. W. 1991. **Yeast Technology**. New York: Van Nostrand Reinhol Publishing.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., and Lonvaud, A. 2000. **Handbook of Enology, The Microbiology of Wine and Vinifications**. Chicheter: John Wiley & Sons.
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., and Manzanares, P. 2001. Studies on Acetate Ester Production by Non- *Saccharomyces* Wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, 70: 283-289.
- Rose, A. H. 1977. **Economic Microbiology**. London: Academic Press Inc.
- Saerens, S. M., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J., and Thevelein, J. M. 2010. Production and Biological Function of Volatile Esters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Biotechnology**, 3: 165-177.
- Sirisantimethakom, L., Laopaiboon, L., Thanonkea, P., Danviruthai, P., and Laopaiboon, P. 2005. **Volatile, Acid and Glycerol Components of Sato**. Proceeding of 1st international conference on fermentation for value added agricultural products. Khon Kean, Thailand : Fermentation for value added agricultural products (FerVAAP), Khonkean University.
- Torija, M. J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., and Mas, A. 2003. Effects of Fermentation Temperature on the Strain Population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, 80: 47-53.

- Ueda, S., Teramoto, Y., Saigusa, N., Ueki, T., Ohba, R., and Yoshizawa, K. 1991. Effects of Rice Bran Lipids and Fermentation Temperatures on the Characteristics of Aromatic Red Rice Wine. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 72: 221-223.
- Yoshioka, K., and Hashimoto, N. 1983. Cellular Fatty Acid and Ester Formation by Brewer's Yeast. **Agricultural and Biological Chemistry**, 47: 2287-2294.
- Yoshizawa, K. 1985. Rice in brewing, In B.O. Juliano (ed.). **Rice Chemistry and Technology**. Minnesota: The American Association of Cereal Chemists Inc: 619-645.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไวน์ข้าว

ก.1 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดย DNS- method (Miller, 1959)

อุปกรณ์

1. อ่างน้ำร้อน (Water bath)
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, spectronic รุ่น Genesys)

สารเคมี

1. DNSA reagent

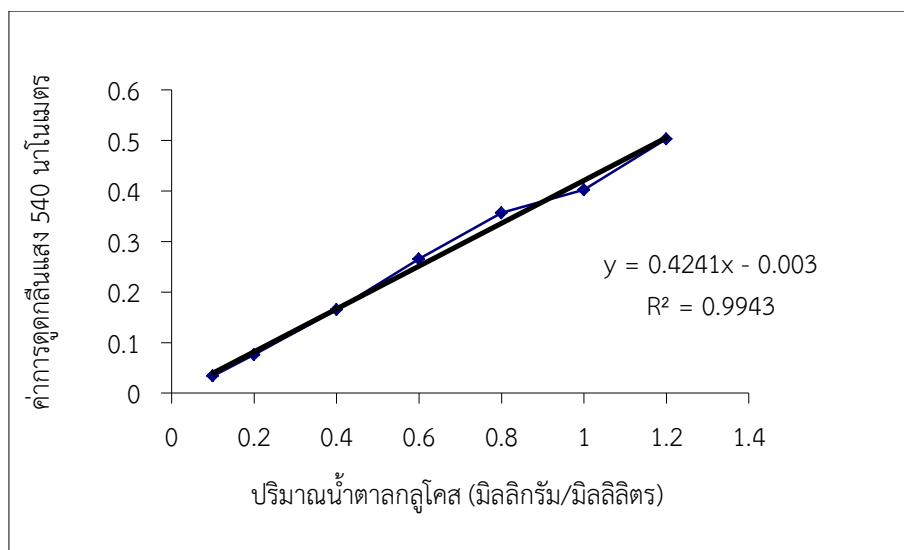
ละลาย 3, 5 - ไดไนโตรซาลิซิลิก แอซิด จำนวน 20 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาณ 500 มิลลิลิตร ค่อยๆเติมสารละลายต่าง (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 32 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร) คนให้สารละลายเข้ากันโดยอ่างน้ำร้อนจนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงเติม potassium sodium tartrate ลงไปที่ละน้อยจนครบ 600 กรัม คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงในสารผสมทั้งหมดจนปริมาตรครบ 2000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา และเก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นระหว่าง 0.1-1.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ดูดสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย DNSA จำนวน 2 มิลลิลิตร
3. ต้มในน้ำเดือด 5 นาที
4. ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร
5. สำหรับ blank ทำได้โดยดูต้นน้ำกลั่นจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DNSA จำนวน 2 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร
6. เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 540 นาโนเมตร
7. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)



ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

1. ดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย DNSA จำนวน 2 มิลลิลิตร
3. ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที
4. ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 540 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคส

ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Titration Acidity) (Amerine and Ough, 1979)

สารเคมี

1. Phenolphthalein เตรียมโดยการผสม ethanol 95 % จำนวน 60 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร แล้วใส่ phenolphthalein 1 กรัม

วิธีการวิเคราะห์

1. ตูดสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 95 มิลลิลิตร
2. ไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N โดยใช้ phenolphthalein เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 มิลลิลิตร จนได้สารละลายสีชมพูอ่อน
3. อ่านค่าปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต

$$\% \text{ TA (g/ 100 ml. Lactic acid)} = \frac{V \times N \times 90 \times 100}{1000 \times v}$$

V = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต

N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นนอร์มัล (N)

v = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร) = 5 มิลลิลิตร

90 = มวลโมเลกุลของกรดแลคติก

ภาคผนวก ข

วิเคราะห์ปริมาณ เอทานอล สารประกอบแอลดีไฮด์ และ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ข. 1 การเตรียมตัวอย่าง

อุปกรณ์

นำตัวอย่างน้ำสาโทไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วหมุนเหวี่ยง 5000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที บรรจุส่วนใสที่ได้ลงขวด vial ขนาด 10 มล. ที่ปิดฝาสนิทด้วย Crimper Seals แล้วนำไปแช่เย็นที่ 4 °C เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์

ข. 2 การวิเคราะห์เอทานอล สารประกอบแอลดีไฮด์ และ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

อุปกรณ์

1. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ประกอบด้วย GC – 6890 ยี่ห้อ Agilent, Flame ionization detector (FID), HP-Innowax column ขนาด 29.8 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร x 0.25 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Agilent
2. ไซริง (Syringe) ขนาด 10 ไมโครลิตร

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐาน (Standard Mixtures) ประกอบด้วย อะซีทัลดีไฮด์ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เอทานอล เตรียมสารละลายมาตรฐานของอะซีทัลดีไฮด์ให้ได้ความเข้มข้น 50, 70, 90, 110 และ 130 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐานของไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ให้ได้ความเข้มข้น 50, 60, 70, 80 และ 90 มิลลิกรัมต่อลิตร และเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลให้ได้ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7, 9, 11 และ 14 เปอร์เซ็นต์
2. ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

วิธีการวิเคราะห์

การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. นำสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ มาบรรจุลงขวด vial ขนาด 1 มิลลิลิตรที่ปิดฝาสนิทด้วย crimber
2. ฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี ที่สภาวะดังนี้

ชนิดของ Column Capillary column ชนิด HP-Innowax ขนาด 30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร x 0.25 ไมโครเมตร

Packing material คือ PEG (Polyethylene glycol)

ชนิดของ Detector Flame ionization (FID)

อุณหภูมิของ Column เริ่มต้นที่ 35 องศาเซลเซียส 3 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น

80 องศาเซลเซียส ในอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที

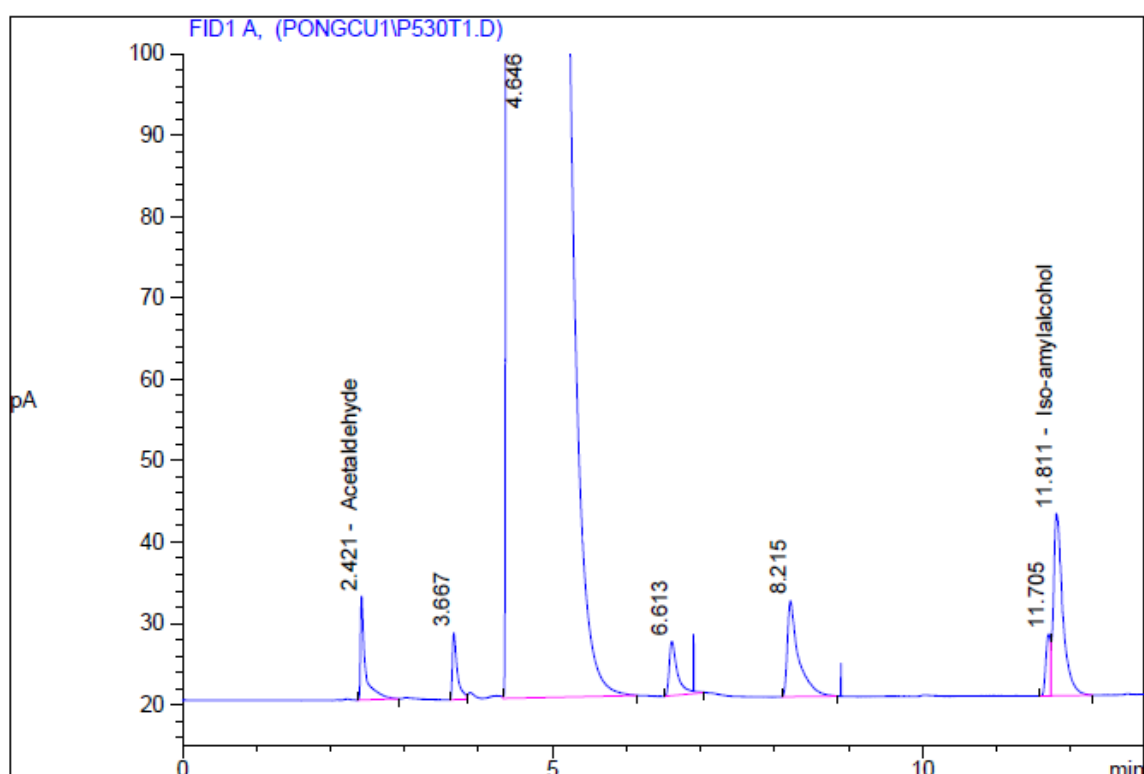
แล้วเพิ่มเป็น 200 องศาเซลเซียส ในอัตรา 30 องศาเซลเซียสต่อ นาที

