ผลของยีสต์และราบางชนิดต่อสารให้กลิ่นในสาโท

นางสาวนริสา ตรีเนตร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF CERTAIN YEASTS AND MOLDS ON AROMA COMPOUNDS IN SATO

Miss Narisa Trinetra

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 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของยีสต์และราบางชนิดต่อสารให้กลิ่นในสาโท
โดย	นางสาวนริสา ตรีเนตร
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

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

…… อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (ถ้ามี)
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์)

…… กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

…… กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

นริสา ตรีเนตร : ผลของยีสต์และราบางชนิดต่อสารให้กลิ่นในสาโท (EFFECTS OF CERTAIN YEASTS AND MOLDS ON AROMA COMPOUNDS IN SATO) อ.ที่ปรึกษา :ผศ.ดร. ชุลี ยมภักดี, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์, 127 หน้า.

สาโทเป็นไวน์ข้าวพื้นบ้านของประเทศไทย มีลูกแป้งสุราเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักข้าวเหนียวเพื่อผลิตเป็นสาโทเพื่อการบริโภคในชุมชน เมื่อผลิตสาโทในระดับอุตสาหกรรม พบว่าสาโทที่ได้มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอระหว่างชุดการผลิต สาเหตุหนึ่งมาจากการใช้ลูกแป้งสุราที่ไม่สามารถควบคุมปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ได้ การใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์ผสมจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาดังกล่าว งานวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่มุ่งศึกษาสมบัติของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งสุราในด้านการย่อยแป้งและความสามารถในการผลิตเอทานอล งานวิจัยนี้สนใจศึกษาบทบาทของยีสต์และราจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้ที่มีต่อการสร้างสารให้กลิ่นในสาโท เริ่มจากนำลูกแป้งสุราที่เมื่อนำมาผลิตสาโท ได้สาโทที่มีคุณภาพด้านกลิ่นรสดีที่สุด จำนวน 3 แหล่ง จากการคัดเลือกแหล่งลูกแป้งสุราที่รวบรวมมาจากจังหวัดต่างๆ ทั่วประเทศ ได้แก่ ลูกแป้งสุราจากจังหวัดนครพนม (NP1) ลูกแป้งสุราจากจังหวัดน่าน (NN6) และลูกแป้งสุราจากจังหวัดหนองคาย (NK2) มาผลิตสาโทและวัดค่าองค์ประกอบทางเคมี กรดอินทรีย์ และสารให้กลิ่นต่างๆ เปรียบเทียบกับสาโททางการค้า 2 แหล่ง พบว่า สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงและมีปริมาณสารให้กลิ่นที่ดีหลายชนิด ตลอดจนได้ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสดีที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 NK2 และสาโททางการค้าอีก 2 แหล่ง จึงเลือกลูกแป้งสุรา NP1 ในการศึกษาขั้นต่อไป โดยนำราและยีสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 มาทำเป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสม จับคู่เป็นชุดการทดลองต่างๆ สำหรับผลิตสาโทเปรียบเทียบกับการใช้ลูกแป้งสุรา NP1 เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า ในชุดควบคุม M1M2 ที่มีเฉพาะราบริสุทธิ์ 2 สายพันธุ์ คือ *Mucor racemosus* NP102 (M1) และ *Rhizopus oligosporus* NP101 (M2) พบสารให้กลิ่นในปริมาณที่ต่ำมากๆ ได้แก่ 2,3 บิวเทนไดออล และพบการสะสมของกรดไพรูวิก โดยมีการสร้างตั้งแต่วันเริ่มต้นของการหมัก(วันที่ 0) ในชุดการทดลอง M1M2+Y1 พบว่ายีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* NP1930 (Y1) มีบทบาทในการสร้างสารให้กลิ่น ไอโซบิวทานอล และเอมิลแอลกอฮอล์ ที่ระดับ 45.68 และ 6.89 มก./ล. ตามลำดับ ส่วนยีสต์ในกลุ่ม Non-*Saccharomycese* ได้แก่ *Pichia anomala* NP101 (Y2) ในชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2 มีบทบาทในการสร้าง ไอโซเอมิลแอซิเทต ที่ระดับ 0.81 มก./ล. และยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* NP1030 (Y3) ในชุดทดลอง M1M2+Y1+Y3 มีบทบาทในการสร้าง เอทิลแอซิเทต ที่ระดับ 27.75 มก./ล. สารให้กลิ่นที่สร้างจากยีสต์เหล่านี้ถูกสร้างตั้งแต่วันที่ 3 ของการหมักและมีระดับสูงสุดในวันสุดท้ายของการหมัก(วันที่ 11) นอกจากนี้การเติมแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ลงในกล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสมของยีสต์และรา (ชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3) ทำให้พบว่าสาโทที่ได้มีปริมาณกรดซัคซินิก กรดแลคติก และกลีเซอรอลสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมของยีสต์และราในชุดทดลองอื่นๆ ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสม พบว่าแม้จะให้ผลทางคุณภาพด้านกลิ่นรสที่ต่ำกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้ง NP1 เล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลจากงานวิจัยนี้จะเป็นแนวทางนำไปสู่การใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่คัดเลือกแล้ว เพื่อพัฒนาการผลิตสาโทที่มีคุณภาพดีและคงที่ระหว่างชุดการผลิตต่อไป

สาขาวิชา....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.....2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4772336523 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: SATO / LOOGPANG / VOLATILE COMPOUND / YEAST / MOLD / AROMA

NARISA TRINETRA : EFFECTS OF CERTAIN YEASTS AND MOLDS ON AROMA COMPOUNDS IN SATO. THESIS ADVISOR : ASST.PROF. CHULEE YOMPAKDEE, Ph.D., THESIS CO ADVISOR : ASST PROF. NATCHANUN LEEPIPATPIBOON, Ph.D., 127 pp.

Sato is a traditional Thai rice wine. Loogpang is used, as a source of microorganisms to ferment glutinous rice into rice wine. Problem on commercial Sato production is the inconsistency in quality of Sato produced between batches. The use of mixed pure culture for Sato production is a way to solve the problem. In the past, the research had been focused on isolation of molds and yeasts on their roles as good producers of amylolytic enzymes and ethanol, respectively. This work intended to study the roles of molds and yeasts isolated from the selected loogpang on aroma compounds in Sato. Three sources of selected loogpang NP1, NN6 and NK2 were used to produce Sato and their physical, biochemical parameters as well as organic acids and volatile compounds were analysed in comparison with 2 sources of commercial Sato. The result showed that among all, Sato produced from NP1 loogpang contained high content of ethanol, good volatile compounds and obtained the best sensory evaluation. Molds and yeasts isolated from NP1 loogpang were used as mixed pured culture in various combination to produce Sato and the resulting Sato were compared to that produced from NP1 loogpang. Sato produced from mold only (M1M2) which consists of *Mucor racemosus* NP102 (M1) and *Rhizopus oligosporus* NP101 (M2) as control group showed detectable amount of 2,3 – butanediol and marked accumulation of pyruvic acid since the beginning of the fermentation process (day 0). Data using different combination of molds and yeasts revealed the roles of each kind of yeast on production of certain aroma in Sato which accumulation on various kinds of volatile compounds were observed. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* NP1930 (Y1) was not only responsible for ethanol production but also some good volatile compounds such as isobutanol (45.68 mg/L) and amyl alcohol (6.89 mg/L). The other 2 non-*Saccharomyces* yeasts, *Pichia anomala* NP101 (Y2) and *Saccharomycopsis fibuligera* NP1030 (Y3) took part in production of isoamyl acetate (0.81 mg/L) and ethyl acetate (27.75 mg/L), respectively. There was no significant difference ($p<0.05$) on sensory evaluation between the Sato produced from mixed pured cultures of yeasts and molds and from NP1 loogpang. Sato produced from the addition of lactic acid bacteria isolated from NP1 loogpang into mixed culture of yeasts and molds didn't cause significant difference ($p<0.05$) on sensory evaluation from those produced from NP1 loogpang and the mixed culture of yeasts and molds. Addition of lactic acid, however, caused increased level of lactic acid as well as glycerol but not other volatile compounds in Sato. The results from this study could be used to develop good source of mixed pure culture in place of loogpang for improvement of quality and the consistency of Sato produced between batch.

Department……Biotechnology……. Student's signature……

Academic year…….2007……Advisor's signature……

Co-advisor's signature……

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ประดิษฐ์ ครุวัณณา ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ เกี่ยวกับการชิมสาโทแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

กราบขอบพระคุณทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

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

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา พี่ น้อง และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญภาพ..... ญ
บทที่
1 บทนำ..... 1
2 วารสารปริทัศน์..... 3
2.1 ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของสาโท..... 7
2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโท..... 7
2.3 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท..... 13
2.4 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีที่สำคัญในการผลิตสาโท..... 15
2.5 สารประกอบที่ให้กลิ่นรสในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดไวน์องุ่น..... 20
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง..... 31
3.1 การผลิตสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุราและเชื้อบริสุทธิ์ผสมของ รา ยีสต์
และแบคทีเรียกรดแลกติก ที่แยกได้จากแหล่งลูกแป้งสุรานั้นๆ..... 34
3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของสาโทที่หมักได้..... 35
3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น (Volatile compound) ในสาโท..... 36
3.4 การศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ในสาโท..... 37
3.5 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory test) ในสาโท..... 38
4 ผลการทดลอง..... 39
4.1 ผลของการใช้ลูกแป้งสุราในการผลิตสาโทเปรียบเทียบกับสาโททางการค้า..... 39
4.2 ผลการผลิตสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุราและเชื้อบริสุทธิ์ผสม
ที่แยกได้จากแหล่งลูกแป้งสุรา..... 55
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 96
รายการอ้างอิง..... 106

ภาคผนวก..... 110
ภาคผนวก ก..... 111
ภาคผนวก ข..... 114
ภาคผนวก ค..... 117
ภาคผนวก ง..... 120
ภาคผนวก จ..... 121
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 127

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 หัวเชื้อชนิดต่างๆ และชื่อไวน์ข้าวของแต่ละประเทศ……..3
2.2 แบคทีเรียกรดแลคติก และแบคทีเรียกรดแอซิติก ที่พบในสาโท……..……...15
2.3 ชนิดและปริมาณของสารประกอบที่สำคัญที่พบในไวน์ ……16
2.4 แสดงกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นและฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในไวน์องุ่น……..……...21
3.1 แสดงสายพันธุ์ของราและยีสต์ ที่แยกได้จากลูกแป้งสุราNP1……..……33
3.2 แสดงการจับคู่ของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1.....34
4.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า.....39
4.2 สรุปปริมาณสารให้กลิ่นของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้าเปรียบเทียบ
กับปริมาณที่พบในไวน์องุ่นและสาเกทั่วไป……...53
4.3 แสดงปริมาณของ ร้อยละเอทานอล สารประกอบให้กลิ่น กรดอินทรีย์ และกลีเซอรอล
ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์และสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราในวันสุดท้ายของการหมัก
(วันที่ 11) เปรียบเทียบกับปริมาณที่พบในไวน์องุ่นและสาเกทั่วไป……..……74
4.4 แสดงปริมาณของ ร้อยละเอทานอล สารประกอบให้กลิ่น กรดอินทรีย์ และกลีเซอรอล
ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3
M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB และสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ในวันสุดท้ายของ
การหมัก (วันที่ 11) เปรียบเทียบกับปริมาณที่พบในไวน์องุ่นและสาเกทั่วไป..... 92

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 กระบวนการผลิตสาโท…….…….... 6
2.2 แสดงแผนภูมิการผลิตลูกแป้งแบบภูมิปัญญาท้องถิ่น……12
2.3 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท……13
2.4 การเจริญของยีสต์ 2 ชนิด จากลูกแป้งสุราจากผู้ผลิต 3 แห่ง ระหว่างการหมักสาโท…….14
2.5 การเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล……..17
2.6 การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล……....18
2.7 แสดงเมแทบอลิซึมของยีสต์ภายใต้ภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ……..……....18
2.8 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดอะมิโนไปเป็นฟูเซลแอลกอฮอล์……..21
2.9 แสดงการสร้างของสารประกอบทุติยภูมิของกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ โดยกรดไพรูวิกเป็นสารตั้งต้น……..……25
2.10 แสดงวิถีการย่อยสลายกลูโคสเป็นกลีเซอรอล ซัคซิเนตและสารประกอบอื่นๆ โดยยีสต์ในภาวะที่ไม่ใช้อากาศ……..……27
2.11 แสดงการเกิดการเอสเทอริฟิเคชันระหว่างกรดและแอลกอฮอล์ โดยมีเอนไซม์เอสเทอเรส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ...……..…29
2.12 แสดงการเกิดการเอสเทอริฟิเคชันระหว่างการหมักโดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แอลกอฮอล์อะเซทิลทรานสเฟอเรส และ แอลกอฮอล์เอซิลทรานสเฟอเรส ……..……..30
4.1 แสดงปริมาณของ กรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดแอซิติก และกลีเซอรอล ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า..... 41
4.2 แสดงปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ที่วิเคราะห์ได้ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโท ทางการค้า (ก) ปริมาณ 1-โพรพานอล, ข) ปริมาณไอโซบิวทานอล, ค) ปริมาณไอโซเอมิล-แอลกอฮอล์, ง) ปริมาณเอมิลแอลกอฮอล์, จ) ปริมาณฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ และ ฉ) ปริมาณ 1-บิวทานอล)…..47
4.3 แสดงปริมาณเอสเทอร์ที่วิเคราะห์ได้ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า (ก) ปริมาณ เอทิลแอซิเทต, ข) ปริมาณเอทิลแคโพรเอต, ค) ปริมาณไอโซเอมิลแอซิเทต, ง) ปริมาณเอทิลแคพริเรต, จ) ปริมาณเอทิลแคเพรต และ ฉ) ปริมาณเอทิลโพรพาโนเอต)…..50
4.4 แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโท ทางการค้า……..……52

ภาพที่ **หน้า**

4.5 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส และ ปริมาณกรดทั้งหมด ของสาโท ที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม……..56
4.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณร้อยละเอทานอล ในระหว่างการหมักของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม…....57
4.7 แสดงปริมาณกรดไพรูวิกของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจาก เชื้อบริสุทธิ์ผสม……58
4.8 แสดงปริมาณของ กรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดแอซิติก และกลีเซอรอล ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม……..58
4.9 แสดงปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ที่วิเคราะห์ได้ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและ สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม (ก) ปริมาณ 1-โพรพานอล, ข) ปริมาณไอโซบิวทานอล, ค) ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์, ง) ปริมาณเอมิลแอลกอฮอล์ และ จ) ปริมาณฟีนิล-เอทิลแอลกอฮอล์)……..63
4.10 แสดงปริมาณเอสเทอร์ที่วิเคราะห์ได้ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและ สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม (ก) ปริมาณ เอทิลแอซิเทต, ข) ปริมาณเอทิลแคโพรเอต, ค) ปริมาณไอโซเอมิลแอซิเทต, ง) ปริมาณเอทิลแคพริเรต, จ) ปริมาณเอทิลแคเพรต และ ฉ) ปริมาณเอทิลโพรพาโนเอต)……..64
4.11 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1……..66
4.12 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม (ก) M1M2+Y1, ข) M1M2+Y1+Y2, ค) M1M2+Y1+Y3 และ ง) M1M2+Y1+Y2+Y3) 67
4.13 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและ สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม (ก) 1-โพรพานอล, ข) ไอโซบิวทิวแอลกอฮอล์ ค) ไอโซ เอมิลแอลกอฮอล์ และ ง) เอมิลแอลกอฮอล์).....70
4.14 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอสเทอร์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและ สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม (ก) เอทิลแอซิเทต, ข) เอทิลแคโพรเอต, ค) ไอโซเอมิล-แอซิเทต, ง) เอทิลแคพริเรต และ จ) เอทิลแคเพรต).....71
4.15 แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมและ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1……...78
4.16 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส และปริมาณกรดทั้งหมด ของสาโท ที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB…… 80

ภาพที่ **หน้า**

4.17 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณร้อยละเอทานอล ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB.....81

4.18 แสดงปริมาณกรดไพรูวิก ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจาก เชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB.....82

4.19 แสดงปริมาณกรดอินทรีย์ (กรดซัคซินิก, กรดแลคติก และกรดแอซิติก) และกลีเซอรอล ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB.....82

4.20 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB.....83

4.21 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม ชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LABเปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม ชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 (ก) 1-โพรพานอล, ข)ไอโซบิวทานอล, ค) ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์, ง) เอมิลแอลกอฮอล์ และ จ) ฟีนิลเอทิล-แอลกอฮอล์).....85

4.22 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอสเทอร์ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LABเปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 (ก) เอทิลแอซิเทต, ข) เอทิล แคโพรเอต, ค) ไอโซเอมิลแอซิเทต, ง) เอทิลแคพริเรต, จ) เอทิลแคเพรต และ ฉ) เอทิลโพรพาโนเอต).....88

4.23 แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB, M1M2+Y1+Y2+Y3 และสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1....94

บทที่ 1

บทนำ

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

ในการผลิตสาโท วัตถุดิบหลัก คือ ข้าวเหนียว สายพันธุ์ที่ใช้ควรมีสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ที่เหมาะสม เช่น สัดส่วนของอะไมโลส และ อะไมโลเพกทิน ตลอดจนมีคุณสมบัติทางด้านสีและกลิ่นรสที่พึงประสงค์ก็จะนำไปสู่การได้สาโทที่มีคุณภาพดีได้ (ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย และพัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2548) ลูกแป้งสุราเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการผลิตสาโทให้ได้คุณภาพดี ลูกแป้งสุรา เป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บในรูปเชื้อแห้งเพื่อใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ แต่เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในลูกแป้งสุรา มีทั้งจุลินทรีย์ที่จำเป็นและไม่จำเป็นต่อการหมัก โดยจุลินทรีย์ที่จำเป็นต่อการหมักอาจมีปัญหาเกี่ยวกับประสิทธิภาพในกระบวนการผลิต ส่วนจุลินทรีย์ที่ไม่จำเป็นบางชนิดอาจมีผลต่อคุณภาพของสาโททำให้มีคุณภาพเสื่อมลงอีกด้วย (มนตรี เชาวน์สังเกต, 2521)

ราและยีสต์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการผลิตสาโท จุลินทรีย์กลุ่มราจะทำหน้าที่เปลี่ยนแป้งที่เป็นองค์ประกอบในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เรียกปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงนี้ว่าแซ็กคาริฟิเคชัน (Saccharification) สำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งโดยราให้เป็นแอลกอฮอล์โดยผ่านกระบวนการหมักที่เรียกว่ากระบวนการหมักแอลกอฮอล์ (alcoholic fermentation) ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดได้ดีในภาวะไร้อากาศ (anaerobic condition) ลูกแป้งสุราที่ดีนอกจากจะมีเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยแป้งและการหมักให้ได้เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์สูงแล้ว จะต้องเป็นเชื้อที่ให้กลิ่นรสที่ดีอีกด้วย

ในระหว่างกระบวนการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ยีสต์จะไม่ได้สร้างเฉพาะแต่แอลกอฮอล์เพียงอย่างเดียว ยังมีการสร้างผลผลิตอื่นอีกมากมายซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญต่อสมบัติของกลิ่นรสที่ดีในไวน์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เอสเทอร์ และ ฟูเซลแอลกอฮอล์ ที่ถูกสร้างระหว่างกระบวนการหมัก มีบทบาทสำคัญในเรื่องกลิ่นรสของไวน์ (Valero และคณะ, 2002)

ในปัจจุบันงานวิจัยในประเทศไทยที่เกี่ยวข้องกับลูกแป้งสุราและสาโทส่วนใหญ่มุ่งศึกษาสมบัติของยีสต์และราในด้านการย่อยแป้งและความสามารถในการผลิตเอทานอล โดย อภิชญา เตชะวสัญญู (2550) ได้ทำการคัดแยก จำแนกยีสต์ และราในลูกแป้งสุราจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย โดยใช้สัณฐานวิทยา ชีวเคมี ร่วมกับเทคนิคอณูชีววิทยา ตลอดจนติดตามประชากรของยีสต์และราในระหว่างการหมัก และศึกษาสมบัติของยีสต์และราในด้านการย่อยแป้งและความสามารถในการผลิตเอทานอล (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงบทบาทของจุลินทรีย์ที่ในลูกแป้งสุราที่มีต่อกลิ่นรสของสาโทให้เป็นที่แน่ชัด และการผลิตลูกแป้งสุรายังไม่มีสูตรและกระบวนการผลิตที่แน่นอน ทำให้คุณภาพของลูกแป้งสุราไม่คงที่ ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพของสาโทที่ไม่ได้มาตรฐานหรือมีคุณภาพไม่คงที่ต่อการผลิตหนึ่งๆ จุลินทรีย์ที่อยู่ในลูกแป้งสุราจึงปัจจัยที่สำคัญต่อคุณภาพของสาโท ซึ่งถ้าสามารถควบคุมทั้งชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในแต่ละครั้งในการผลิตตลอดจนควบคุมการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่จำเป็นต่อการหมักได้ก็จะทำให้ได้สาโทคุณภาพดี แนวทางการควบคุมการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่จำเป็นต่อการหมักนั้นสามารถทำได้ด้วยการเปลี่ยนการผลิตจากเดิมที่ใช้ลูกแป้งสุรามาเป็นการใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์ ซึ่งวิธีการใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์นั้น จะทำให้สังเกตประสิทธิภาพการหมักได้ชัดเจนกว่าและทำให้คุณภาพของสาโทที่ได้มีความคงที่ทุกรุ่นการผลิตได้ดีกว่าวิธีการใช้ลูกแป้งสุรา (อาจารีย์ ปรีชากุล, 2550) แนวทางนี้มีความสำคัญต่อการพัฒนาการผลิตสาโทระดับอุตสาหกรรม ที่ต้องการจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง และต้องการผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีสม่ำเสมอได้มาตรฐาน จึงควรมีการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีคุณลักษณะเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสาโทในประเทศไทยต่อไป

จากงานวิจัยของ อภิชญา เตชะวสัญญู (2550) ทำให้ทราบถึงบทบาทของยีสต์และราในลูกแป้งสุราที่มีต่อการผลิตสาโทแต่ยังมิได้ศึกษาถึงบทบาทต่อกลิ่นรสของสาโทที่ได้ ดั้งนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาบทบาทของยีสต์และราที่มีต่อรูปแบบของสารให้กลิ่นในสาโท เพื่อจะนำไปสู่การพัฒนาคุณภาพของกลิ่นรสของสาโทให้ดียิ่งขึ้นต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาบทบาทในการสร้างสารให้กลิ่นของยีสต์และราที่อยู่ในลูกแป้งสุรา

บทที่2

วารสารปริทัศน์

ไวน์ (Wine) เป็นเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ประเภทสุราแช่ ทำจากการหมักน้ำผลไม้ หรือพืชชนิดอื่นๆ โดยทั่วไปไวน์หมายถึง น้ำไวน์ที่ได้จากการหมักผลองุ่นสด โดยใช้ยีสต์ หากเป็นผลไม้หรือพืชอื่นๆ มักจะใส่ชื่อผลไม้ หรือชื่อพืชนั้นๆลงไปด้วย เช่น ไวน์สตรอเบอรี่ ไวน์มะยม และไวน์ข้าว เป็นต้น การทำไวน์ข้าวจะแยกออกจากการทำไวน์ผลไม้ เนื่องจากกรรมวิธีการผลิตและหลักการแตกต่างจากการทำไวน์ผลไม้ค่อนข้างมาก กระบวนการผลิตไวน์ข้าวของแต่ละประเทศมีความแตกต่างกันทั้งวัตถุดิบ สัดส่วน อุณหภูมิ และระยะเวลา แต่โดยรวมแล้วเป็นการหมักแบบธรรมชาติโดยใช้ธัญพืชเป็นหลัก (โชคชัย วนภูและคณะ, 2546) โดยแต่ละแห่งมีการทำหัวเชื้อ (starter) ด้วยส่วนผสม รูปร่าง และจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน และมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 2.1 หัวเชื้อชนิดต่างๆ และชื่อไวน์ข้าวของแต่ละประเทศ

ประเทศ	ชื่อหัวเชื้อ	ชื่อไวน์ข้าว
จีน	*Chu*	Shao-Shin-Chu
เกาหลี	*Nuruk, Meju*	Makkari
ญี่ปุ่น	*Koji*	Sake, Amazake
อินโดนีเซีย	*Ragi*	Brem
มาเลเซีย	*Ragi*	Tapay
ฟิลิปปินส์	*Bubod*	Tapuy
ไทย	*Lookpang*	กระแช่, น้ำขาว, สาโท, อุ
อินเดีย	*Marcha*	Shonti, Murcha

ไวน์ข้าวที่รู้จักกันดี และเป็นที่นิยมไปทั่วโลก คือ สาเก เพราะกระบวนการผลิตสาเกของประเทศญี่ปุ่นได้มีการพัฒนามานานมาก โดยเริ่มตั้งแต่การคัดเลือกชนิดของข้าวถึงการบรรจุภัณฑ์ ซึ่งกระบวนการผลิดสาเกจะพิจารณาวัตถุดิบเป็นสำคัญ ดังนี้

1. ข้าว เป็นวัตถุดิบหลักของการผลิตสาเก ข้าวที่ใช้จะเป็น *Oryzae sativa* var Japonica ที่มีลักษณะเมล็ดอ้วนสั้น มีความเหนียว เนื่องจากมีอะไมโลเพกทินสูงกว่าข้าว *O. sativa* var Indica ซึ่งมีเมล็ดผอมยาวและไม่เหนียว และมีปริมาณอะไมโลสสูง เมื่อนึ่งสุกข้าวจะแห้งเร็ว ไม่อมน้ำและไม่จับกันเป็นก้อนทำ

ให้ราไม่สามารถยึดจับและสร้างไมซีเลียมได้ดีนัก และกลิ่นข้าวของญี่ปุ่นเมื่อหมักแล้วจะให้กลิ่นที่หอมกว่าและมีปริมาณแอลกอฮอล์สูงกว่า

2. หัวเชื้อรา koji ทำมาจากเชื้อราสีเหลือง หรือ *Aspergillus oryzae* ซึ่งเป็นหัวใจของกระบวนการผลิตสาเก ราทำหน้าที่ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสด้วยเอนไซม์ α-อะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส

3. Sake yeast ยีสต์ที่ใช้ส่วนมากเป็น *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ หมายเลข 5, 7, 9, 10, 14 และ 15 ของ the Japan Brewing Association โดยเฉพาะหมายเลข 15 เป็นยีสต์ที่ไม่ให้ฟองในการหมัก ทำให้มีประสิทธิภาพสูงมาก

4. น้ำ ต้องเป็นน้ำที่มีคุณภาพดี ไม่มีสี ไม่มีรสและไม่มีกลิ่น มีสภาพเป็นกลางหรือมีความเป็นเบสเล็กน้อยและมีเกลือแร่เล็กน้อย และต้องไม่มีเชื้อโรค

ขั้นตอนในการผลิตสาเกทั่วๆ ไป ประกอบด้วยขั้นตอนตามลำดับ คือ การขัดข้าว → การนึ่งข้าว → การผสม koji → การหมักครั้งที่ 1 → เติมยีสต์ → การหมักครั้งที่ 2 → การกรอง → พลาสเจอไรส์ → การบ่ม → บรรจุขวด โดยจะใช้เวลาประมาณ 1 เดือนในการหมัก และการบ่มจะใช้เวลานานขึ้นกับคุณภาพของสาเกเป็นหลัก แอลกอฮอล์ที่ได้จะอยู่ระหว่าง 15 ถึง 18%

ส่วนประกอบของสาเกทั่วไป (ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2546)

องค์ประกอบ	ปริมาณ
ปริมาณน้ำตาลเทียบเป็นกลูโคส (% น้ำหนัก/ปริมาตร)	4.20
ปริมาณน้ำตาลที่สามารถหมักได้ (%น้ำหนัก/ปริมาตร)	3.46
ปริมาณกรด (มก./100 มล.)	1.52
ปริมาณกรดอินทรีย์ (มก./100 มล.)	115.22
ปริมาณแอลกอฮอล์ (%ปริมาตร/ปริมาตร)	15.0

ฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในสาเก

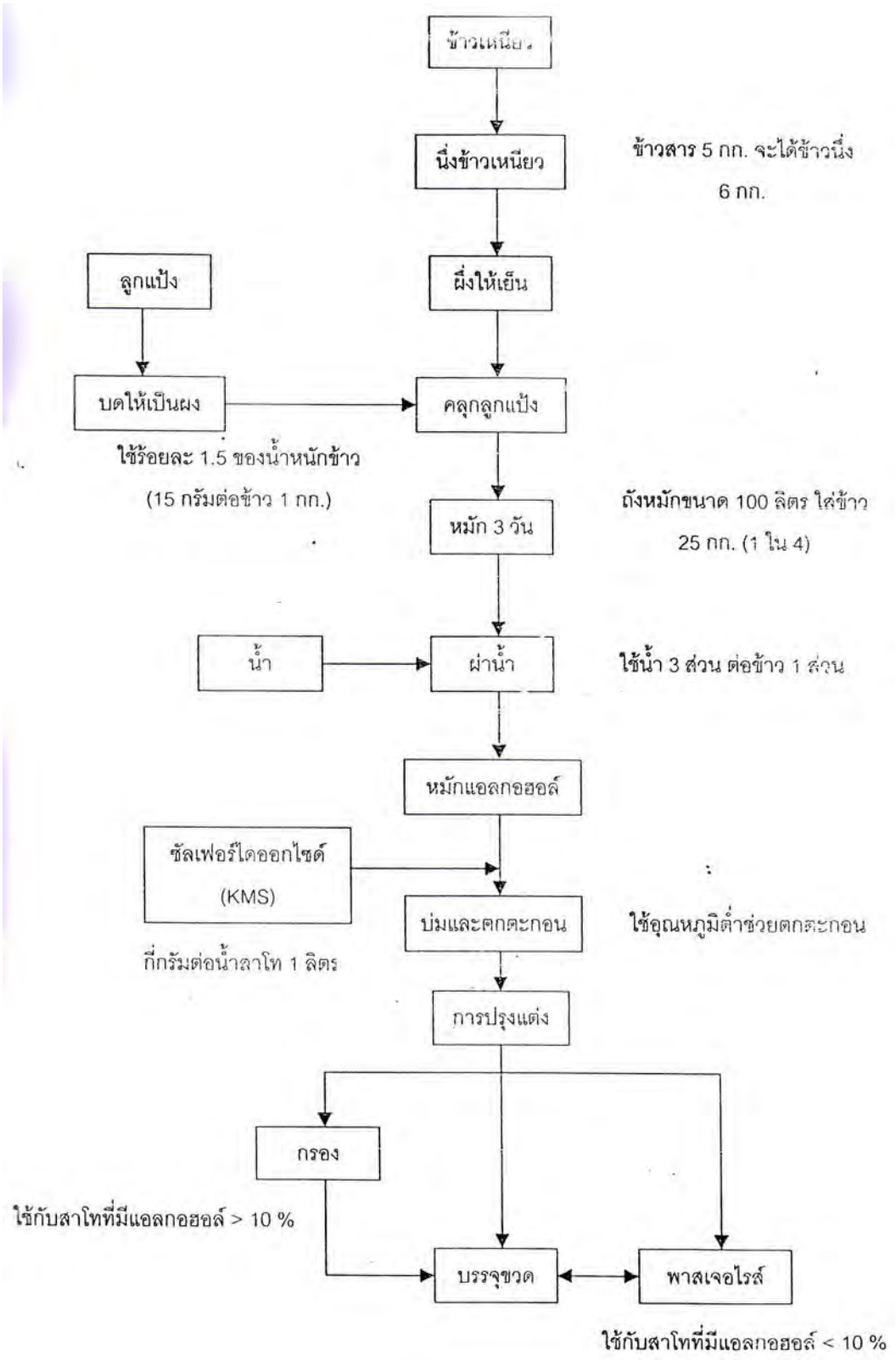
แอลกอฮอล์	ค่าเฉลี่ย (มก./ล.)
เอน - โพรพานอล	120
ไอโซบิวทานอล	64
ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์	170
2 - ฟีนิลแอลกอฮอล์	75

ฟูเซลแอลกอฮอล์เหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญทางด้านกลิ่นของสาเก ปริมาณที่พบจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณกรดอะมิโน อุณหภูมิที่หมัก และสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ สารซึ่งเป็นองค์ประกอบในการสร้างกลิ่นที่สำคัญของสาเกคือ เอสเทอร์

ส่วนประกอบของเอสเทอร์ในสาเก

เอสเทอร์	ปริมาณ (มก./ล.)		
	สาเกชั้นเลิศ	สาเกชั้นดี	สาเกธรรมดา
เอทิลแอซิเทต	120	50	20 – 30
ไอโซบิวทิลแอซิเทต	1.0 – 1.5	0.5	0.2 – 0.5
เอทิลบิวทิเรต	2.0 – 5.0	1.5	0.5
ไอโซเอมิลแอซิเทต	10	5	2
เอทิลแคโพรเอต	10	3	2
เอทิลแคพริเรต	10	5	5
เอทิลแคเพรต	10	10	10
ฟีนิลเอทิลแอซิเทต	7	5	8

ส่วนไวน์ข้าวพื้นบ้านของประเทศไทยนั้น เรียกว่า สาโท มีกระบวนการผลิตแตกต่างกับสาเก การหมักไวน์ข้าวทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันของจุลินทรีย์ในหัวเชื้อที่ใช้ สาเกใช้หัวเชื้อโคจิ (koji) ซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์ของ *Aspergillus oryzae* ที่เจริญบนข้าวสุก และเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์ *Saccharomyces sake* (Kodoma, 1970) แต่ในการหมักสาโทใช้หัวเชื้อซึ่งเรียกว่า ลูกแป้งสุรา ซึ่งเป็นกล้าเชื้อผสมของจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย (นภา โล่ห์ทอง, 2535) ดังนั้นคุณภาพของสาโท จึงขึ้นกับคุณภาพของลูกแป้งสุราเป็นสำคัญ การผลิตสุราแช่พื้นบ้านไทยได้จากการหมักข้าวเหนียวในโอ่งหรือไหดินเผา ขั้นตอนการผลิตและส่วนผสมแตกต่างกันไป นับตั้งแต่การทำลูกแป้งสุราที่ใช้แป้งข้าวเหนียวผสมกับสมุนไพรหลายๆ ชนิด โดยมีรา ยีสต์ และแบคทีเรียชนิดต่างๆกันไปในแต่ละท้องถิ่นของประเทศจนกระทั่งถึงกระบวนการหมัก เพื่อให้ได้สุราที่เรียกว่า สาโท เหล้าโท น้ำขาว หรือน้ำแดง ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ไม่มีการกลั่น นิยมผลิตกันมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ บางชุมชนใช้การหมักข้าวเหนียวนึ่งผสมแกลบกับลูกแป้งและน้ำในไหเรียกสุราแช่ประเภทนี้ว่า อุ หรือเหล้าแกลบ หรือเหล้าไห หรือช้าง สาโทถูกผลิตกันมากในภาคเหนือ อีสาน และภาคกลาง มีลักษณะเป็นของเหลวสีขุ่นหรือสีตามข้าว รสหวานหอม เฝื่อนเล็กน้อย ถ้าหมักจากข้าวเหนียวดำจะมีสีดำมีรสชาติอร่อย ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ อาจมีการใช้ข้าวเจ้าในการผลิตสาโทแต่ไม่ค่อยเป็นที่นิยม รสชาติของสาโทขึ้นอยู่กับความเหนียวของข้าว ยิ่งข้าวมีความเหนียวมากเท่าใด ก็ยิ่งทำให้สาโทมีรสชาติอร่อยนุ่มนวล โดยเฉพาะหากมีความหอมของข้าวด้วยแล้วจะทำให้สาโทเกิดกลิ่นหอมยิ่งขึ้น (สุพัฒน์ และกำพล, 2545) นอกจากนั้นก็ยังมีปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของสาโทด้วย



ภาพที่ 2.1 กระบวนการผลิตสาโท

ที่มา: เจริญ เจริญชัย และคณะ, 2545

2.1 ปัจจัยต่าง ๆที่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของสาโท (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550)

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

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโท

2.2.1 ข้าว

เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตสาโท มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ คือ *Oryzae sativa* โดยข้าวที่ปลูกในประเทศไทยจัดอยู่ใน indica type มี 2 ชนิด คือ ข้าวเจ้า (rice, ordinary rice) และข้าวเหนียว (glutinous rice, sticky rice) มีลักษณะเมล็ดยาวรี องค์ประกอบหลักในเมล็ดข้าว คือ แป้ง (starch) ซึ่งอยู่ในรูปของเม็ดแป้ง (starch granule) ซึ่งมีความสำคัญในการเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลและแอลกอฮอล์ เมื่อมีการหมักเกิดขึ้น แป้งมีสูตรทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ มีค่า n ไม่น้อยกว่า 1,000 โมเลกุลของแป้งประกอบด้วย α -D-glucopyranose ซึ่งต่อกันเป็นลูกโซ่ด้วย 1,4 - glycosidic linkage โดยการสร้าง oxygen bridge ระหว่างอะตอมของคาร์บอนตัวที่หนึ่งกับคาร์บอนตัวที่สี่ของกลูโคสโมเลกุลถัดไป แป้งส่วนใหญ่เป็นสาร heterogeneous ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสประกอบด้วย 2 ส่วน คือ อะไมโลส และ อะไมโลเพกทิน ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน

- อะไมโลส เป็นสายตรง ประกอบด้วย 70 - 2,100 หน่วยของน้ำตาลกลูโคส ต่อกันด้วยพันธะ α1-,4 glycosidic linkage ในแป้งทั่วไปพบพันธะชนิดนี้ได้ถึงเกือบ 100%
- อะไมโลเพกทิน เป็นพอลิเมอร์ที่มีการแตกแขนง ส่วนที่เป็นแขนงต่อกันด้วยพันธะ α1-,6 glycosidic linkage แต่ส่วนกลูโคสหน่วยอื่นๆต่อด้วยพันธะ α1-,4 glycosidic linkage

ปริมาณอะไมโลสในข้าวเหนียวยังขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวอีกด้วย เช่น ข้าวเหนียวดำมี 5.7% ข้าวเหนียวสันป่าตอง 2.8% และข้าวเหนียวดำไผ่ 41 มี 5.2% เป็นต้น การที่ข้าวมีอะไมโลสมากน้อยแตกต่างกัน จึงเป็นผลให้ลักษณะของข้าวเมื่อสุกแล้วแตกต่างกันด้วย กล่าวคือ ข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสสูง มีความเหนียว(sticky) และมีความชื้นน้อยกว่าข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสต่ำ และข้าวเหนียวมีเมล็ดแข็งกว่าข้าวเจ้า และแป้งข้าวเหนียวมีความหนืดมากกว่าแป้งข้าวเจ้า

การแบ่งประเภทของข้าว

จำแนกตามลักษณะการบริโภค หรือชนิดของแป้ง (สุภมาส ไข่คำ, 2544)

ข้าวเจ้า (non glutinous rice) มีอะไมโลสอยู่ประมาณ 7 - 33% ที่เหลือเป็นอะไมโลเพกทินเมล็ดข้าวมีสีขาวใส และเมื่อหุงสุกแล้วเมล็ดจะมีลักษณะร่วนกว่าข้าวเหนียว ข้าวเจ้าแต่ละพันธุ์มีความนุ่มเหนียวแตกต่างกัน

ข้าวเหนียว (glutinous rice หรือ waxy rice) ประกอบด้วยอะไมโลเพกทิน 98% และมีอะไมโลสอยู่น้อยมากเพียง 0 - 2% เมล็ดข้าวสารมีสีขาวขุ่น เมื่อนึ่งแล้วได้ข้าวสุกที่จับตัวเหนียวติดกัน และมีลักษณะใส

ในการทำสาโทนิยมใช้ข้าวเหนียวเป็นวัตถุดิบมากกว่าข้าวเจ้า เนื่องจากข้าวเหนียวให้กลิ่นและรสที่ดีกว่า และจุลินทรีย์ในลูกแป้งสามารถย่อยแป้งข้าวเหนียวได้ดีกว่าแป้งข้าวเจ้า (มนตรี เชาวน์สังเกต, 2521) องค์ประกอบภายในเมล็ดข้าว ส่วนใหญ่คือ starch ซึ่งประกอบด้วยอะไมโลส และอะไมโลเพกทิน เป็นองค์ประกอบหลัก และมีผลต่อคุณสมบัติของข้าวเมื่อนึ่งสุกแล้ว โดยข้าวที่มีอะไมโลสต่ำสามารถดูดน้ำและขยายตัวได้น้อยกว่าข้าวที่มีอะไมโลสสูง เมื่อนึ่งสุกข้าวจะเหนียวนุ่มกว่า จึงทำให้การแทงเส้นใยของเชื้อราเข้าสู่ภายในเมล็ดข้าวได้ง่าย (ราโตได้ดี) และองค์ประกอบของข้าวเหนียว พบว่า มีอะไมโลสน้อยมากจนแทบไม่มีเลย ดังนั้นข้าวเหนียวจึงเหมาะที่นำมาทำสาโทมากกว่าข้าวเจ้า (สุภมาส ไข่คำ, 2544) ส่วนการขัดสีข้าวก็อาจมีผลต่อคุณภาพและการหมักสาโท หากใช้ข้าวที่ยังมีรำข้าวเหลืออยู่บ้างอาจช่วยให้มีการหมักดีขึ้น เนื่องจากมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่าข้าวขัดขาว (พรพิมล ควรรณสุ, 2548)