| | |
|-----------------------|------------------------------------|
| อุณหภูมิของ Injection | 200 องศาเซลเซียส |
| อุณหภูมิของ Detector | 240 องศาเซลเซียส |
| Carrier gas | He อัตราการไหล 45 มิลลิลิตรต่อนาที |
| ปริมาตรฉีด | 1 ไมโครลิตร |

3. หาคความสัมพันธ์ (เชิงเส้นตรง) ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากโครมาโตแกรมกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ใช้ฉีด ได้เป็นกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณสารตัวอย่างในสาโท

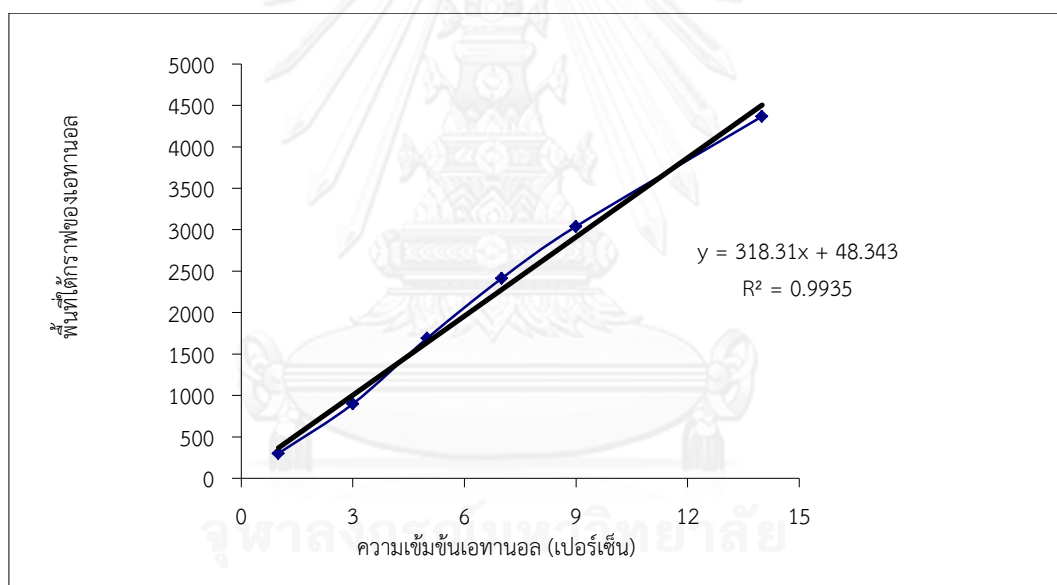
- นำสารตัวอย่างที่ได้บรรจุลงขวด vial ที่ปิดสนิทด้วย crimber seal
- เขย่าสารให้เข้ากัน และฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี
- คำนวณหาปริมาณ อะซิทัลดีไฮด์ เอทานอล และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในตัวอย่างจากโดยใช้พื้นที่ใต้รูปในโครมาโตแกรมที่ได้และกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ ข.1 โครมาโทแกรมของตัวอย่างสาโท แสดง retention time ของสารอะซิทัลดีไฮด์ และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (2.421, อะซิทัลดีไฮด์; 11.811, ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์)

ตารางที่ ข.1 ความเข้มข้นของเอทานอล (เปอร์เซ็นต์) และพื้นที่ใต้กราฟเอทานอล

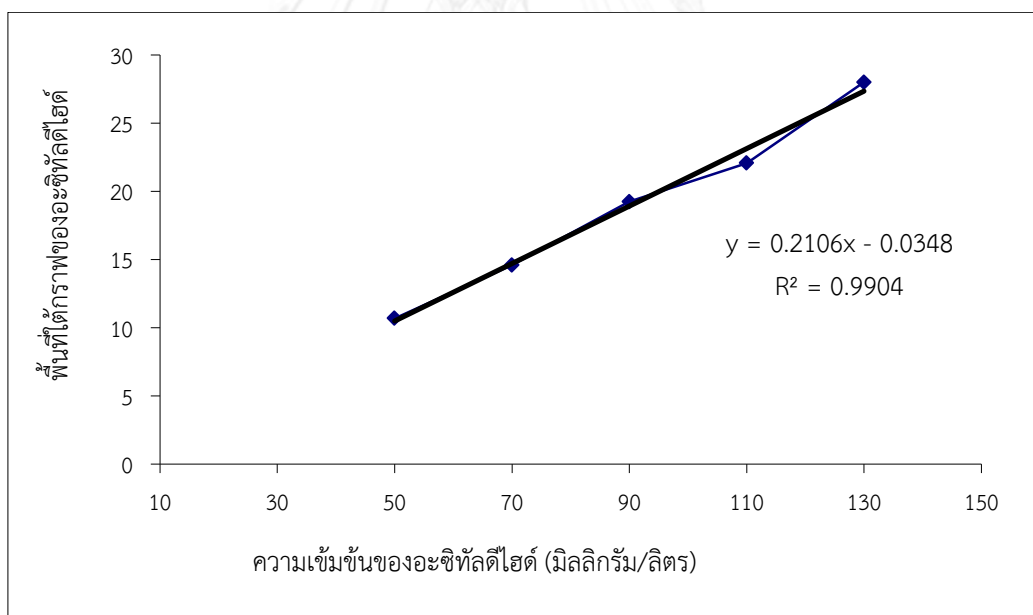
| ความเข้มข้นของเอทานอล (%) | พื้นที่ใต้กราฟของเอทานอล | ความเข้มข้นของเอทานอล (%) | พื้นที่ใต้กราฟของเอทานอล |
|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 1 | 300.265 | 7 | 2410.809 |
| 3 | 897.796 | 9 | 3039.246 |
| 5 | 1690.228 | 14 | 4365.879 |



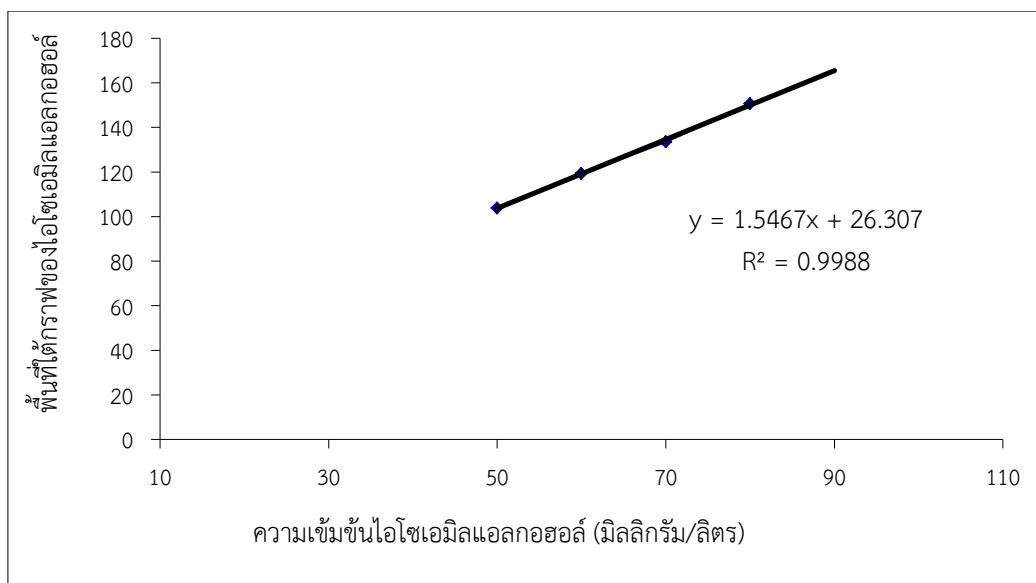
ภาพที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มข้นของเอทานอล