กุณฑลี ไกรธรรมจิตกุล และ นุชรี อ่อนพร้อม (2547) ได้ทำการศึกษากลิ่นและรสที่ดีของสาโทที่ผลิตจากข้าวเหนียวดำและข้าวหอมนิลเปรียบเทียบกับที่ผลิตจากข้าวเหนียวขาว ซึ่งเป็นข้าวเหนียวที่ใช้กันทั่วไปสำหรับการผลิตสาโท จากการวิเคราะห์น้ำหมักสาโทด้วยเครื่อง แก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมตรี พบว่ารูปแบบของสารให้กลิ่นรสในสาโททั้งสามชุดการทดลองให้ผลแตกต่างกัน โดยพบสารระเหยบางชนิดซึ่งส่วนใหญ่ให้กลิ่นที่ดี พบในสาโทที่ผลิตจากข้าวเหนียวดำและข้าวหอมนิลแต่ไม่พบในสาโทที่ผลิตจากข้าวเหนียวขาว สารระเหยเหล่านี้ได้แก่ เอทิลโพรพิโอเนต, เอทิลบิวทิเรต และ โทลูอีน ซึ่งให้กลิ่นคล้ายผลไม้ และการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่ากลิ่นรสของสาโทที่หมักจากการใช้ข้าวเหนียวดำเป็นวัตถุดิบ เป็นที่ยอมรับจากผู้ทดสอบมากกว่าสาโทที่ผลิตจากข้าวเหนียวขาว คณะผู้วิจัยจึงรายงานว่ากลิ่นรสที่ดีนี้นอกจากจะเกิดจากสายพันธุ์ข้าวที่ใช้แล้วน่าจะเกิดจากกระบวนการที่จุลินทรีย์ในลูกแป้งสุราหมักแป้งที่เป็นองค์ประกอบในข้าวแต่ละสายพันธุ์ และได้กลิ่นที่แตกต่างกัน (กุณฑลี ไกรธรรมจิตกุล, 2547 และ นุชรี อ่อนพร้อม, 2547)

พรพิมล ควรรณสุ (2548) ได้ทำการศึกษาผลของพันธุ์และระดับการขัดสีข้าวต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีระหว่างการหมักไวน์ข้าว โดยทำการผลิตไวน์ข้าว โดยใช้พันธุ์ข้าว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ลอย กข6 และ ขาวดอกมะลิ 105 ที่มีระดับการขัดสี 3 ระดับ ได้แก่ ระดับการขัดสีที่ 0 หรือไม่ผ่านการขัดสี (อัตราการขัดสี 100%) ระดับการขัดสีที่ 1 (อัตราการขัดสีระหว่าง 86-84%) และ ระดับการขัดสีที่ 2 (อัตราการขัดสีระหว่าง 82-80%) และจุลินทรีย์ที่ใช้ได้แก่ *Amylomyces rouxii* TISTR 3128 และ *Saccharomyces*

cerevisiae TISTR 5049 จากนั้นวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของไวน์ข้าวในระหว่างการหมัก ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (total soluble solid) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ความเป็นกรด – เบส (pH) ปริมาณกรด (Total acidity) ปริมาณแอลกอฮอล์ สารประกอบเอสเทอร์ และฟูเซลออยล์ และประเมินคุณภาพของไวน์ข้าวโดยทดสอบความชอบทางด้านกลิ่นและการยอมรับ ผลการทดลองพบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าของของแข็งที่การละลายได้จะลดลงตามระยะเวลาในการหมัก และปริมาณแอลกอฮอล์จะสูงขึ้นตามระยะเวลาในการหมัก ส่วนปริมาณเอสเทอร์และฟูเซลออยล์ พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับการขัดสีข้าว ส่วนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นและการยอมรับของผู้บริโภคพบว่า ไวน์ข้าวที่หมักจากข้าวพันธุ์ กข6 ที่ระดับการขัดสีที่ 1 และ 2 ได้รับคะแนนความชอบสูงที่สุดทั้งในด้านกลิ่นและการยอมรับ (พร-พิมล ควรรณสุ, 2548)

2.2.2 น้ำ

เป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในสาโทไม่ต่ำกว่า 80% คุณภาพของน้ำมีผลต่อคุณภาพของสาโทเป็นอย่างมาก การผลิตจะต้องคำนึงถึงคุณภาพของน้ำเป็นพิเศษ น้ำที่เหมาะสมควรเป็นน้ำที่มีคุณภาพใกล้เคียงกับมาตรฐานน้ำดื่ม คือ ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และไม่มีรสชาติ สะอาด ไม่มีจุลินทรีย์ก่อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ควรเป็นน้ำอ่อน ไม่มีสนิมเหล็ก ไม่มีคลอรีน เพราะคลอรีนสามารถขัดขวางการเจริญของยีสต์ ทำให้ปฏิกิริยาการหมักเกิดขึ้นช้า และทำให้สาโทมีกลิ่นที่ผิดปกติไป (กุณฑลี ไกรธรรมจิตกุล, 2547)

2.2.3 ลูกแป้ง

เป็นกล้าเชื้อผสม (mixed culture) ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่เป็นตัวการสำคัญในการเปลี่ยนสภาพแป้งในข้าวให้กลายเป็นน้ำตาลหรือแอลกอฮอล์ (กฤษฎา ขุนแหลม, 2542) ลูกแป้งมีหลายชนิดผลิตขึ้นตามวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้ เช่นลูกแป้งสุรา ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งทำน้ำส้มสายชู เป็นต้น การผลิตลูกแป้งมักทำกันเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือน โดยมีกรรมวิธีที่คล้ายคลึงกัน และคล้ายคลึงกับการผลิตลูกแป้งของชนชาติอื่น ต่างกันแต่เพียงองค์ประกอบของวัตถุดิบ ขนาด รูปร่าง ตลอดจนชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์เท่านั้น (มนตรี เชาวน์สังเกต, 2521) องค์ประกอบสำคัญของลูกแป้ง ก็คือปลายข้าว ซึ่งใช้ได้ทั้งข้าวเหนียวและข้าวเจ้านำมาผสมกับเครื่องเทศหรือสมุนไพรต่างๆ คุณภาพของลูกแป้งขึ้นอยู่กับคุณภาพของข้าวและเครื่องเทศ

ลักษณะทั่วๆไปของลูกแป้งที่ดีคือ มีลักษณะโปร่งเบา สีขาวนวล (grey-white) ไม่มีรอยแตกร้าว ก้อนแป้งเป็นรูพรุน ซึ่งเกิดจากการฟูของแป้งขณะบ่ม เมื่อขยี้จะยุ่ยเป็นผงละเอียด ไม่มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว ลูกแป้งที่ผลิตจากแต่ละแหล่งพบว่าให้ประสิทธิภาพการหมักต่างกัน (นภา โล่ห์ทอง, 2535) โดยลูกแป้งที่นำมาใช้ในการผลิตสาโทนั้น เป็นชนิดลูกแป้งสุรา

จุลินทรีย์ในลูกแป้ง มีทั้งเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย ดังนี้

- เชื้อรา ที่ตรวจพบในลูกแป้งจากทุกๆ แหล่งที่มีรายงานการศึกษา ได้แก่ *Mucor hiemalis, M. racemosus, M. Indicus, Rhizopus oligosporus*, *R. oryzae* (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus* spp. ปริมาณที่พบมากน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของลูกแป้ง

- ยีสต์ในลูกแป้งสุราส่วนใหญ่จะพบ *Saccharomyces cerevisiae* ในปริมาณมากกว่า *Endomycopsis* spp. (นภา โล่ห์ทอง, 2535) นอกจากนี้ยังมียีสต์ชนิดอื่นที่พบในลูกแป้งเฉพาะแหล่ง ได้แก่ *Candida* spp.และ *Torulopsis* spp. เป็นต้น ส่วน อภิชญา เตชะวสัญญู (2550) สามารถพบ *Saccharomycopsis fibuligera, Pichia anomala*, *Issatchenkia orientalis*, *Tolulaspora delbrueckii* และ *Candida glabrata* (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550)

- แบคทีเรีย ตรวจพบแบคทีเรียแลคติก ซึ่งส่วนใหญ่ ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* และอาจพบ *Lactobacillus* spp. (นภา โล่ห์ทอง, 2535)

วัตถุดิบในการผลิตลูกแป้ง ได้แก่

1. แป้ง ใช้ได้ทั้งแป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวเจ้า
2. น้ำ ต้องใช้น้ำสะอาด สำหรับปริมาณน้ำที่ใช้ไม่แน่นอนขึ้นกับความชำนาญของผู้ทำ
3. ลูกแป้งเก่า ใช้เป็นแหล่งจุลินทรีย์เริ่มแรก เพื่อขยายพันธ์เพิ่มขึ้นในลูกแป้งใหม่
4. เครื่องเทศหรือสมุนไพร เป็นส่วนผสมสำคัญที่ทำทหน้าที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการในลูกแป้ง (สุหัทยา นำชัยสี่วัฒนา, 2549)

ขั้นตอนการผลิตลูกแป้งแบบภูมิปัญญาท้องถิ่น แสดงดังภาพที่ 2.2 แสดงให้เห็นว่าทุกขั้นในการผลิตมีโอกาสที่เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่จำเป็นต่อการหมัก ตั้งแต่ตัวแป้ง สมุนไพร ลูกแป้งเก่า การนวด การปั้น การตาก การบ่ม ไม่มีการควบคุม ตลอดจนการเก็บซึ่งส่วนใหญ่จะห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547) และปัจจุบันยังไม่มีสูตรและกระบวนการผลิตสาโทที่แน่นอนซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อคุณภาพของสาโทที่ได้ไม่คงที่ เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการผลิตสาเกซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประจำชาติของญี่ปุ่น ในกระบวนการผลิตสาเกนั้นใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วในการหมัก โดยขั้นแรกสาเกมีการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยใช้ *Aspergillus oryzae* และจากนั้นน้ำตาล จะถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์โดย *Saccharomyces sake* ซึ่งการใช้เชื้อบริสุทธ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วนี้มีข้อดีคือ ช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อการหมัก ทำให้ได้คุณภาพของสาเกที่ค่อนข้างคงที่ จากแนวคิดนี้ทำให้ได้มีนักวิจัยหลายคนได้ศึกษาเกี่ยวกับการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์จากลูกแป้งสุรา ดังนี้

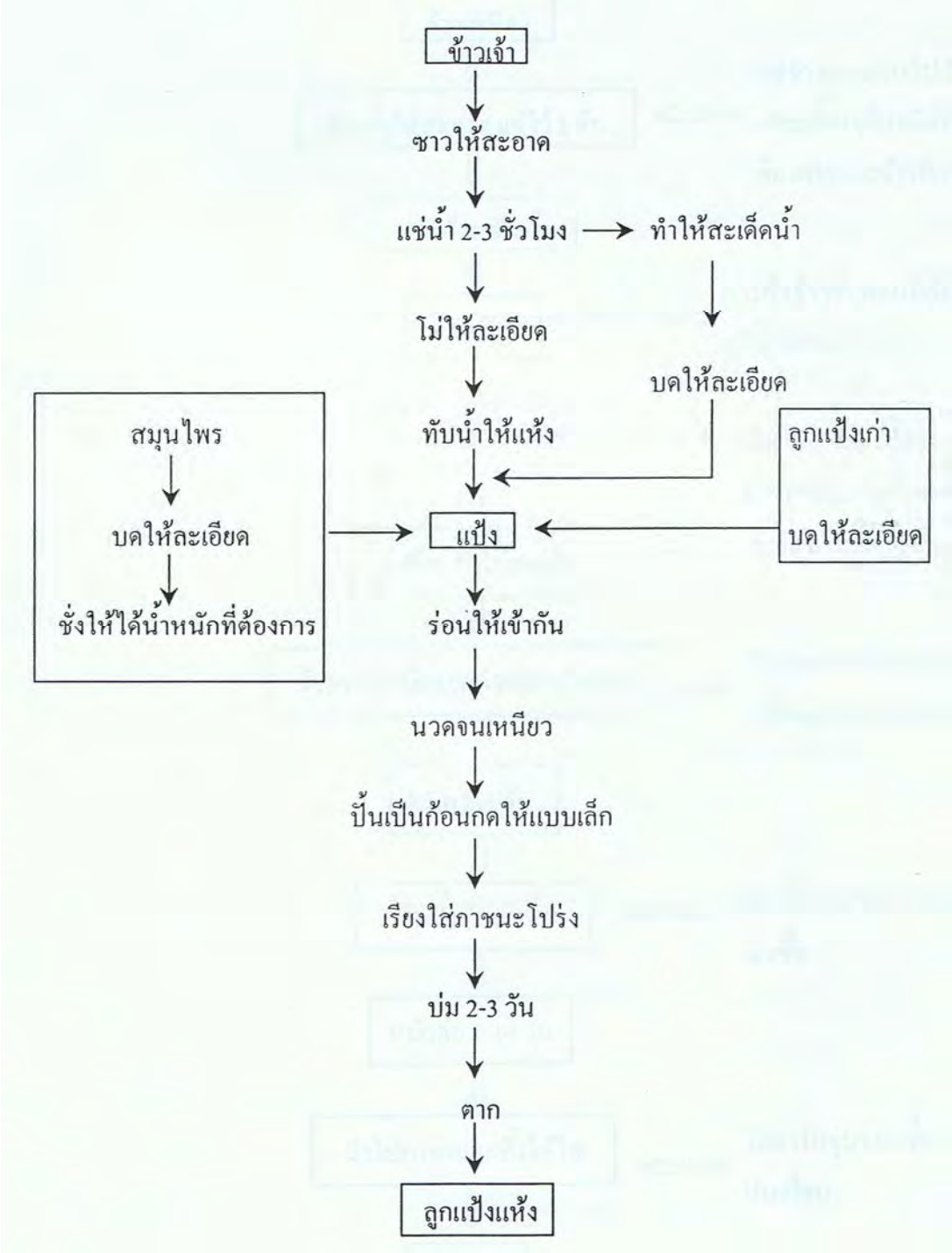
มนตรี เชาว์สังเกตุ (2521) ได้ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และราเพื่อใช้ผลิตไวน์ข้าวจากลูกแป้งทั่วประเทศ พบว่าราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งได้ดี ปริมาณกรดต่ำ และให้กลิ่นรสที่ดีแก่สาโทได้แก่

Rhizopus MM-52 และ *Amylomyces rouxii* MM-136 ส่วนยีสต์ทีทนปริมาณแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นสูง และให้กลิ่นรสที่ดีคือ *Saccharomyces cerevisiae* MS-52 เมื่อนำมาหมักและทดสอบด้านประสาทสัมผัสเทียบกับการหมักกับลูกแป้งพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน

วรรัตน์ โชติวรรณพร (2539) ทำการศึกษาการผลิตไวน์ข้าวเหนียวดำโดยการหมักโดยเชื้อบริสุทธิ์ โดยรวบรวมลูกแป้งจากทั่วประเทศและคัดแยกราและยีสต์ พบว่ารา LM 18 ซึ่งเป็นลูกแป้งสุราจากจังหวัดแพร่ย่อยแป้งได้ดีที่สุด และยีสต์ LY 17 หมักน้ำตาลได้ดีและทนต่อแอลกอฮอล์สูง ข้อมูลเบื้องต้นนี้สามารถนำไปสู่การพัฒนาการผลิตสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ต่อไป (วรรัตน์ โชติวรรณพร, 2539)

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

ซึ่งแนวทางการใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์นั้นจะทำให้สามารถควบคุมชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ได้ ตลอดจนสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่จำเป็นต่อการหมัก ทำให้สามารถสังเกตประสิทธิภาพการหมักได้ และยังทำให้สาโทที่ได้มีความคงที่ทุกรุ่นการผลิตดีกว่าวิธีการใช้ลูกแป้งสุรา (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547)



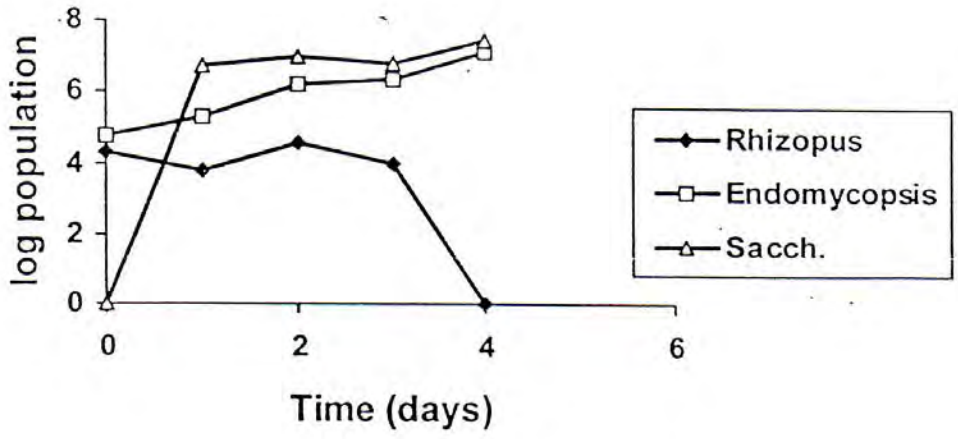
ภาพที่ 2.2 แสดงแผนภูมิการผลิตลูกแป้งแบบภูมิปัญญาท้องถิ่น

ที่มา: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547

2.3 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท

2.3.1 รา

ในระหว่างการหมักสาโท ราเจริญได้ดีในช่วง 2 - 3 วันแรกของการหมัก ซึ่งเป็นสภาพการหมักที่ใช้อากาศ เนื่องจากการบรรจุข้าวในถังหมัก จะบรรจุเพียง 1 ใน 4 ของปริมาตร เพื่อให้ราได้รับออกซิเจนจากอากาศอย่างทั่วถึง จากนั้นเมื่อเกิดน้ำเชื่อมข้าว (น้ำต้อย) ขึ้น และยีสต์เริ่มการหมัก ทำให้มีปริมาณแอลกอฮอล์และสภาพไร้ออกซิเจน ซึ่งเกิดจากการที่ยีสต์ปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ทำให้ราตายไป ดังกราฟในภาพที่ 2.3

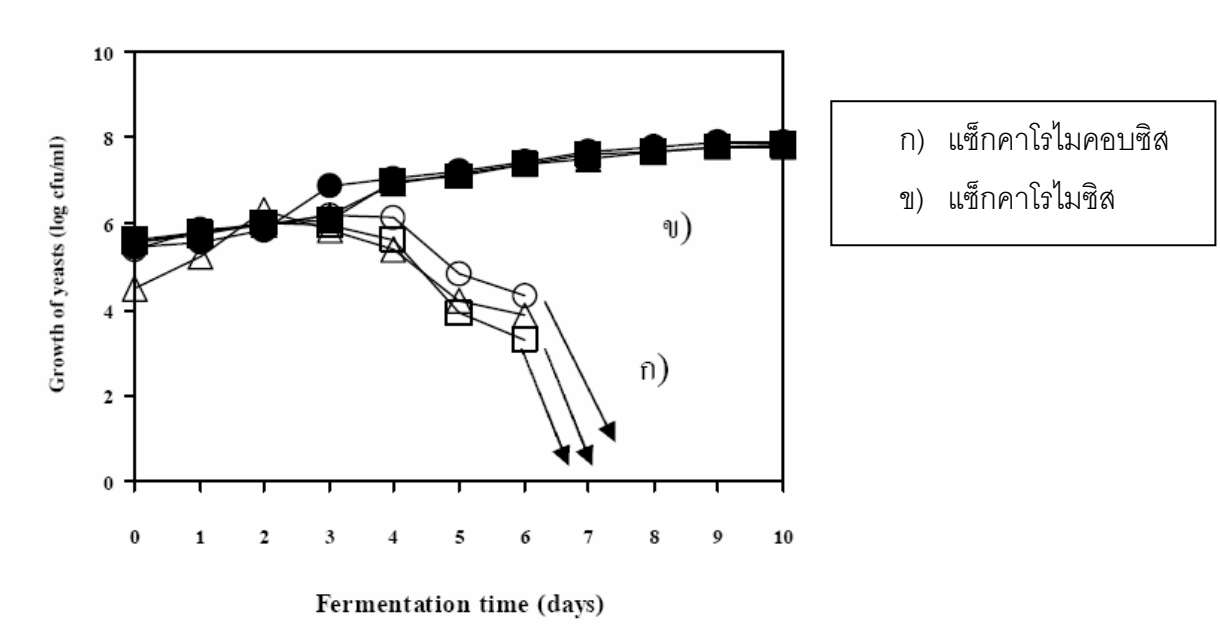


ภาพที่ 2.3 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท

ที่มา: เจริญ เจริญชัย และคณะ, 2545

2.3.2 ยีสต์

แม้ว่าในช่วงแรกของการหมัก พบยีสต์ในลูกแป้งเป็นชนิด *Saccharomycopsis* sp. แต่ในระหว่างการหมักสาโท ยีสต์นี้จะเจริญเพียงช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้นแล้วยีสต์นี้จะตายไป แต่จะพบยีสต์ *Saccharomyces* sp. ทำหน้าที่ในการหมักแทน ดังกราฟในภาพที่ 2.4 โดยยีสต์ *Saccharomyces* sp.มีความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ได้ดีกว่า และทนปริมาณแอลกอฮอล์ได้สูงกว่ายีสต์ชนิด *Saccharomycopsis* sp. แหล่งที่มาของยีสต์ที่ทำให้เกิดการหมักนี้ยังไม่ทราบเป็นที่แน่นอน แต่อาจมาจากลูกแป้งเช่นกัน แต่มีอยู่ในลูกแป้งในปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ในสภาพที่เหมาะสมของการหมักสาโท



ภาพที่ 2.4 การเจริญของยีสต์ 2 ชนิด จากลูกแป้งจากผู้ผลิต 3 แห่ง ระหว่างการหมักสาโท
ที่มา: เจริญ เจริญชัย และคณะ, 2545

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

2.3.3 แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับสาโท

2.3.3.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก มีความสำคัญต่อการหมักสาโท เนื่องจากสาเหตุ 2 ประการ คือ แบคทีเรียเหล่านี้มีส่วนในการทำให้สาโทเสื่อมเสีย และทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะของผลิตภัณฑ์

2.3.3.2 แบคทีเรียกรดแอซิติก

แบคทีเรียกรดแอซิติก หรือที่เรียกว่า แบคทีเรียกรดน้ำส้ม เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง สามารถออกซิไดส์เอทานอลให้เป็นกรดแอซิติก (กรดน้ำส้มสายชู) แบ่งเป็น 2 genera คือ *Acetobacter* sp. และ *Gluconobacter* sp. ซึ่งทำให้เกิดการเสื่อมเสียของสาโท ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรสน้ำส้มสายชู นอกจากนั้นการเจริญของแบคทีเรียแอซิติกในระหว่างการหมักสาโทยังอาจมีผลต่อการเจริญของยีสต์ด้วย ตารางที่ 2.2 แสดงชื่อต่างๆ ของแบคทีเรียกรดแลคติก และแบคทีเรียกรดแอซิติกที่พบในสาโท

ตารางที่ 2.2 แบคทีเรียกรดแลคติก และแบคทีเรียกรดแอซิติก ที่พบในสาโท

ชนิดของแบคทีเรีย	**สปีชีส์**
แบคทีเรียกรดแลคติก	*Leuconostoc oenos*, *Pediococcos pentosaceus*, *P. Parvulus*, *P. damnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. Casei*, *L. Brevis*, *L. Fermentum*, *L. Buchneri*, *L. trichodes*, *L. Hilgardii*, *L. fructivorans*
แบคทีเรียกรดแอซิติก	*Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*

นอกจากนี้อาจพบ *Bacillus* spp. ในลูกแป้งจากการปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ เช่น แป้ง และสมุนไพร แต่ถ้าส่วนผสมของสมุนไพรเหมาะสม สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์นี้ได้มาก (นภา โล่ห์ทอง, 2535)

2.4 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีที่สำคัญในการผลิตสาโท (ไพบูลย์ ด่านวิรุทัยและพัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2548)

ในกระบวนการผลิดเครื่องดื่มแอลกอฮอล์นั้น การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีถือได้ว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อคุณภาพและลักษณะเฉพาะของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แต่ละชนิด วัตถุดิบที่หลากหลายผสมผสานกับการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรสชาติ กลิ่น สี และเนื้อสัมผัส ที่เป็นเอกลักษณ์ที่ลงตัวของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์นั้นๆ

ปัจจุบันยังไม่พบรายงาน ปริมาณสารประกอบที่ให้กลิ่นและรสชาติในสาโท แต่ได้พบรายงานดังกล่าวในไวน์ ซึ่งองค์ประกอบต่างๆ เหล่านี้จะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของวัตถุดิบ ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตตลอดจนภาวะของการหมัก

ตารางที่ 2.3 ชนิดและปริมาณของสารประกอบที่สำคัญที่พบในไวน์

สารประกอบ	ความเข้มข้น
แอลกอฮอล์	
เอทานอล	80-130 ก./ล.
กลีเซอรอล	2-10 ก./ล.
ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	20-350 มก./ล.
แอคทีฟเอมิลแอลกอฮอล์	1-300 มก./ล.
ไอโซบิวทานอล	2-150 มก./ล.
โพรพานอล	10-125 มก./ล.
2 – ฟีนิลเอทานอล	15-200 มก./ล.
เอสเทอร์	
เอทิลแอซิเทต	5-200 มก./ล.
เอทิลแลคเทต	1-50 มก./ล.
ฟีนิลเอทิลแอซิเทต	0.1-10 มก./ล.
ไอโซเอมิลแอซิเทต	0.1-8 มก./ล.
ไอโซเอมิลออคตาโนเอต	0.1-2 มก./ล.
กรด	
ทาร์ทาริก	0.5-7 ก./ล.
มาลิก	0.05-5 ก./ล.
ซัคซินิก	0.05-2 ก./ล.
แลคติก	0.01-5 ก./ล.
แอซิติก	0.02-2 ก./ล.
ซิตริก	0.05-1 ก./ล.

การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีในการผลิตไวน์ผลไม้และสาโทนั้นมีทั้ง รา ยีสต์ และแบคทีเรีย

2.4.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยรา

การเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการหมักสาโทที่ใช้แป้งเป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิต ราที่เกี่ยวข้องเป็นกลุ่มที่สามารถสังเคราะห์อะไมโลไลติกเอนไซม์ (amylolytic enzyme) เช่น *Mucor hiemalis*, *M. racemosus* และ *Rhizopus oryzae* เป็นต้น (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ถูกส่งออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายแป้ง อะไมโลไลติกเอนไซม์ ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) และ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) หรืออะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) ซึ่งสามารถย่อยพันธะแอลฟา -1,4 และพันธะแอลฟา-1,6- ไกลโคซิดิก (α-1,4-และα-1,6-glycosidic) ของสายพอลิเมอร์ของแป้งทั้งที่มีโครงสร้างเป็นอะไมโลส หรืออะไมโลเพกทินได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ดังภาพที่ 2.5 นอกจากราจะเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลแล้วรายังผลิตสารประกอบที่ให้กลิ่นและรสชาติในสาโทด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีสต์ชนิด *Saccharomycopsis fibuligera* สามารถทำการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลได้ด้วย (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550)

$$(C_6H_{10}O_5)_n \xrightarrow{\text{อะไมโลไลติกเอนไซม์, (n-1) } H_2O} nC_6H_{12}O_6$$

แป้ง เอนไซม์ น้ำตาล

ภาพที่ 2.5 การเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล

2.4.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยยีสต์

ยีสต์ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ ทนต่อแอลกอฮอล์ได้ดีและตกตะกอนแยกออกจากไวน์ได้ง่ายซึ่งยีสต์หลักที่ทำการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ได้แก่ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งกิจกรรมหลักของยีสต์นั้น จะเปลี่ยนน้ำตาล 1 โมเลกุลให้ได้เป็นเอทานอล 2 โมเลกุล คาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล และพลังงาน ดังภาพที่ 2.6 ซึ่งปฏิกิริยาที่แสดงนี้เป็นปฏิกิริยาพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลงในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทุกชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีสต์ในกลุ่ม Non- *Saccharomyces* เช่น *Hanseniaspora guilliermondii* และ *Pichia anomala* ยังมีบทบาทในการสร้างสารให้กลิ่นรสในไวน์องุ่นอีกด้วย (Rajas และคณะ, 2001)

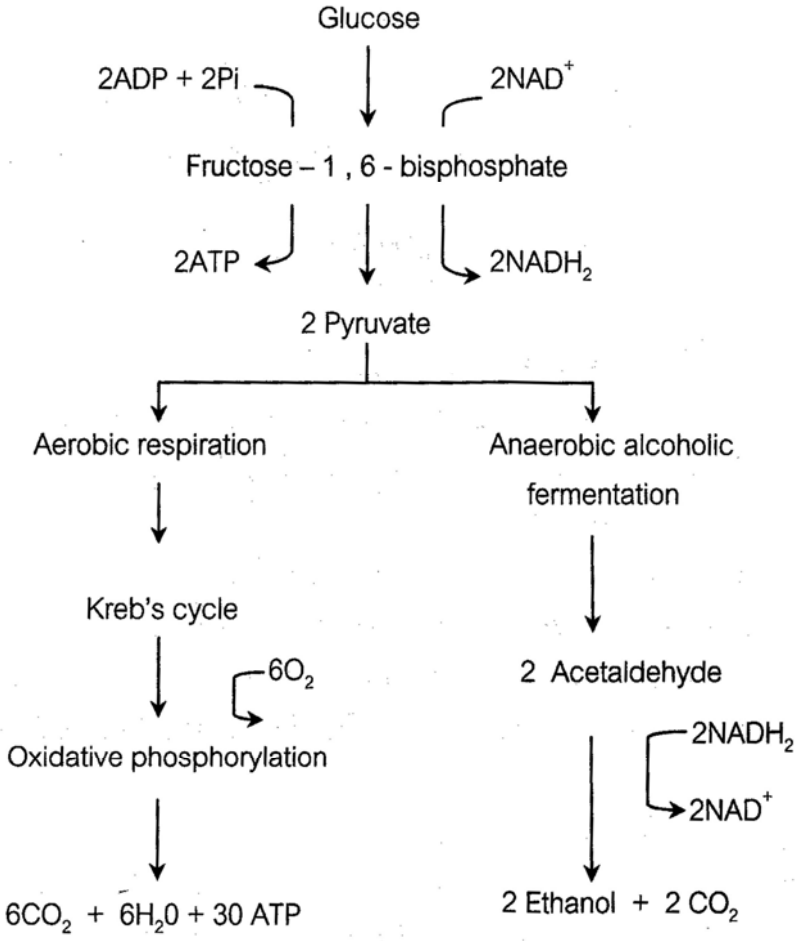
$C_6H_{12}O$ $\xrightarrow[\text{ยีสต์}]{}$ $2C_2H_5OH$ + $2CO_2$ + Energy

น้ำตาล เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ พลังงาน

ภาพที่ 2.6 การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล

ชีวเคมีของการเกิดเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ส่วนใหญ่จะเป็นการเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของยีสต์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงสรุปดังภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 แสดงเมแทบอลิซึมของยีสต์ภายใต้ภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ

ที่มา : ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย และพัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2548

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

ขั้นตอนต่อมาไพรูเวตจะถูกเปลี่ยนต่อไปให้ผลผลิตสุดท้ายต่างกันตามชนิดของยีสต์และภาวะแวดล้อมในระหว่างกระบวนการหมัก โดยแบ่งการเปลี่ยนแปลงเป็น 2 ประเภท คือ

1. ออกซิเดทิฟเมแทบอลิซึม (aerobic respiration) ในภาวะที่มีออกซิเจน ยีสต์ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นไพรูเวต จากนั้นไพรูเวตถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำโดยผ่านวัฏจักรเครบ (Kreb's cycle) และวิถีการหายใจ (oxidative respiration) ได้พลังงาน 30 ATP รวมกับขั้นตอนแรก 6-8 ATP (2 ATP รวมกับ 4-6 ATP ที่ได้จากการเปลี่ยน $NADH_2$ 2 โมเลกุล) เป็น 36-38 ATP ในภาวะนี้ยีสต์นำ ATP ที่ได้ไปใช้เป็นพลังงานในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของยีสต์ให้มากขึ้น

2. เฟอเมนเททิฟเมแทบอลิซึม (anaerobic fermentation) ในกรณีที่น้ำตาลกลูโคสมีความเข้มข้นสูงและ/หรือภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ไพรูเวตถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเรียกว่าเกิดภาวะ "การหมัก" (fermentation) ขึ้น โดยภาวะนี้มีจำนวนเซลล์ยีสต์เพิ่มเล็กน้อยและมีการเปลี่ยนไพรูเวตให้เป็นอะซีทัลดีไฮด์แล้วถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นเอทานอล ส่วน 2 $NADH_2$ ที่ได้จากขั้นตอนแรกถูกเปลี่ยนเป็น 2 NAD^+ ในขั้นตอนการเปลี่ยนเป็นเอทานอลเพื่อนำกลับไปใช้ในการสังเคราะห์ 2 ATP อีกรอบหนึ่ง ทำให้วิถีการเจริญของยีสต์ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนดำเนินต่อไปได้ โดยมี 2 NAD^+ เพียงพอในการใช้งาน

องค์ประกอบเคมีในสาโท

มนตรี เชาวน์สังเกต (2521) ได้ทำการวิเคราะห์สาโทในขณะที่ยังมีปฏิกิริยาของการหมัก จากบางแหล่งในประเทศ 11 ตัวอย่าง พบว่ามีลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีดังนี้

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

และในการวิเคราะห์องค์ประกอบของสาโทที่หมักโดยลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ 5 ตัวอย่าง และปล่อยให้เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์ ปรากฏว่าได้สาโทที่มีลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีดังนี้

ค่าความเป็นกรด-เบส	3.71 – 4.00
ปริมาณกรดทั้งหมด (% กรดแลคติก)	1.18 – 4.23

กรดระเหยง่าย (% กรดแอซิติก)	0.026 – 2.43
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (°Brix)	7.8 – 15.6
น้ำตาลรีดิวซ์ (%)	0.0 – 7.3
แอลกอฮอล์ (%)	6.8 – 14.8

2.5 สารประกอบที่ให้กลิ่นรสในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดไวน์องุ่น

สารประกอบที่ให้กลิ่นรสในสาโทนั้นมีความคล้ายคลึงกับที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดอื่นๆ ซึ่งสารประกอบที่ให้กลิ่นรสนั้นเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by product) ที่เกิดขึ้นโดยยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ในการสร้างสารประกอบให้กลิ่นของยีสต์มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง เช่น การเปลี่ยนแปลงภาวะในการหมัก ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส และ การกวน เป็นต้น ดังนั้นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แต่ละประเภทมีชนิดและปริมาณที่แตกต่างกันไปแปรผันตามวัตถุดิบ สายพันธุ์จุลินทรีย์ และกระบวนการที่ใช้ในการผลิต

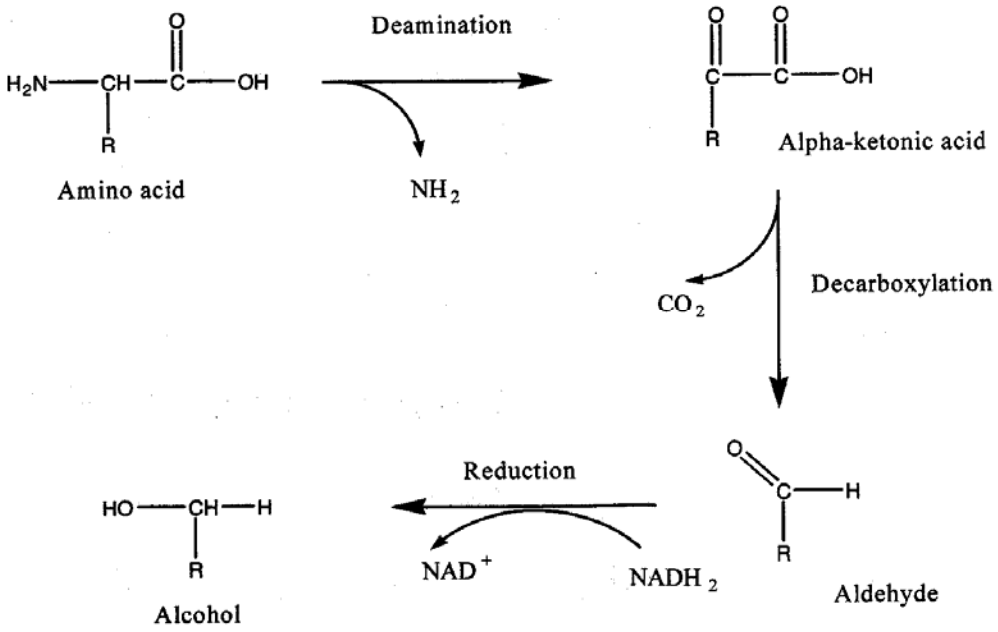
สารประกอบให้กลิ่นหลักในไวน์องุ่นทั่วไปคือ ฟูเซลแอลกอฮอล์ กรดระเหยง่าย และ เอสเทอร์ของกรดไขมัน โดยฟูเซลแอลกอฮอล์นั้นมีอยู่ประมาณ 50% ของ สารประกอบให้กลิ่นรส (Jackson, 2000)

ฟูเซลแอลกอฮอล์ (fusel alcohol)

ฟูเซลแอลกอฮอล์ เป็นกลุ่มแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอนอะตอมมากกว่า 2 อะตอม ซึ่งมีความสำคัญเนื่องจากช่วยให้กลิ่นรสของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีความซับซ้อน ส่วนใหญ่ที่พบในไวน์องุ่นเกิดจากผลิตภัณฑ์พลอยได้ของกระบวนการหมักของยีสต์ ซึ่งการเกิดฟูเซลแอลกอฮอล์ถูกสร้างไปควบคู่กับการสร้างเอทานอล พบฟูเซลแอลกอฮอล์ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มากกว่า 40 ชนิด แต่มีเพียงบางตัวเท่านั้นที่มีความสำคัญต่อกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ ฟูเซลแอลกอฮอล์ที่สำคัญคือพวกแอลกอฮอล์สายตรง ได้แก่ โพรพานอล ไอโซบิวทานอล แอทิฟเอมิลแอลกอฮอล์ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ แอโรมาติกแอลกอฮอล์ เฮกซานอล และ 2- ฟีนิล-เอทิลแอลกอฮอล์ เป็นต้น ความเข้มข้นของฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีความสำคัญ โดยพบว่าที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยทำให้เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดนั้นมีกลิ่นรสที่ซับซ้อน แต่ถ้ามากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี ฉุน และกลบกลิ่นรสที่ดีของสารตัวอื่น (พรพิมล ควรรณสุ, 2548) นอกจากนี้ฟูเซลแอลกอฮอล์ยังมีบทบาททางอ้อมในการพัฒนากลิ่นหอมของไวน์ โดยเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอินทรีย์ ทำให้เกิดเอสเทอร์ โดยในระหว่างกระบวนการหมักมีการสร้างเอสเทอร์อย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์จากยีสต์และมีการสร้างเอสเทอร์ต่อเนื่องไปในระหว่างการบ่มด้วย (Jackson, 2000)

การสังเคราะห์ฟูเซลแอลกอฮอล์นั้นเกิดโดยยีสต์สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ โดยโมเลกุลของกรดอะมิโนเกิดดีอะมิเนชัน (deamination) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ดึงเอาเอาแอมโมเนียออกจากโมเลกุลของกรดอะมิโนได้เป็นกรดแอลฟาคีโตนิก (α-ketonic acid) จากนั้นเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิลเลชัน

(decaboxylation) เอาคาร์บอนไดออกไซด์ออกได้เป็นแอลดีไฮด์ แล้วจึงเกิดปฏิกิริยารีดักชันของแอลดีไฮด์ได้เป็นแอลกอฮอล์ โดยปฏิกิริยาสุดท้ายมีการใช้ $NADH_2$ โดยเปลี่ยนไปเป็น NAD^+ ดังแสดงในภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดอะมิโนไปเป็นฟูเซลแอลกอฮอล์
ที่มา : ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย และพัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2548

จากกระบวนการดังกล่าวข้างต้นทำให้ได้ชนิดและปริมาณของฟูเซลแอลกอฮอล์แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน ดังสรุปได้ในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 กรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นและฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในไวน์องุ่น (ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย และพัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2548)

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

กรด (Acids)

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

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

กรดไขมันสามารถให้ความซับซ้อนของกลิ่นในไวน์ กรดแอซิติกมีประโยชน์เมื่อมีอยู่ในผลิตภัณฑ์ในปริมาณน้อยๆ ถ้าปริมาณกรดคาร์บอกซิลิกเกินกว่าระดับ threshold จะให้ผลในทางลบต่อกลิ่นรสของไวน์ ในระหว่างกระบวนการหมักและบ่ม กรดมีผลต่อปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์ ซึ่งมีความสำคัญต่อกลิ่นรสผลไม้ของไวน์ นอกจากนี้อิทธิพลของความเป็นกรดยังมีผลในระหว่างการบ่ม ที่ pH ต่ำทำให้เกิดการย่อยสลายพวกไดแซ็กคาไรด์ เช่น ทรีฮาโลส และพอลิแซ็กคาไรด์อื่นๆ ซึ่งเป็นการเพิ่มน้ำตาลในไวน์ในระหว่างการบ่มด้วย (Jackson, 2000)

กรดไพรูวิก

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

กรดซิตริก (Citric acid)

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

- ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ
- มีสมบัติเป็นตัวป้องกันการเกิดออกซิเดชันของซัลเฟอร์ไดออกไซด์
- ทำให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ต้องการเพิ่มขึ้น
- ทำให้ไวน์ใสขึ้น
- ช่วยปรับภาวะสมดุลของไวน์ (รุ่งตระการ จันทนพันธ์, 2549)