ตารางที่ ข.2 ความเข้มข้นของอะซิทัลดีไฮด์ (มิลลิกรัม/ลิตร) ความเข้มข้นของไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ พื้นที่ใต้กราฟของอะซิทัลดีไฮด์ และพื้นที่ใต้กราฟไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

| ความเข้มข้นของอะซิทัลดีไฮด์ (มก. /ล) | พื้นที่ใต้กราฟของอะซิทัลดีไฮด์ | ความเข้มข้นของไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (มก. /ล) | พื้นที่ใต้กราฟไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ |
|--------------------------------------|--------------------------------|---|----------------------------------|
| 50 | 10.68477 | 50 | 90.17932 |
| 70 | 14.59637 | 60 | 103.84715 |
| 90 | 19.25145 | 70 | 119.30521 |
| 110 | 22.07525 | 80 | 133.56284 |
| 130 | 28.01024 | 90 | 150.65083 |



ภาพที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มข้นของอะซิทัลดีไฮด์



ภาพที่ ข.4 กราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ภาคผนวก ค

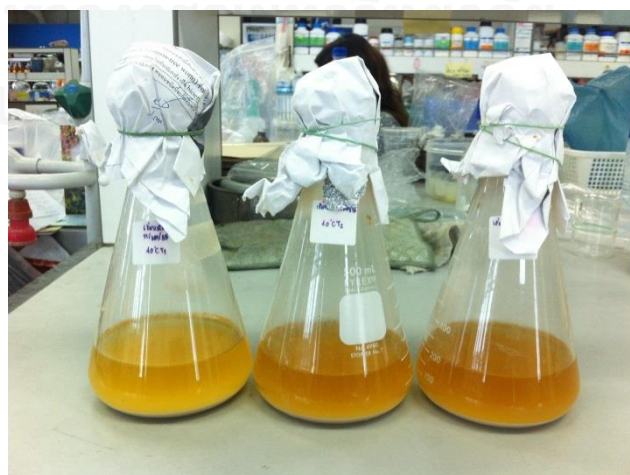
วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักสาโทโดยวิธีการอบแห้ง

ค. 1 การเตรียมตัวอย่าง

1. เตรียมกระดาษกรอง (Cellulose acetate filter, Sarorius) เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 25 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.45 ไมครอน ที่อบแห้ง 105 องศาเซลเซียส และชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน
2. ดูดตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 5000 rpm นาน 10 นาที 3 รอบ
3. แยกส่วนตะกอนมาวางบนกระดาษกรอง
4. นำตะกอนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทิ้งให้เย็นในโถทำแห้ง
5. ชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรองพร้อมเซลล์แห้งที่แน่นอน แล้วคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{[\text{น้ำหนักกระดาษกรองพร้อมเซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักกระดาษกรอง (กรัม)}] \times 10^3}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่กรอง (มิลลิลิตร)}}$$

ภาคผนวก ง
ภาพอุปกรณ์การทำทดลอง



ภาพที่ ง.1 น้ำหมักสาโทที่หมักด้วยอุณหภูมิต่างๆ ที่ผ่านการแยกกากข้าวเหนียวออกแล้ว



ภาพที่ ง.2 ข้าวเหนียวหมักกับลูกแป้งสุราหลังการผ่านน้ำ



ภาพที่ ง.3 ตัวอย่างสาโทที่บรรจุลงขวด vial ที่ปิดสนิทด้วย crimber seals เพื่อรอวิเคราะห์ โดยแก๊สโครมาโทกราฟี

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก จ

ตารางองค์ประกอบทางเคมีของข้าว และตาราง ANOVA



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ จ.1 ปริมาณน้ำตาสดริวซ์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการทำสุกไก่ด้วยอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ

| อุณหภูมิ หมัก | | ปริมาณน้ำตาสดริวซ์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|------|--|------|------|--------------------|------|------|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | การทดลองครั้งที่ 1 | | | การทดลองครั้งที่ 2 | | | การทดลองครั้งที่ 3 | | | | | | | | |
| | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | | | | | |
| | | 3 | 5 | 8 | 12 | 16 | 3 | 5 | 8 | 12 | 16 | 3 | 5 | 8 | 12 | 16 |
| 18 °C | 1.98 | 1.98 | 6.09 | 5.91 | 2.48 | 1.79 | 3.21 | 5.94 | 5.94 | 3.32 | 1.52 | 3.16 | 6.05 | 6.11 | 2.42 | 1.61 |
| 30 °C | 1.44 | 5.83 | 2.80 | 0.95 | 1.35 | 0.90 | 6.00 | 2.40 | 1.05 | 1.08 | 1.93 | 5.91 | 2.98 | 0.83 | 1.35 | |
| 40 °C | 1.83 | 5.90 | 5.92 | 4.99 | 5.15 | 2.00 | 5.98 | 5.96 | 5.20 | 5.90 | 1.69 | 5.77 | 5.90 | 5.40 | 5.49 | |