กรดแอซิติก

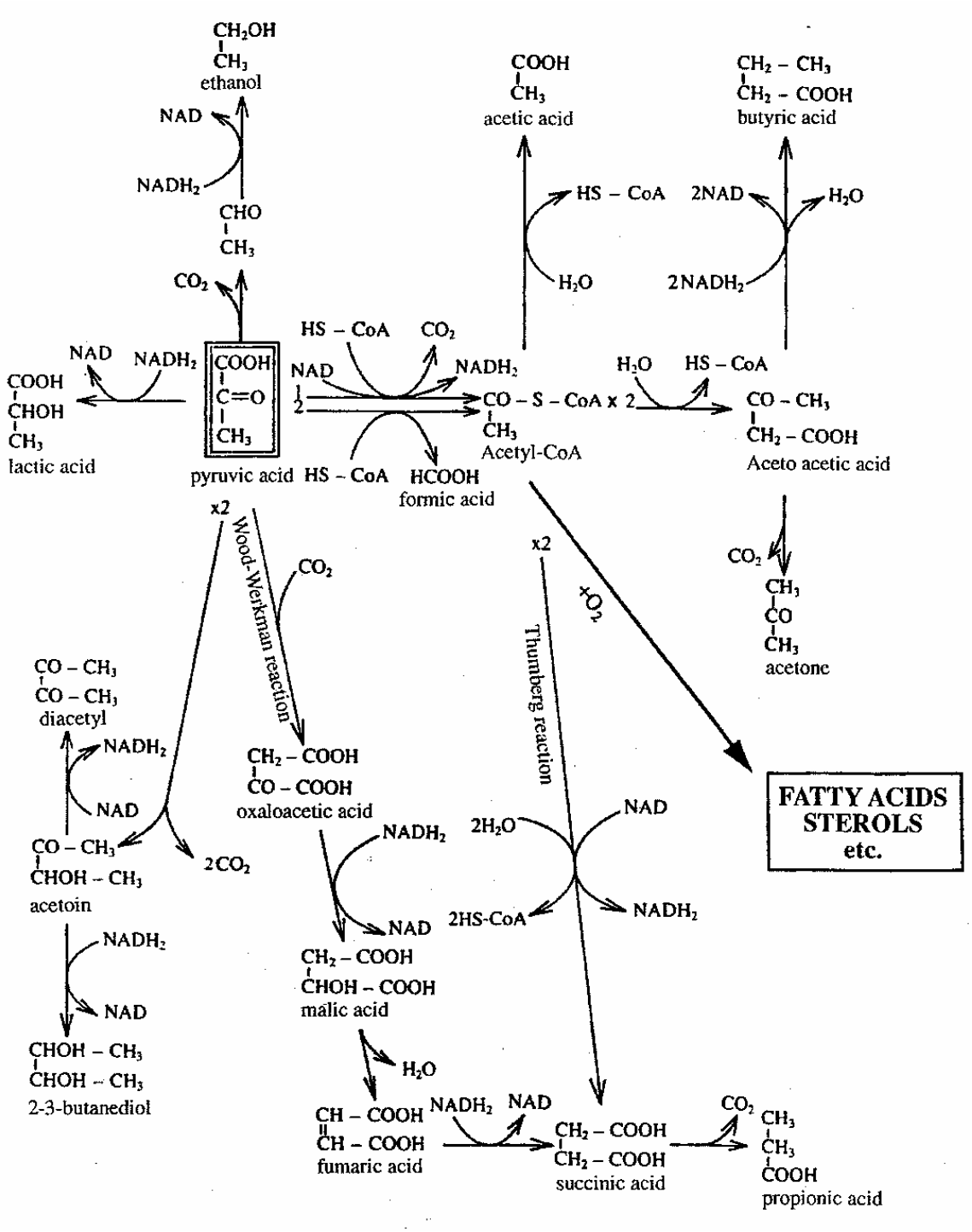
ในระหว่างกระบวนการหมักไวน์ ยีสต์ช่วยสร้างกรดแอซิติกได้ในปริมาณน้อย ระดับปกติที่พบในไวน์คือ น้อยกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอซิติกสามารถช่วยเพิ่มความซับซ้อนให้กับกลิ่นรสที่ดีในไวน์ได้ มีความสำคัญในการสร้างสารในกลุ่มแอซิเทตเอสเทอร์ซึ่งให้กลิ่นผลไม้ในไวน์ แต่ถ้ามีมากเกิน 300 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้เกิดรสเปรี้ยวและกลิ่นที่ไม่ดีกับไวน์ ซึ่งถ้ามีปริมาณกรดแอซิติกมากแสดงว่าอาจเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียกรดแอซิติกหรือกรดแลคติกได้ (Jackson, 2000)

กรดแลคติก

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

กรดซัคซินิก

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



ภาพที่ 2.9 การสร้างสารประกอบทุติยภูมิของกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ที่มีกรดไพรูวิกเป็นสารตั้งต้น

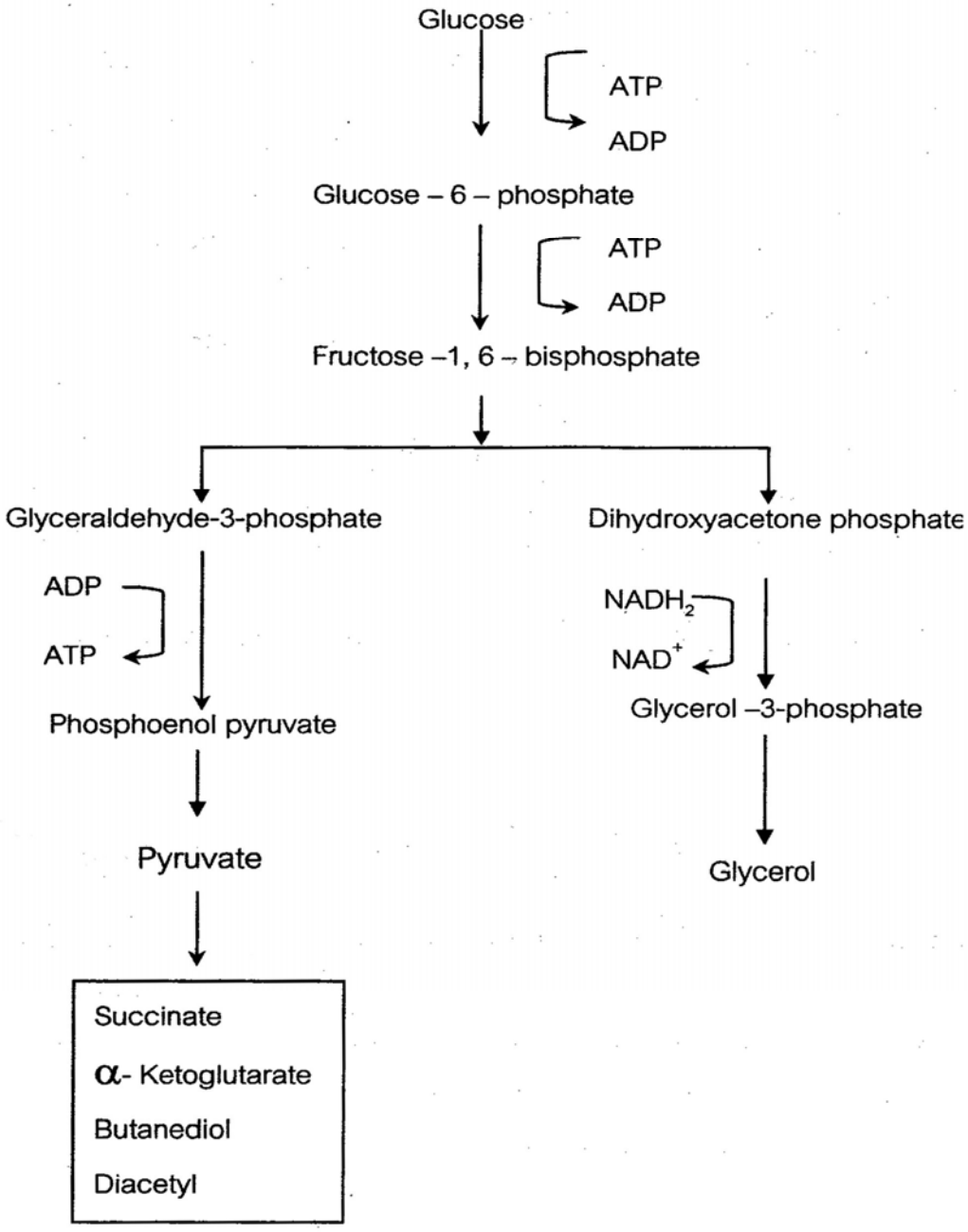
ที่มา : Delfini และ Formica, 2001

กลีเซอรอล

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

ชีวเคมีของการเกิดกลีเซลรอล (ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย และพัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2548)

นอกจากยีสต์จะเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นเอทานอลในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแล้ว ยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้ทำไวน์ยังสามารถเปลี่ยนกลูโคสโดยวิถีการหมักกลีเซอโรไพรูวิก (glyceropyruvic fermentation) ให้ได้กลีเซลรอลและไพรูเวต ดังภาพที่ 2.10 โดยการเกิดกลีเซลรอลนั้นส่วนใหญ่จะเกิดในระยะเริ่มต้นของกระบวนการหมัก ซึ่งการผลิตกลีเซลรอลจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์และปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์เริ่มต้นที่มีอยู่ในน้ำผลไม้ก่อนหมัก เพราะซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะไปทำปฏิกิริยากับอะเซทัลดีไฮด์ ทำให้อะเซทัลดีไฮด์ไม่สามารถรีดิวซ์ต่อไปเป็นเอทานอลได้ เป็นผลให้วิถีการผลิตเอทานอลหยุดลง โดยทั่วไปร้อยละ 8 ของกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นกลีเซลรอล อีกร้อยละ 92 ของกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล ส่วนไพรูเวตสามารถเปลี่ยนต่อไปเป็นสารประกอบอื่นๆ ได้ดังภาพที่ 2.9 ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ล้วนมีผลต่อกลิ่นและรสชาติของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์



ภาพที่ 2.10 แสดงวิถีการย่อยสลายกลูโคสเป็นกลีเซอรอล ซัคซิเนตและสารประกอบอื่นๆ โดยยีสต์ในภาวะที่ไม่ใช้อากาศ

ที่มา : ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย และพัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2548

เอสเทอร์ (Esters)

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

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

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

โดยใน 3 กลุ่มย่อยนี้ มีเฉพาะโมโนคาร์บอกซิลิกแอซิดเอสเทอร์ เท่านั้นที่ถูกเชื่อว่ามีความสำคัญทางด้านกลิ่นรส ซึ่งขึ้นอยู่กับ เอทานอลและกรดไขมันอิ่มตัว เช่น กรดเฮกซาโนอิก (แคโพรอิก) ,กรดออกทาโนอิก (แคพริริก) และ กรดเดคาโนอิก (แคพริก) และขึ้นกับกรดแอซิติก และฟูเซลล์แอลกอฮอล์ เช่น ไอโซเอมิล และ ไอโซบิวทิล แอลกอฮอล์ ซึ่งในกลุ่มนี้พบว่าให้กลิ่นรสในไวน์มาก เอสเทอร์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำเหล่านี้จะถูกเรียกว่า เอสเทอร์ผลไม้ (fruit ester) เนื่องจากส่วนใหญ่ให้กลิ่นผลไม้ เช่น ไอโซเอมิลแอซิเทต ให้กลิ่นกล้วย (banana like odor) และ เบนซิลแอซิเทต ให้กลิ่นแอ๊ปเปิ้ล (apple like odor) เป็นต้น เมื่อความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนเพิ่มขึ้นกลิ่นจะเปลี่ยนจากกลิ่นผลไม้ไปสู่กลิ่นสบู่ (soap like odor) และสุดท้ายเมื่อกรดไขมันมีคาร์บอน 16 ถึง 18 ให้กลิ่นน้ำมันหมู (lard like odor) ส่วนในกลุ่มของไดหรือไตรคาร์บอกซิลิกแอซิดเอสเทอร์นั้นปกติปริมาณที่จะมีเกิดขึ้นในไวน์จะประมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเฉพาะเอทิลแลคเทต ซึ่งเกิดจากกระบวนการหมักแบบมาโลแลคติก แต่สารในกลุ่มนี้มีกลิ่นอ่อนจึงไม่มีผลต่อกลิ่นรสของไวน์อย่างโดดเด่น แต่ในทางตรงข้ามการเกิดของ เมทาโนลิก และ เอทาโนลิก เอสเทอร์ ของกรดซัคซินิกให้กลิ่นในไวน์ Muscadine ตัวอย่างอื่นๆ คือ เอสเทอร์ที่ขึ้นกับ กรดมาลิก กรดทาร์ทาริก และกรดซิตริก ในกลุ่มของ ไฮดรอกซิลและออกโซแอซิดเอสเทอร์นั้น เกิดการระเหยได้ยากและพบว่ามีบทบาททางประสาทสัมผัสด้านการชิมเล็กน้อย เอสเทอร์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับกรดแลคติก ส่วนเอทิลและเมทิลเอสเทอร์ของกรดอะมิโนจะ

เกิดในระดับมิลลิกรัมต่อลิตร และสมบัติทางประสาทสัมผัสด้านการชิมยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Jackson, 2000)

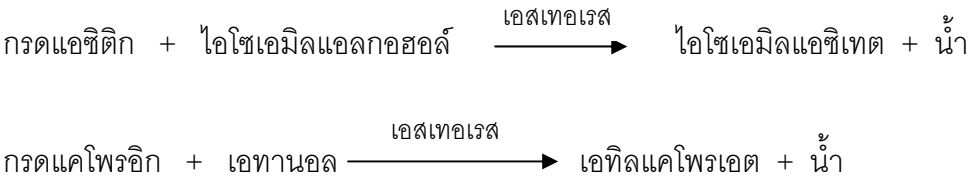
มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการเกิดเอสเทอร์ในระหว่างกระบวนการหมัก เช่น กิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรส (Esterase) ในยีสต์ที่ต่างสายพันธุ์ อุณหภูมิในระหว่างการหมัก ถ้าหมักที่อุณหภูมิต่ำ (~ 10° C) จะสนับสนุนการสังเคราะห์ของเอสเทอร์ผลไม้ เช่น ไอโซเอมิล ไอโซบิวทิล และ เฮกซิลแอซิเทต เป็นต้น แต่ถ้าหมักที่อุณหภูมิสูงจะสนับสนุนการเกิดของเอสเทอร์ที่มีมวลโมเลกุลสูงๆ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

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

การเกิดสารประกอบเอสเทอร์ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เกิดได้จาก 2 กระบวนการ คือ

1. ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ในระหว่างการเก็บบ่ม

ปฏิกิริยานี้เป็นการเกิดเอสเทอริฟิเคชันระหว่าง แอลกอฮอล์กับกรดอินทรีย์ ที่มีในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ทำให้เกิดสารประกอบพวกเอสเทอร์ขึ้น กระบวนการนี้เกิดขึ้นอย่างช้าๆ ในระหว่างการหมักบ่มโดยมีเอนไซม์เอสเทอร์เรส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการแสดงในภาพที่ 2.11

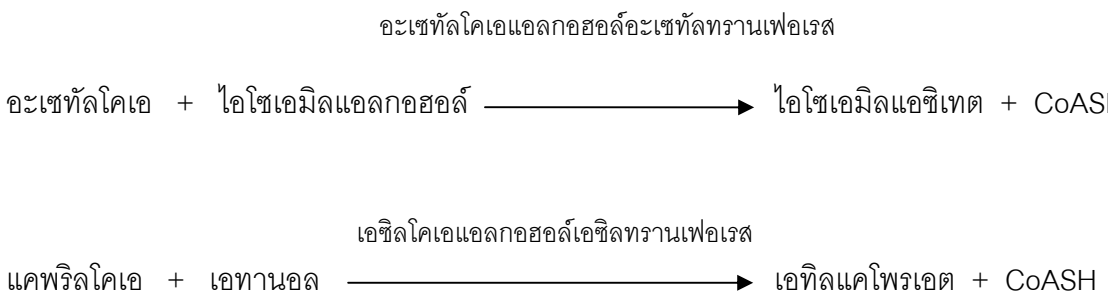


ภาพที่ 2.11 การเกิดเอสเทอริฟิเคชันระหว่างกรดและแอลกอฮอล์ โดยมีเอนไซม์เอสเทอเรส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ที่มา : สุมัลลิกา โมรากุล, 2545

2. เอสเทอริฟิเคชันโดยเอนไซม์ระหว่างการหมัก

เกิดช่วงหลังของการหมักโดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แอลกอฮอล์อะเซทิลทรานสเฟอเรส และ แอลกอฮอล์เอซิลทรานสเฟอเรส ทำให้เกิดเอสเทอร์ดังสมการที่แสดงในภาพที่ 2.12



ภาพที่ 2.12 การเกิดเอสเทอริฟิเคชันระหว่างการหมักโดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แอลกอฮอล์อะเซทิลทรานสเฟอเรส และ แอลกอฮอล์เอซิลทรานสเฟอเรส

ที่มา : สุมัลลิกา โมรากุล, 2545

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

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

ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับบทบาทของราและยีสต์ในการสร้างสารให้กลิ่นรสในสาโทอย่างเป็นที่แน่ชัด งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาบทบาทในการสร้างสารให้กลิ่นของยีสต์และราที่อยู่ในลูกแป้งสุรา เพื่อนำไปสู่แนวทางในการใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมในการผลิตสาโทซึ่งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany.
2. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
3. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA.
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland.
6. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
7. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น GenieII G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
8. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท SANYO, Japan.
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น NST 2000 ของบริษัท EYELA, Japan.
10. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France.
11. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
12. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสแอซิเทต ขนาดความกว้างรู 0.22 ไมโครเมตร Restek,Thailand
13. Headspace Autosampler Vial 20 มิลลิลิตร ของบริษัท Varian, Thailand
14. Crimper 20 mm Seals ของบริษัท Agilent, USA

สารเคมี

1. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
2. น้ำตาลกลูโคสของบริษัท Difco Laboratories, USA.
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E Merck, Germany.
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
5. แอลกอฮอล์สัมบูรณ์ ของบรษัท E Merck, Germany.
6. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland.
7. กรดแอซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
8. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ของบริษัท E Merck, Germany.

9. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France.
10. กรดซัคซินิก ของบริษัท May & Baker Ltd., England.
11. กรดซิตริก ของบริษัท E Merck, Germany.
12. กรดไพรูวิก ของบริษัท Sigma, USA.
13. กรดแลคติก ของบริษัท Sigma, USA.
14. สารมาตรฐานสารประกอบให้กลิ่นรวม (Custom mix Standard) ของบริษัท Sigma, USA.
15. โบรโมครีซอล เพอร์เพิล (Bromocresol purple) ของบริษัท Fluka, Switzerland.
16. นิสทาทิน ของบริษัท Biobasic inc, Canada.

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

แหล่งลูกแป้งสุรา

นำลูกแป้งสุราที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่าเมื่อนำไปผลิตสาโทแล้วได้รสชาติดี เป็นที่ยอมรับจากส่วนวิทยานิพนธ์ของนางสาว อภิชญา เตชะวสัญญู นิสิตปริญญาโท ที่ดำเนินการวิจัยใน พ.ศ. 2548 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 3 แหล่งลูกแป้งสุรา ดังนี้

1. ลูกแป้งสุราจากจังหวัดนครพนม (NP1)
2. ลูกแป้งสุราจากจังหวัดน่าน (NN6)
3. ลูกแป้งสุราจากจังหวัดหนองคาย (NK2)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์ของราและยีสต์ ที่แยกได้จากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกแล้ว (NP1)

จุลินทรีย์	ชนิดของจุลินทรีย์	ปริมาณ (CFU/กรัม)
รา	*Mucor racemosus* NP 102 (M1)	2×10^4
	Rhizopus oligosporus NP 101 (M2)	3×10^3
ยีสต์	*Saccharomyces cerevisiae* NP 1930 (Y1)	7×10^4
	Pichia anomala NP 101 (Y2)	22×10^4
	Saccharomycopsis fibuligera NP 1030 (Y3)	2×10^4
แบคทีเรีย	Lactic acid bacteria (LAB)	3×10^5

การแยกยีสต์และรา จากลูกแป้งสุรา

ราและยีสต์บริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดลอง ทำการแยกโดยนางสาว อภิชญา เตชะวสัญญู นิสิตปริญญาโท ที่ดำเนินการวิจัยใน พ.ศ. 2548 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก จากลูกแป้งสุรา

นำลูกแป้งสุรา NP1 มาบดละเอียด จากนั้นชั่ง 1 กรัม ละลายในโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร เจือจางในระดับต่างๆ จากนั้นเกลี่ยสารละลายที่เจือจางในระดับต่างๆ ปริมาตร 0.1 มล. ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่เติมนิสทาทิน และ โบรโมครีซอล เพอร์เพิล

0.004 % เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการทดสอบทางชีวเคมี ตามวิธีของ Stanley และคณะ (1989) โดยทดสอบปฏิกิริยาแคทาเรส โดยทำการหยดไฮโดรเจนเปอออกไซด์ ลงบนแบคทีเรียที่แยกได้ ถ้าเป็นแบคทีเรียกรดแลค-ติกซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจะไม่เกิดฟองฟู่

วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 การผลิตสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุราและเชื้อบริสุทธิ์ผสมของ รา ยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลกติก ที่แยกได้จากแหล่งลูกแป้งสุรานั้น ๆ

3.1.1 การหมักสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุรา

ทำการบดตัวอย่างลูกแป้งสุรา 2 กรัม ใส่ลงในข้าวเหนียวนึ่ง 100 กรัม ที่บรรจุขวดขนาด 500 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้เข้ากัน โดยเติมน้ำในช่วงการหมักวันที่ 3 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 11 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ได้แก่ ความเป็นกรด-เบส (pH) ปริมาณกรดทั้งหมด (%total acidity) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล ปริมาณกรดอินทรีย์และกลีเซอรอล และสารประกอบให้กลิ่น

3.1.2 การหมักสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมของ รา ยีสต์ และ แบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา

ทำการหมักสาโทตามวิธีในข้อ 3.1.1 แต่ใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ดังตารางที่ 3.1 โดยทำการจับคู่ราและยีสต์บริสุทธิ์ เป็นชุดทดลอง ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงการจับคู่ของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1

ชนิดของจุลินทรีย์	ชุดทดลอง					
	M1M2	M1M2+Y1	M1M2+Y1+Y2	M1M2+Y1+Y3	M1M2+Y1+Y2+Y3	M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB
รา						
M. racemosus (M1)	√	√	√	√	√	√
R. oligosporus (M2)	√	√	√	√	√	√
ยีสต์						
S. cerevisiae (Y1)	-	√	√	√	√	√
P. anomala (Y2)	-	-	√	-	√	√
S. fibuligera (Y3)	-	-	-	√	√	√
แบคทีเรีย						
แบคทีเรียกรดแลคติก (LAB)	-	-	-	-	-	√

ในทุกชุดการทดลองทำการเติมรา *M. racemosus* (M1) และ *R. oligosporus* (M2) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 30 องซาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ลงในข้าวเหนียวนึ่ง 100 กรัม จำนวนชนิดละ 3 คอร์กบอร์เรอร์ (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) ในวันที่ 0 ของการหมักคลุกเคล้าให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำในวันที่ 3 ของการหมัก ปริมาตร 200 มล. และทำการเติมยีสต์ที่เจริญในอาหารเหลว YM medium ที่อุณหภูมิ 30 องซาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ในชุดทดลองต่างๆ ดังนี้

- *S. cerevisiae* (Y1) จำนวน 7 x 10^4 cfu/g ในทุกชุดการทดลอง เนื่องจากในทุกลูกแป้งจะมียีสต์ดังกล่าวเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยเสมอ (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) ยกเว้นชุดควบคุม M1M2

- *P. anomala* (Y2) จำนวน 22 x 10^4 cfu/g ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2, M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB

- *S. fibuligera* (Y3) จำนวน 2 x 10^4 cfu/g ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y3, M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB

และทำการเติมแบคทีเรียกรดแลคติก โดยนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จำนวน 10 ไอโซเลต เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 30 องซาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 2 วัน รวมจำนวนได้ 3 x 10^5 cfu/g ลงในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 11 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ได้แก่ ความเป็นกรด-เบส ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล ปริมาณกรดอินทรีย์และกลีเซอรอล และสารประกอบให้กลิ่น

3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ ของสาโทที่หมักได้

เก็บน้ำหมักที่ได้จากข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังนี้

3.2.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด – เบส

วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยเครื่อง pH meter

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

นำไวน์ตัวอย่างมา 5 ml เติมน้ำร้อน 50 ml แล้วหยด Phenopthalene 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับ NaOH 0.1 นอร์แมล จนสารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู อ่านค่าปริมาตร NaOH ที่ได้ แล้วนำไปคำนวณ %TA

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

V = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นนอร์แมล (N)

v = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

MW (lactic acid) = 90

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

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

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

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ เอทานอล กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดซิตริก กรดไพรูวิก กรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดแอซิติก และกลีเซอรอล ตามวิธีที่แสดงในภาคผนวก ข

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

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

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น (Volatile compound) ในสาโท

นำน้ำหมักที่ได้จากข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 มา 10 มิลลิลิตร ใส่ใน vial ที่ปราศจากเชื้อ ขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิทด้วย Crimper 20 mm Seals จากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐาน ที่ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์ :	HP-624, Capillary Column, Agilent 19091v-402
	(25.0 m x 0.2 mm id x 1.12 µm film thickness)
Injector :	Split (20:1)

อุณหภูมิของ Injector : 200 องศาเซลเซียส

ปริมาตรฉีด : 1 ไมโครลิตร

Carrier gas : ฮีเลี่ยม

Carrier gas flow rate : 1 มล./นาที

อุณหภูมิของ Oven : 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

40 องศาเซลเซียส ถึง 220 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 15 องศาเซลเซียส/นาที

220 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

Run Time : 20 นาที

ชนิดของ Detector : Masspectometer (MS)

Detector gas : ฮีเลี่ยม

อุณหภูมิของ Detector : 280 องศาเซลเซียส

Headspace Device : Agilent G1888 Headspace Sampler

อุณหภูมิของ Oven : 80 องศาเซลเซียส

Vial equilibration time : 20 นาที

3.4 การศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ในสาโท

ทำการศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ในน้ำหมักโดยใช้วิธี dilution plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะ เริ่มจากทำการหมักสาโทเฉพาะลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 ตามวิธีในข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 11 ของการหมัก นำตัวอย่างมาตีด้วยเครื่อง stomacher จนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปทำ ให้เจือจาง และนำตัวอย่างที่เจือจางแล้วไปเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ ดังนี้

3.4.1 สำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์และรา

3.4.1.1) นำของเหลว 1 มล. ใส่ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 9 มล. เจือจางในระดับต่างๆ

3.4.1.2) หยดสารละลายที่ได้จาก 3.4.1.1 ปริมาตร 0.1 มล. ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Rose bengal สำหรับตรวจหาปริมาณรา และ Yeast malt agar (YM) สำหรับตรวจหาปริมาณยีสต์ เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

3.4.1.3) นับจำนวนเชื้อ และคำนวณหาปริมาณของราและยีสต์ในน้ำหมัก (หน่วย CFU ต่อ มล.น้ำหมัก)

3.4.2 สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

3.4.2.1) นำของเหลว 1 มล. ใส่ในโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ปราศจากเชื้อ 9 มล. เจือจางในระดับต่างๆ

3.4.2.2) หยดสารละลายที่ได้จาก 3.4.2.1 ปริมาตร 0.1 มล. ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Medium ที่เติมนิสทาทิน และ โบรโมครีซอล เพอร์เพิล ความเข้มข้น 0.004% เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 2 วัน

3.4.2.3) นับจำนวนเชื้อและคำนวณหาปริมาณของแบคทีเรียในน้ำหมัก (หน่วย CFU ต่อ มล.น้ำหมัก)

3.5 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory test) ในสาโท

นำสาโทจากข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 มาทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยผู้ทดสอบที่มีความเชี่ยวชาญและคุ้นเคยกับการดื่มสาโท จำนวน 10 คน ทำการชิมและให้คะแนนในใบให้คะแนน (ภาคผนวก ค) และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ทางสถิติโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การใช้ลูกแป้งสุราในการผลิตสาโทเปรียบเทียบกับสาโททางการค้า

จากการใช้ลูกแป้งสุราที่คัดเลือกแล้ว 3 แหล่งคือ NP1 NN6 และ NK2 นำมาทำการผลิตสาโท ได้ทำการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีต่างๆเทียบกับสาโททางการค้า ได้ผลแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกแล้วและสาโททางการค้า

องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ	สาโท				
	NP1	NN6	NK2	ทางการค้า 1	ทางการค้า 2
ค่าความเป็นกรด – เบส	3.67	3.48	3.6	3.59	3.5
ปริมาณกรดรวม (%TA)	0.36	0.56	0.43	0.36	0.45
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก. /มล.)	0.44	3.59	0.95	17.41	24.09
ร้อยละเอทานอล	11.83	9.75	11.28	7.89	8.74

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

ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ในสาโทมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยค่า pH ของสาโทจะมีค่าต่ำเมื่อสาโทมีปริมาณกรดรวมมาก โดย มนตรี เชาวน์สังเกต (2521) ได้ทำการวิเคราะห์สาโทที่เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์พบว่า ค่า pH และค่าปริมาณกรดรวม ในสาโท มีค่าอยู่ระหว่าง 3.40 – 4.70 และ 0.29 – 0.93 ตามลำดับ (ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2546) จากการทดลองพบว่าเมื่อสาโทมีค่า pH ต่ำจะมีปริมาณกรดรวมสูง โดยค่า pH ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราอยู่ระหว่าง 3.48 – 3.67 และค่าปริมาณกรดรวม มีค่าอยู่ระหว่าง 0.36 – 0.56 ส่วนค่า pH ของสาโททางการค้าอยู่ระหว่าง 3.5 – 3.59 และค่าปริมาณกรดรวมมีค่าอยู่ระหว่าง 0.36 – 0.45 ซึ่งค่า pH และค่าปริมาณกรดรวมจากสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้ามีค่าใกล้เคียงกัน

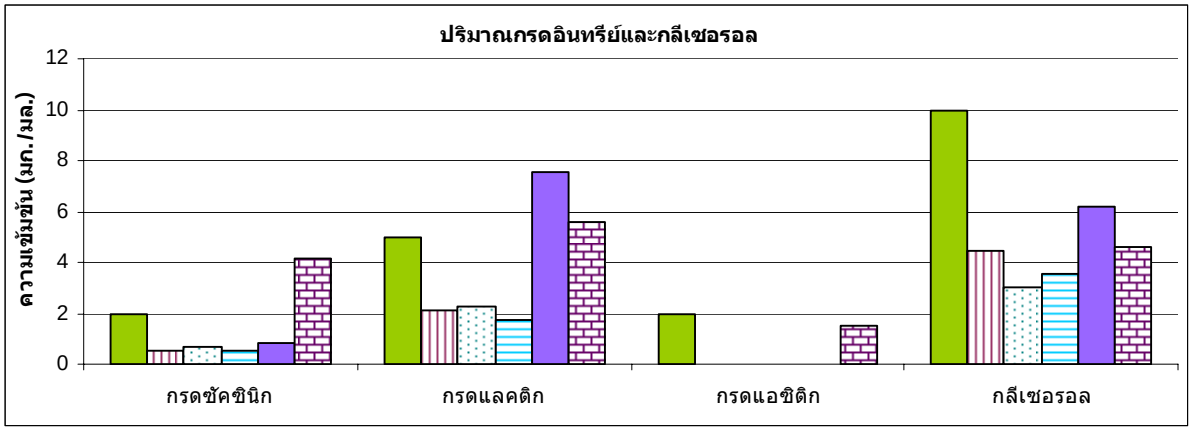
4.1.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) และปริมาณร้อยละเอทานอล

น้ำตาลรีดิวซ์เกิดจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ α-อะไมเลส และ อะไมโลกลูโคซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตมาจากรา หลังจากทำการเติมน้ำในวันที่สามของการหมักเกิดกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ไปเป็นแอลกอฮอล์ โดยเกิดจากการทำงานของยีสต์ เมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มมากขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จะค่อยๆลดลง แต่ปริมาณแอลกอฮอล์จะค่อยๆเพิ่มขึ้น จากการทดลองพบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยที่สุดคือ 0.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่ามีปริมาณเอทา-นอลสูงที่สุด คือ ร้อยละ 11.83 รองลงมาคือสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NK2 ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.95 มก./มล. และมีปริมาณเอทานอลร้อยละ 11.28 ส่วนสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 นั้นมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด คือ 3.59 มก./มล. จึงมีปริมาณเอทานอลต่ำที่สุดคือ ร้อยละ 9.75 ส่วนในสาโททางการค้านั้น เนื่องจากมีการปรับแต่งกลิ่นรสทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้มีค่าสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรามาก และมีร้อยละของปริมาณเอทานอลน้อยกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา

4.1.3 ปริมาณกรดอินทรีย์และปริมาณกลีเซอรอล

กรดอินทรีย์ที่พบในกระบวนการหมักมีหลายชนิดโดยมีบทบาทช่วยให้ไวน์มีความคงทนและรักษาคุณภาพทางด้านสีและกลิ่นของไวน์ กรดทาร์ทาริกและกรดมาลิกเป็นกรดหลักในไวน์องุ่น ส่วนกรดอื่นๆ ได้แก่ กรดซัคซินิก กรดซิตริก กรดแลคติก และกรดไพรูวิกจะมีปริมาณรองลงมา (Lamikanra, 1997) ส่วนกลีเซอรอลนั้นเป็นสารในกลุ่มพอลิออลซึ่งถูกสร้างโดยยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมัก กลีเซอรอลมีความเกี่ยวข้องกับประสาทการลิ้มรสบอดี้ และให้ความรู้สึกกลมกล่อมของไวน์ในปาก

จากการทดลองเมื่อทำการวิเคราะห์น้ำหมักสาโทพบว่า ทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้าไม่พบปริมาณกรดซิตริก ทั้งนี้อาจเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถใช้กรดซิตริกในการเจริญได้ (โชค-ชัย วนภู, 2546) ส่วนปริมาณกรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดแอซิติก และกลีเซอรอล ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้และสาโททางการค้า แสดงดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 แสดงปริมาณของ กรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดแอซิติก และกลีเซอรอล ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า (ปริมาณที่พบในไวน์องุ่นทั่วไป สาโท NP1 สาโท NN6 สาโท NK2 สาโททางการค้า 1 และ สาโททางการค้า 2)

กรดซัคซินิกเป็นกรดที่ถูกสร้างโดยยีสต์ในช่วงต้นของการหมักและจะหยุดเมื่อยีสต์สร้างแอลกอฮอล์เสร็จสิ้นแล้ว Lamikanra (1997) รายงานว่ากรดซัคซินิกเป็นกรดที่มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเอส-เทอริฟิเคชัน สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอินทรีย์อื่นในไวน์องุ่น ทำให้ใน Muscadine wine ซึ่งมีปริมาณกรดซัคซินิกสูง จึงสามารถตรวจพบเมทิลซัคซิเนตได้สูง ซึ่งสารดังกล่าวเป็นเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกให้กลิ่นผลไม้ (fruit odor) ทำให้เป็นกลิ่นที่มีความโดดเด่นใน Muscadine wine นอกจากนี้กรดซัคซินิกยังเป็นสารตั้งต้นของสารให้กลิ่นในไวน์อีก 2 ชนิด คือ ไดเอทิลซัคซิเนต และ เมทิลซัคซิเนต ซึ่งให้กลิ่นผลไม้ (Lamikanra และคณะ, 1995)

จากการทดลองพบว่าทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า 1 มีปริมาณกรดซัคซินิกน้อยกว่าที่มีในไวน์องุ่นทั่วไป คือน้อยกว่า 2 มก./มล. แต่พบว่าในสาโททางการค้า 2 มีปริมาณกรดซัคซินิกสูงสุด คือ 4.17 มก./มล. และสาโททางการค้า 2 เป็นสาโทชนิดเดียวที่สามารถพบเอสเทอร์ของกรดซัคซินิกซึ่งก็คือ ไดเอทิลซักซิเนต รองลงมา คือ สาโททางการค้า 1 คือมีปริมาณ 0.83 มก./มล. ส่วนในกลุ่มสาโทที่

ผลิตจากลูกแป้งสุราพบว่า ลูกแป้งสุรา NN6 มีปริมาณสูงที่สุด คือ 0.66 มก./มล. รองลงมาคือ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้ง NP1 และ NK2 ซึ่งมีค่า 0.56 และ 0.54 มก./มล. ตามลำดับ

กรดแลคติกเป็นกรดที่ยีสต์สร้างได้ในปริมาณน้อย คือประมาณ 0.1 – 0.6 กรัมต่อลิตร ยีสต์ที่สามารถสร้างกรดแลคติกได้ดีนั้นจัดเป็นยีสต์ที่ดีเนื่องจากกรดแลคติก เป็นกรดที่เพิ่มความเป็นกรดในไวน์แต่ไม่เพิ่มรสชาติความเป็นกรด กรดแลกติกเป็นสารตั้งต้นของสารประกอบให้กลิ่น ได้แก่ เอทิลลอเรต (Delfini และ Formica, 2001)

จากการทดลองพบว่าสาโททางการค้า 1 มีปริมาณกรดแลคติกสูงสุด คือ 7.55 มก./มล. รองลงมา คือ สาโททางการค้า 2 มีปริมาณ 5.62 มก./มล. ซึ่งทั้งสองตัวอย่างมีค่าสูงกว่าปริมาณกรดแลคติกที่สามารถพบในไวน์องุ่นทั่วไป คือ มากกว่า 5 มก./มล. ส่วนในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรานั้นมีค่าต่ำกว่า 5 มก./มล. โดยมีค่าเรียงลำดับจากมากไปน้อย ได้แก่ 2.28 2.13 และ 1.77 มก./มล. ซึ่งเป็นของสาโท NN6, NP1 และ NK2 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยีสต์ที่อยู่ในลูกแป้งสุรามีความสามารถในการผลิตกรดแลคติกได้น้อย หรือมีการใช้กรดแลคติกในการเจริญ ทำให้สาโทจากลูกแป้งสุรามีปริมาณกรดแลคติกน้อย

กรดแอซิติก เป็นกรดระเหยง่าย เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ของเมแทโบไลต์ของยีสต์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ โดยยีสต์สร้างได้ในปริมาณน้อย (Jackson, 2000) กรดแอซิติกสามารถเพิ่ม ความซับซ้อน ให้กับกลิ่นรสที่ดีในไวน์ (Delfini และ Formica, 2001) เป็นสารตั้งต้นของสารในกลุ่มแอซิเทตเอสเทอร์ เช่น เอทิลแอซิเทต เป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรดแอซิติกและเอ-ทานอล ซึ่งให้กลิ่นผลไม้ และ ไอโซเอมิลแอซิเทต ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรดแอซิติกและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ซึ่งให้กลิ่นกล้วย (สุมัลลิกา โมรากุล, 2545)

Sujiya และคณะ (2004) ได้รายงานว่า ปริมาณไอโซเอมิลแอซิเทตใน เบรม ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านของประเทศอินโดนีเซียเพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณกรดแอซิติกในน้ำหมัก ทาเป (tape) ที่ได้จากการหมักโดยยีสต์ *S. cerevisiae* karyotype 2 และ 4 มีปริมาณลดลง

จากการทดลองพบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราทั้ง 3 แหล่ง และสาโททางการค้า 1 ไม่พบปริมาณกรดแอซิติก ทั้งนี้อาจเนื่องจากกรดแอซิติกเกิดปฏิกิริยากับสารกลุ่มแอลกอฮอล์ทำให้เปลี่ยนไปเป็นสารในกลุ่มแอซิเทตเอสเทอร์ ยกเว้น สาโททางการค้า 2 ที่มีปริมาณกรดแอซิติก เท่ากับ 1.49 มก./มล. ซึ่งมีค่าต่ำกว่าปริมาณทั่วไปที่สามารถพบได้ในไวน์ คือ น้อยกว่า 2 มก./มล.

กลีเซอรอล เป็นสารในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีแอลกอฮอล์ซึ่งถูกสร้างโดยยีสต์ระหว่างกระบวนการหมัก มีค่าอยู่ในช่วง 3 – 11 กรัมต่อลิตร (Delfini และ Formica, 2001) กลีเซอรอลมีความสำคัญทางประสาทสัมผัสด้านการชิมเนื่องจากมีรสหวานและมีความเป็น oiliness (Amerine และคณะ, 1972) จึงมีความเกี่ยวข้องกับบอดี้ของไวน์และการให้ความรู้สึกกลมกล่อมของไวน์ในปาก (Jackson, 2000)

จากการทดลองพบว่าปริมาณกลีเซอรอลในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณน้อยกว่าที่พบในไวน์ทั่วไป คือน้อยกว่า 10 มก./มล. สาโททางการค้า 1 มีปริมาณสูงสุด คือ 6.17 มก./มล. รองลงมาคือ สาโททางการค้า 2 มีปริมาณ 4.57 มก./มล. ส่วนในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรานั้นพบว่าสาโท NP1 มีปริมาณสูงสุดคือ 4.44 มก./มล. รองลงมาคือสาโท NK2 มีปริมาณ 3.53 มก./มล. สาโท NN6 เป็นสาโทที่มีปริมาณกลีเซอรอลน้อยที่สุด คือ 3.06 มก./มล. ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณกลีเซอรอล ได้แก่ สายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ และสภาวะในการหมัก เช่น อุณหภูมิและความเป็นกรด-เบส เป็นต้น (Lubbers และคณะ, 2001)

4.1.4 ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น

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

ปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์

ความเข้มข้นของฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีความสำคัญโดยพบว่าที่ความเข้มข้น น้อยกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร จะช่วยทำให้ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดนั้นมีกลิ่นรสที่ซับซ้อน แต่ถ้ามากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี ฉุน และกลบกลิ่นรสที่ดีของสารชนิดอื่น (พรพิมล ควรรณสุ, 2548) นอกจากนี้ฟูเซลแอลกอฮอล์ยังมีบทบาททางอ้อมในการพัฒนากลิ่นหอมของไวน์โดยจะเกิดปฏิกิริยากับกรดอินทรีย์ ซึ่งจะทำให้เกิดเอสเทอร์โดยในระหว่างกระบวนการหมักจะมีการสร้างเอสเทอร์อย่างรวดเร็วภายใต้การควบคุมของเอนไซม์จากยีสต์และจะเกิดต่อเนื่องไปในระหว่างการบ่มด้วย (Jackson, 2000)

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า โดยวิธีแก๊สโคมาโทรกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐานผลแสดงในภาพที่ 4.2 แสดงปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า พบว่า สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของฟูเซลแอลกอฮอล์ ที่พบได้แก่

- 1-โพรพานอล เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ ที่ให้กลิ่นแอลกอฮอล์และกลิ่นฉุน (www.flavornet.org/flavornet.html) มีความสำคัญเนื่องจากเป็นตัวทำละลายสารที่ให้กลิ่น และสารระเหยในไวน์ ถ้ามีปริมาณมากจะให้กลิ่นที่ไม่ดีแก่ไวน์ (Amerine และคณะ, 1979) ปริมาณที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไปคือ 10-125 มก./ล. จากการทดลองพบว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NK 2 มีปริมาณของ 1-โพรพานอลสูงที่สุด คือ 36.25 มก./ล. รองลงมาได้แก่สาโทจากลูกแป้งสุรา NN6 และ NP1 มีปริมาณ 31.2 และ 27.34 มก./ล. ตามลำดับ ส่วนสาโททางการค้า 2 และสาโททางการค้า 1 นั้นมีปริมาณ 1-โพรพานอล 11.62 และ 8.69 มก./ล. ตามลำดับ ซึ่งในทุกตัวอย่างมีค่าไม่เกินกว่าที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไป ส่งผลให้ให้กลิ่นที่ดีแก่สาโทได้

- ไอโซบิวทานอล เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ที่ให้กลิ่นไวน์และกลิ่นตัวทำละลาย (www.flavornet.org/flavornet.html) มีความสำคัญเนื่องจากเป็นตัวทำละลายสารที่ให้กลิ่นและสารระเหยในไวน์ (Amerine และคณะ, 1979) ปริมาณที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไป คือ 2-150 มก./ล. จากการทดลองพบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า มีปริมาณไอโซบิวทานอลอยู่ในช่วง 24.19 - 50.41 มก./ล. โดยสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณมากที่สุด

- ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ที่ให้กลิ่นวิสกี้และมอล์ต (www.flavornet.org/flavornet.html) ปริมาณที่พบในไวน์องุ่นทั่วไปคือ 20-350 มก./ล. จากการทดลองพบว่าปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้ามีค่าอยู่ในช่วง 25.40 – 42.42 มก./ล. โดยสาโททางการค้า 1 มีปริมาณสูงที่สุด

- เอมิลแอลกอฮอล์ เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ที่ให้กลิ่นไวน์ (www.flavornet.org/flavornet.html) ปริมาณที่พบในไวน์องุ่นทั่วไปคือ 1-300 มก./ล. จากการทดลองพบปริมาณเอมิลแอลกอฮอล์ของสาโทที่

ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า มีปริมาณ 5.46-9.63 มก./ล. โดยสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณสูงที่สุด

- ฟีนิลเอทิล แอลกอฮอล์ เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ที่ให้กลิ่นน้ำผึ้งและกุหลาบ (www.flavornet.org/flavornet.html) ปริมาณที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไปคือ 15-200 มก./ล. จากการทดลองพบว่า ปริมาณฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 และ NK2 และสาโททางการค้ามีปริมาณ 16.73 – 70.25 มก./ล. ปริมาณสูงที่สุดพบได้ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 แต่ไม่พบปริมาณฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1

- 1-บิวทานอล เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ที่ให้กลิ่นผลไม้ (www.flavornet.org/flavornet.html) ปริมาณที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไปคือไม่เกิน 150 มก./ล. และจากการทดลองพบ 1-บิวทานอล เฉพาะในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 และ NK2 เท่านั้นซึ่งมีปริมาณ 2.41 และ 1.70 มก./ล. ตามลำดับ

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

ประดิษฐ์ ครุวัณณา (2546) รายงานปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในสาเกซึ่งเป็นไวน์ข้าวเช่นเดียวกับสาโท พบว่า มีปริมาณ เอน-โพรพานอล, ไอโซบิวทานอล, ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ 120, 64, 170 และ 75 มก./ล. ตามลำดับ ซึ่งฟูเซลแอลกอฮอล์เหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญทางด้านกลิ่นของสาเก การสร้างจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณกรดอะมิโน อุณหภูมิที่หมัก และสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ (ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2546) และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 มีปริมาณฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ใกล้เคียงกับปริมาณที่พบได้ในสาเก

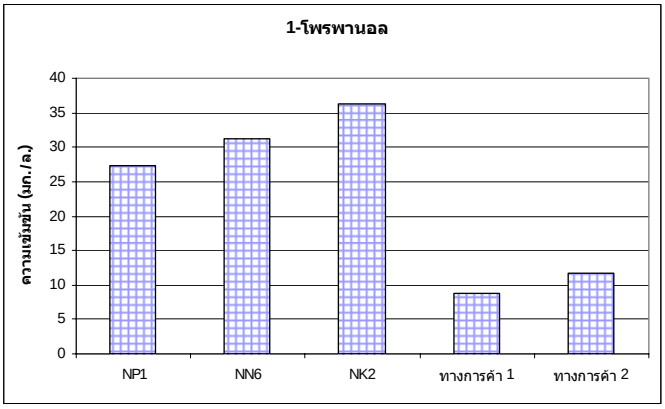
Sirisantimathakom และคณะ (2004) ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในสาโทตามท้องตลาดทั่วไป 8 ตัวอย่าง โดยทำการฉีดตัวอย่างน้ำหมักโดยตรงและวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รายงานว่า มีปริมาณไอโซบิวทิลแอลกอฮอล์ 31- 94 มก./ล., ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 55.81-117.69 มก./ล. และมีปริมาณฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ 21.66-53.6 มก./ล. ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ

งานวิจัยนี้พบว่า ปริมาณไอโซบิวทานอล และ ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรามีปริมาณอยู่ในระดับที่สามารถพบได้ในสาโทตามท้องตลาดทั่วไป

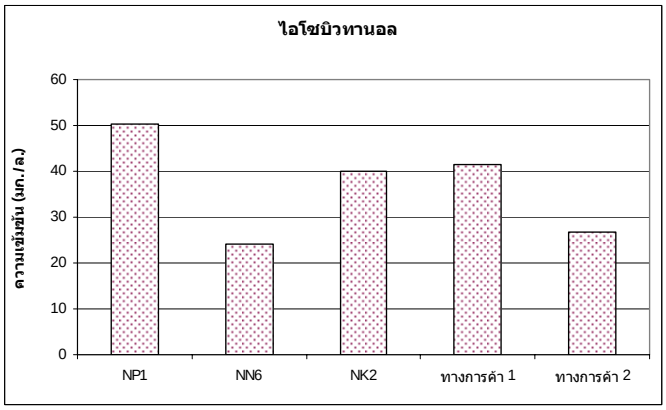
ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดฟูเซลแอลกอฮอล์นั้นมีหลายปัจจัย เช่น กระบวนการหมัก ลูกแป้งสุราที่ใช้ในการผลิตซึ่งมีจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันออกไป และข้าวซึ่งเป็นวัตถุดิบในการหมัก เป็นต้น

Rodriguez และคณะ (2003) รายงานว่าฟูเซลแอลกอฮอล์ไม่ควรเกินกว่า 400 - 500 มก./ล. ซึ่งจากการทดลองพบว่าปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์รวมของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณอยู่ในช่วง 89 – 162.69 มก./ล. ซึ่งไม่เกินกว่าปริมาณที่กำหนด ฟูเซลแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจึงไม่น่าให้กลิ่นที่ไม่ดีแก่สาโท

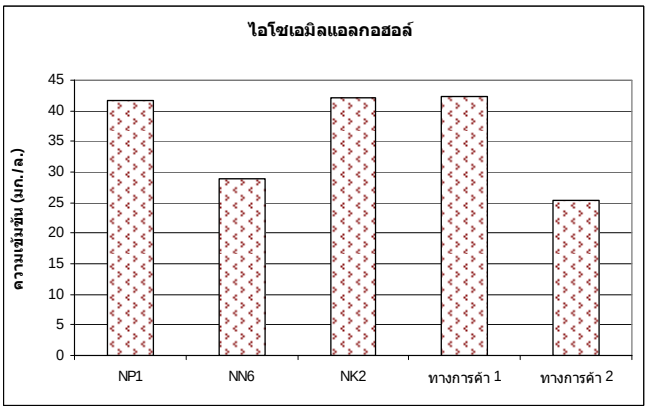
ก)



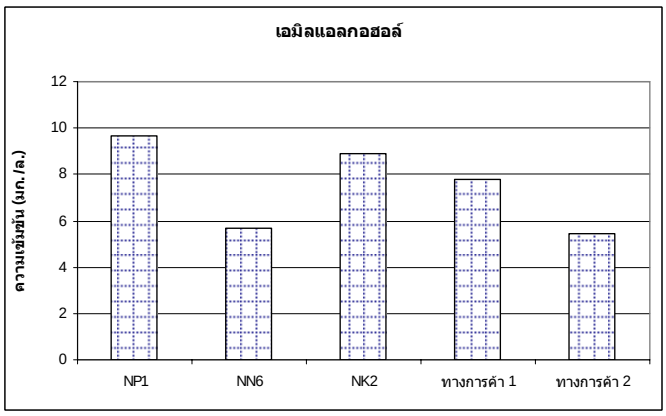
ข)



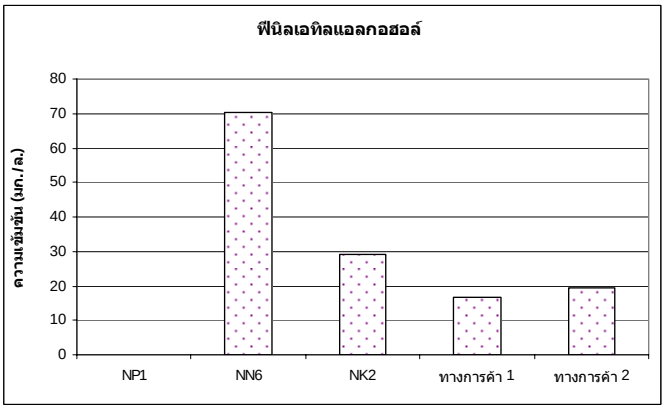
ค)



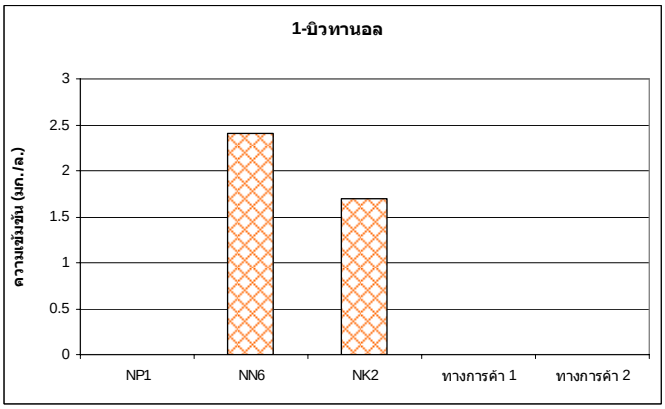
ง)



จ)



ฉ)



ภาพที่ 4.2 แสดงปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า ที่วิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐาน (ก) ปริมาณ 1-โพรพานอล, ข) ปริมาณไอโซบิวทานอล, ค) ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์, ง) ปริมาณเอมิลแอลกอฮอล์, จ) ปริมาณฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ และ ฉ) ปริมาณ 1-บิวทานอล)

ปริมาณเอสเทอร์

เอสเทอร์ เป็นสารที่มีความสำคัญในการให้กลิ่นรสที่ดีในไวน์ เป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ ที่ถูกสร้างโดยยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ในไวน์ประกอบด้วยเอสเทอร์หลายชนิด เช่น แอซิเทตเอสเทอร์ ได้แก่ เอทิลแอซิเทต ไอโซเอมิลแอซิเทต และไอโซบิวทิลแอซิเทต เป็นต้น เอทิลเอสเทอร์ได้แก่ เอทิล-แคโพรเอต, เอทิลแคพริเรต และเอทิลแคเพรต เป็นต้น ซึ่งเอสเทอร์เหล่านี้ให้กลิ่นผลไม้ ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเอสเทอร์มีหลายปัจจัย ได้แก่ วัตถุดิบที่ใช้และสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการหมัก (Rojas และคณะ, 2003) เอสเทอร์สามารถถูกตรวจพบในไวน์ได้หลากหลายมีทั้งที่สามารถระบุชนิดได้และมีทั้งที่มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถระบุได้ ซึ่งเอสเทอร์ที่มีปริมาณเท่ากับหรือมากกว่าระดับ threshold นั้นจะ ให้กลิ่นผลไม้ซึ่งมีความสำคัญยิ่งต่อกลิ่นรสของไวน์

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐานผลแสดงดังภาพที่ 4.3 แสดงปริมาณเอสเทอร์ ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า พบว่าสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของเอสเทอร์ ที่พบมีดังนี้

- เอทิลแอซิเทต เป็นเอสเทอร์ ที่ให้กลิ่นที่สำคัญของไวน์ โดยให้กลิ่นผลไม้ สารกลุ่มนี้เกิดจากเอนไซม์จากยีสต์หรือแบคทีเรีย ได้แก่ เอนไซม์เอสเทอเรส ในไวน์ที่เพิ่งหมักเสร็จจะเกิดปฏิกิริยา เอสเทอริฟิเคชั่น และ ทรานเอสเทอริฟิเคชั่น ซึ่งถ้ามีในปริมาณที่ต่ำกว่า 200 มก./ล. จะให้กลิ่นที่น่าพอใจ แต่ถ้าปริมาณสูงกว่านี้จะให้กลิ่นน้ำส้มสายชูซึ่งเป็นกลิ่นที่ไม่ดี (Amerine และคณะ, 1979) จากการทดลองพบว่าปริมาณเอทิลแอซิเทตของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณเอทิลแอซิเทตอยู่ระหว่าง 4.44 – 10.11 มก./ล. และ 33.58 – 98.54 มก./มล. ตามลำดับ โดยพบว่าทั้งสาโททางการค้า 1 และ 2มีปริมาณเอทิลแอซิเทตสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา และในกลุ่มสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา พบว่าลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณเอทิลอะซิเทตสูงที่สุดคือ 10.11 มก./ล.

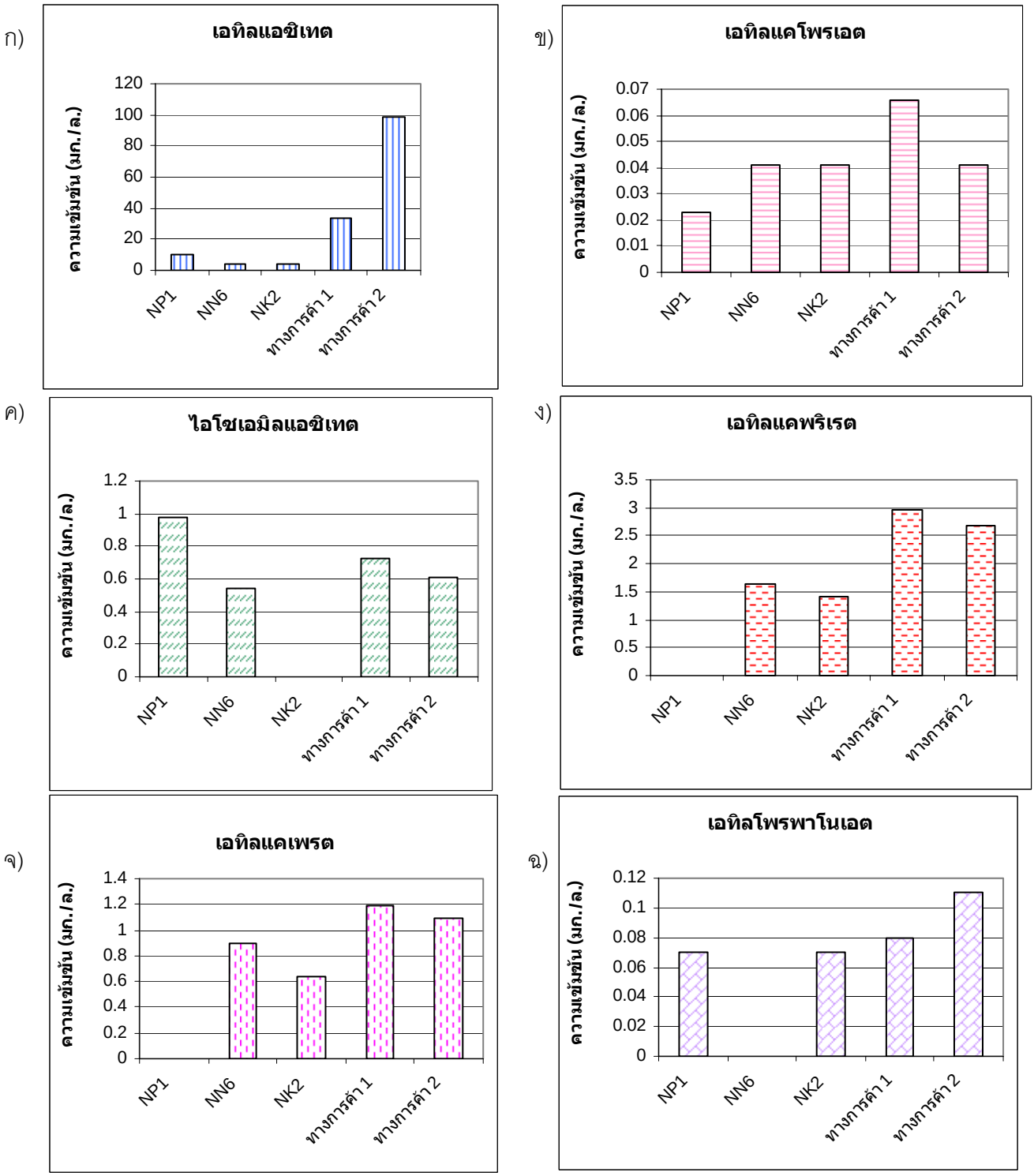
- เอทิลแคโพรเอต เป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่น แอปเปิ้ลและกลิ่นผลไม้ (www.flavornet.org/flavornet.html) ปริมาณที่พบได้ทั่วไปในไวน์องุ่น คือ 0 – 3.4 มก./ล.(Maares, 1991) จากการทดลองพบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณเอทิลแคโพรเอต 0.02 – 0.07 มก./ล. โดยสาโททางการค้า 1 มีปริมาณสูงที่สุด

- ไอโซเอมิลแอซิเทต เป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นกล้วย (www.flavornet.org/flavornet.html) ปริมาณที่พบได้ทั่วไปในไวน์องุ่นคือ 0.1 - 8 มก./ล.จากการทดลองพบว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณไอโซเอมิลแอซิเทตอยู่ระหว่าง 0.61-0.98 มก./ล. โดยในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 พบในปริมาณสูงที่สุด คือ 0.98 มก./ล. รองลงมาคือสาโททางการค้า 1 มีปริมาณ 0.71 มก./ล. แต่ไม่พบไอโซเอมิลอะซิเทตในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NK2

- เอทิลแคพริเรต เป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นสับปะรด (www.flavornet.org/flavornet.html) ปริมาณที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไป คือ 0.2-3.8 มก./ล. (Maares, 1991) จากการทดลองพบว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณเอทิลแคพริเรต1.41-2.96 มก./ล. ซึ่งมีปริมาณอยู่ในระดับที่พบได้ทั่วไปในไวน์องุ่น โดยสาโททางการค้า 1 มีปริมาณเอทิลแคพริเรตสูงที่สุด คือ 2.96 มก./ล. ส่วนในกลุ่มของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรานั้นพบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 มีปริมาณสูงที่สุดคือ 1.64 มก./ล. รองลงมาคือสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NK2 คือ 1.41 มก./ล. แต่ไม่พบปริมาณเอทิลแคพริเรตในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1

- เอทิลแคเพรต เป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นองุ่น (www.flavornet.org/flavornet.html) ปริมาณที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไป คือ 0 – 0.3 มก./ล. (Maares, 1991) จากการทดลองพบว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณเอทิลแคเพรตอยู่ในช่วง 0.64-1.19 มก./ล. ซึ่งมีค่าเกินกว่าที่พบได้ทั่วไปในไวน์องุ่น โดยสาโททางการค้า 1 มีปริมาณเอทิลแคเพรตสูงที่สุด คือ 1.19 มก./ล. ส่วนในกลุ่มของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรานั้นพบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งรา NN6 มีปริมาณสูงที่สุดคือ 0.90 มก./ล.รองลงมาคือสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NK2 คือ 0.64 มก./ล. แต่ไม่พบปริมาณเอทิลแคเพรตในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1

- เอทิลโพรพาโนเอต เป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่น ผลไม้ (www.flavornet.org/flavornet.html) ปริมาณที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไป คือ 0 - 20 มก./ล. (Maares, 1991) จากการทดลองพบว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณเอทิลโพรพาโนเอต 0.07-0.11 มก./ล. โดยพบในสาโททางการค้า 2 มากที่สุด คือ 0.11 มก./ล. และในกลุ่มของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราพบว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และ NK2 มีปริมาณเท่ากัน คือ 0.07 มก./ล. แต่ไม่พบเอทิลโพรพาโนเอตในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6

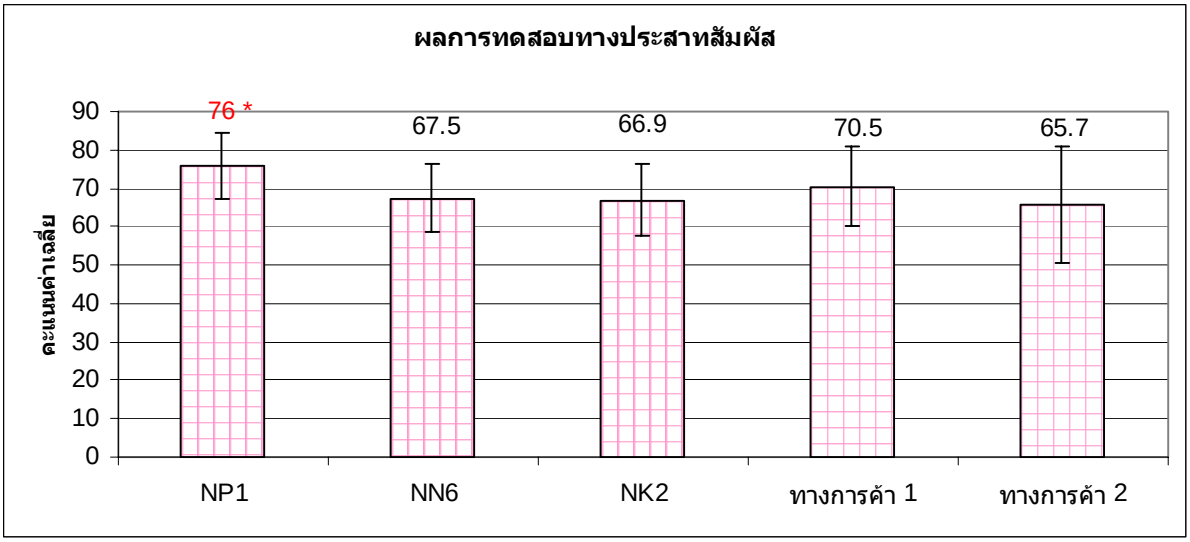


ภาพที่ 4.3 แสดงปริมาณเอสเทอร์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า ที่วิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์ และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐาน (ก) ปริมาณ เอทิลแอซิเทต ข) ปริมาณเอทิลแคโพรเอต ค) ปริมาณไอโซเอมิลแอซิเทต ง) ปริมาณเอทิลแค-พริเรต จ) ปริมาณเอทิลแคเพรต และ ฉ) ปริมาณเอทิลโพรพาโนเอต)

ประดิษฐ์ ครุวัณณา (2546) รายงานปริมาณเอสเทอร์ที่พบในสาเกซึ่งเป็นไวน์ข้าวของปรเทศญี่ปุ่น พบว่า มีปริมาณ เอทิลแอซิเทต, ไอโซเอมิลแอซิเทต, เอทิลแคโพรเอต, เอทิลแคพริเรต, เอทิลแคเพรต และเอทิลบิวทิเรต 20-30, 2, 2, 5, 10 และ 0.5 มก./ล. ตามลำดับ ซึ่งเอสเทอร์เหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญทางด้านกลิ่นของสาเก (ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2546) ซึ่งจากการทดลองพบว่าทั้งในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า สามารถพบปริมาณของเอสเทอร์ที่สำคัญเช่นเดียวกับที่พบในสาเก แต่เนื่องจากกระบวนการผลิต อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตและสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ มีความแตกต่างกันจึงทำให้ปริมาณที่ได้แตกต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงเสนอว่า เพื่อให้ได้สาโทที่มีคุณภาพคงที่ในการผลิตแต่ละครั้งและให้ได้สาโทที่มีกลิ่นรสที่ดี จึงควรมีการศึกษาเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่จำเป็นต่อการหมักจากลูกแป้งสุรา และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในรูปของเชื้อบริสุทธิ์ผสม เพื่อเตรียมเป็นกล้าเชื้อใช้ในการผลิตไวน์ข้าวแทนการใช้ลูกแป้งสุรา เพื่อให้ได้สาโทที่มีคุณภาพดีและสม่ำเสมอในการผลิต ความคิดนี้ได้มีคณะผู้วิจัยอื่นกล่าวไว้เช่นกัน (อาจรีย์ ปรีชากุล, 2550)

4.1.5 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้โดย อภิชญา เตชะวสัญญู และคณะ, (2550) ทำการคัดเลือกลูกแป้งสุราจากทั่วประเทศได้ 7 แหล่งซึ่งเป็นลูกแป้งสุราที่ผลิตสาโทแล้วให้สาโทที่มีกลิ่นและรสที่ดี จากจำนวนลูกแป้งทั้งหมด 114 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมมาจาก 42 จังหวัดทั่วประเทศไทย (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) ในงานวิจัยนี้จึงนำลูกแป้งสุราที่เมื่อนำมาผลิตสาโทได้สาโทที่มีคุณภาพด้านกลิ่นรสดีที่สุด จำนวน 3 แหล่ง ได้แก่ ลูกแป้งสุราจากจังหวัดนครพนม (NP1) ลูกแป้งสุราจากจังหวัดน่าน (NN6) และลูกแป้งสุราจากจังหวัดหนองคาย (NK2) มาผลิตสาโท และนำมาทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบที่มีความคุ้นเคยและเชี่ยวชาญทางด้านการชิมไวน์และสาโทในระดับชาติ จำนวน 10 ท่าน ให้คะแนนในใบให้คะแนนและวิธีการให้คะแนน (ภาคผนวก ค) เปรียบเทียบกับสาโททางการค้าที่มีคะแนนสูงสุด (สาโททางการค้า 1) นำคะแนนที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Sripunya และคณะ, 2005) ผลการทดสอบที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (sensory test) ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาโททางการค้า 1 ($p<0.05$)

พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) กับสาโททางการค้า โดยสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีคะแนนเฉลี่ย 76 คะแนน เป็นที่ยอมรับและจัดเป็นสาโทที่มีคุณภาพดี เมื่อเปรียบเทียบกับสาโททางการค้า ส่วนสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 และ NK2 นั้นมีคะแนนเฉลี่ย 67.5 และ 66.9 คะแนนตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสาโททางการค้า 1 พบว่าสาโท NN6 และ NK2 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p< 0.05$) กับสาโททางการค้า 1 และสาโททั้ง 2 จัดเป็นสาโทอยู่ในระดับพอใช้

ตารางที่ 4.2 สรุปปริมาณสารให้กลิ่นของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้าเปรียบเทียบกับปริมาณที่พบในไวน์องุ่น และสาเกทั่วไป

	ปริมาณที่พบในไวน์องุ่นทั่วไป (มก./ล.)*	ปริมาณที่พบในสาเก (มก./ล.)**						
			ข้าวเหนียวนึ่ง	NP1	NN6	NK2	ทางการค้า 1	ทางการค้า 2
ร้อยละเอทานอล	3.0 - 11.0	15	-	11.83	9.75	11.28	7.89	8.74
ฟูเซลแอลกอฮอล์ (มก./ล.)								
1-โพรพานอล	10 - 125	120	-	27.34	31.2	36.25	8.69	11.62
ไอโซบิวทานอล	2 - 150	64	-	50.41	24.19	40.06	41.38	26.64
ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	20 - 350	170	-	41.64	28.94	42.14	42.42	25.40
เอมิลแอลกอฮอล์	1 - 300	-	-	9.63	5.70	8.91	7.76	5.46
ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์	15 - 200	75	-	-	70.25	29.25	16.73	19.49
1-บิวทานอล	0 - 150	-	-	-	2.41	1.70	-	-
ฟูเซลแอลกอฮอล์ทั้งหมด	-	-	-	**129.02**	**162.69**	**158.31**	**116.98**	**88.61**
เอสเทอร์ (มก./ล.)								
เอทิลแอซิเทต	9 - 257	20 - 120	0.1	10.11	4.44	4.53	33.58	98.94
เอทิลแคโพรเอต	0 - 3.4	2.0 - 10.0	-	0.02	0.04	0.04	0.07	0.04
ไอโซเอมิลแอซิเทต	0.1 - 8	2.0 - 10.0	-	0.98	0.54	-	0.72	0.61
เอทิลแคพริเรต	0.2 - 3.8	5.0 - 10.0	-	-	1.64	1.41	2.96	2.67
เอทิลแคเพรต	0 - 0.3	10	-	-	0.9	0.64	1.19	1.09
เอทิลโพรพาโนเอต	0 - 20	-	-	0.07	-	0.07	0.08	0.11

* ที่มา: Maares, 1991 ** ที่มา : ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2546

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ปริมาณสารให้กลิ่นและการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราทั้ง 3 แหล่ง พบว่า สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือน้อยที่สุดและมีปริมาณร้อยละเอทานอลสูงที่สุด นอกจากนี้ยังมีปริมาณกลีเซอรอลสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 และ NK2 อีกด้วย และจากตารางที่ 4.3 พบว่าปริมาณสารให้กลิ่นในกลุ่มของฟูเซลแอลกอฮอล์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณไอโซบิวทานอลและเอมิลแอลกอฮอล์สูงที่สุด ส่วนในกลุ่มเอสเทอร์พบว่ามีปริมาณเอทิลแอซิเทตและไอโซเอมิลแอซิเทตซึ่งเป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้แก่เครื่องดื่มแอลกอฮอล์สูงที่สุด และเมื่อรวมไปถึงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสก็พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ได้รับการยอมรับสูงกว่าสาโททางการค้า 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) ดังนั้นลูกแป้งสุรา NP1 จึงมีความน่าสนใจที่จะนำไปศึกษาถึงจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตสาโทต่อไป

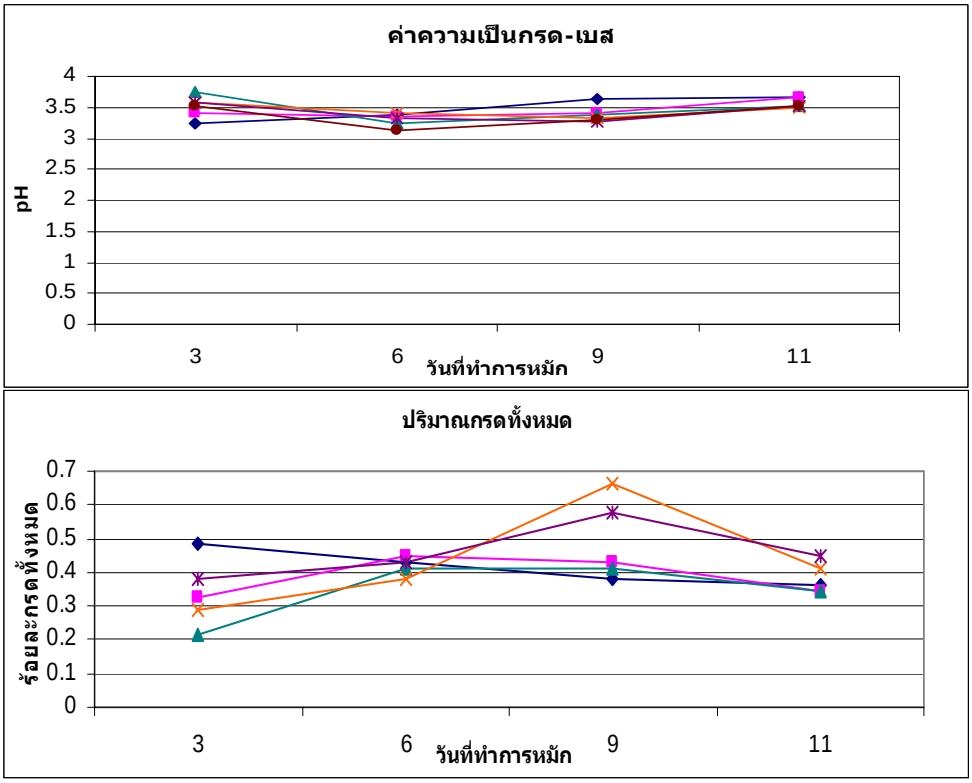
4.2 การผลิตสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุราและเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากแหล่งลูกแป้งสุรา

อภิชญา เตชะวสัญญู และคณะ (2550) สามารถแยกราและยีสต์จากลูกแป้งสุรา NP1 โดยได้รา บริสุทธิ์ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. racemosus* NP102 (M1) และ *R. oligosporus* NP101 (M2) และ ยีสต์ 3 สายพันธุ์ได้แก่ *S. cerevisiae* NP1930 (Y1) *P. anomala* NP101 (Y2) และ *Sch. fibuligera* NP1030 (Y3) (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550)

จากการผลิตสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุราเปรียบเทียบกับสาโททางการค้าพบว่า สาโท NP1 มีความน่าสนใจ สามารถผลิตสาโทที่ได้คุณภาพมีปริมาณแอลกอฮอล์สูงกว่าสาโททางการค้า มีปริมาณสารให้กลิ่นที่ดีหลายชนิด และผลจากการประเมินทางประสาทสัมผัสพบว่าให้คะแนนการยอมรับอยู่ในระดับ ดี

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาบทบาทจุลินทรีย์ที่อยู่ในลูกแป้งสุรา NP1 โดยได้รับราและยีสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 จากงานวิทยานิพนธ์ของ นส.อภิชญา เตชะวสัญญู (2550) และผู้วิจัยได้ทำการแยกแบคทีเรียที่ทนกรดจากลูกแป้ง NP1 จากนั้นนำราและ ยีสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสมสำหรับผลิตสาโท โดยชนิด และ ปริมาณของยีสต์และราในแต่ละชุดการทดลองได้อธิบายไว้ในข้อ 3.1.2 ผลิตสาโทและเปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ทำการติดตามวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ในช่วงเวลาต่างๆ วันที่ 3, 6, 9 และ 11 ในระหว่างกระบวนการหมักองค์ประกอบทางเคมีที่วิเคราะห์ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-เบส ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณร้อยละเอทานอล ปริมาณกรดอินทรีย์ ปริมาณกลีเซอรอล และปริมาณสารประกอบให้กลิ่น ซึ่งผลค่าความเป็นกรด-เบส และปริมาณกรดทั้งหมด ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.5

4.2.1 ค่าความเป็นกรด-เบส และปริมาณกรดทั้งหมด

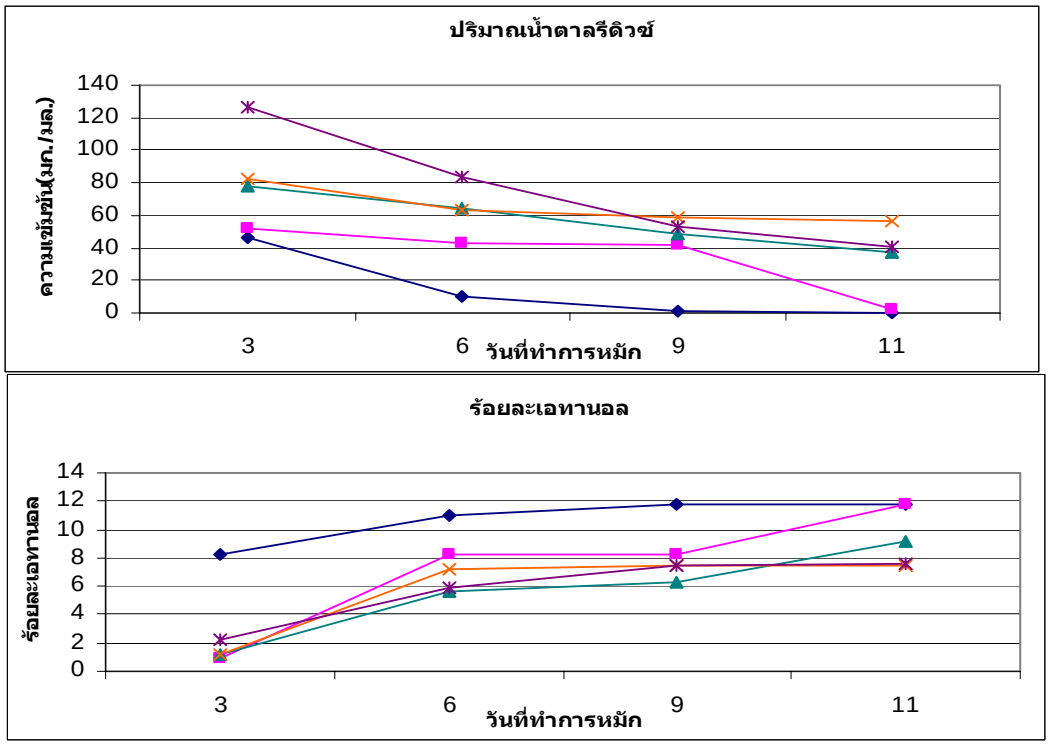


ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส และ ปริมาณกรดทั้งหมด ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมของราและยีสต์ (สาโท NP1 M1M2+Y1 M1M2+Y1+Y2 M1M2+Y1+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3)

จากผลการทดลอง ดังภาพที่ 4.5 ซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-เบสและปริมาณกรดทั้งหมดของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม พบว่าค่า ความเป็นกรด-เบสของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม ค่าอยู่ระหว่าง 3.12 – 3.75 ซึ่งยังอยู่ในช่วง 3.40 – 4.70 ซึ่งค่าปกติที่พบในไวน์องุ่นทั่วไป

โดยในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมทุกชุดทดลองมีค่า pH ลดลงในช่วงแรกของการหมักและเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงท้ายของการหมักสอดคล้องกับปริมาณกรดทั้งหมดคือเมื่อมีปริมาณกรดน้อยค่า pH จะมีค่าสูงขึ้น ส่วนสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 นั้นมีความแตกต่างจากสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมเล็กน้อย โดยพบว่าค่า pH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงแรกหลังจากนั้นค่อนข้างคงที่ ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 3.23 – 3.67 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นในช่วงแรกหลังจากนั้นมีปริมาณลดลง ปริมาณกรดที่ลดลงและค่อนข้างคงที่ในช่วงวันท้ายๆ ของการหมัก อาจเนื่องมาจากการทำงานของยีสต์ถูกยับยั้งโดยแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น กรดซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ในกระบวนการหมักจึงลดลงหรือค่อนข้างคงที่ (วรรัตน์ โชติวรรณพร,2539) แต่ค่าความเป็นกรด-เบสและปริมาณกรดทั้งหมดของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมมีค่าใกล้เคียงกัน

4.2.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ ร้อยละเอทานอล



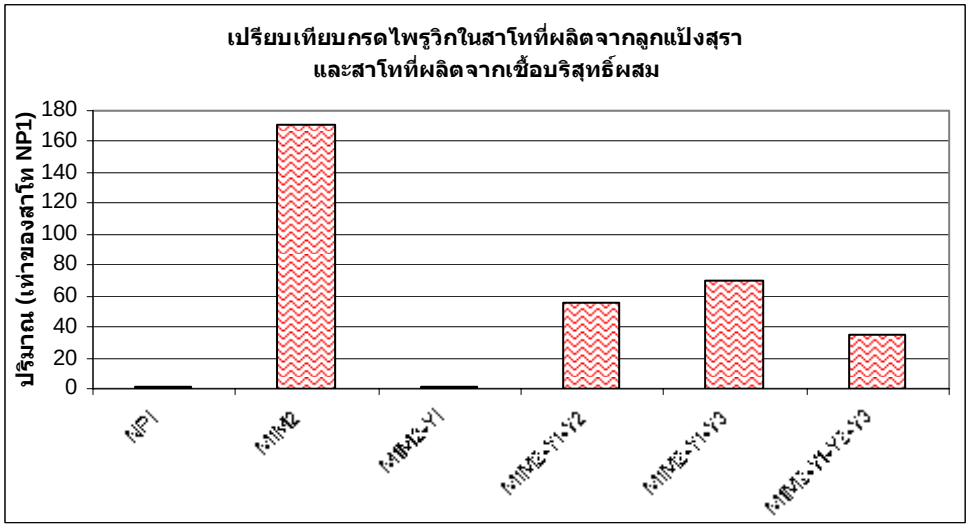
ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณร้อยละเอทานอล ในระหว่างการหมักของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมของราและยีสต์