ตารางที่ จ.2 ปริมาณเอทานอล (เปอร์เซ็นต์) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการทำหมักสาคูด้วยอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ

| อุณหภูมิหมัก | | ปริมาณเอทานอล (เปอร์เซ็นต์) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------|-----------------------------|------|------|------|------|--------------------|------|------|------|------|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | การทดลองครั้งที่ 1 | | | | | การทดลองครั้งที่ 2 | | | | | การทดลองครั้งที่ 3 | | | | | | | |
| ระยะเวลาหมัก (วัน) | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | | | | |
| 3 | 5 | 8 | 12 | 16 | 3 | 5 | 8 | 12 | 16 | 3 | 5 | 8 | 12 | 16 | 3 | 5 | 8 | 12 | 16 |
| 18 °C | 0.05 | 0.54 | 2.43 | 4.49 | 3.46 | 0.05 | 0.81 | 2.50 | 4.53 | 3.58 | 0.06 | 0.61 | 2.82 | 4.56 | 0.06 | 0.61 | 2.82 | 4.56 | 3.89 |
| 30 °C | 0.07 | 2.26 | 4.89 | 5.94 | 4.18 | 0.07 | 2.28 | 4.70 | 5.20 | 4.06 | 0.08 | 1.77 | 4.76 | 6.44 | 0.08 | 1.77 | 4.76 | 6.44 | 4.12 |
| 40 °C | 0.12 | 1.84 | 5.04 | 6.72 | 5.87 | 0.19 | 2.46 | 5.44 | 6.41 | 5.12 | 0.14 | 2.59 | 5.21 | 6.35 | 0.14 | 2.59 | 5.21 | 6.35 | 5.93 |

ตารางที่ จ.3 ปริมาณกรดโดยรวม (เปอร์เซ็นต์) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสัปดาห์ด้วยอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ

| อุณหภูมิ หมัก | ปริมาณกรด (เปอร์เซ็นต์) | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|-------------------------|------|------|------|--------------------|------|------|------|--------------------|------|------|------|------|------|------|
| | การทดลองครั้งที่ 1 | | | | การทดลองครั้งที่ 2 | | | | การทดลองครั้งที่ 3 | | | | | | |
| | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | | | |
| | 3 | 5 | 8 | 12 | 16 | 3 | 5 | 8 | 12 | 16 | 3 | 5 | 8 | 12 | 16 |
| 18 °C | 0.27 | 0.45 | 0.63 | 0.45 | 0.54 | 0.18 | 0.45 | 0.54 | 0.54 | 0.45 | 0.18 | 0.45 | 0.54 | 0.45 | 0.45 |
| 30 °C | 0.18 | 0.63 | 0.63 | 0.54 | 0.45 | 0.09 | 0.54 | 0.63 | 0.54 | 0.54 | 0.09 | 0.63 | 0.63 | 0.54 | 0.45 |
| 40 °C | 0.09 | 0.54 | 0.63 | 0.63 | .63 | 0.09 | 0.54 | 0.72 | 0.63 | 0.72 | 0.09 | 0.63 | 0.63 | 0.72 | 0.72 |

ตารางที่ จ.4 ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (มก./ลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทด้วยอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ

| อุณหภูมิ หมัก | ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (มิลลิกรัม/ลิตร) | | | | | | | | | | | |
|------------------|-------------------------------------|-------|-------|--------------------|--------------------|-------|-------|--------------------|--------------------|-------|-------|--------------------|
| | การทดลองครั้งที่ 1 | | | | การทดลองครั้งที่ 2 | | | | การทดลองครั้งที่ 3 | | | |
| | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) |
| 18 °C | 3 | 5 | 8 | 12 | 3 | 5 | 8 | 12 | 3 | 5 | 8 | 12 |
| | 6.01 | 8.13 | 29.81 | 25.55 | 6.42 | 7.56 | 20.30 | 28.19 | 5.21 | 4.99 | 22.93 | 26.23 |
| 30 °C | 18.59 | 30.34 | 39.06 | 48.40 | 19.14 | 32.19 | 41.12 | 49.89 | 19.26 | 38.44 | 38.12 | 47.53 |
| 40 °C | 46.38 | 43.63 | 54.12 | 66.17 | 41.53 | 37.67 | 46.64 | 50.08 | 37.87 | 46.56 | 44.30 | 54.63 |