(สาโท NP1 M1M2+Y1 M1M2+Y1+ M1M2+Y1+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3)

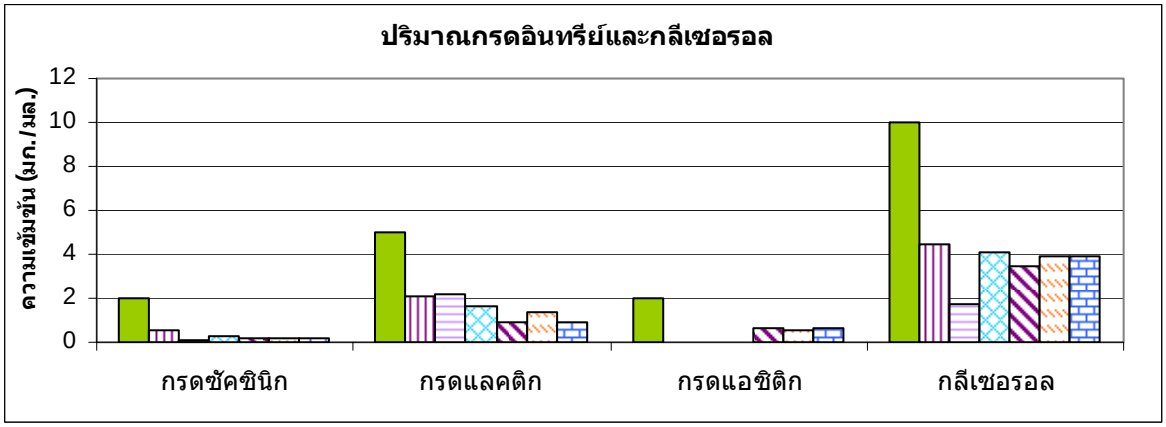
จากผลการทดลอง ดังภาพที่ 4.6 ซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณร้อยละเอทานอล ในระหว่างการหมักของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในชุดการทดลองต่างๆ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงและมีปริมาณร้อยละเอทานอลเพิ่มขึ้นทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกชุดการทดลองยกเว้นชุดควบคุม เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น โดยสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดในวันที่ 3 คือ 46.63 มก./มล. แต่เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงจนวันที่ 11 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการหมักพบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำที่สุด คือ 0.44 มก./มล. ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณร้อยละของเอทานอลคือมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และพบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณร้อยละเอทานอลสูงที่สุด คือ ร้อยละ 11.83 รองลงมาคือ สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม M1M2+Y1 ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 3 ของการหมัก 51.98 มก./มล. และลดลงจนในวันสุดท้ายของการหมักมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 2.27 มก./มล. และมีปริมาณร้อยละของเอทานอลเท่ากับ 11.78 ส่วนสาโทที่

ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2 และ M1M2+Y1+Y2+Y3 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันสุดท้ายของการหมักเท่ากับ 37.24 และ 41.05 มก./มล. และมีปริมาณร้อยละเอทานอลเท่ากับ 9.19 และ 7.61 ตามลำดับ ส่วนสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y3 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันสุดท้ายของการหมักสูงที่สุดคือ 56.23 มก./มล. จึงมีปริมาณร้อยละของเอทานอลต่ำที่สุดคือ 7.49

4.2.3 ปริมาณกรดอินทรีย์และปริมาณกลีเซอรอล



ภาพที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดไพรูวิกของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม



ภาพที่ 4.8 แสดงปริมาณของ กรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดแอซิติก และกลีเซอรอล ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 (ปริมาณที่พบในไวน์องุ่นทั่วไป สาโท NP1 M1M2 M1M2+Y M1M2+Y1+Y2

M1M2+Y1+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ ทั้ง กรดซิตริก, กรดไพรูวิก, กรดซัคซินิก, กรดแลคติก, กรดแอซิติก และกลีเซอรอล ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม พบว่าไม่พบกรดซิตริกในน้ำหมักสาโทของทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม ส่วนปริมาณกรดอินทรีย์อื่นๆแสดงดังภาพที่ 4.7 และ 4.8

กรดไพรูวิกเป็นสารตัวกลางที่สำคัญของกระบวนการเมแทบอลิซึมเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการไกลโคลิซิส กรดไพรูวิกสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็นสารตัวอื่นใน 2 ภาวะ คือ ในภาวะที่มีอากาศกรดไพรูวิกจะถูกเปลี่ยนเป็น อะเซทิลโคเอนไซม์เอ และเข้าสู่วัฏจักร TCA ซึ่งจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์จากเมแทบอไลต์มากมายหลายชนิด เช่น กรดซัคซินิก กรดแอซิติก และ 2,3 บิวเทนไดออล เป็นต้น หรือถ้าอยู่ในภาวะที่ไม่มีอากาศกรดไพรูวิกจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกในกระบวนการหมักแลคเทตหรือจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์

จากผลการทดลองดังภาพที่ 4.7 พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณกรดไพรูวิกคงเหลือน้อยที่สุด ส่วนในชุดควบคุม M1M2 ซึ่งเป็นชุดการทดลองควบคุม ประกอบด้วยราบริสุทธิ์ 2 สายพันธุ์เป็นกล้าเชื้อ พบปริมาณกรดไพรูวิกสูงสุดโดยพบว่ามีปริมาณสูงถึง 171.41 เท่าของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ยุพกนิษฐ์ พ่วงวีระกุล (2545) รายงานว่า ราจะสร้างเอนไซม์ จำนวนมาก ออกมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล สร้างกรดอินทรีย์ และยังได้สารอาหารและวิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของยีสต์ และพบว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมยีสต์ ปริมาณกรดไพรูวิกจะมีปริมาณลดลงเป็นอย่างมากโดยพบว่าในชุดการทดลอง M1M2+Y1 มีปริมาณกรดไพรูวิกคงเหลือน้อยที่สุด คือ 1.27 เท่าของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรายังคงมีปริมาณกรดไพรูวิกคงเหลือน้อยกว่า แสดงให้เห็นว่า รา M1M2 เปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นเอทานอลและสารประกอบอื่นๆ ได้ไม่ดีเท่ายีสต์

จากผลการทดลองดังภาพที่ 4.8 พบว่าปริมาณกรดซัคซินิกในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณสูงที่สุด คือ 0.56 มก./มล. ส่วนในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมนั้น พบว่า ชุดการทดลอง M1M2+Y1 มีปริมาณสูงที่สุด คือ 0.26 มก./มล. ส่วนในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2, M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y3 มีปริมาณกรดซักซินิก 0.17, 0.17 และ 0.16 มก./มล. ตามลำดับ แต่ในชุดควบคุม M1M2 มีปริมาณกรดซักซินิก 0.06 มก./มล. จากผลการทดลองแสดงยีสต์มีบทบาทในการสร้างกรดซัคซินิก แต่ทั้งสาโทผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมมีค่าน้อยกว่า 2 มก./มล. ที่เป็นปริมาณปกติที่พบในไวน์องุ่นทั่วไป

กรดแลคติกพบว่าในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในกลุ่มควบคุม M1M2 มีปริมาณกรดแลคติกสูงที่สุด คือ 2.21 มก./มล. ส่วนในชุดการทดลอง M1M2+Y1, M1M2+Y1+Y3, M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2 มีปริมาณกรดแลกติก 1.61, 1.40, 0.93 และ 0.91 มก./มล. ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ซึ่งมีปริมาณ 2.13 มก./มล. ทั้งสาโทผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมมีค่าน้อยกว่ากว่าปริมาณที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไป คือน้อยกว่า 5 มก./มล.

ส่วนกรดแอซิติกนั้นพบเฉพาะในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3, M1M2+Y1+Y2 และ M1M2+Y1+Y3 เท่านั้น ซึ่งมีปริมาณ 0.65, 0.64 และ 0.58 มก./มล. ซึ่งยังคงมีอยู่ในปริมาณควบคุมคือ มีปริมาณน้อยกว่า 2 มก./มล. ซึ่งเป็นปริมาณที่พบในไวน์ทั่วไป ถ้าปริมาณสูงเกินกว่านี้อาจทำให้สาโทที่ผลิตได้มีรสเปรี้ยว

ปริมาณกลีเซอรอลของทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมนั้นพบว่ามีปริมาณใกล้เคียงกันโดยพบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณกลีเซอรอล 4.44 มก./มล. รองลงมาคือสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในชุดการทดลอง M1M2+Y1, M1M2+Y1+Y3, M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2 ซึ่มีปริมาณกลีเซอรอลเท่ากับ 4.12, 3.93, 3.88 และ3.47 มก./มล. ตามลำดับ และมีปริมาณต่ำกว่าปริมาณที่พบได้ในไวน์ทั่วไป คือน้อยกว่า 10 มก./มล.

4.2.4 ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น

จากการวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ผสม พบว่าสามารถวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นได้ทั้งฟูเซลแอลกอฮอล์และเอสเทอร์ โดยฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบได้แก่1-โพรพานอล ไอโซบิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เอมิลแอลกอฮอล์ และฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ ดังแสดงในภาพที่ 4.9 โดยสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณของ 1-โพรพานอล ไอโซบิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และ เอมิลแอลกอฮอล์ สูงกว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกชุดการทดลอง

1-โพรพานอลและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณ 27.37 และ 41.64 มก./ล. ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มของเชื้อบริสุทธิ์ผสมนั้นพบว่าในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 มีปริมาณของสารทั้ง 2 ชนิด สูงสุดคือ 21.03 และ 27.37 มก./ล. รองลงมาคือชุดการทดลอง M1M2+Y1 มีปริมาณ 12.3 และ 27.32 มก./ล. โดยในชุดการทดลองควบคุม M1M2 มีปริมาณต่ำสุดคือ 1.25 และ 1.80 มก./ล. ตามลำดับ

ไอโซบิวทานอลและเอมิลแอลกอฮอล์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 พบว่ามีปริมาณ 50.41 และ 9.63 มก./ล. ส่วนในชุดการทดลองของเชื้อบริสุทธิ์ผสมพบว่าในชุดการทดลอง M1M2+Y1 มีปริมาณ

สูงที่สุด คือ 45.68 และ 6.89 มก./ล. รองลงมาคือสาโทจากชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 มีปริมาณ 31.1 และ 6.32 มก./ล. ตามลำดับ ส่วนในชุดควบคุมมีปริมาณต่ำที่สุด คือ 1.51 และ 0.38 มก./ล. ตามลำดับ

ส่วนปริมาณของฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์นั้น เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบเฉพาะในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ในปริมาณ 69.54 มก./ล. เท่านั้น และไม่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1

ในกลุ่มของสารประกอบให้กลิ่นชนิดเอสเทอร์นั้น แสดงดังภาพที่ 4.10 ซึ่งแสดงปริมาณของเอส-เทอร์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ผสม พบว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมบางชุดการทดลองมีปริมาณสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และในชุดควบคุม M1M2 พบปริมาณของเอทิลแอซิเทตเท่านั้นแต่ไม่พบเอสเทอร์อื่นๆ ในชุดการทดลองนี้

โดยปริมาณเอทิลแอซิเทตในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 มีปริมาณ 32.83 มก./ล. ซึ่งสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ซึ่งมีปริมาณ 10.11 มก./ล. รองลงมาคือสาโทในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y3 มีปริมาณ 27.75 มก./ล. ส่วนในชุดการทดลอง M1M2+Y1 M1M2+Y1+Y2 และกลุ่มควบคุม M1M2 มีปริมาณต่ำกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา คือมีปริมาณ 5.75 4.37 และ 0.19 มก./ล. ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า Y3 มีบทบาทในการสร้างเอทิลแอซิเทต โดยจะเห็นได้ว่าในชุดทดลอง M1M2+Y1 มีปริมาณเอทิลแอซิเทต 5.75 มก./ล. เมื่อเป็นชุดทดลอง M1M2+Y1+Y3 พบว่ามีปริมาณเอทิลอะซิเทตเพิ่มสูงขึ้นถึง 27.75 มก./ล. ซึ่งผลสอดคล้องกับรายงานของ Rojas และคณะ (2001) ซึ่งรายงานว่ายีสต์ในกลุ่ม Non-*Saccharomyces* มีบทบาทสำคัญในการสร้างแอซิเทตเอสเทอร์ (Rojas และคณะ, 2001) ซึ่งในงานวิจัยนี้ Y3 เป็นยีสต์ในกลุ่ม Non-*Saccharomyces*

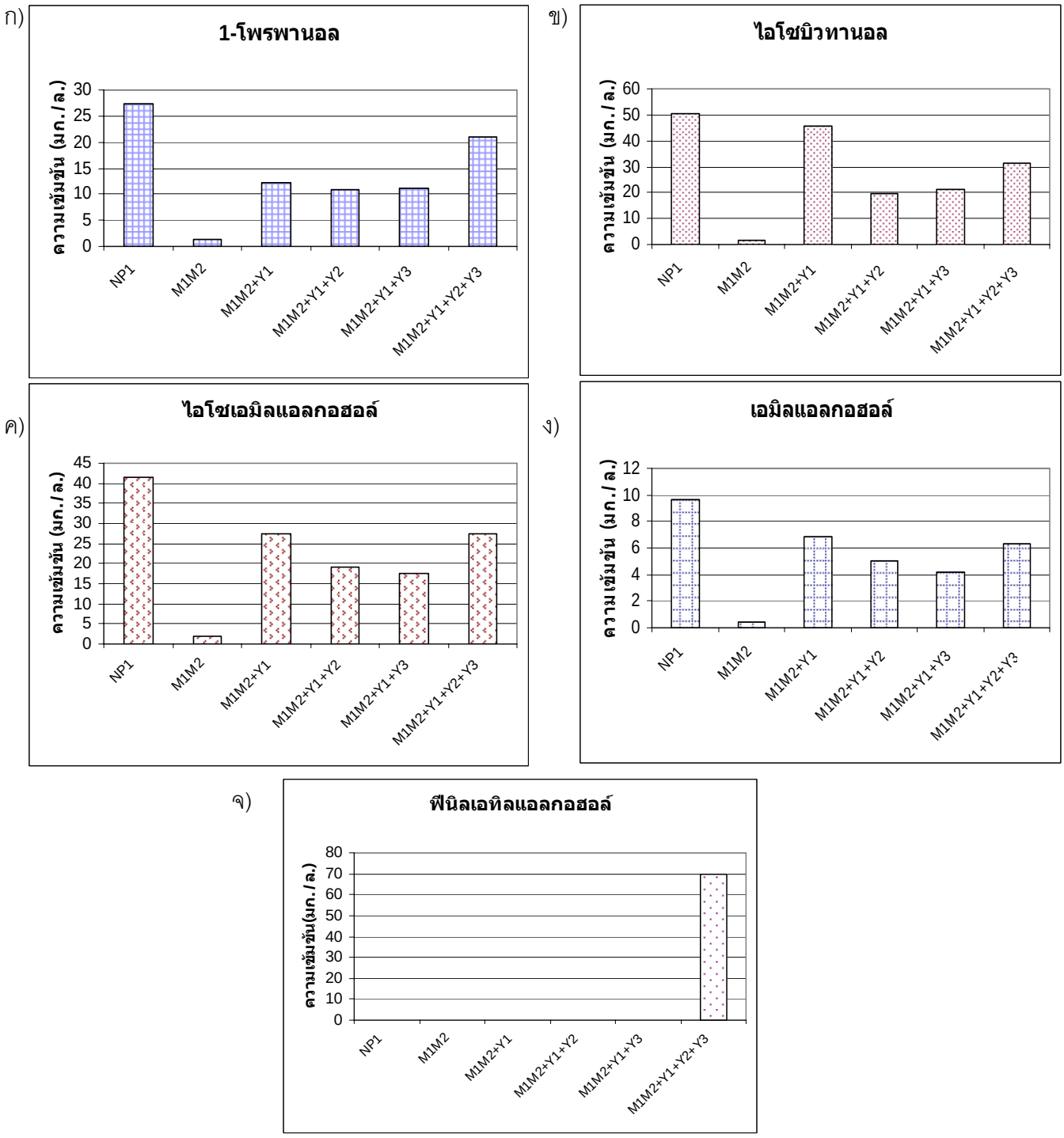
ปริมาณเอทิลแคโพรเอตที่พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมพบว่า ชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 มีปริมาณสูงที่สุดคือ 0.11 มก./ล. ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณเอทิลแคโพรเอตต่ำที่สุด

ปริมาณไอโซเอมิลแอซิเทตพบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 สูงที่สุด คือ มีปริมาณ 1.23 มก./ล.รองลงมาคือในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2 มีปริมาณอยู่ 0.81 มก./ล. ซึ่งมากกว่าในชุดทดลอง M1M2+Y1 ที่มีปริมาณ 0.75 มก./ล. จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rojas และคณะ (2003) ที่รายงานว่า ยีสต์สายพันธุ์ *P. anomala* 10590 มีความสามารถในการผลิตไอโซเอมิลแอซิเทต ในการหมักไวน์ร่วมกับ *S. cerevisiae* T_{73}

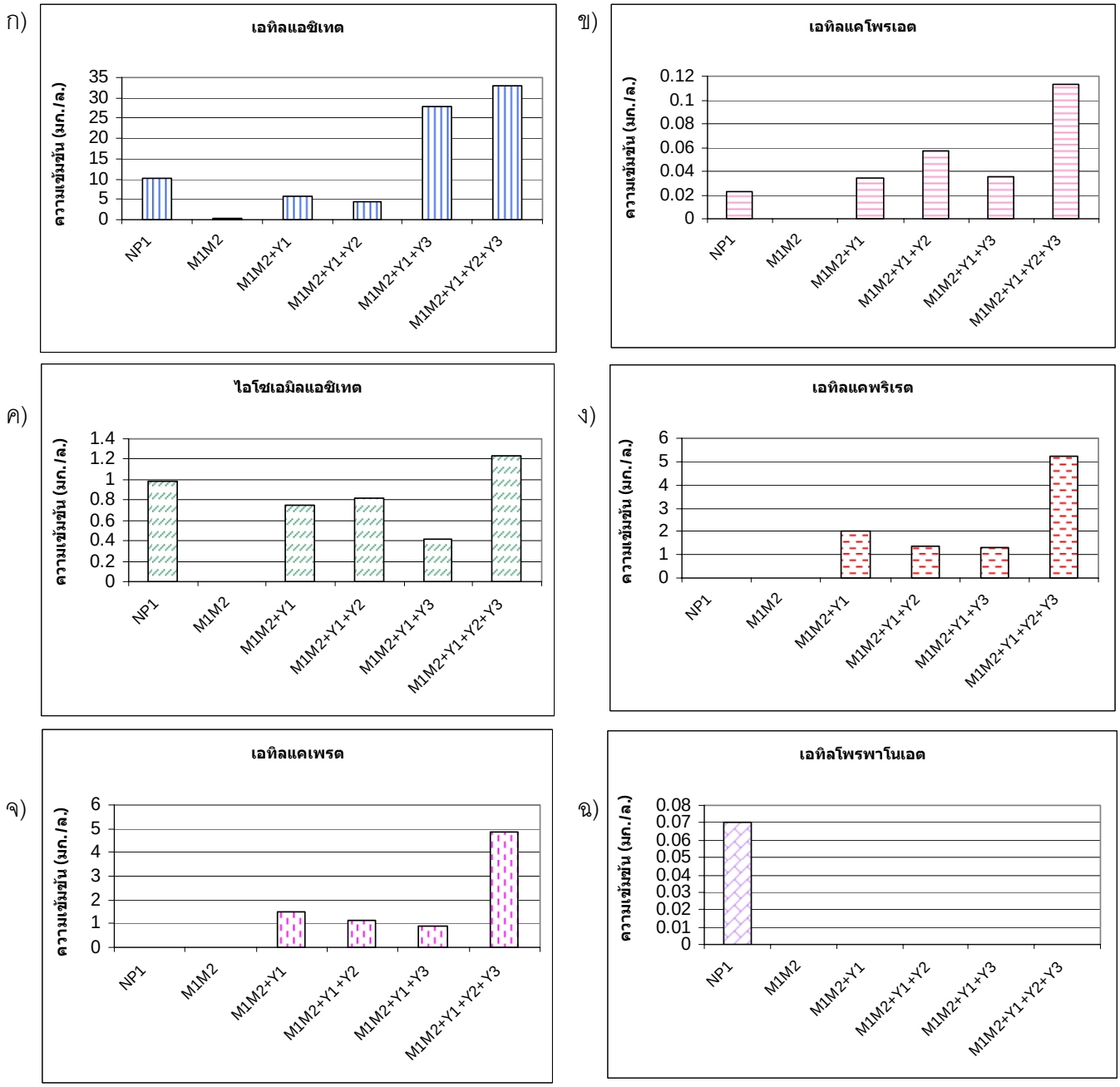
(Rojas และคณะ, 2003) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า Y2 มีบทบาทในการสร้างไอโซเอมิลแอซิเทต ในการผลิตสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสม

ส่วนปริมาณของเอทิลแคพริเรตและเอทิลคาเพรตนั้นพบเฉพาะในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมเท่านั้น โดยสาโทที่ได้จากชุดการทดลองM1M2+Y1+Y2+Y3 มีปริมาณเอทิลแคพริเรตและเอทิลแคเพรตสูงที่สุด คือ 5.22 และ 4.86 มก./ล. ตามลำดับ

และปริมาณของเอทิลโพรพาโนเอตนั้นพบเฉพาะในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ซึ่งมีปริมาณ 0.07 มก./ล. เท่านั้น ไม่สามารถพบได้ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม



ภาพที่ 4.9 แสดงปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ที่วิเคราะห์ได้ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม วิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐาน (ก) ปริมาณ 1-โพรพานอล ข) ปริมาณไอโซบิวทานอล ค) ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ง) ปริมาณเอมิลแอลกอฮอล์ และ จ) ปริมาณฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์



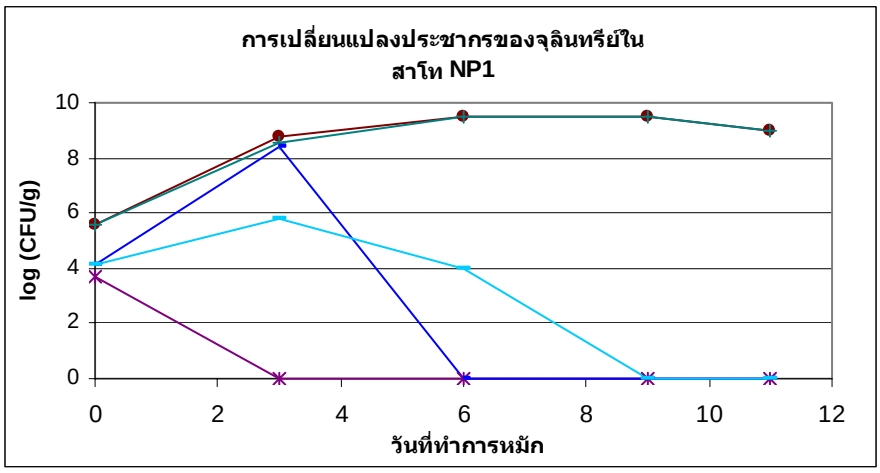
ภาพที่ 4.10 แสดงปริมาณเอสเทอร์ที่วิเคราะห์ได้ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม วิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐาน (ก) ปริมาณ เอทิลแอซิเทต ข) ปริมาณเอทิลแคโพรเอต ค) ปริมาณไอโซเอมิลแอซิเทต ง) ปริมาณเอทิลแคพริเรต จ) ปริมาณเอทิลแคเพรต และ ฉ) ปริมาณเอทิลโพรพาโนเอต)

4.2.5 การเปลี่ยนแปลงประชากรระหว่างกระบวนการหมักสาโท

จากการวิเคราะห์ปริมาณของสารให้กลิ่นในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา พบว่าปริมาณสารให้กลิ่นที่ได้มีความแตกต่างกันโดยสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณของฟูเซลแอลกอฮอล์สูงกว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกชุดการทดลอง ส่วนปริมาณเอสเทอร์นั้นพบว่าบางชุดการทดลองของเชื้อบริสุทธิ์ผสมมีปริมาณสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาบทบาทของจุลินทรีย์ในการผลิตสารให้กลิ่นในสาโท

ดังนั้นจึงทำการศึกษาโดยวิธี dilution plate count ในอาหารต่างชนิดกัน โดยทำการผลิตสาโทจากลูกแป้งสุรา NP1 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมในชุดการทดลองต่างๆดังเช่นหัวข้อ 3.1.2 ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 6, 9, 11 นำตัวอย่างที่ได้ไปตีด้วยเครื่อง stomacher เพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน ดังที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.4 จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่าง และนำสารละลายเจือจางมาเกลี่ยบนอาหารที่เลี้ยงเชื้อต่างๆ ดังนี้ อาหาร Rose Bengal สำหรับการเจริญของรา YM medium สำหรับการเจริญของยีสต์ L-lysine สำหรับการเจริญของยีสต์ในกลุ่ม Non-*Saccharomycese* และ อาหาร MRS ที่เติมนิสทาทิน และ โบโมครีซอลเพอร์เพิล สำหรับการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก

ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.11 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1



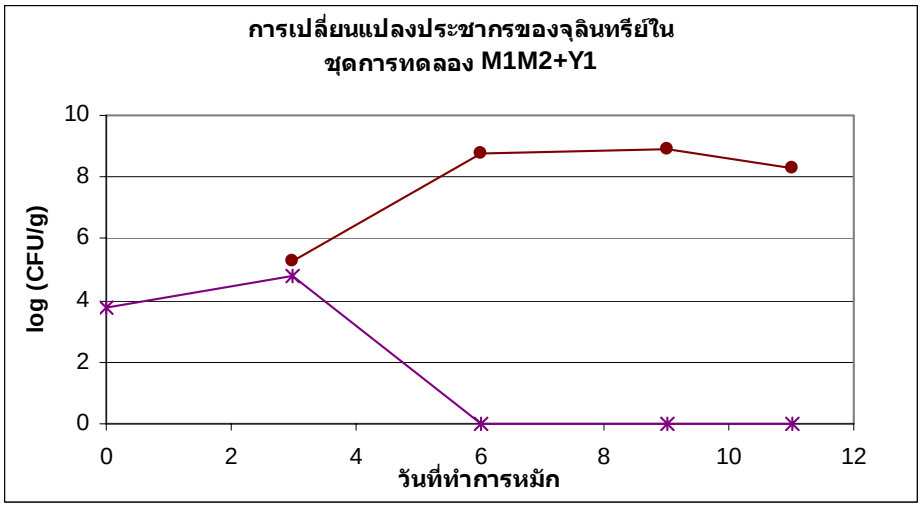
ภาพที่ 4.11 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1

(Molc Total yea *Saccharomycese* Non-*Saccharomycese*

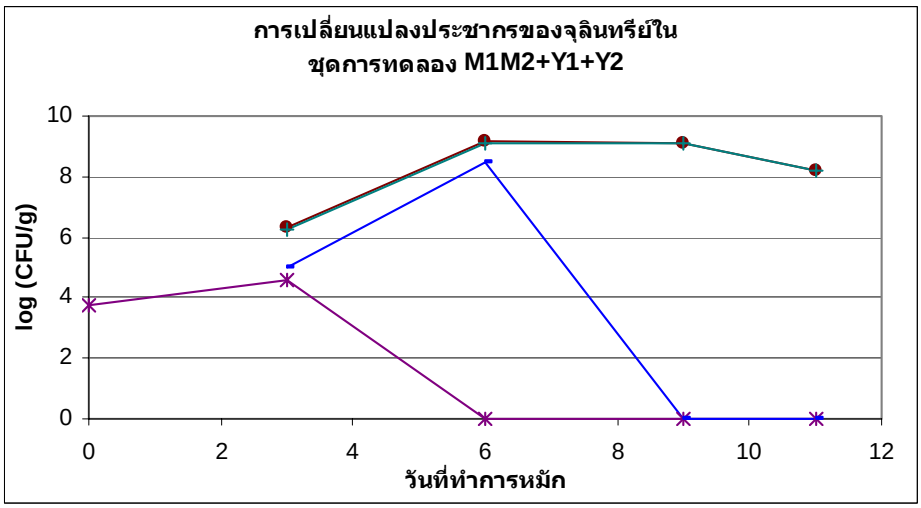
และ Lactic acid bacteria)

จากรูปพบประชากรของราได้ในช่วงต้นของการหมักคือวันที่ 0 – 3 เท่านั้นโดยในวันที่ 0 ราจะมีจำนวน 5×10^3 CFU/g และไม่พบประชากรของราในวันที่ 3 ของการหมัก จึงสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ อภิชญา เตชะวสัญญู (2550) ส่วนประชากรของยีสต์นั้นพบว่าในกลุ่ม Non-*Saccharomycese* ในวันที่ 0 มีปริมาณ 1.3×10^4 CFU/g และมีจำนวนเพิ่มขึ้นถึง 2.46×10^8 CFU/g ในวันที่ 3 ของการหมักและเริ่มมีจำนวนลดลงและไม่พบจำนวนของยีสต์กลุ่ม Non-*Saccharomycese* ในวันที่ 6 ของการหมัก ส่วนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* นั้นในวันที่ 0 มีจำนวน 3.57×10^5 CFU/g และมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 6 มีจำนวนสูงที่สุด คือ 3×10^9 CFU/g จากนั้นค่อนข้างคงที่และมีจำนวนลดลงเล็กน้อยโดยในวันที่ 11 พบว่ามีจำนวน 9.7×10^8 CFU/g ส่วนแบคทีเรียกรดแลกติกนั้นในวันที่ 0 มีจำนวน 1.3×10^4 CFU/g และมีจำนวนสูงสุดในวันที่ 3 คือมีจำนวน 6×10^5 CFU/g จากนั้นเริ่มมีจำนวนลดลงจนไม่พบในวันที่ 9 ของการหมัก ซึ่งผลการทดลองนี้ตรงกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550)

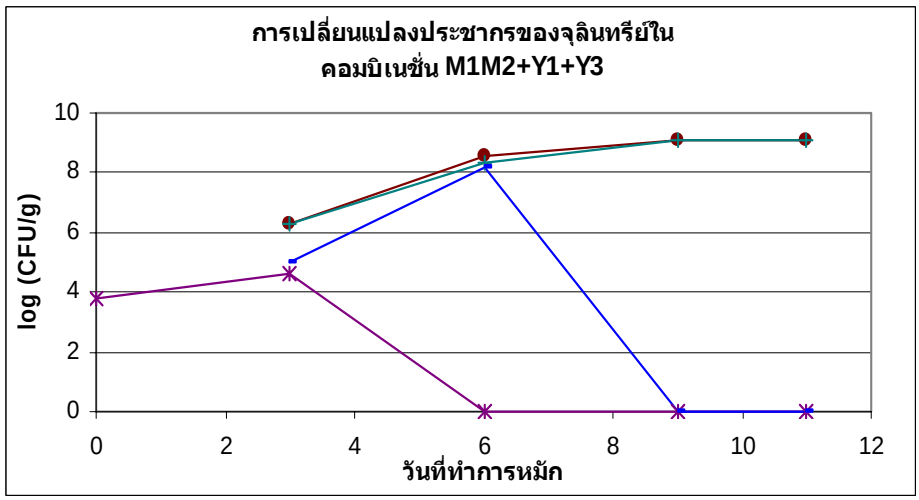
ก)



ข)



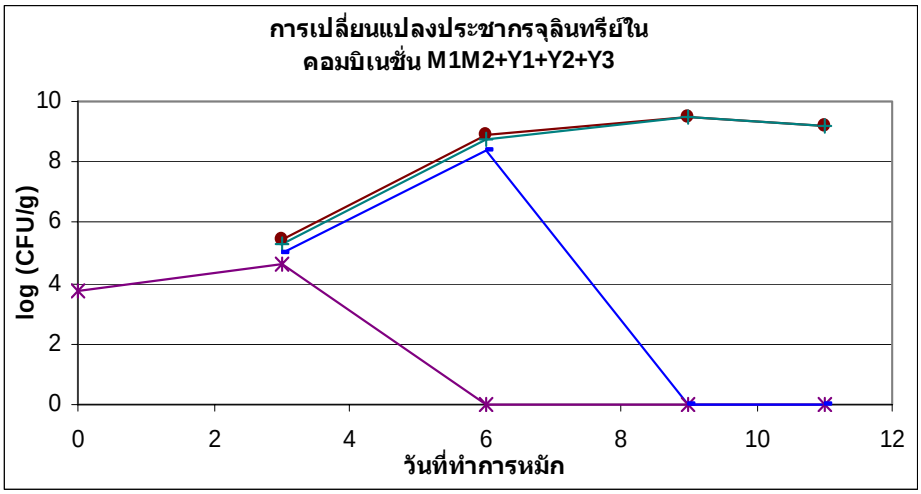
ค)



ภาพที่ 4.12 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม (ก) M1M2+Y1, ข) M1M2+Y1+Y2, ค) M1M2+Y1+Y3 และ ง) M1M2+Y1+Y2+Y3)

(Mold Total yeast *Saccharomycese sp.* และ Non-*Saccharomycese*)

ง)



ภาพที่ 4.12 (ต่อ) แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม (ก) M1M2+Y1 ข) M1M2+Y1+Y2 ค) M1M2+Y1+Y3 และ ง) M1M2+Y1+Y2+Y3)

(Mold Total yeast *Saccharomycese sp.* และ Non-*Saccharomycese*)

จากการทดลองแสดงผลดังภาพที่ 4.12 ซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมของราและยีสต์ ในกลุ่มของเชื้อบริสุทธิ์ผสมนั้นได้ทำการใส่ราบริสุทธิ์ 2 ชนิด จำนวนชนิดละ 3 คอร์กบอร์เรอร์ (อภิชญา เตชะวสัญญ, 2550) ลงในวันที่ 0 จากนั้นจึงเติมยีสต์ลงไปในวันที่ 3 เนื่องจากยีสต์ที่อยู่ในลูกแป้งสุรา NP1 นั้นเป็นยีสต์ที่อยู่ในสภาพไม่พร้อมทำงานแต่ยีสต์บริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดลอง ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวก่อน จึงเป็นยีสต์ที่มีความพร้อมในการเจริญ ถ้าใส่ยีสต์ที่อยู่ในสภาพพร้อมเจริญได้ดี (active state)สูง ลงในข้าวตั้งแต่วันที่ 0 จะทำให้ภาวะการหมักแตกต่างจากในการผลิตสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุรา ดังนั้นในวันที่ 3 ในชุดการทดลอง M1M2+Y1 ยังพบจำนวนของราซึ่งมีจำนวน 6.1 x 10^4 CFU/g และในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2 M1M2+Y1+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3 พบจำนวน 4 x 10^4 CFU/g ซึ่งจะแตกต่างจากการผลิตสาโทจากลูกแป้งสุราซึ่งพบว่าในวันที่ 3 ของการหมักไม่สามารถตรวจพบราได้เลย เนื่องจาก ราเจริญได้ดีในช่วงแรกของการหมักวันที่ 0 – 3 หลังจากมีการเติมน้ำ (การผ่านน้ำ) ในวันที่ 3 เป็นการสร้างภาวะขาดอากาศ ทำให้ไม่เหมาต่อการเจริญของรา แต่ยีสต์สามารถเจริญได้ จึงพบการเจริญของยีสต์สูงสุดในวันที่ไม่พบราแล้วและปริมาณของยีสต์จะยังคงสูงอยู่ตลอดช่วงท้ายของการหมัก และมีแนวโน้มลดลงในวันสุดท้ายของการหมักคือ วันที่ 11 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะร้อยละของเอทานอลที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้ยีสต์เริ่มทนไม่ได้ ดังนั้นหลังจากในวันที่ 6 ของการหมักในทุกชุดการทดลองจะไม่พบจำนวนของรา และยีสต์จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น

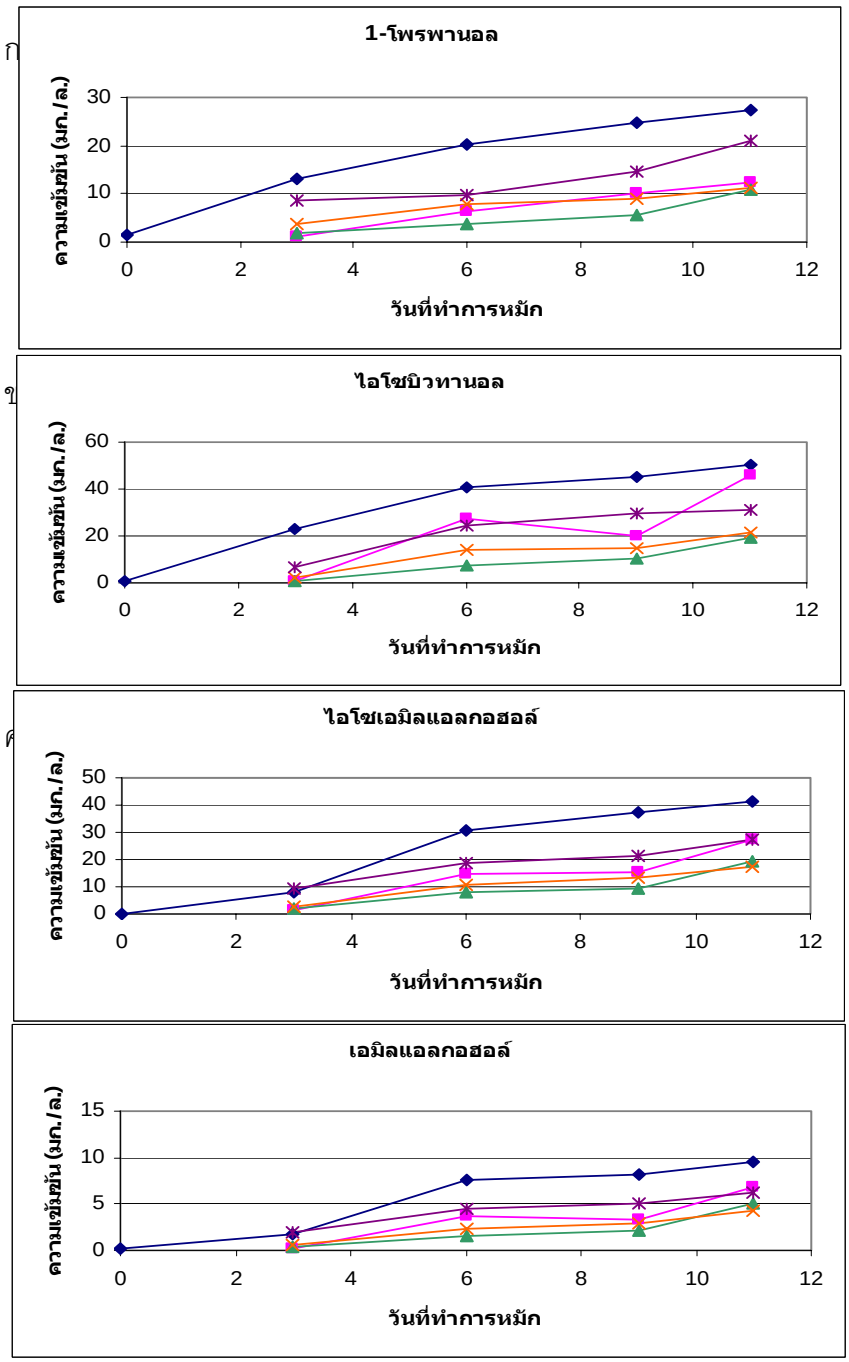
ภาพที่ 4.12 ก) ในชุดการทดลอง M1M2+Y1 ยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* ในวันที่ 3 มีจำนวน 2 x 10^5 CFU/g ส่วนในวันที่ 6 มีจำนวน 6 x 10^8 CFU/g จากนั้นมีจำนวนค่อนข้างคงที่โดยในวันที่ 9 มีจำนวน 7.7 x 10^8 CFU/g และในวันที่ 11 มีจำนวน 1.87 x 10^8 CFU/g

ภาพที่ 4.12 ข) ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2 ยีสต์ในกลุ่ม Non-*Saccharomycese* ในวันที่ 3 มีจำนวน 1 x 10^5 CFU/g ในวันที่ 6 จะมีจำนวน 3 x 10^8 CFU/g และหลังจากนั้นเริ่มมีจำนวนลดลงจนไม่พบยีสต์ในกลุ่มนี้ในวันที่ 9 ของการหมัก ส่วนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* ในวันที่ 3 มีจำนวน 1.9 x 10^5 CFU/g ส่วนในวันที่ 6 มีจำนวน 1.46 x 10^9 CFU/g จากนั้นมีจำนวนค่อนข้างคงที่และลดลงเล็กน้อยในวันที่ 11 โดยในวันที่ 9 และในวันที่ 11 มีจำนวน 1.32 x 10^9 CFU/g และ 1.67 x 10^8 CFU/g ตามลำดับ

ภาพที่ 4.12 ค) ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y3 ยีสต์ในกลุ่ม Non-*Saccharomycese* ในวันที่ 3 มีจำนวน 1 x 10^5 CFU/g ในวันที่ 6 มีจำนวน 1.5 x 10^8 CFU/g และหลังจากนั้นเริ่มมีจำนวนลดลงจนไม่พบยีสต์ในกลุ่มนี้ในวันที่ 9 ของการหมัก ส่วนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* ในวันที่ 3 มีจำนวน 2 x 10^5 CFU/g ส่วนในวันที่ 6 มีจำนวน 3.7 x 10^8 CFU/g จากนั้นมีจำนวนเพิ่มขึ้นและค่อนข้างคงที่ โดยในวันที่ 9 และในวันที 11 มีจำนวน 1.24 x 10^9 CFU/g และ 1.23 x 10^9 CFU/g ตามลำดับ

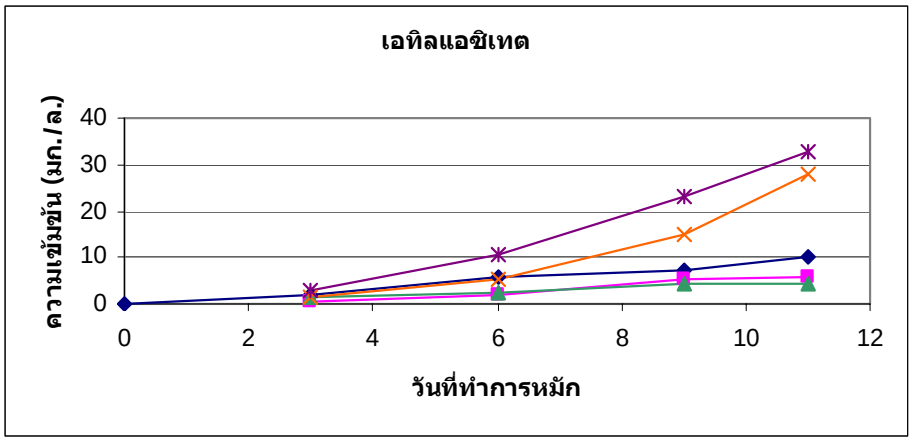
ภาพที่ 4.12 ง) ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ยีสต์ในกลุ่ม Non-*Saccharomycese* ในวันที่ 3 มีจำนวน 1 x 10^5 CFU/g ในวันที่ 6 มีจำนวน 2.5 x 10^8 CFU/g และหลังจากนั้นจะเริ่มมีจำนวนลดลงจนไม่พบยีสต์ในกลุ่มนี้ในวันที่ 9 ของการหมัก ส่วนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* ในวันที่ 3 มีจำนวน 2 x 10^5 CFU/g ส่วนในวันที่ 6 มีจำนวน 8 x 10^8 CFU/g จากนั้นมีจำนวนเพิ่มขึ้นและค่อนข้างคงที่ โดยในวันที่ 9 และในวันที 11 มีจำนวน 2.9 x 10^9 CFU/g และ 1.62 x 10^9 CFU/g ตามลำดับ

จากนั้นเมื่อทำการติดตามการเกิดสารประกอบให้กลิ่นในวันต่างๆ ทั้งในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม ผลแสดงดังภาพที่ 4.13 ซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม

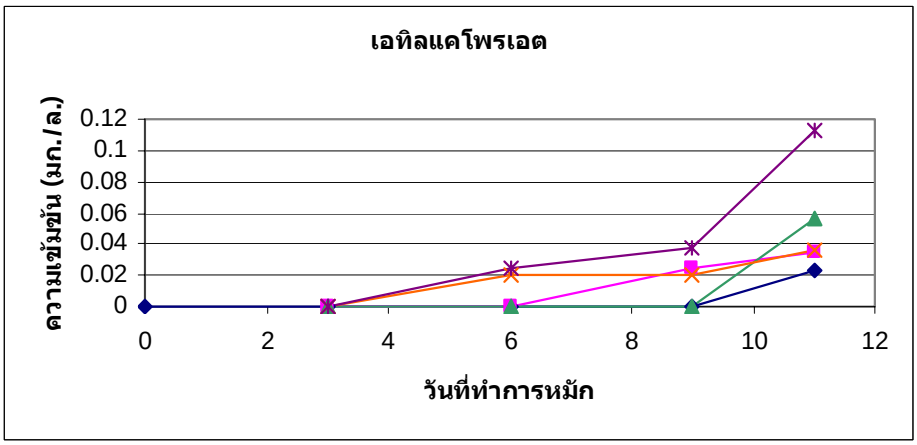


ภาพที่ 4.13 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม วิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่น บริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐาน (ก) 1-โพรพานอล ข) ไอโซบิวทิวแอลกอฮอล์ ค) ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และ ง) เอมิลแอลกอฮอล์ (—◆— สาโท NP1 —■— M1M2+Y1 —▲— M1M2+Y1+Y2 —×— M1M2+Y1+Y3 และ —✱— M1M2+Y1+Y2+Y3)

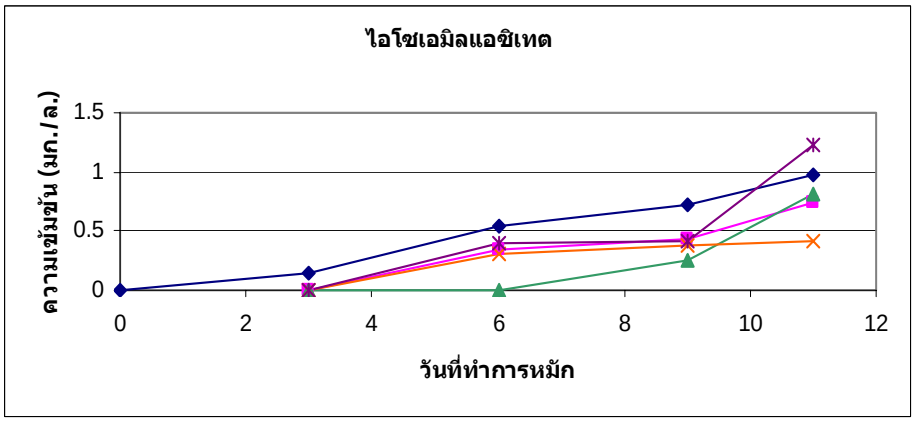
ก)



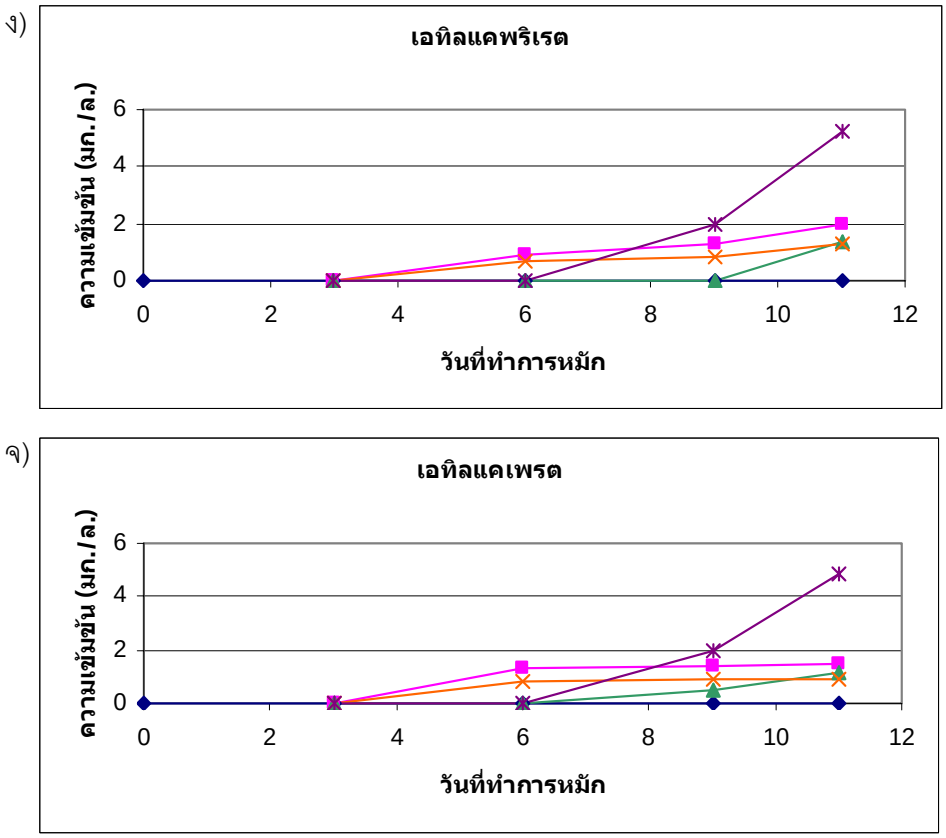
ข)



ค)



ภาพที่ 4.14 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอสเทอร์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม วิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐาน (ก) เอทิลแอซิเทต ข) เอทิลแคโพรเอต ค) ไอโซเอมิลแอซิเทต ง) เอทิล-แคพริเรต และ จ) เอทิลแคเพรต) (—◆— สาโท NP1 —■— M1M2+Y1 —▲— M1M2+Y1+Y2 —×— M1M2+Y1+Y3 และ —✳— M1M2+Y1+Y2+Y3)



ภาพที่ 4.14 (ต่อ) แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอสเทอร์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม วิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐาน (ก) เอทิลแอซิเทต ข) เอทิลแคโพรเอต ค) ไอโซเอมิลแอซิเทต ง) เอทิล-แคพริเรต และ จ) เอทิลแคเพรต) (—◆—สาโท NP1 —■— M1M2+Y1 —▲— M1M2+Y1+Y2 —✳— M1M2+Y1+Y3 และ —✳— M1M2+Y1+Y2+Y3)

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณของฟูเซลแอลกอฮอล์ดังภาพที่ 4.13 พบว่า ปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ทุกชนิดทั้งในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณฟูเซล-แอลกอฮอล์สูงกว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกชุดการทดลอง ซึ่งเมื่อพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงประชากรพบว่ายีสต์ที่มีบทบาทหลักในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรานั้นคือ *S. cerevisiae* ซึ่งจะเห็นได้ว่าหลังจากวันที่ 3 ของการหมักปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์และเอมิลแอลกอฮอล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จาก 7.71 มก./ล. เป็น 30.65 มก./ล. และ จาก 1.82 มก./ล. เป็น 7.68 มก./ล. ตามลำดับ และจะเห็นได้ว่าในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในชุดการทดลอง M1M2+Y1 มีเฉพาะยีสต์ *S. cerevisiae* มีปริมาณไอโซบิวทานอลใกล้เคียงกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา โดยมีปริมาณ 45.68 และ 50.41 มก./ล. ตามลำดับ

Rojas และคณะ (2003) รายงานถึงปริมาณของสารกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ในไวน์องุ่นซึ่งได้แก่ 1-โพรพานอล, ไอโซบิวทานอล, ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ระหว่างการใช้เชื้อบริสุทธิ์ของ *S. cerevisiae* T73 และ ในเชื้อบริสุทธิ์ผสมของ *S. cerevisiae* T73 และ *P. anomala* พบว่า ในไวน์องุ่นที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมระหว่าง *S. cerevisiae* T73 และ *P. anomala* มีปริมาณสารในกลุ่มฟูเซล-แอลกอฮอล์เหล่านี้น้อยกว่าในเชื้อบริสุทธิ์ของ *S. cerevisiae* T73 แต่เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์นั้นพบว่า ในไวน์องุ่นที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม ระหว่าง *S. cerevisiae* T73 และ *P. anomala* มีปริมาณ เอทิลแอซิเทต ไอโซเอมิลแอซิเทต เอทิลแคพริเรต และเอทิลแคโพรเอต มากกว่าปริมาณที่พบในการผลิตไวน์องุ่นโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ ของ *S. cerevisiae* T73 ซึ่งจากการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเอสเทอร์ดังแสดงในภาพที่ 4.14 พบว่า เอสเทอร์ทุกชนิดทั้งในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น แต่ในกลุ่มของเชื้อบริสุทธิ์ผสมในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3 มีปริมาณเอทิลแอ-ซิเทตสูงกว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ซึ่งเมื่อพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงประชากรแล้วพบว่าในกลุ่มของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมสามารถตรวจพบยีสต์ในกลุ่ม Non- *Saccharomyces* จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก Rojas และคณะ (2003) ยังรายงานถึงการใช้ยีสต์ในกลุ่ม Non- *Saccharomyces* ซึ่งคือ *H. guilliermondii* และ *P. anomala* ในการผลิตไวน์องุ่นพบว่ามีปริมาณเอทิลแอซิเทตสูงกว่า *S. cerevisiae* T73

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณของ ร้อยละเอทานอล สารประกอบให้กลิ่น กรดอินทรีย์ และกลีเซอรอล ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์และสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 11) เปรียบเทียบกับปริมาณที่พบในไวน์องุ่นและสาเกทั่วไป

	ปริมาณที่พบในไวน์องุ่นทั่วไป (มก./ล.)*	ปริมาณที่พบในสาเก (มก./ล.)**							
			ข้าวเหนียวนึ่ง	NP1	M1M2	M1M2+Y1	M1M2+Y1+Y2	M1M2+Y1+Y3	M1M2+Y1+Y2+Y3
ร้อยละเอทานอล	3.0 - 11.0	15	-	11.83	1.95	11.79	9.2	7.49	7.62
ฟูเซลแอลกอฮอล์ (มก./ล.)									
1-โพรพานอล	10 - 125	120	-	27.34	1.25	12.3	10.76	11.12	21.03
ไอโซบิวทานอล	2 - 150	64	-	50.41	1.51	45.68	19.43	21.41	31.1
ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	20 - 350	170	-	41.64	1.80	27.32	19.01	17.45	27.37
เอมิลแอลกอฮอล์	1 - 300	-	-	9.63	0.38	6.89	5	4.22	6.32
ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์	15 - 200	75	-	-	-	-	-	-	69.54
ฟูเซลแอลกอฮอล์ทั้งหมด	-	-	-	**129.02**	**4.94**	**92.19**	**54.20**	**54.20**	**155.36**
เอสเทอร์ (มก./ล.)									
เอทิลแอซิเทต	9 - 257	20 - 120	0.1	10.11	0.19	5.75	4.37	27.75	32.83
เอทิลแคโพรเอต	0 - 3.4	2.0 - 10.0	-	0.02	-	0.03	0.06	0.04	0.11
ไอโซเอมิลแอซิเทต	0.1 - 8	2.0 - 10.0	-	0.98	-	0.75	0.81	0.41	1.23
เอทิลแคพริเรต	0.2 - 3.8	5.0 - 10.0	-	-	-	2.01	1.38	1.32	5.22
เอทิลแคเพรต	0 - 0.3	10	-	-	-	1.5	1.15	0.9	4.86
เอทิลโพรพาโนเอต	0 - 20	-	-	0.07	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) แสดงปริมาณของ ร้อยละเอทานอล สารประกอบให้กลิ่น กรดอินทรีย์ และกลีเซอรอล ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์และสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 11) เปรียบเทียบกับปริมาณที่พบในไวน์องุ่นและสาเกทั่วไป

	ปริมาณที่พบในไวน์องุ่นทั่วไป (มก./ล.)*	ปริมาณที่พบในสาเก (มก./ล.)**							
			ข้าวเหนียวนึ่ง	NP1	M1M2	M1M2+Y1	M1M2+Y1+Y2	M1M2+Y1+Y3	M1M2+Y1+Y2+Y3
กรดอินทรีย์ (มก./มล.)									
กรดซัคซินิก	0.05 - 2	-	-	0.56	0.06	0.26	0.17	0.16	0.17
กรดแลคติก	0.01 - 5	-	-	2.13	2.21	1.61	0.91	1.4	0.93
กรดแอซิติก	0.02 - 2	-	-	-	-	-	0.64	0.58	0.65
กลีเซอรอล	2.0 - 10	-	-	4.44	1.77	4.12	3.47	3.93	3.88
กรดไพรูวิก (เท่าของสาโท NP1)	-	-	-	1	171.41	1.27	55.77	70.14	34.88

* ที่มา: Maares, 1991 ** ที่มา : ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2546

จากตารางที่ 4.3 เมื่อพิจารณาเฉพาะสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม พบว่า ในกลุ่มควบคุม M1M2 มีปริมาณกรดไพรูวิกสูงถึง 171.41 เท่าของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ซึ่งมีปริมาณกรดไพรูวิก คงเหลือน้อยสุด สอดคล้องกับปริมาณร้อยละเอทานอลในชุดควบคุมซึ่งมีปริมาณต่ำ และมีการสร้างสารให้กลิ่นเฉพาะฟูเซลแอลกอฮอล์ในปริมาณน้อยกว่าปริมาณทั่วไปที่พบในไวน์องุ่น แต่ไม่พบการสร้างสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์อื่นยกเว้น เอทิลแอซิเทต ซึ่งมีปริมาณ 0.19 มก./ล. แต่เมื่อพิจารณาจากสารให้กลิ่นในข้าวเหนียวนึ่งซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโทพบปริมาณเอทิลแอซิเทตในปริมาณ 0.1 มก./ล. ดังนั้นแสดงว่า เอทิลแอซิเทตที่พบในชุดควบคุมอาจมาจากวัตถุดิบส่วนหนึ่งและราสร้างได้แต่ในปริมาณน้อยอีกส่วนหนึ่ง นอกจากนี้ยังพบว่าในชุดควบคุมมีการสร้างสารให้กลิ่น 2,3 บิวเทนไดออล หรือ 2,3 บิวทิลีน ไกลคอล แต่ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญในไวน์ เป็นสารที่ให้กลิ่นเล็กน้อย และให้รสชาติหวานขม มีบทบาทต่อคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสด้านการชิมเล็กน้อยในไวน์ (Jackson, 2000) เป็นสารประกอบให้กลิ่นที่เป็นผลพลอยได้จากเมแทบอไลต์ของกรดไพรูวิก ดังนั้นในการผลิตสาโทนั้นนอกจากราจะมีบทบาทในการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลและสร้างกรดอินทรีย์และสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของยีสต์ (ยุพกนิษฐ์ พ่วงวีระกุล, 2545) แล้วรายังสามารถสร้างสารประกอบให้กลิ่นในปริมาณเล็กน้อยได้เช่นกัน

จากนั้นเมื่อผลิตสาโทจากเชื้อบริสุทธิ์โดยเติมยีสต์ *S. cerevisiae* NP1930 (Y1) ลงไปดังในชุดการทดลอง M1M2+Y1 จะเห็นได้ว่า พบปริมาณกรดไพรูวิกเพียง 1.27 เท่าของสาโท NP1 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณร้อยละเอทานอลที่เพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับในชุดทดลองอื่นๆ และพบปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์และเอสเทอร์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดและมีปริมาณอยู่ในระดับที่พบได้ทั่วไปในไวน์องุ่น และมีปริมาณใกล้เคียงกับในสาเกซึ่งเป็นไวน์ข้าวเช่นเดียวกัน และจากการทดลองจะเห็นได้ว่า *S. cerevisiae* NP1930 (Y1) มีบทบาทสำคัญในการสร้างสาร ไอโซบิวทานอล และ เอมิลแอลกอฮอล์ ในปริมาณ 45.68 และ 6.89 มก./ล. ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดทดลองอื่นๆ

ส่วนในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2 พบว่ามีปริมาณกรดไพรูวิกคงเหลือ 55.77 เท่าของสาโท NP1 ซึ่งจะเห็นได้ว่าในชุดการทดลองนี้มีปริมาณร้อยละเอทานอลและปริมาณสารประกอบให้กลิ่นส่วนใหญ่น้อยกว่าในชุดทดลองอื่นๆ ยกเว้นปริมาณไอโซเอมิลแอซิเทต ที่มีปริมาณ 0.81 มก./ล. ซึ่งมากกว่าในชุดทดลอง M1M2+Y1 และ M1M2+Y1+Y3 ดังนั้นจากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า *P. anomala* NP101 (Y2) ซึ่งเป็นยีสต์ในกลุ่ม Non- *Saccharomyces* มีบทบาทในการสร้างไอโซเอมิลแอซิเทต ในการผลิตสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสม

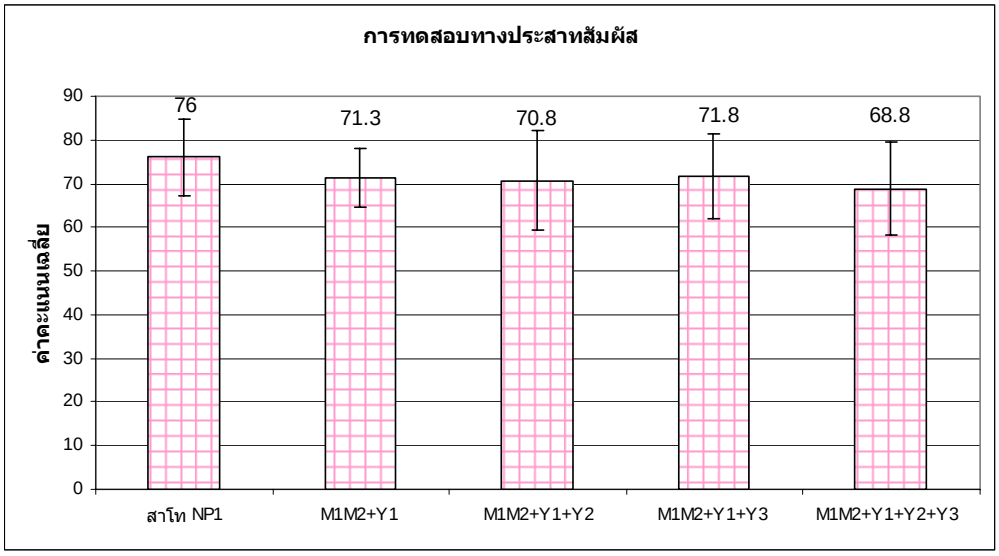
ส่วนในชุดทดลอง M1M2+Y1+Y3 มีปริมาณกรดไพรูวิกคงเหลือสูงสุดคือ 70.14 เท่าของสาโท NP1 และมีปริมาณร้อยละเอทานอลต่ำที่สุดและพบว่ามีปริมาณสารประกอบให้กลิ่นอื่นๆ ต่ำยกเว้นปริมาณเอทิลแอซิเทตซึ่งมีปริมาณสูงกว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและในชุดทดลองอื่นๆ ดังนั้นนอกจากจากงานวิจัยก่อนหน้านี้จะมีรายงานว่ายีสต์ *Sch. fibuligera* NP1030 มีความสามารถในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลแล้ว (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) จากการทดลองนี้ยังพบบทบาทในการสร้างเอทิลแอซิเทต ในการผลิตสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสม

ในชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 มีปริมาณกรดไพรูวิกคงเลือก 34.88 เท่าของสาโท NP1 แต่มีปริมาณร้อยละเอทานอลไม่สูงมาก แต่พบปริมาณสารประกอบให้กลิ่นหลายชนิดในปริมาณสูง ดังนั้นจากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่านอกจากยีสต์จะมีบทบาทในการสร้างเอทานอลแล้วยีสต์ยังมีบทบาทในการสร้างสารให้กลิ่นต่างๆ ที่สำคัญในสาโทเช่นกัน

ลักษณะเฉพาะของกลิ่นรสที่ถูกสร้างโดยยีสต์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ (Fleet, 2003) ผลของความสัมพันธ์ระหว่าง ยีสต์ - ยีสต์ สามารถถูกนำมาใช้ประโยชน์ได้นอกเหนือจากการสร้าง เอทานอล และ กรดอินทรีย์แล้วยังมีการเกี่ยวข้องถึงการสร้างเอทิลเอสเทอร์ด้วย ความสัมพันธ์ระหว่างยีสต์ในกลุ่ม Non-*Saccharomyces* และ *Saccharomyces sp.* ขึ้นอยู่กับการแข่งขันการใช้สารอาหารทั้งคาร์โบไฮเดรต ไนโตรเจน และสารอื่นๆ (Querol และ Fleet, 2006)

4.2.6 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

นำสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดต่างๆไปทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการชิม โดยผู้ทดสอบที่มีความคุ้นเคยและเชี่ยวชาญการชิมไวน์องุ่นและสาโทในระดับชาติ จำนวน 10 ท่าน ให้คะแนนในใบให้คะแนนและวิธีการให้คะแนน (ภาคผนวก ค) เปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 นำคะแนนที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาค่าความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Sripunya และคณะ, 2005)



ภาพที่ 4.15 แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมและสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1

โดยพบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีคะแนนเฉลี่ย 76 คะแนน เป็นที่ยอมรับและจัดเป็นสาโทที่มีคุณภาพดี ส่วนสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมนั้นมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 68.8 – 71.8 คะแนน ซึ่งจัดเป็นสาโทที่ได้รับการยอมรับและจัดอยู่ในระดับ พอใช้ ถึง ดี และนำค่าเฉลี่ยมาทดสอบตามวิธีทางสถิติเพื่อหาค่าความแปรปรวน พบว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) กับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP 1

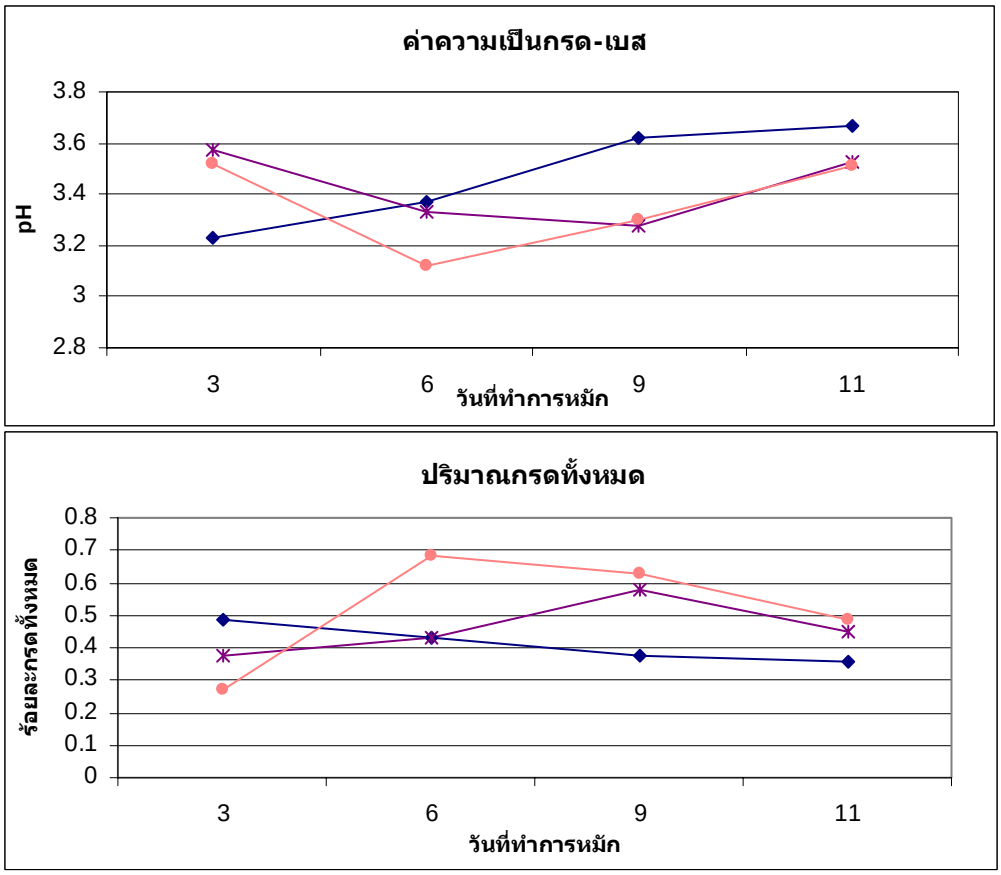
แต่จากคะแนนเฉลี่ยถึงแม้ว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมและสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 จะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) แต่ก็มีคะแนนเฉลี่ยทั้งทางด้าน สี กลิ่น รส และการยอมรับน้อยกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา (ภาคผนวก ง) ทั้งนี้อาจเนื่องจากในลูกแป้งสุรายังมีจุลินทรีย์อื่น นอกจากราและยีสต์ที่มีบทบาทต่อการผลิตสาโทที่มีอยู่ในลูกแป้ง NP1 แต่ไม่มีในเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่นำมาทดลอง

4.2.7 ผลของแบคทีเรียกรดแลกติกต่อสารให้กลิ่นในสาโท

ในการผลิตไวน์องุ่น แบคทีเรียกรดแลกติกมีบทบาทสำคัญในการเกิดกระบวนการหมักมาโลแลค-ติก ซึ่งเป็นกระบวนการหมักทุติยภูมิ ซึ่งเกิดขึ้นหลักจากกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นการช่วยเพิ่มกลิ่นรสที่ดีให้แก่ไวน์องุ่น (Fleet, 2003) ในประเทศไทยมีการวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติก ส่วนใหญ่ศึกษาในผลิตภัณฑ์อื่น เช่น แหนม ผักดอง และผลิตภัณฑ์นม แต่ยังไม่มีรายงานถึงบทบาทของแบคทีเรียกรดแลกติกในการผลิตสาโท ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษา บทบาทของแบคทีเรียกรดแลกติกในการสร้างสารให้กลิ่นในสาโท ผู้วิจัยจึงได้ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากลูกแป้งสุรา NP1 ดังนี้ทำการแยกแบคทีเรีย กรดแลคติก เช่นเดียวกับที่กล่าวในข้อ การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลูกแป้งสุรา เลือกโคโลนีสีเหลืองที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่เติมนิสทาทิน และโบรโมครีซอล เพอร์เพิล ทำการยืนยันว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการทดสอบทางชีวเคมีตามวิธีของ Stanley และคณะ (1989)

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จำนวน 10 ไอโซเลต รวมจำนวนได้ 3×10^5 CFU/g มาผสมเข้ากับเชื้อจุลินทรีย์ผสมของราและยีสต์ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 (ในจำนวนตามข้อ 3.1.2) นำกล้าเชื้อดังกล่าวไปผลิตสาโทเปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ปริมาณกรดอินทรีย์และกลีเซอรอล การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น และนำไปทดสอบทางประสาทสัมผัสต่อไป

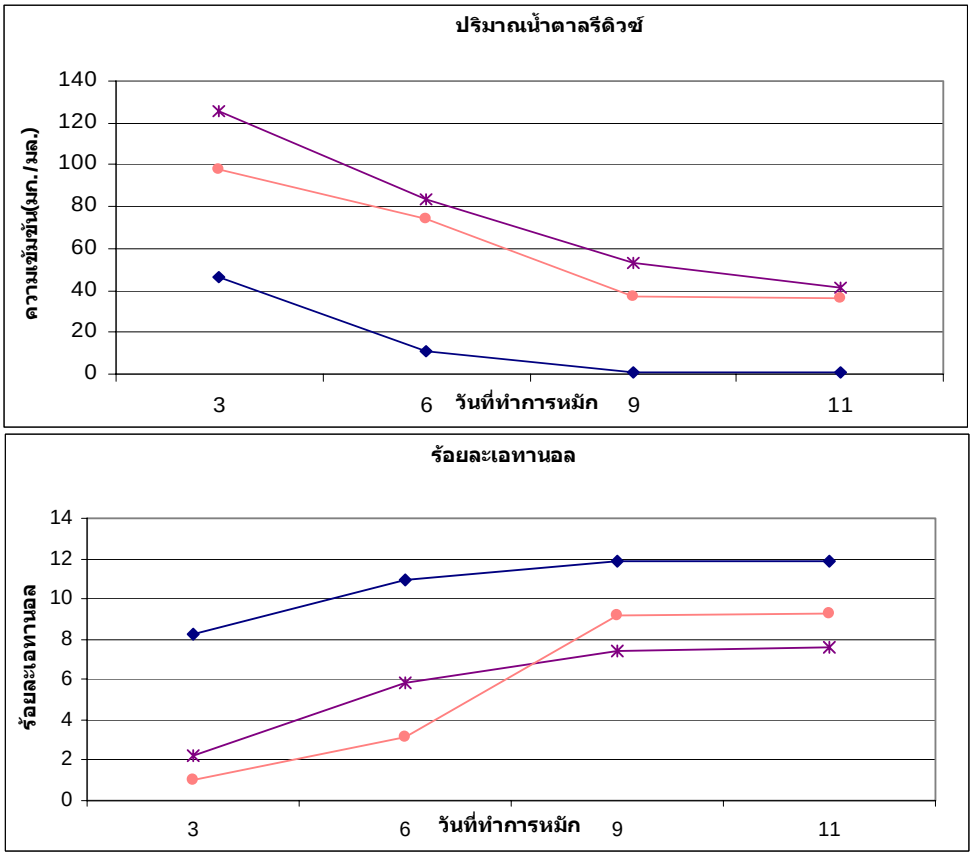
ผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ แสดงดังภาพที่ 4.16 และ 4.17



ภาพที่ 4.16 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส และปริมาณกรดทั้งหมด ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB (สาโท NP1 M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB)

จากรูปพบว่าค่าความเป็นกรด-เบสของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB มีค่า 3.12 - 3.52 และมีค่าใกล้เคียงกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-เบสสูงในวันที่ 3 และลดลงเล็กน้อยในวันที่ 6 จากนั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งแตกต่างจากสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราที่ค่าความเป็นกรด-เบส มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยค่าความเป็นกรด-เบสของสาโททั้ง 3 ชนิด สอดคล้องกับปริมาณกรดทั้งหมด กล่าวคือ ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB นั้นมีปริมาณกรดทั้งหมดต่ำในวันที่ 3 จากนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันที่ 6 และเริ่มมีปริมาณลดลงในวันที่ 9 และวันที่ 11 ส่วนในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 นั้นปริมาณกรดมีแนวโน้มลดลง

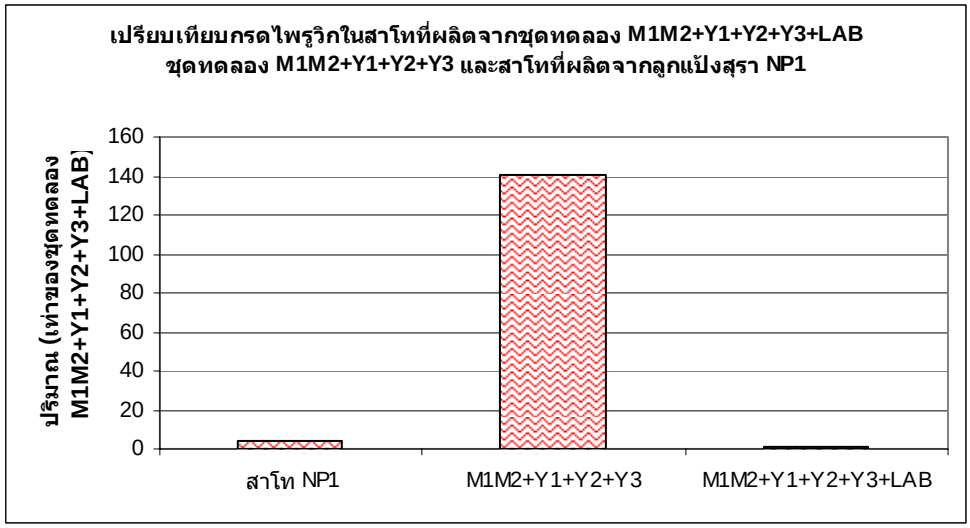
ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณร้อยละของเอทานอลแสดงดังภาพที่ 4.17



ภาพที่ 4.17 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณร้อยละเอทานอล ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB (—◆— สาโท NP1 —✳— M1M2+Y1+Y2+Y3 และ —●— M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB)

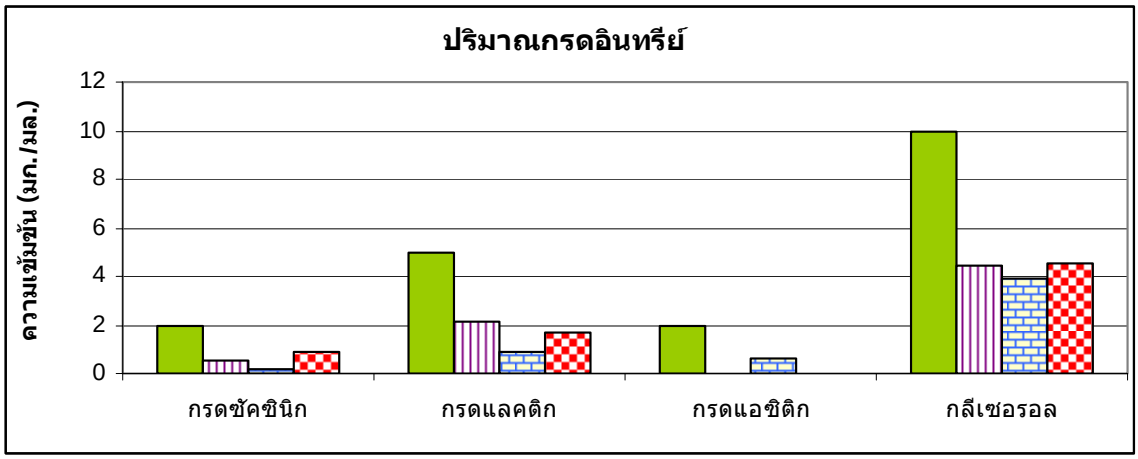
จากรูปปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB มีแนวโน้มลดลงและปริมาณร้อยละเอทานอลเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น โดยในวันสุดท้ายของการหมัก มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 36.02 มก./มล. และมีปริมาณร้อยละเอทา-นอล 9.29 ซึ่งจะให้ปริมาณร้อยละเอทานอลที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันสุดท้ายของการหมัก 41.06 มก./มล. และมีปริมาณร้อยละเอทานอล 7.62 แต่ไม่มากกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1

ผลปริมาณกรดอินทรีย์และกลีเซอรอล แสดงดังภาพที่ 4.18 และ 4.19



ภาพที่ 4.18 แสดงปริมาณกรดไพรูวิก ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB

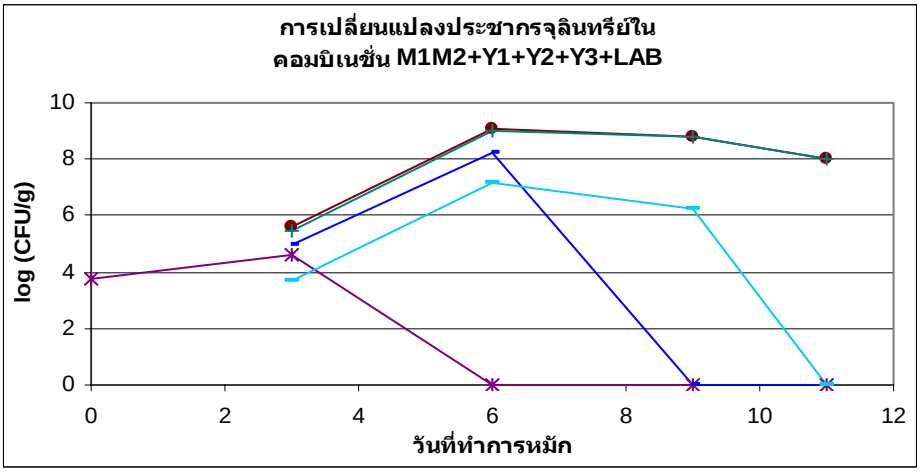
จากรูปปริมาณกรดไพรูวิกของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB มีปริมาณคงเหลือต่ำที่สุด ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ซึ่งมีปริมาณกรดไพรูวิกคิดเป็น 4.03 เท่าของชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB ส่วนในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 นั้นพบว่ามีปริมาณกรดไพรูวิกคงเหลือสูงสุดคือ 140.70 เท่าของชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถเปลี่ยนกรดไพรูวิกต่อไปได้



ภาพที่ 4.19 แสดงปริมาณกรดอินทรีย์ (กรดซัคซินิก, กรดแลคติก และกรดแอซิติก) และกลีเซอรอล ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB ปริมาณที่พบในไวน์องุ่นทั่วไป สาโท NP1 M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB)

จากรูปปริมาณกรดซัคซินิก กรดแลคติก และกลีเซอรอล ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB มีปริมาณสูงกว่าในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ยกเว้นปริมาณของกรดแลคติกที่มีปริมาณ 1.69 มก./มล. แต่ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณ 2.13 มก./มล. ส่วนของกรดซัคซินิกพบในปริมาณ 0.90 และกลีเซอรอล 4.58 มก./มล. ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณมากกว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ที่มีปริมาณ 0.17 และ 3.88 มก./มล.และ ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 พบปริมาณกรดซัคซินิก และกลีเซอรอลใน 0.56 และ 4.44 มก./มล. ตามลำดับ แต่ไม่พบปริมาณกรดแอซิติกเช่นเดียวกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 จากการทดลองจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทในการสร้างกรดซัคซินิก กรดแลคติก และกลีเซอรอล ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญด้านรสชาติของสาโท

จากนั้นทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB โดยมีขั้นตอนการทำดังเช่นการทดลองในข้อ 3.4.2 เช่นเดียวกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 โดยวิธี dilution plate count ในอาหารต่างชนิดกัน ผลการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ระหว่างการหมักของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB แสดงดังภาพที่ 4.20



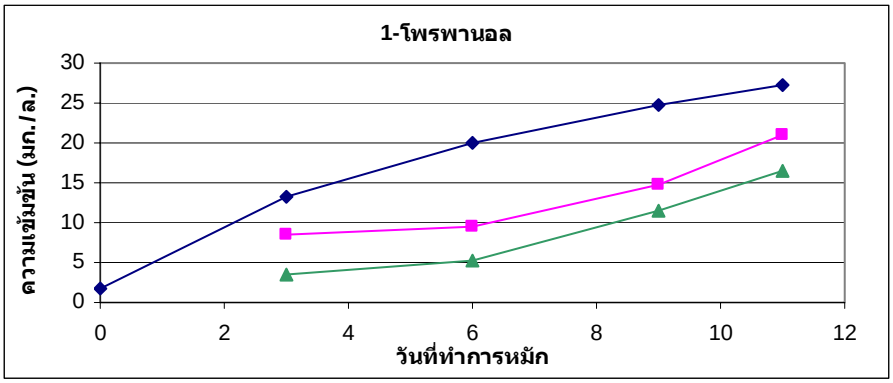
ภาพที่ 4.20 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB (Mold Total yeast *Saccharomycese sp.* Non-*Saccharomycese* และ Lactic acid bacteria)

จากรูปในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB พบว่าในวันที่ 3 ของการหมักพบรา จำนวน 4 x 10^4 CFU/g ในกลุ่มของเชื้อบริสุทธิ์ผสมนั้นได้ทำการใส่ราบริสุทธิ์ 2 ชนิด จำนวนชนิดละ 3 คอร์กบอร์เรอร์