ตารางที่ จ.5 ปริมาณอะซิโตนไฮไดรเจน (มก./ลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสไลด้วยอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ

| ปริมาณอะซิโตนไฮไดรเจน (มก./ลิตร) | | การทดลองครั้งที่ 1 | | | | | | การทดลองครั้งที่ 2 | | | | | | การทดลองครั้งที่ 3 | | | | | | | | |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------|--------|--------------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|--------------------|--------|-------|--------------------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|
| อุณหภูมิ หมัก | ระยะเวลาหมัก (วัน) | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | | | | | |
| | | 3 | 5 | 8 | 3 | 5 | 8 | 3 | 5 | 8 | 3 | 5 | 8 | 3 | 5 | 8 | | | | | | |
| 18 °C | 35.95 | 53.65 | 90.94 | 49.89 | 34.24 | 67.18 | 76.82 | 55.37 | 28.70 | 73.89 | 58.54 | 58.47 | 38.90 | 75.19 | 97.47 | 120.53 | 101.31 | 128.36 | 40.73 | 70.62 | 86.52 | 107.00 |
| 30 °C | 70.33 | 91.22 | 126.94 | 144.12 | 80.81 | 71.94 | 93.06 | 64.16 | 84.82 | 84.71 | 87.25 | 104.69 | | | | | | | | | | |

ตารางที่ จ.6 นำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักสาโทด้วยอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ

| อุณหภูมิหมัก | | นำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|----|-----------------------------|----|----|----|--------------------|----|----|----|--------------------|----|----|----|----|----|----|
| | | การทดลองครั้งที่ 1 | | | | การทดลองครั้งที่ 2 | | | | การทดลองครั้งที่ 3 | | | | | | |
| | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | ระยะเวลาหมัก (วัน) | | | | | | |
| 18 °C | 11 | 3 | 5 | 8 | 12 | 16 | 3 | 5 | 8 | 12 | 16 | 3 | 5 | 8 | 12 | 16 |
| 30 °C | 11 | 11 | 15 | 16 | 11 | 7 | 8 | 16 | 14 | 9 | 7 | 11 | 11 | 14 | 11 | 7 |
| 40 °C | 14 | 14 | 19 | 15 | 15 | 13 | 11 | 17 | 17 | 10 | 15 | 14 | 13 | 16 | 16 | 15 |

ตารางที่ จ.7 ตาราง ANOVA ปริมาณเอทานอลในสาโทที่หมักด้วยอุณหภูมิ 18, 30 และ 40 องศาเซลเซียส

วันที่ 3

| Treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|-----------|---|-------------------------|----------|
| | | 1 | 2 |
| 18.00 | 3 | .0560793 | |
| 30.00 | 3 | .0749400 | |
| 40.00 | 3 | | .1544200 |

วันที่ 5

| Treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|-----------|---|-------------------------|-----------|
| | | 1 | 2 |
| 18.00 | 3 | .6555347 | |
| 30.00 | 3 | | 2.1077867 |
| 40.00 | 3 | | 2.2996417 |

วันที่ 8

| Treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|-----------|---|-------------------------|-----------|-----------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 18.00 | 3 | 2.5836487 | | |
| 30.00 | 3 | | 4.7834700 | |
| 40.00 | 3 | | | 5.2297920 |

วันที่ 12

| Treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|-----------|---|-------------------------|-----------|
| | | 1 | 2 |
| 18.00 | 3 | 4.5323120 | |
| 30.00 | 3 | | 5.8651390 |
| 40.00 | 3 | | 6.4942787 |

วันที่ 16

| Treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|-----------|---|-------------------------|-----------|
| | | 1 | 2 |
| 18.00 | 3 | 3.6436910 | |
| 30.00 | 3 | 4.1256323 | |
| 40.00 | 3 | | 5.6408727 |

ตารางที่ จ.8 ตาราง ANOVA ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และอะซีทัลดีไฮด์ในสาโทที่หมักด้วย อุณหภูมิ 18, 30 และ 40 องศาเซลเซียส ณ วันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 16)

Iso-amylalcohol

| temp | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|-------|---|-------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| 18.00 | 3 | 44.0795 | |
| 30.00 | 3 | | 76.2014 |
| 40.00 | 3 | | 88.8885 |
| Sig. | | 1.000 | .125 |

Acetaldehyde

| temp | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|-------|---|-------------------------|----------|
| | | 1 | 2 |
| 18.00 | 3 | 80.3976 | |
| 40.00 | 3 | 99.6365 | |
| 30.00 | 3 | | 147.5893 |
| Sig. | | .167 | 1.000 |