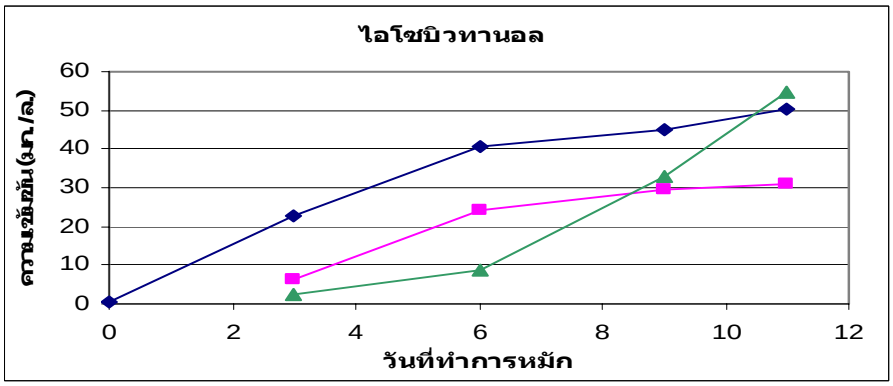
(อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) ลงในวันที่ 0 จากนั้นจึงเติมยีสต์ลงไปในวันที่ 3 เนื่องจากยีสต์ที่อยู่ในลูกแป้งสุรา NP1 นั้นเป็นยีสต์ที่อยู่ในสภาพไม่พร้อมทำงานแต่ยีสต์บริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดลอง ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวก่อน จึงเป็นยีสต์ที่มีความพร้อมในการเจริญ ถ้าใส่ยีสต์ที่อยู่ในสภาพพร้อมเจริญได้ดี (active state) สูง ลงในข้าวตั้งแต่วันที่ 0 จะทำให้ภาวะการหมักแตกต่างจากในการผลิตสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุรา ดังนั้นในวันที่ 3 ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB ยังพบจำนวนของราอยู่ ส่วนจำนวนของยีสต์ในกลุ่ม Non-*Saccharomycese* ของชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB นั้นพบว่าในวันที่ 3 มีจำนวน 1 x 10^5 CFU/g ในวันที่ 6 มีจำนวน 1.72 x 10^8 CFU/g และหลังจากนั้นเริ่มมีจำนวนลดลงจนไม่พบยีสต์ในกลุ่มนี้ในวันที่ 9 ของการหมัก ส่วนยีสต์ในกลุ่ม *S.cerevisiae* ในวันที่ 3 มีจำนวน 3 x 10^5 CFU/g ส่วนในวันที่ 6 จะมีจำนวน 1.048 x 10^9 CFU/g จากนั้นจะมีจำนวนลดลง โดยในวันที่ 9 และในวันที่ 11 มีจำนวน 5.8 x 10^8 CFU/g และ 9.6 x 10^7 CFU/g ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นพบว่าในวันที่ 3 มีจำนวน 5 x 10^3 CFU/g และมีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันที่ 6 ซึ่งมีจำนวน 1.41 x 10^7 CFU/g จากนั้นจะมีจำนวนลดลงในวันที่ 9 พบจำนวน 1.8 x 10^6 CFU/g และจะไม่พบแบคทีเรียกรดแลคติกในวันสุดท้ายของการหมัก ผลที่ได้แตกต่างจากผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ที่จะไม่พบแบคทีเรียกรดแลคติกตั้งแต่วันที่ 9 ของการหมัก ซึ่งเป็นเพราะในการทดลองทำการ inoculate เชื้อในวันที่ 3 ของการหมักจึงทำให้การเปลี่ยนแปลงประชากรต่างจากในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1

จากนั้นทำการติดตามผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB เปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 จากการวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐานพบการเปลี่ยนแปลงสารประกอบให้กลิ่นทั้งในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์และเอสเทอร์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.21 และ 4.22

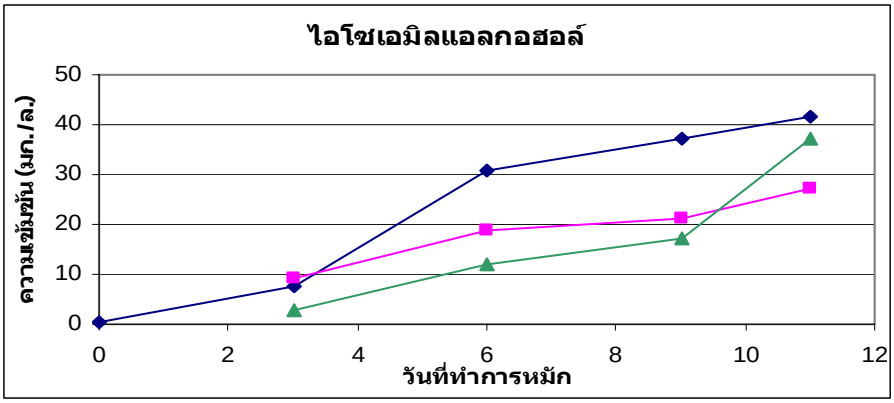
ก)



ข)



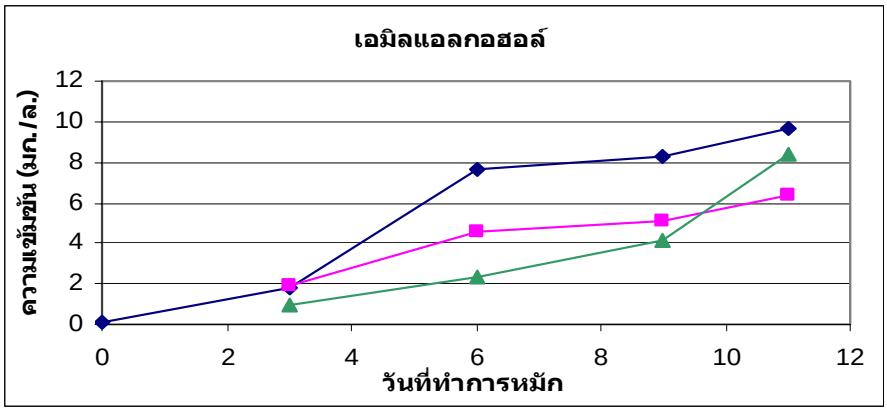
ค)



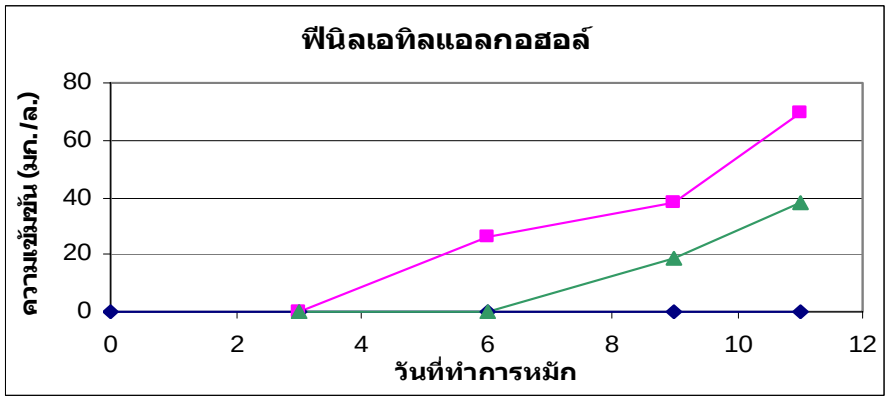
ภาพที่ 4.21 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB เปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 วิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐาน (ก) 1-โพรพานอล ข)ไอโซบิวทา-นอล ค) ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ง) เอมิลแอลกอฮอล์ และ จ) ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์)

(—◆—สาโท NP1 —■—M1M2+Y1+Y2+Y3 และ—▲—M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB)

ง)



จ)



ภาพที่ 4.21 (ต่อ) แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB เปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 วิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐาน (ก) 1-โพรพานอล ข)ไอโซบิวทา-นอล ค) ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ง) เอมิลแอลกอฮอล์ และ จ) ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์)

(—◆—สาโท NP1 —■—M1M2+Y1+Y2+Y3 และ—▲—M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB)

สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB ที่พบได้แก่ 1-โพรพานอล, ไอโซบิวทานอล, ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และเอมิลแอลกอฮอล์ เช่นเดียวกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ยกเว้น ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ที่พบเฉพาะในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB เท่านั้น

ปริมาณ 1-โพรพานอล ของสาโทที่ผลิตจากชุดการทดลองM1M2+Y1+Y2+Y3+LAB มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมัก มีปริมาณ 3.42 – 16.48 มก./ล. แต่มีปริมาณน้อยกว่าทั้งในชุดการ

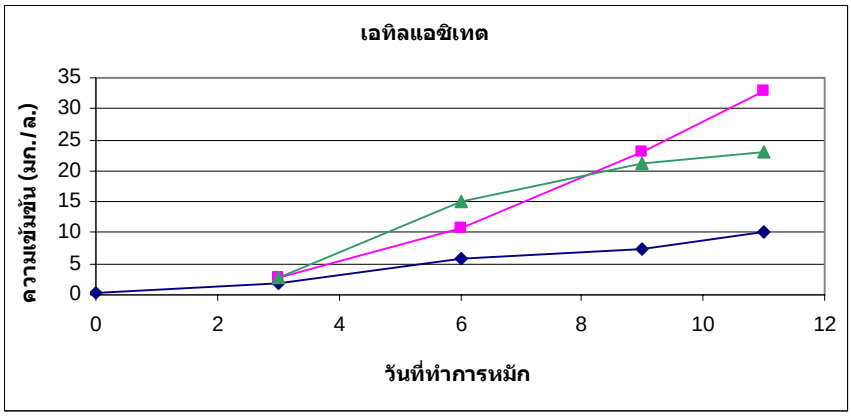
ทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ที่มีปริมาณ 8.53 – 21.03 และ 1.65 – 27.34 มก./ล. ตามลำดับ

ส่วนปริมาณของไอโซบิวทานอล, ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และเอมิลแอลกอฮอล์นั้น จะเห็นได้ว่าในช่วงวันที่ 0 ถึง วันที่ 9 ของการหมัก ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB พบปริมาณที่ต่ำกว่าในสาโทที่ผลิตจากชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 แต่หลังจากวันที่ 9 ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเริ่มมีจำนวนลดลง ปริมาณของ ไอโซบิวทานอล มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 54.78 มก./ล. ซึ่งมากกว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ที่มีปริมาณ 50.41มก./มล. และปริมาณของไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และเอมิลแอลกอฮอล์ นั้นก็มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 37.13 และ 8.44 มก./ล. ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ซึ่งมีปริมาณ 27.37 และ 6.32 มก./ล. ตามลำดับ

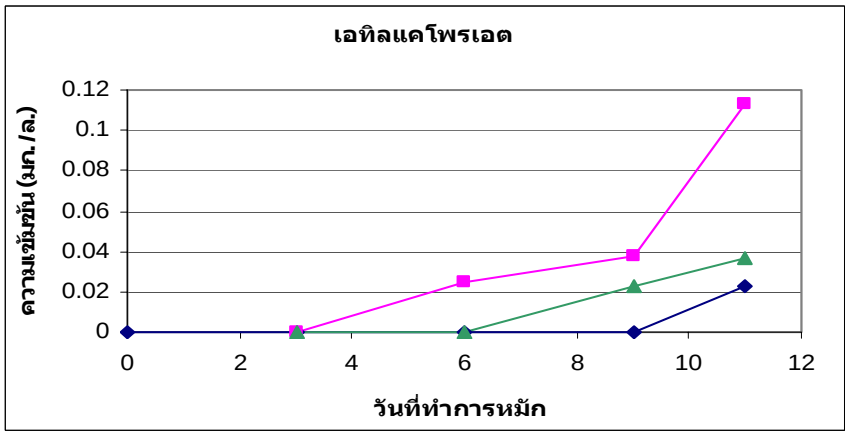
ส่วนปริมาณฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ซึ่งพบเฉพาะในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมทั้งสองชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB นั้น พบว่าในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB มีปริมาณ 38.27 มก./ล. ซึ่งน้อยกว่าในสาโทที่ผลิตจากชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ที่มีปริมาณ 69.54 มก./ล. จะเห็นได้ว่าการเกิดฟีนิลแอลกอฮอล์ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB นั้นพบได้ในวันที่ 9 ของการหมัก แต่ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ซึ่งไม่มีแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถพบปริมาณฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ได้ตั้งแต่วันที่ 6 ของการหมัก

สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์ของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB ที่พบได้แก่ เอทิลแอซิเทต เอทิลแคโพรเอต ไอโซเอมิลแอซิเทต เอทิลแคพริเรต และ เอทิลแคเพรต ส่วนเอทิลโพรพาโนเอตนั้นพบเฉพาะในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 เท่านั้น ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.22

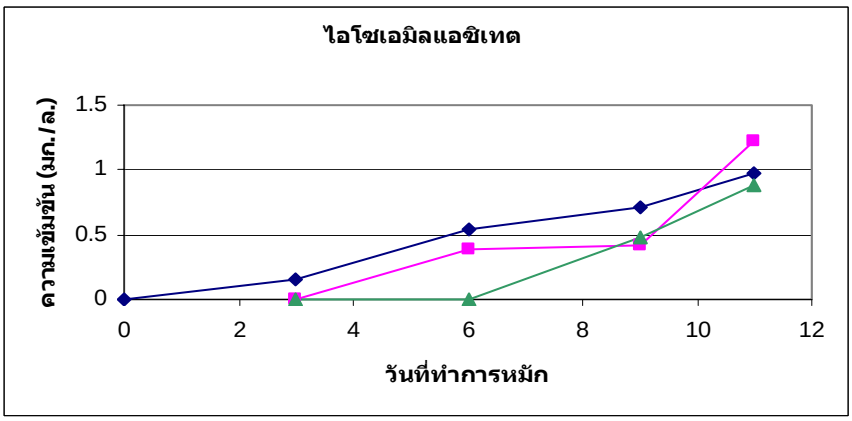
ก)



ข)

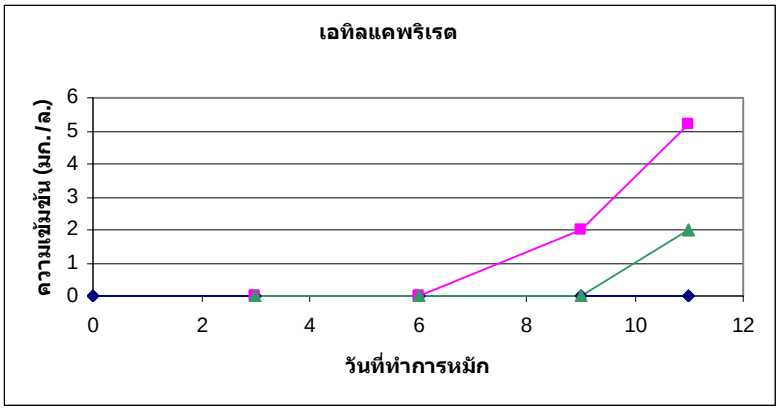


ค)

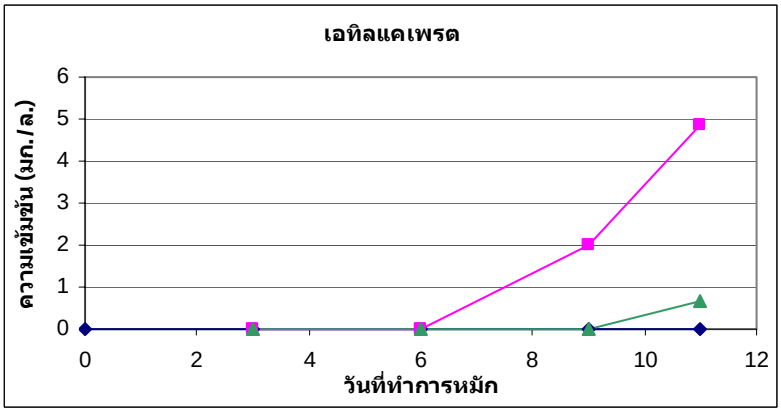


ภาพที่ 4.22 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอสเทอร์ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB เปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 วิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐาน (ก) เอทิลแอซิเทต ข)เอทิลแคโพร-เอต ค) ไอโซเอมิลแอซิเทต ง) เอทิลแคพริเรต จ) เอทิลแคเพรต และ ฉ) เอทิลโพรพาโนเอต) (—◆— สาโท NP1 —■— M1M2+Y1+Y2+Y3 และ —▲— M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB)

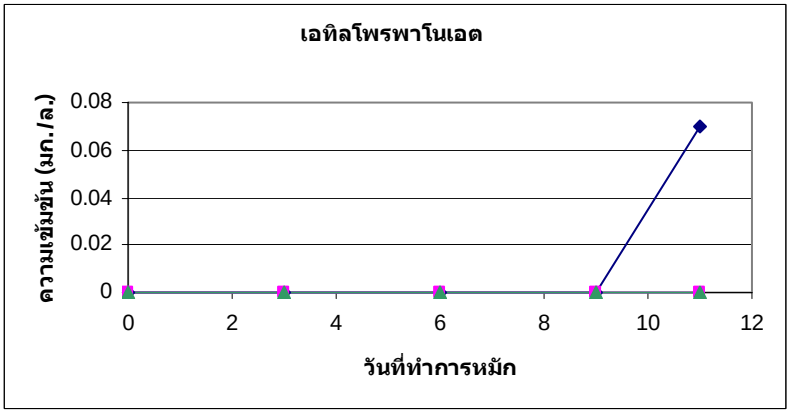
ง)



จ)



ฉ)



ภาพที่ 4.22 (ต่อ) แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอสเทอร์ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB เปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 วิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐาน (ก) เอทิลแอซิเทต ข) เอทิลแคโพร-เอต ค) ไอโซเอมิลแอซิเทต ง) เอทิลแคพริเรต จ) เอทิลแคเพรต และฉ) เอทิลโพรพาโนเอต) (—◆— สาโท NP1 —■— M1M2+Y1+Y2+Y3 และ —▲— M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB)

ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB นั้นในช่วงเริ่มต้นของการหมักแสดงอัตราการเพิ่มปริมาณของเอทิลแอซิเทตสูง โดยในวันที่ 6 มีปริมาณ 15.16 มก./ล. ซึ่งมากกว่าในสาโทที่ผลิตจากชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 จากนั้นมีอัตราการเพิ่มลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจนในวันสุดท้ายของการหมัก มีปริมาณเอทิล-แอซิเทต 23.09 มก./ล. ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 แต่ไม่มากกว่าในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ที่มีปริมาณ 10.11 และ 32.83 มก./ล. ตามลำดับ

ส่วนปริมาณของเอทิลแคโพรเอตนั้น ในปริมาณ 0.02 – 0.04 มก./ล. และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 (ภาพ 4.22 ข) พบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณของ เอทิลแคโพรเอต ของชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ได้ตั้งแต่วันที่ 6 ของการหมักซึ่งมีปริมาณ 0.03 มก./ล. และมีปริมาณเพิ่มขึ้นถึง 0.11 มก./ล. ในวันสุดท้ายของการหมัก ส่วนในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB นั้นสามารถวิเคราะห์ปริมาณเอทิลคาโพรเอตได้ในวันที่ 9 ซึ่งเป็นวันที่แบคทีเรียกรดแลคติกเริ่มมีจำนวนลดลงซึ่งมีปริมาณ 0.02 มก./ล. และในวันสุดท้ายของการหมักมีปริมาณ 0.04 มก./ล. ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลองM1M2+Y1+Y2+Y3

ปริมาณไอโซเอมิลแอซิเทตของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB นั้นพบอัตราการสร้างไอโซเอมิลแอซิเทตช้ากว่าในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 โดยพบปริมาณของไอโซ-เอมิลแอซิเทตในวันที่ 9 ของการหมักมีปริมาณ 0.49 มก./ล. และในวันสุดท้ายของการหมัก มีปริมาณ 0.88 มก./ล. ในขณะที่ในสาโทที่ผลิตจากชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 สามารถตรวจพบปริมาณไอโซเอมิลแอซิเทตได้ตั้งแต่วันที่ 3 และวันที่ 6 ในวันสุดท้ายของการหมักมีปริมาณ1.23 และ 0.98 มก./ล. ตามลำดับ

เอทิลแคพริเรต และเอทิลแคเพรต นั้นสามารถวิเคราะห์ได้ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB เท่านั้นจะไม่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ซึ่งในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ เอทิลแคพริเรต และเอทิลแคเพรต ได้เฉพาะในวันสุดท้ายของการหมักเท่านั้นซึ่งมีปริมาณ 1.99 และ 0.68 มก./ล. ตามลำดับ แต่ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 สามารถพบปริมาณของเอทิลแคพริเรตและเอทิลแค-เพรต ได้ตั้งแต่วันที่ 9 ของการหมักและมีปริมาณในวันสุดท้ายของการหมักมากว่าในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB คือมีปริมาณ 5.22 และ 4.86 มก./ล. ตามลำดับ

ส่วนปริมาณของเอทิลโพรพาโนเอตนั้นสามารถพบได้เฉพาะในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ในวันสุดท้ายของการหมักที่ปริมาณ 0.07 มก./ล. เท่านั้น ไม่พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมทั้ง 2 ชุดการทดลอง

จากผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์และการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบให้กลิ่นในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB นั้น เห็นได้ว่าไม่มีส่วนช่วยเพิ่มปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในสาโท

Querol และ Fleet (2006) รายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตไวน์องุ่นว่า ยีสต์ที่ใช้ผลิตไวน์องุ่นอาจสามารถยับยั้งหรือกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกได้ แต่โดยปกติแบคทีเรียกรดแลคติกจะเกิดขึ้นจำนวนน้อยและตายไปในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ สิ่งที่สนับสนุนการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นคือ ออโตลิซิส (autolysis) ของยีสต์ กรดอะมิโน วิต-ตามินและปริมาณร้อยละของเอทานอลที่ต่ำ (Querol และ Fleet, 2006)

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณของ ร้อยละเอทานอล สารประกอบให้กลิ่น กรดอินทรีย์ และกลีเซอรอล ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB และสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 11) เปรียบเทียบกับปริมาณที่พบในไวน์องุ่นและสาเกทั่วไป

	ปริมาณที่พบในไวน์องุ่นทั่วไป (มก./ล.)*	ปริมาณที่พบในสาเก (มก./ล.)**					
			ข้าวเหนียวนึ่ง	NP1	M1M2	M1M2+Y1+Y2+Y3	M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB
ร้อยละเอทานอล	3.0 - 11.0	15	-	11.83	1.95	7.62	9.29
ฟูเซลแอลกอฮอล์ (มก./ล.)							
1-โพรพานอล	10 - 125	120	-	27.34	1.25	21.03	16.48
ไอโซบิวทานอล	2 - 150	64	-	50.41	1.51	31.1	54.78
ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	20 - 350	170	-	41.64	1.80	27.37	37.13
เอมิลแอลกอฮอล์	1 - 300	-	-	9.63	0.38	6.32	8.44
ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์	15 - 200	75	-	-	-	69.54	38.27
ฟูเซลแอลกอฮอล์ทั้งหมด	-	-	-	129.02	4.94	155.36	150.02
เอสเทอร์ (มก./ล.)							
เอทิลแอซิเทต	9 - 257	20 - 120	0.1	10.11	0.19	32.83	23.09
เอทิลแคโพรเอต	0 - 3.4	2.0 - 10.0	-	0.02	-	0.11	0.04
ไอโซเอมิลแอซิเทต	0.1 - 8	2.0 - 10.0	-	0.98	-	1.23	0.88
เอทิลแคพริเรต	0.2 - 3.8	5.0 - 10.0	-	-	-	5.22	1.99
เอทิลแคเพรต	0 - 0.3	10	-	-	-	4.86	0.68
เอทิลโพรพาโนเอต	0 - 20	-	-	0.07	-	-	-

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) แสดงปริมาณของ ร้อยละเอทานอล สารประกอบให้กลิ่น กรดอินทรีย์ และกลีเซอรอล ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB และสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 11) เปรียบเทียบกับปริมาณที่พบในไวน์องุ่นและสาเกทั่วไป

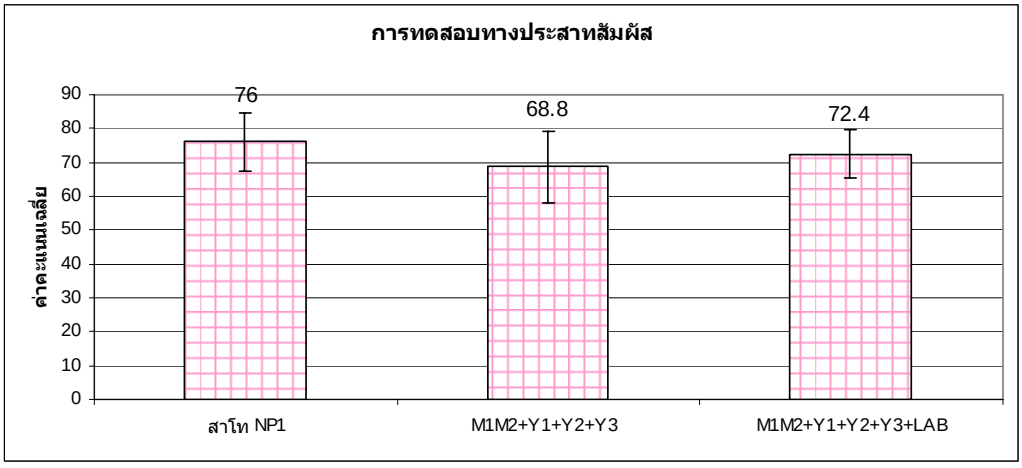
	ปริมาณที่พบในไวน์องุ่นทั่วไป (มก./ล.)*	ปริมาณที่พบในสาเก (มก./ล.)**					
			ข้าวเหนียวนึ่ง	NP1	M1M2	M1M2+Y1+Y2+Y3	M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB
กรดอินทรีย์ (มก./มล.)							
กรดซัคซินิก	0.05 - 2	-	-	0.56	0.06	0.17	0.9
กรดแลคติก	0.01 - 5	-	-	2.13	2.21	0.93	1.69
กรดแอซิติก	0.02 - 2	-	-	NT	NT	0.65	NT
กลีเซอรอล	2.0 - 10	-	-	4.44	1.77	3.88	4.58
กรดไพรูวิก (เท่าของสาโทชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB)	-	-	-	4.03	691.53	140.70	1

* ที่มา: Maares, 1991 ** ที่มา : ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2546

จากตารางที่ 4.4 สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB มีปริมาณกรดไพรูวิกคงเหลือต่ำสุดพบปริมาณร้อยละเอทานอลน้อยกว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 แต่พบว่ามีปริมาณสารประกอบให้กลิ่น ไอโซบิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และเอมิลแอลกอฮอล์ในปริมาณสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 แต่ไม่พบบทบาทการสร้างสารให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์ และพบว่าในชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB มีปริมาณกรดซัคซินิก กรดแลคติก และกลีเซอรอลสูงกว่าในชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ซึ่งสารเหล่านี้มีความสำคัญด้านรสชาติและบอดี้ ดังนั้นจากการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทในการสร้างสารที่มีความสำคัญด้านรสชาติของสาโท

ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส

จากการนำสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB ไปทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการชิม จากผู้ทดสอบที่มีความคุ้นเคยและเชี่ยวชาญทางด้านการชิมไวน์องุ่นและสาโทในระดับชาติจำนวน 10 ท่าน ให้คะแนนในใบให้คะแนนและวิธีการให้คะแนน (ภาคผนวก ค) เปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และ สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 นำคะแนนที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Sripunya และคณะ, 2005)



ภาพที่ 4.23 แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB M1M2+Y1+Y2+Y3 และสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1

ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 4.23 พบว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB และ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีคะแนนเฉลี่ย 72.4 และ 76 คะแนน เป็นที่ยอมรับและจัดเป็นสาโทที่มีคุณภาพดี ซึ่งมีคะแนนสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการ

ทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ที่มีค่าเฉลี่ย 68.8 คะแนน ซึ่งจัดเป็นสาโทที่ได้รับการยอมรับและจัดอยู่ในระดับ พอใช้ แต่เมื่อวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติแล้วพบว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) กับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP 1 และ สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3

ดังนั้นการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีบทบาทด้านกลิ่นรสนอกเหนือจากบทบาทการเปลี่ยนข้าวเป็นน้ำตาลโดยรา และเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์ จึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการพัฒนากล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่ดี

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ผลของการใช้ลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้นำมาผลิตสาโทเปรียบเทียบกับสาโททางการค้า

การผลิตสาโทไม่เป็นที่ยอมรับเนื่องจากขาดคุณภาพที่ได้มาตราฐานระหว่างชุดการผลิต ทั้งยังขาดการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารให้กลิ่นรสในสาโท ตลอดจนบทบาทของจุลินทรีย์ในลูกแป้งและสาโทที่มีต่อสารให้กลิ่นรสที่ดีในสาโท ในการศึกษานี้ต้องการศึกษาถึงบทบาทของ จุลินทรีย์โดยเฉพาะยีสต์และราที่มีผลต่อสารให้กลิ่นที่ดีในสาโท

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้โดย อภิชญา เตชะวสัญญู (2550) ทำการคัดเลือกลูกแป้งสุราจากทั่วประเทศได้ 7 แหล่งซึ่งเป็นลูกแป้งสุราที่ผลิตสาโทแล้วให้สาโทที่มีกลิ่นและรสที่ดี จากจำนวนลูกแป้งทั้งหมด 114 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมมาจาก 42 จังหวัดทั่วประเทศไทย (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) ในงานวิจัยนี้จึงนำลูกแป้งสุราที่เมื่อนำมาผลิตสาโทได้สาโทที่มีคุณภาพด้านกลิ่นรสดีที่สุด จำนวน 3 แหล่งได้แก่ ลูกแป้งสุราจากจังหวัดนตรพนม (NP1) ลูกแป้งสุราจากจังหวัดน่าน (NN6) และลูกแป้งสุราจากจังหวัดหนองคาย (NK2) มาผลิตสาโทและวัดค่าองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-เบส ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณร้อยละเอทานอล ปริมาณกรดอินทรีย์ ปริมาณกลีเซอรอล และปริมาณสารประกอบให้กลิ่น พบว่า ทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า เมื่อสาโทมีค่า pH ต่ำจะมีปริมาณกรดรวมสูง โดยค่า pH ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรามีค่าประมาณ 3.48 – 3.67 และค่าปริมาณกรดรวม มีค่าอยู่ระหว่าง 0.36 – 0.558 ส่วนค่า pH ของสาโททางการค้ามีค่าประมาณ 3.5 – 3.59 และค่าปริมาณกรดรวมมีค่าอยู่ระหว่าง 0.36 – 0.45 ซึ่งค่า pH และค่าปริมาณกรดรวมจากสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้ามีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณร้อยละของเอทานอลนั้นพบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยที่สุดคือ 0.44 มก./มล. และพบว่ามีปริมาณเอทานอลสูงที่สุด คือ ร้อยละ 11.83 ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าสาโททางการค้า ส่วนปริมาณกรดอินทรีย์นั้น พบว่า ปริมาณกรดซัคซินิกและกรดแลคติกที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรานั้นมีค่า 0.54 – 0.68 และ 1.77 – 2.28 มก./มล. ตามลำดับซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าในสาโททางการค้าที่จะมีปริมาณ 0.83 - 4.17 และ 5.62 – 7.55 มก./มล. ตามลำดับ ปริมาณของกรดแอซิติกนั้นพบเฉพาะสาโททางการค้า 2 เท่านั้นซึ่งมีปริมาณ 1.49 มก./มล. ส่วนปริมาณของกลีเซอรอลซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับบอดี้ของไวน์องุ่นนั้นพบว่า ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณกลีเซอรอลสูงที่สุด มีปริมาณ 4.44 มก./มล. แต่มีปริมาณน้อยกว่าสาโททางการค้า 1 และ 2 ที่มีปริมาณกลีเซอรอล 6.17 และ 4.58 มก./มล. ตามลำดับ

จากนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้ 3 แหล่ง เปรียบเทียบกับสาโททางการค้า 2 แหล่งพบว่า สามารถพบสารประกอบให้กลิ่นทั้งในกลุ่มฟูเซล-แอลกอฮอล์และเอสเทอร์ โดยฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบทั้งในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า ได้แก่ 1-โพรพานอล, ไอโซบิวทานอล, ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณเอทิลบิวทานอลและเอมิลแอลกอฮอล์ สูงที่สุด ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นไวน์ ส่วน 1- บิวทานอลนั้น พบเฉพาะในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 และ NK2 เท่านั้น Rodriguez และคณะ (2003) รายงานว่าฟูเซลแอลกอฮอล์ไม่ควรมีเกินกว่า 400 - 500 มก./ล. ในไวน์องุ่น (Rodriguez และคณะ, 2003) ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์รวมของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้และสาโททางการค้ามีปริมาณอยู่ในช่วง 89 – 162.69 มก./ล. ซึ่งไม่เกินกว่าปริมาณที่กำหนด ฟูเซล-แอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจึงไม่น่าที่จะให้กลิ่นที่ไม่ดีแก่สาโท

ส่วนสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์ที่พบได้แก่ เอทิลแอซิเทต, เอทิลแคโพรเอต, ไอโซเอ-มิลแอซิเทต, เอทิลแคพริเรต, เอทิลแคเพรต และเอทิลโพรพาโนเอต ซึ่งเป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้ เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะในกลุ่มสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้ 3 แหล่ง พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณเอทิลแอซิเทตและไอโซเอมิลแอซิเทต สูงที่สุด ซึ่งมีปริมาณ 10.11 และ 0.98 มก./ล. นอกจากนี้ยังพบสารประกอบให้กลิ่นที่ไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ ได้แก่ 2-โพรพานอล เอทิลบิวทิ-เรต เอน เอน ไดเมทิลโพรพานาไมด์ และ 1,1 ไดเอทอกซิอีเทน ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นผลไม้เฉพาะในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และ NK2 แต่ไม่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6

จากการนำสาโทที่ผลิตได้จากลูกแป้งสุราทั้ง 3 แหล่งและสาโททางการค้า 2 แหล่งไปทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการชิมจากผู้ทดสอบที่มีความคุ้นเคยและเชี่ยวชาญกับผลิตภัณฑ์ในระดับชาติ จำนวน 10 คน นำคะแนนที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) กับสาโททางการค้าทั้ง 2 แหล่ง โดยสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีคะแนนค่าเฉลี่ย 76 คะแนน เป็นที่ยอมรับและจัดเป็นสาโทที่มีคุณภาพดี เมื่อเปรียบเทียบกับสาโททางการค้า ส่วนสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 และ NK2 นั้นมีค่าเฉลี่ยคะแนนเป็น 67.4 และ 66.9 คะแนน ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสาโททางการค้า 1 พบว่าสาโท NN6 และ NK2 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p< 0.05$) กับสาโททางการค้า 1 และสาโททั้ง 2 จัดเป็นสาโทอยู่ในระดับพอใช้เท่านั้น

จากการทดลองพบว่าทั้งในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา สามารถพบปริมาณของเอสเทอร์ที่สำคัญเช่นเดียวกับที่พบในสาเก ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไวน์ข้าวของประเทศญี่ปุ่น แต่เนื่องจากกระบวนการผลิต อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตและสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ มีความแตกต่างกันจึงทำให้ปริมาณที่ได้แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่จำเป็นต่อการหมักจากลูกแป้งสุรา และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในรูปของเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อเตรียมเป็นกล้าเชื้อใช้ในการผลิตไวน์ข้าวแทนการใช้ลูกแป้งสุรา เพื่อให้ได้สาโทที่มีคุณภาพดีและสม่ำเสมอในการผลิต (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547) เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ปริมาณสารให้กลิ่นและการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราทั้ง 3 แหล่ง พบว่า สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือน้อยที่สุดและมีปริมาณร้อยละเอทานอลสูงที่สุด นอกจากนี้ยังมีปริมาณกลีเซอรอลสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 และ NK2 อีกด้วย ส่วนปริมาณสารให้กลิ่นในกลุ่มของฟูเซลแอลกอฮอล์พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณไอโซบิวทานอลและเอมิลแอลกอฮอล์สูงที่สุด ส่วนในกลุ่มเอสเทอร์พบว่ามีปริมาณเอทิลแอซิเทตและไอโซเอมิลแอซิเทตซึ่งเป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้แก่เครื่องดื่มแอลกอฮอล์สูงที่สุด และเมื่อรวมไปถึงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสก็สนับสนุนว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ได้รับการยอมรับสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NK2 และ NN6 สาโททางการค้า 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p< 0.05$) ดังนั้นลูกแป้งสุรา NP1 จึงมีความน่าสนใจที่จะนำไปศึกษาถึงบทบาทของจุลินทรีย์ที่มีต่อกลิ่นรสในกระบวนการผลิตสาโทต่อไป

5.2 ผลการผลิตสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุราและเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากแหล่งลูกแป้งสุรา

นำราและยีสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 โดย อภิชญา เตชะวสัญญู (2550) ในรูปแบบเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันชนิดของยีสต์ในชุดการทดลองต่างๆ มาผลิตสาโท ทำการวิเคราะห์ผลองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ปริมาณกรดอินทรีย์และ กลีเซอรอล ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น และการทดสอบทางประสาทสัมผัส เปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 พบว่า ค่าความเป็นกรด-เบสของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม มีค่าอยู่ระหว่าง 3.12 – 3.75 ซึ่งยังอยู่ในช่วง 3.40 – 4.70 ซึ่งเป็นค่าปกติที่พบในไวน์องุ่นทั่วไป ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณร้อยละของเอทานอลนั้นพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงและมีปริมาณร้อยละเอทานอลเพิ่มขึ้น ทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น โดยพบว่าในวันสุดท้ายของการหมัก สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมทุกชุดการทดลองจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือสูงกว่า และมีปริมาณร้อยละของเอทานอลต่ำกว่า สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 โดยพบว่าในชุดการทดลอง M1M2+Y1 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือน้อยที่สุด คือ 2.27 มก./มล.และมีปริมาณร้อยละเอทานอลสูงที่สุดคือ 11.78

ปริมาณกรดอินทรีย์และกลีเซอรอลของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมเปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราพบว่า ปริมาณกรดซัคซินิกและกรดแลคติกในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1 มีปริมาณสูงสุดในกลุ่มชุดการทดลองด้วยกัน คือมีปริมาณ 0.26 และ 1.61 มก./มล. ตามลำดับ ส่วนปริมาณกรดแอซิติกนั้นพบเฉพาะในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 M1M2+Y1+Y2 และ M1M2+Y1+Y3 เท่านั้น ซึ่งมีปริมาณ 0.65 0.64 และ 0.58 มก./มล. ตามลำดับ ส่วนปริมาณกลีเซอรอลนั้นพบว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1 มีปริมาณสูงที่สุดในกลุ่มสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม คือมีปริมาณ 4.12 มก./มล. แต่ยังคงมีปริมาณน้อยกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ที่มีปริมาณกลีเซอรอล 4.44 มก./มล.

จากนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและเชื้อบริสุทธิ์ผสมพบว่าสามารถวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นได้ทั้งฟูเซลแอลกอฮอล์และเอสเทอร์ โดยฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบได้แก่1-โพรพานอล ไอโซบิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เอมิลแอลกอฮอล์ และฟีนิล-เอทิลแอลกอฮอล์ โดยสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรามีปริมาณของ 1-โพรพานอล ไอโซบิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และ เอมิลแอลกอฮอล์ สูงกว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกชุดการทดลอง แต่เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะในกลุ่มของเชื้อบริสุทธิ์ผสมนั้นพบว่า สาโทที่ผลิตจากชุดการทดลอง M1M2+Y1 มีปริมาณไอโซบิวทานอลและเอมิลแอลกอฮอล์ สูงที่สุด คือ 45.68 และ 6.89 มก./ล. ตามลำดับ ส่วนปริมาณของ 1-โพรพานอลและ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ นั้นพบว่าสาโทที่ผลิตจากชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 มีปริมาณสูงที่สุดคือมีปริมาณ 21.03 และ 27.37 มก./ล. ตามลำดับ นอกจากนี้สาโท

ที่ผลิตจากชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 เป็นชุดการทดลองเดียวที่สามารถพบ ฟีนิล-เอทิลแอลกอฮอล์ ในปริมาณ 69.54 มก./ล. เท่านั้นและไม่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นกุหลาบ (rose odor) ส่วนสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์พบว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมบางชุดการทดลองมีปริมาณสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา โดยปริมาณเอทิลแอซิเทต เอทิลแคโพรเอต และไอโซเอมิลแอซิเทต ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 มีปริมาณ 32.83 0.11 และ 1.23 มก./ล. ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ซึ่งมีปริมาณ 10.11 0.02 และ 0.98 มก./ล. ตามลำดับ ส่วนปริมาณเอทิลแคพริเรตและเอทิลแคเพรตนั้นพบเฉพาะในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม โดยในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 มีปริมาณเอทิลแคพริเรตและเอทิลแคเพรตสูงที่สุด ส่วนเอทิลโพรพาโนเอตนั้นพบเฉพาะในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ซึ่งมีปริมาณ 0.07 มก./ล. เท่านั้น ไม่สามารถพบได้ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม

จากการวิเคราะห์ปริมาณของสารให้กลิ่นในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NP1 พบว่าปริมาณสารให้กลิ่นที่ได้มีความแตกต่างกัน จึงสนใจที่จะศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาถึงบทบาทของจุลินทรีย์ในการผลิตสารให้กลิ่นในสาโท ดังนั้นจึงทำการศึกษาโดยวิธี viable plate count ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน และทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณของฟูเซลแอลกอฮอล์และเอสเทอร์ ของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมเปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 พบว่า ปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ทุกชนิดทั้งในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น โดยในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรามีปริมาณสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกชุดการทดลอง ซึ่งเมื่อพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์พบว่ายีสต์ที่มีบทบาทหลักในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรานั้นคือ *S. cerevisiae* ซึ่งจะเห็นได้ว่าหลังจากวันที่ 3 ของการหมักซึ่งเป็นวันที่ทำการผ่าน้ำและ *S. cerevisiae* เริ่มกิจกรรมการหมักแอลกอฮอล์ ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์และเอมิลแอลกอฮอล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จาก 7.71 เป็น 30.65 มก./ล. และ จาก 1.82 เป็น 7.68 มก./ล. ตามลำดับ และจะเห็นได้ว่าในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในชุดการทดลอง M1M2+Y1 ซึ่งมีเฉพาะยีสต์ *S. cerevisiae* มีปริมาณไอโซบิวทิวแอลกอฮอล์ใกล้เคียงกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา โดยมีปริมาณ 45.68 และ 50.41 มก./ล. ตามลำดับ ส่วนปริมาณของเอสเทอร์นั้นพบว่า เอสเทอร์ทุกชนิดทั้งในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น แต่ในกลุ่มของเชื้อบริสุทธิ์ผสมในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3 มีปริมาณเอทิลอะซิเทตสูงกว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ซึ่งเมื่อพิจารณาจากการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์แล้วพบว่าในกลุ่มของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมมีการเจริญของยีสต์ในกลุ่ม Non-*Saccharomyces* จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก Rojas และคณะ (2003) รายงานถึงการใช้ยีสต์ในกลุ่ม Non-

Saccharomyces ซึ่งคือ *H. guilliermondii* และ *P. anomala* ผลิตไวน์องุ่นพบว่ามีปริมาณเอทิลอะซิเทตสูงกว่า *S.cerevisiae* มาก

ในกลุ่มควบคุม M1M2 ซึ่งมีกล้าเชื้อเพียงรา 2 ชนิดคือ *M. racemosus* NP102 (M1) และ *R. oligosporus* NP101 (M2) มีปริมาณกรดไพรูวิกสูงถึง 171.41 เท่าของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ซึ่งมีปริมาณกรดไพรูวิกคงเหลือน้อยสุด สอดคล้องกับปริมาณร้อยละเอทานอลในชุดควบคุมซึ่ง มีปริมาณต่ำและมีการสร้างสารให้กลิ่นเฉพาะฟูเซลแอลกอฮอล์ในปริมาณน้อยกว่าปริมาณทั่วไปที่พบในไวน์องุ่นและสาเก แต่ไม่พบการสร้างสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์อื่นยกเว้น เอทิลแอซิเทต ซึ่งมีปริมาณ 0.19 มก./ล. แต่เมื่อพิจารณาจากสารให้กลิ่นในข้าวเหนียวนึ่งซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโทพบปริมาณเอทิลแอซิเทตในปริมาณ 0.1 มก./ล. ดังนั้นแสดงว่า เอทิลแอซิเทตที่พบในชุดควบคุมอาจมาจากวัตถุดิบส่วนหนึ่งและราสร้างได้แต่ในปริมาณน้อยอีกส่วนหนึ่ง นอกจากนี้ยังพบว่าในชุดควบคุมมีการสร้างสารให้กลิ่น 2,3 บิวเทนไดออล หรือ 2,3 บิวทิลีน ไกลคอล แต่ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญในไวน์ เป็นสารที่ให้กลิ่นเล็กน้อย และให้รสชาติหวานขม มีบทบาทต่อคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสด้านการชิมเล็กน้อยในไวน์ (Jackson, 2000) เป็นสารประกอบให้กลิ่นที่เป็นผลพลอยได้จากเมแทบอไลต์ของกรดไพรูวิก ดังนั้นในการผลิตสาโทนั้นนอกจากราจะมีบทบาทในการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลและสร้างกรดอินทรีย์และสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของยีสต์ (ยุพกนิษฐ์ พ่วงวีระกุล, 2545) แล้วรายังสามารถสร้างสารประกอบให้กลิ่นในปริมาณเล็กน้อยได้เช่นกัน

จากนั้นเมื่อผลิตสาโทจากเชื้อบริสุทธ์โดยเติมยีสต์ *S. cerevisiae* NP1930 (Y1) ลงไปดังในชุดการทดลอง M1M2+Y1 จะเห็นได้ว่า พบปริมาณกรดไพรูวิกเพียง 1.27 เท่าของสาโท NP1 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณร้อยละเอทานอลที่เพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับในชุดทดลองอื่นๆ และพบปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์และเอสเทอร์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดและมีปริมาณอยู่ในระดับที่พบได้ทั่วไปในไวน์องุ่น และมีปริมาณใกล้เคียงกับในสาเกซึ่งเป็นไวน์ข้าวเช่นเดียวกัน และจากการทดลองจะเห็นได้ว่า *S. cerevisiae* NP1930 (Y1) มีบทบาทสำคัญในการสร้างสาร ไอโซบิวทานอล และ เอมิลแอลกอฮอล์ ในปริมาณ 45.68 และ 6.89 มก./ล. ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดทดลองอื่นๆ

ส่วนในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2 ที่มียีสต์ *P. anomala* NP101 (Y2) พบว่ามีปริมาณกรดไพรูวิกคงเหลือ 55.77 เท่าของสาโทNP1 ซึ่งจะเห็นได้ว่าในชุดการทดลองนี้มีปริมาณร้อยละเอทานอลและปริมาณสารประกอบให้กลิ่นส่วนใหญ่น้อยกว่าในชุดทดลองอื่นๆ ยกเว้นปริมาณไอโซเอมิลแอซิเทต ที่มีปริมาณ 0.81 มก./ล. ซึ่งมากกว่าในชุดทดลอง M1M2+Y1 และM1M2+Y1+Y3 ดังนั้นจากการทดลองนี้จะ

เห็นได้ว่า *P. anomala* NP101 (Y2) ซึ่งเป็นยีสต์ในกลุ่ม Non-*Saccharomyces* มีบทบาทในการสร้างไอโซเอมิลแอซิเทต ในการผลิตสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสม

ส่วนในชุดทดลอง M1M2+Y1+Y3 ที่มียีสต์ *Sch. fibuligera* NP1030 (Y3) มีปริมาณกรดไพรูวิกคงเหลือสูงสุดคือ 70.14 เท่าของสาโท NP1 และมีปริมาณร้อยละเอทานอลต่ำที่สุดและพบว่ามีปริมาณสารประกอบให้กลิ่นอื่นๆ ต่ำยกเว้นปริมาณเอทิลแอซิเทตซึ่งมีปริมาณสูงกว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและในชุดทดลองอื่นๆ ดังนั้นนอกจากจากงานวิจัยก่อนหน้านี้จะมีรายงานว่ายีสต์ *Sch. fibuligera* NP1030 มีความสามารถในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลแล้ว (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) จากการทดลองนี้สามารถพบบทบาทในการสร้าง เอทิลแอซิเทต ในการผลิตสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสม

ในชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ซึ่งมียีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีปริมาณกรดไพรูวิกคงเลือก 34.88 เท่าของสาโท NP1 แต่มีปริมาณร้อยละเอทานอลไม่สูงมาก แต่พบปริมาณสารประกอบให้กลิ่นหลายชนิดในปริมาณสูง ดังนั้นจากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่านอกจากยีสต์จะมีบทบาทในการสร้างเอทานอลแล้วยีสต์ยังมีบทบาทในการสร้างสารให้กลิ่นต่างๆ ที่สำคัญในสาโทเช่นกัน

จากนั้นนำสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมไปทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบที่มีความคุ้นเคยกับสาโทเปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีค่าเฉลี่ยคะแนน 76 คะแนน เป็นที่ยอมรับและจัดเป็นสาโทที่มีคุณภาพดี ส่วนสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมนั้นมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 68.8 – 71.8 คะแนน ซึ่งจัดเป็นสาโทที่ได้รับการยอมรับและจัดอยู่ในระดับพอใช้ ถึง ดี และเมื่อพิจารณาตามวิธีทางสถิติแล้วพบว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP 1 แต่จากคะแนนเฉลี่ยถึงแม้ว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมและสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 จะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) แต่ก็มีคะแนนเฉลี่ยทั้งทางด้าน สี กลิ่น รส และการยอมรับน้อยกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา (ภาคผนวก ง) ทั้งนี้อาจเนื่องจากในลูกแป้งสุรามีจุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อการผลิตสาโทมากกว่าจุลินทรีย์ที่สามารถแยกได้

ในประเทศไทยมีการวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติก ส่วนใหญ่ศึกษาในผลิตภัณฑ์อื่น เช่น แหนม ผักดอง และผลิตภัณฑ์นม แต่ยังไม่มีรายงานถึงบทบาทของแบคทีเรียกรดแลกติกในการผลิตสาโท ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษา บทบาทของแบคทีเรียกรดแลกติกในการสร้างสารให้กลิ่นในสาโท ดังนั้นจึงสนใจศึกษาบทบาทของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยนำมาผลิตสาโทเปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ปริมาณกรดอินทรีย์และกลีเซอรอล การเปลี่ยนแปลงประชากร

จุลินทรีย์ ปริมาณสารประกอบให้กลิ่น และนำไปทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าค่าความเป็นกรด-เบส และปริมาณกรดทั้งหมดของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB มีแนวโน้มใกล้เคียงกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณร้อยละเอทานอลนั้นพบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 36.021 มก./มล. และมีปริมาณร้อยละเอทานอล 9.29 ซึ่งจะให้ปริมาณร้อยละเอทานอลที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันสุดท้ายของการหมัก 41.06 มก./มล. และมีปริมาณร้อยละเอทานอล 7.62 แต่ไม่มากกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1

ส่วนปริมาณกรดอินทรีย์และปริมาณกลีเซอรอลพบว่า ปริมาณกรดไพรูวิกของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB มีปริมาณคงเหลือน้อยกว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ส่วนปริมาณกรดซัคซินิก กรดแลคติก และกลีเซอรอลในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB มีปริมาณสูงกว่าในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และไม่พบปริมาณกรดแอซิติกเช่นเดียวกับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์และทำการติดตามผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB เปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB ที่พบได้แก่ 1-โพรพานอล ไอโซบิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และเอมิลแอลกอฮอล์ เช่นเดียวกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ยกเว้น ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ที่พบเฉพาะในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB เท่านั้นแต่จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงจะเห็นได้ว่าการเกิดฟีนิลแอลกอฮอล์ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB นั้นพบได้ในวันที่ 9 ของการหมัก ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเริ่มมีจำนวนลดลง แต่ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ซึ่งไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบปริมาณฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ได้ตั้งแต่วันที่ 6 ของการหมัก

และปริมาณของไอโซบิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และเอมิลแอลกอฮอล์นั้น จะเห็นได้ว่าในช่วงวันที่ 0 ถึง วันที่ 9 ของการหมัก ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB แสดงปริมาณที่ต่ำกว่าในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 แต่หลังจากวันที่ 9 ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเริ่มมีจำนวนลดลง ปริมาณของ ไอโซบิวทานอล มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 54.78 มก./ล. ซึ่งมากกว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ที่มีปริมาณ 50.41มก./มล. และปริมาณของไอโซเอมิล

แอลกอฮอล์ และเอมิลแอลกอฮอล์ นั้นก็มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 37.13 และ 8.44 มก./ล. ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ซึ่งมีปริมาณ 27.37 และ 6.32 มก./ล. ตามลำดับ

ส่วนสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์ของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB ที่พบได้แก่ เอทิลแอซิเทต เอทิลแคโพรเอต ไอโซเอมิลแอซิเทต เอทิลแคพริเรต และ เอทิลแคเพรต ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 โดยปริมาณของเอทิลแคโพรเอต และ ไอโซเอมิลแอซิเทต ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB นั้นสามารถพบได้ในวันที่ 9 ของการหมักซึ่งเป็นวันที่ปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกมีปริมาณลดลงในขณะที่ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 สามารถวิเคราะห์ปริมาณไอโซเอมิลแอซิเทตได้ตั้งแต่วันที่ 6 ส่วนปริมาณของเอทิลแคพริเรตและเอทิลแคเพรต นั้นสามารถวิเคราะห์ได้ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และ M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB เท่านั้นจะไม่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 ซึ่งในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ เอทิลแคพริเรต และ เอทิล-แคเพรต ได้เฉพาะในวันสุดท้ายของการหมัก แต่ในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 สามารถวิเคราะห์ได้ตั้งแต่วันที่ 9 ของการหมักและมีปริมาณในวันสุดท้ายของการหมักมากกว่าในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB

สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB มีปริมาณกรดไพรูวิกคงเหลือต่ำสุดพบปริมาณร้อยละเอทานอลน้อยกว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 แต่พบว่ามีปริมาณสารประกอบให้กลิ่น ไอโซบิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และเอมิลแอลกอฮอล์ในปริมาณสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 และสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 แต่ไม่พบบทบาทการสร้างสารให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์ และพบว่าในชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB มีปริมาณกรดซัคซินิก กรดแลคติก และกลีเซอรอลสูงกว่าในชุดทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 ซึ่งสารเหล่านี้มีความสำคัญด้านรสชาติและบอดี้ ดังนั้นจากผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์และการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบให้กลิ่นในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB นั้น จะเห็นได้ว่าไม่พบบทบาทเด่นชัดในการสร้างสารประกอบให้กลิ่นแต่พบบทบาทในการสร้างสารที่มีความสำคัญด้านรสชาติของสาโท

เมื่อนำสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB ไปทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบที่มีความคุ้นเคยเพื่อเปรียบเทียบสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 พบว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB และ สาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีคะแนนเฉลี่ย 72.4 และ

76 คะแนน เป็นที่ยอมรับและจัดเป็นสาโทที่มีคุณภาพดี ส่วนสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3 นั้นมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 68.8 คะแนน ซึ่งจัดเป็นสาโทที่ได้รับการยอมรับและจัดอยู่ในระดับ พอใช้ และเมื่อพิจารณาตามวิธีทางสถิติแล้วพบว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP 1 และ สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดการทดลอง M1M2+Y1+Y2+Y3

กล่าวโดยสรุป พบว่ายีสต์มีบทบาทสำคัญนอกจากการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์แล้วยังมีบทบาทในด้านการผลิตสารให้กลิ่นในสาโท จากการทดลองพบว่า ราบริสุทธิ์ 2 สายพันธุ์ คือ *M. racemosus* NP102 (M1) และ *R. oligosporus* NP101 (M2) สามารถสร้างสารให้กลิ่นได้บ้าง ได้แก่ 2,3 บิวเทนไดออล และพบการสะสมของกรดไพรูวิก ยีสต์ *S. cerevisiae* NP1930 (Y1) มีบทบาทในการสร้างสารให้กลิ่น ไอโซบิวทานอล และ เอมิลแอลกอฮอล์ ส่วนยีสต์ในกลุ่ม Non-*Saccharomycese* ได้แก่ *P. anomala* NP101 (Y2) มีบทบาทในการสร้างสารให้กลิ่น ไอโซเอมิลแอซิเทต และ *Sch. fibuligera* NP1030 (Y3) ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้พบบทบาทในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) แต่จากงานวิจัยนี้พบบทบาทในการสร้างสารให้กลิ่น เอทิลแอซิเทต การใช้ยีสต์และรา เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสม เพื่อผลิตสาโท ให้ผลทางคุณภาพด้านกลิ่นรสไม่ต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากการใช้ลูกแป้งสุราเพื่อการผลิตสาโท

ส่วนแบคทีเรียแลคติก จากงานวิจัยนี้ไม่พบบทบาทของแบคทีเรียแลคติกในการสร้างสารให้กลิ่น แต่มีบทบาทในการสร้างสารที่มีความสำคัญด้านรสชาติของสาโท ได้แก่ กรดซัคซินิก กรดแลคติก และกลีเซอรอล

การศึกษานี้ยืนยันถึงความเป็นไปได้ในการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสมแทนลูกแป้งสุรา เพื่อการผลิตสาโทที่มีคุณภาพดี และมีคุณภาพที่คงที่ในทุกชุดการผลิต ดังนั้นการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีบทบาทด้านกลิ่นรสนอกเหนือจากบทบาทการเปลี่ยนข้าวเป็นน้ำตาลโดยรา และเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์ จึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการพัฒนากล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่ดี การศึกษายีนประมวลรหัสสารให้กลิ่นสำคัญในสาโท จะเป็นแนวทางหนึ่งต่อไปในการพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ เพื่อใช้ในการพัฒนากล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสมสำหรับการผลิตสาโทที่มีกลิ่นรสที่ดียิ่งขึ้นต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กฤษฎา ขุนแหลม. 2542 . **ปัญหาพิเศษเรื่องการศึกษาประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กุณฑลี ไกรธรรมจิตกุล. 2547. **การศึกษาปัจจัยของสายพันธุ์ข้าวที่มีผลต่อกลิ่นและรสที่ดีของสาโทซึ่งผลิตจากข้าวเหนียวดำ เปรียบเทียบกับที่ผลิตจากข้าวเหนียวขาว** . โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

โชคชัย วนภู และคณะ . 2546 . **คนทำไวน์** : Winemaker I . พิมพ์ครั้งที่1 . กรุงเทพฯ: ซีเอ็ดยูเคชั่น.

นภา โล่ห์ทอง . 2535 . **กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต** . กรุงเทพฯ: พันนีพัลลิชชิ่ง.

นุชรี อ่อนพร้อม. 2547. **ปัจจัยของสายพันธุ์ข้าวที่มีผลต่อกลิ่นและรสที่ดีของสาโท ซึ่งผลิตจากข้าวหอมนิล เปรียบเทียบกับการผลิตจากข้าวเหนียวขาว**. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

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

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

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

ยุพกนิษฐ์ พ่วงวีระกุล. **กระบวนการผลิตสาโทและจุลชีววิทยาของสาโท**. วารสารสถาบันอาหาร (NFI Journal) ปีที่ 5 ฉบับที่ 28 (มี.ค.-เม.ย. 2545) : 64-80.

รุ่งตระการ จันทนพันธ์. 2549. **สารประกอบอินทรีย์บางชนิดในสาโท**. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2547. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่อง "**การผลิตหัวเชื้อลูกแป้งสาโท**" ณ ห้องประชุมชั้น 1 อาคารวิจัยและพัฒนา 1 เทคโนธานี คลองห้า จ.ปทุมธานี วันที่ 30 พฤษภาคม 2547.

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

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

สุภมาส ไข่คำ . 2544 . **การศึกษาคุณภาพของสุรากลั่นพื้นบ้านที่ผลิตในเขตภาคเหนือตอนบน** . วิทยานิพนธ์ปริญญา ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ : 7-8,18-19,21,23-26

สุหัทยา นำชัยสี่วัฒนา. 2549. **ผลของสมุนไพรและเครื่องเทศต่อสารให้กลิ่นในไวน์ข้าว**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อภิชญา เตชะวสัญญู. 2550. **การแยก จำแนก และลักษณะสมบัติของยีสต์และราในลูกแป้งสุราเพื่อการผลิตสาโท**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Amerine, M.A., Berg H.W. and Cruess W.V. 1972. **The technology of wine making**. The AVI Publishing

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

Delfini, C., Formica, J.V. 2001. **wine microbiology : science and technology.** New York. USA: Marcel Dekker.

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

Jackson, R.S. 2000. **Wine science : principle, practice, perception.** 2nd ed. USA: Academic press.

Kodama, K. 1970. **Sake yeast.** In A. H. Rose and J. S. Harrison (eds.), The yeasts, Vol3. pp. 225-282. London : Academic Press

Lamikanra, O., Grimm, C.C., Inyang, I.D. 1995. **Formation and occurrence of flavor components in Noble muscadine wine.** Journal of Food Chemistry. 56 : 373-376

Lamikanra, O.1997. **Change in organic acid composition during fermentation and aging of Noble muscadine wine.** Journal of Agricultural and food chemistry . 45 : 935-937

Lubbers, S., Verret, C., Voilley, A. 2001. **The effect of glycerol on the perceived aroma of a model wine and a white wine.** Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. 34 : 262-265

Maares, H. 1991. **Volatile compound in foods and beverages.** Dekker. New York. USA.

Miller, G.L., 1959. **Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chem. 31: 426–428.

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

Rodrıguez, J.J., Conde, J.E., Garcıa, F., Perez, J.P. 2003. **Determination of major compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography**. J. Chromatography. 991 : 13 -22.

Rojas, V., Gil, J.V., Pinaga, F., Manzanares, P. 2001. **Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeast.** International Journal of Food microbiology. 70 : 283-289

Rojas, V., Gil, J.V., Pinaga, F., Manzanares, P. 2003. **Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations.** International Journal of Food microbiology. 86 : 181-188

Sripunya, P. Wanapu, C. Boonkerd, N. 2005. **Effect of β-glucosidase enzyme in Saccharomyces cerevisiae strains on aroma production during mango (Chok-anan) wine fermentation.** Journal of Biotechnology. 6 : 50-56

Sirisantimathakom, L., Sritrakul, N., Laopaiboon, P. and Laopaiboon, L. (2004) Quantitative analysis of main volatile compounds in Sato using gas chromatography In : 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology,3-6 February 2004,Chieng Mai,Thailand.

Stanley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. and Holt, J.G. (eds). **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Williams & Wilkin, Baltimore 3.

Sujaya, I.N. Antara, N.S. Sone, T. Tamura, Y. Aryanta, W.R. Yokota, A. Asano, K. and Tomita, F. 2004. **Identification and characterization of yeasts in brem, a traditional Balinese rice wine.** World Journal of Microbiology & Biotechnology 20: 143–150

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

http://www.flavornet.org/flavornet.html

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato dextrose agar (PDA)

Potato starch	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม

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

Yeast malt extract agar (YM)

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

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

Rose bengal agar

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

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

L-lysine medium

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

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

MRS Medium

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

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

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสาโท

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

การเตรียมสารละลาย Phenopthalene

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

วิธีการวิเคราะห์

นำไวน์ตัวอย่างมา 5 มล. เติมน้ำร้อน 50 มล. แล้วหยด Phenopthalene 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์แมล จนสารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู อ่านค่าปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้ แล้วนำไปคำนวณ %TA

$$\text{การคำนวณ \%TA} = \frac{\text{V(Titer) x N(NaOH) x MW(lactic acid) x 100}}{\text{1000 x V(Sample)}}$$

V = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรากไซด์เป็นนอร์แมล (N)

v = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

MW (กรดแลคติก) = 90

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

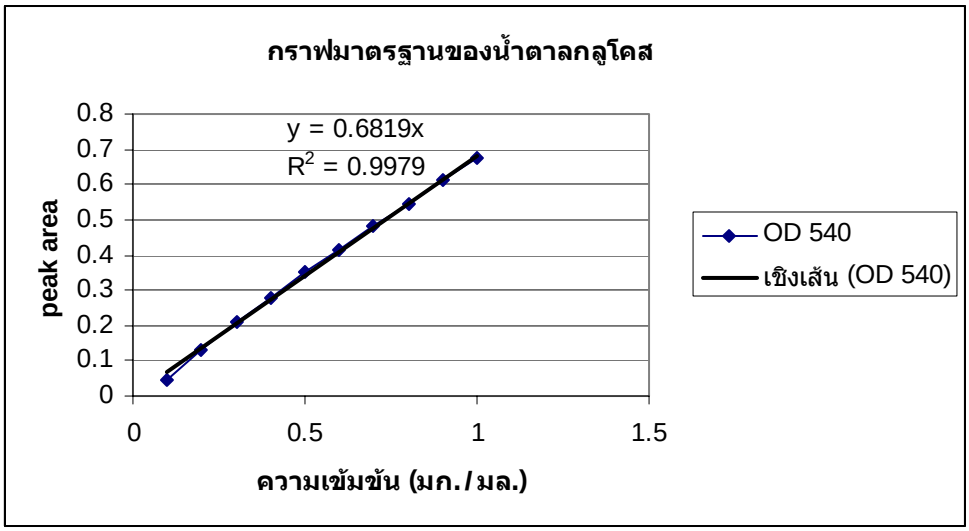
การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก (Dinitrosalicylic acid, DNSA)

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

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

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

ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ (blank) แล้วเขียนกราฟระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร



รูปที่ ข1 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของกลูโคส

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

3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ กลีเซอรอล และเอทานอล

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

ตารางที่ ข1 แสดงความเข้มข้นของสารมาตรฐานรวมของกรดอินทรีย์ กลีเซอรอล และเอทานอล

	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (มก./มล.)					
	กรดซิตริก	กรดซัคซินิก	กรดแลคติก	กรดแอซิติก	กลีเซอรอล	เอทานอล
1	0.05	0.2	1	0.5	5	7
2	0.1	0.5	3	1	7	9
3	0.2	1	5	3	9	12
4	0.3	1.5	7	5	11	15

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

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

ตัวทำละลายเคลื่อนที่: 0.02 mM H_2SO_4

อัตราการไหล (flow rate): 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที

อุณหภูมิคอลัมน์: 55 องศาเซลเซียส

ชนิดของ detector: Refragtive Index (RI)

ปริมาตรฉีด: 100 ไมโครลิตร

3.2 การเตรียมตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase)

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

วิธีการเตรียม

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

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

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

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

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

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

ปิเปตสารละลายเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก มา 0.106 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จะได้ 2 มิลลิโมลาร์ของกรดซักฟิวริก

ภาคผนวก ค

ใบให้คะแนนการชิมสาโท

ชื่อผู้ทดสอบ.....วันที่ทดสอบ.....

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

หมายเหตุ

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

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

วิธีการให้คะแนน

สี **คะแนนเต็ม 10 คะแนน**

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

กลิ่น **คะแนนเต็ม 30 คะแนน**

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

รส **คะแนนเต็ม 40 คะแนน**

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

การยอมรับ **คะแนนเต็ม** 10 **คะแนน** (ความประทับใจในคุณภาพ)

ยอมรับมาก	9 – 10	คะแนน
ยอมรับ	7 -8	คะแนน
พอใช้	5 – 6	คะแนน
ไม่ชอบ	3 – 4	คะแนน
ไม่ชอบมาก	ต่ำกว่า 3	คะแนน

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

ภาคผนวก ง

ตารางที่ ง1 แสดงค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสทั้ง สี กลิ่น รส การยอมรับ และคะแนนรวมของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า

	สี	กลิ่น	รส	การยอมรับ	คะแนนรวม
สาโท NP1	8.2 ± 0.78	22.05 ± 2.43	30.2 ± 4.82	15.55 ± 2.52	76 ± 8.64
สาโท NN6	7.9± 0.73	20.8 ± 2.74	25.1 ± 4.09	13.65 ± 3.09	67.45 ± 9.01
สาโท NK2	6.75 ± 1.27	20.95 ± 2.71	25.7 ± 4.64	13.45 ± 2.57	66.85 ± 9.45
สาโททางการค้า 1	7.9 ± 0.56	21.5 ± 3.68	26.25 ± 4.00	14.85 ± 3.12	70.5 ± 10.31
สาโททางการค้า 2	7.45± 1.06	19.3 ± 5.41	25.65 ± 6.08	13.3 ± 3.83	65.7 ± 15.05

ตารางที่ ง2 แสดงค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสทั้ง สี, กลิ่น, รส, การยอมรับ และคะแนนรวมของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมและสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1

	สี	กลิ่น	รส	การยอมรับ	คะแนนรวม
สาโท NP1	8.2 ± 0.78	22.05 ± 2.43	30.2 ± 4.82	15.55 ± 2.52	76 ± 8.64
M1M2+Y1	8.15 ± 0.74	21.1 ± 2.33	27.5 ± 3.40	14.55 ± 1.89	71.3 ± 6.77
M1M2+Y1+Y2	7.85 ± 0.74	21.4 ± 2.95	27.2 ± 6.01	14.3 ± 3.36	70.75 ± 11.39
M1M2+Y1+Y3	7.85 ± 0.74	21.5 ± 2.41	27.7 ± 5.55	14.7 ± 2.94	71.75 ± 9.71
M1M2+Y1+Y2+Y3	8 ± 0.81	21.45 ± 3.09	25.5 ± 4.92	13.85 ± 3.21	68.8 ± 10.56
M1M2+Y1+Y2+Y3 + LAB	7.95 ± 1.01	21.6 ± 2.01	27.85 ± 3.51	15 ± 2.30	72.4 ± 7.23

ภาคผนวก จ

ตารางที่ จ1. แสดงค่าองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม และสาโททางการค้า

ตัวอย่าง	องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ			
	ความเป็นกรด-เบส	ปริมาณกรดทั้งหมด (%TA)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.)	ร้อยละเอทานอล (% v/v)
สาโท NP1 วันที่ 3	3.23	0.49	46.63	8.28
สาโท NP1 วันที่ 6	3.37	0.43	10.71	10.94
สาโท NP1 วันที่ 9	3.62	0.38	0.59	11.82
สาโท NP1 วันที่ 11	3.67	0.36	0.44	11.83
M1M2	3.57	0.41	90.78	1.95
M1M2+Y1 วันที่ 3	3.41	0.32	51.99	0.94
M1M2+Y1 วันที่ 6	3.34	0.45	43.26	8.22
M1M2+Y1 วันที่ 9	3.4	0.43	42.01	8.30
M1M2+Y1 วันที่ 11	3.65	0.34	2.27	11.79
M1M2+Y1+Y2 วันที่ 3	3.75	0.22	78.46	1.15
M1M2+Y1+Y2 วันที่ 6	3.25	0.41	63.99	5.59
M1M2+Y1+Y2 วันที่ 9	3.37	0.41	48.39	6.3
M1M2+Y1+Y2 วันที่ 11	3.52	0.34	37.25	9.2
M1M2+Y1+Y3 วันที่ 3	3.59	0.29	81.98	1.24
M1M2+Y1+Y3 วันที่ 6	3.4	0.38	63.72	7.23
M1M2+Y1+Y3 วันที่ 9	3.32	0.67	59.25	7.48
M1M2+Y1+Y3 วันที่ 11	3.5	0.41	56.24	7.49
M1M2+Y1+Y2+Y3 วันที่ 3	3.57	0.38	126.02	2.2
M1M2+Y1+Y2+Y3 วันที่ 6	3.33	0.43	83.74	5.83
M1M2+Y1+Y2+Y3 วันที่ 9	3.28	0.58	53.16	7.42
M1M2+Y1+Y2+Y3 วันที่ 11	3.53	0.45	41.06	7.62
M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB วันที่ 3	3.52	0.27	97.89	0.99
M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB วันที่ 6	3.12	0.68	73.84	3.12
M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB วันที่ 9	3.3	0.63	36.88	9.2
M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB วันที่ 11	3.51	0.49	36.03	9.29

ตารางที่ จ1. (ต่อ) แสดงค่าองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม และสาโททางการค้า

ตัวอย่าง	องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ			
	ความเป็นกรด-เบส	ปริมาณกรดทั้งหมด (%TA)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.)	ร้อยละเอทานอล (% v/v)
สาโท NN6	3.48	0.56	3.59	9.75
สาโท NK2	3.6	0.43	0.95	11.28
สาโททางการค้า 1	3.59	0.36	87.05	7.89
สาโททางการค้า 2	3.5	0.45	120.43	8.74

ตารางที่ จ2. แสดงปริมาณกรดอินทรีย์และกลีเซอรอล ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม และสาโททางการค้า

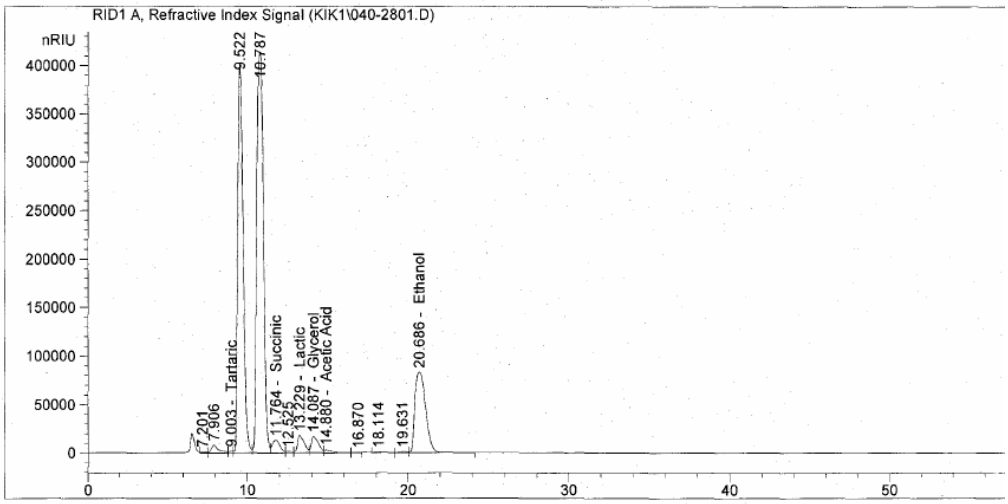
ตัวอย่าง	ปริมาณกรดอินทรีย์ และกลีเซอรอล (มก./มล.)				
	กรดไพรูวิก	กรดซัคซินิก	กรดแลคติก	กรดแอซิติก	กลีเซอรอล
สาโท NP1 วันที่ 3	28.24	0.20	2.66	-	4.42
สาโท NP1 วันที่ 6	5.37	0.23	2.53	-	4.28
สาโท NP1 วันที่ 9	1.26	0.61	2.60	-	5.23
สาโท NP1 วันที่ 11	0.64	0.56	2.13	-	4.44
M1M2	110.17	0.06	2.21	-	1.77
M1M2+Y1 วันที่ 3	55.09	-	1.30	-	0.49
M1M2+Y1 วันที่ 6	46.04	0.18	1.27	-	3.07
M1M2+Y1 วันที่ 9	11.34	0.15	1.72	-	4.62
M1M2+Y1 วันที่ 11	0.81	0.26	1.61	-	4.12
M1M2+Y1+Y2 วันที่ 3	59.12	0.19	1.09	-	0.57
M1M2+Y1+Y2 วันที่ 6	48.20	0.21	1.67	-	3.16
M1M2+Y1+Y2 วันที่ 9	42.46	0.16	2.00	-	4.33
M1M2+Y1+Y2 วันที่ 11	35.84	0.17	0.91	0.64	3.47
M1M2+Y1+Y3 วันที่ 3	86.77	-	1.56	-	0.68
M1M2+Y1+Y3 วันที่ 6	55.53	0.17	1.86	-	3.83
M1M2+Y1+Y3 วันที่ 9	47.01	0.31	2.02	-	4.57
M1M2+Y1+Y3 วันที่ 11	45.08	0.16	1.40	0.58	3.93
M1M2+Y1+Y2+Y3 วันที่ 3	91.34	0.25	1.84	-	1.27
M1M2+Y1+Y2+Y3 วันที่ 6	78.04	0.29	1.46	-	3.46
M1M2+Y1+Y2+Y3 วันที่ 9	32.80	0.12	2.62	-	3.45
M1M2+Y1+Y2+Y3 วันที่ 11	22.41	0.17	0.93	0.65	3.88
M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB วันที่ 3	49.48	-	1.04	-	0.35
M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB วันที่ 6	34.13	0.14	6.45	0.68	2.84
M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB วันที่ 9	28.37	0.09	3.42	0.49	4.59
M1M2+Y1+Y2+Y3+LAB วันที่ 11	0.16	0.90	1.69	-	4.58

ตารางที่ จ2.(ต่อ) แสดงปริมาณกรดอินทรีย์และกลีเซอรอล ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม และสาโททางการค้า

ตัวอย่าง	ปริมาณกรดอินทรีย์ และกลีเซอรอล (มก./มล.)				
	กรดไพรูวิก	กรดซัคซินิก	กรดแลคติก	กรดแอซิติก	กลีเซอรอล
สาโท NN6	2.07	0.07	2.28	-	3.06
สาโท NK2	2.36	0.54	1.77	-	3.53
สาโททางการค้า 1	29.37	0.83	7.55	-	6.17
สาโททางการค้า 2	54.76	4.17	5.62	1.49	4.57

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\KIK1\040-2801.D Sample Name: com sat

```
Injection Date  : 1/9/2007 12:02:53 PM          Seq. Line :  28
Sample Name     : com sato 2                    Location : Vial 40
Acq. Operator   : natchanun                        Inj :   1
Acq. Instrument : Instrument 1                 Inj Volume : 10 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\KIK.M
Last changed    : 30/8/2007 14:05:46 PM by natchanun
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\KIK.M
Last changed    : 1/9/2007 15:50:06 PM by peet
                  (modified after loading)
Ferment broth of 20 percent Glucose+Fructose
```



External Standard Report

```
Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      1/9/2007 15:36:11 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal
```

RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [mg/ml]	Grp	Name
8.263		-	-	-		Citric
9.003	VV	3.41273e4	5.41927e-6	1.84945e-1		Tartaric
11.764	VV	4.44266e5	9.39154e-6	4.17234		Succinic
13.229	VV	5.23568e5	1.07323e-5	5.61907		Lactic
14.087	VV	5.36509e5	8.51420e-6	4.56795		Glycerol
14.880	VV	1.29818e5	1.14845e-5	1.49089		Acetic Acid
20.686	VV	3.91514e6	2.23301e-6	8.74255		Ethanol
Totals :				24.77774		

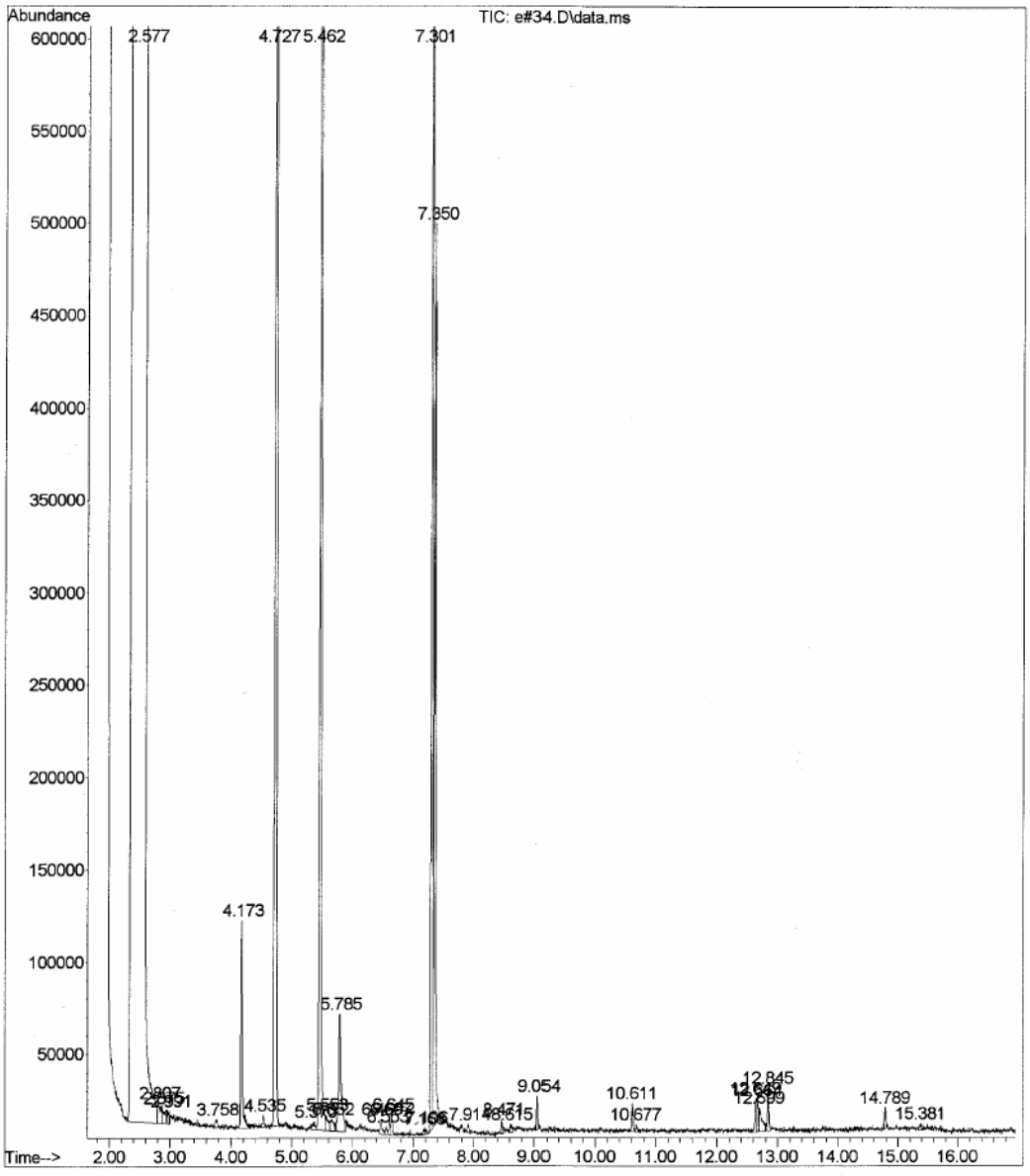
```
 Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found
```

*** End of Report ***

Instrument 1 1/9/2007 15:56:26 PM peet Page 1 of 1

รูปที่ จ1. แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมของกรดอินทรีย์และกลีเซอรอลที่ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

```
File       :D:\MSDCHEM\DATA\072807\e#34.D
Operator   : Phatcharaporn
Acquired   : 31 Jul 2007  14:12     using AcqMethod ETHANOL.M
Instrument :   Instrument #1
Sample Name: M+Y1+Y2+Y3+lab day11
Misc Info  : sticky rice
Vial Number: 42
```



รูปที่ จ2. แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารประกอบให้กลิ่นที่วิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนริสา ตรีเนตร เกิดเมื่อวันที่ 9 เมษายน พ.ศ.2524 ที่จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2545 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547