ตารางที่ จ.9 ตาราง ANOVA ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในสาโทที่หมักด้วยอุณหภูมิ 18, 30 และ 40 องศาเซลเซียส (วันที่ 3-12 ของการหมัก)

วันที่ 3

| temp | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|------|---|-------------------------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 18 | 3 | 5.8822 | | |
| 30 | 3 | | 18.9978 | |
| 40 | 3 | | | 41.9296 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

วันที่ 5

| temp | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|------|---|-------------------------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 18 | 3 | 6.8946 | | |
| 30 | 3 | | 33.6605 | |
| 40 | 3 | | | 42.6187 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

วันที่ 8

| temp | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|------|---|-------------------------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 18 | 3 | 24.3494 | | |
| 30 | 3 | | 39.4375 | |
| 40 | 3 | | | 48.3559 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

วันที่ 12

| temp | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|------|---|-------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| 18 | 3 | 26.5614 | |
| 30 | 3 | | 48.6092 |
| 40 | 3 | | 56.9615 |
| Sig. | | 1.000 | .083 |

ตารางที่ จ.10 ตาราง ANOVA ปริมาณอะซิทัลดีไฮด์ในสาโทที่หมักด้วยอุณหภูมิ 18, 30 และ 40 องศาเซลเซียส (วันที่ 3-12 ของการหมัก)

วันที่ 3

| temp | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|------|---|-------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| 18 | 3 | 32.9664 | |
| 30 | 3 | 38.2297 | |
| 40 | 3 | | 78.6541 |
| Sig. | | .255 | 1.000 |

วันที่ 5

| temp | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|------|---|-------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| 18 | 3 | 64.9099 | |
| 30 | 3 | 73.8719 | 73.8719 |
| 40 | 3 | | 82.6256 |
| Sig. | | .238 | .248 |

วันที่ 8

| temp | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|------|---|-------------------------|----------|
| | | 1 | |
| 18 | 3 | | 75.4367 |
| 30 | 3 | | 95.1039 |
| 40 | 3 | | 102.4214 |
| Sig. | | | .096 |

วันที่ 12

| temp | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|------|---|-------------------------|----------|
| | | 1 | 2 |
| 18 | 3 | 54.5810 | |
| 40 | 3 | | 104.3277 |
| 30 | 3 | | 118.6331 |
| Sig. | | 1.000 | .494 |

ตารางที่ จ.11 ค่าทางสถิติของปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (มก./ลิตร) ระหว่างการหมักสาโทด้วย อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ

| อุณหภูมิหมัก | ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (มิลลิกรัม/ลิตร) | | | |
|--------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | วันที่ 3 | วันที่ 5 | วันที่ 8 | วันที่ 12 |
| 18°C | 5.88 ^c ± 0.62 | 6.89 ^c ± 1.67 | 24.34 ^c ± 4.91 | 26.56 ^b ± 1.50 |
| 30°C | 18.99 ^b ± 0.36 | 33.66 ^b ± 4.24 | 39.44 ^b ± 1.19 | 48.61 ^a ± 1.19 |
| 40°C | 41.93 ^a ± 4.27 | 42.61 ^a ± 4.53 | 48.36 ^a ± 8.29 | 56.96 ^a ± 8.29 |

ตารางที่ จ.12 ค่าทางสถิติของปริมาณอะซิทัลดีไฮด์ (มก./ลิตร) ระหว่างการหมักสาโทด้วยอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ

| อุณหภูมิหมัก | อะซิทัลดีไฮด์ (มิลลิกรัม/ลิตร) | | | |
|--------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | วันที่ 3 | วันที่ 5 | วันที่ 8 | วันที่ 12 |
| 18°C | 32.96 ^b ± 3.79 | 64.91 ^b ± 10.31 | 75.44 ^a ± 16.24 | 54.58 ^b ± 4.34 |
| 30°C | 38.23 ^b ± 2.89 | 73.87 ^{ab} ± 2.83 | 95.10 ^a ± 7.67 | 118.63 ^a ± 10.8 |
| 40°C | 78.65 ^a ± 7.48 | 82.62 ^a ± 9.80 | 102.42 ^a ± 4.11 | 104.33 ^a ± 27.87 |

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ พงศธร พูนพิพัฒน์

เกิดวันที่ 27 เมษายน พ.ศ. 2530

ประวัติการศึกษา

ระดับประถมศึกษา โรงเรียนอัสสัมชัญสมุทรปราการ

ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนนวมิตราชินุทิศ เตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ

ระดับอุดมศึกษา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY