

รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัย

เรื่อง

ความหลากหลายของยีสต์และราจากลูกแป้งในจังหวัดน่าน

โดย

ผศ.ดร.ชุติ ยมภักดี

รศ.จิราภรณ์ ธานีวัน

ผศ.ดร.ณัฐชนันต์ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์

สถาบันวิจัยและพัฒนา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปี 2548 - 2550

รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัย

เรื่อง

ความหลากหลายของยีสต์และราจากลูกแป้งในจังหวัดน่าน

โดย

ผศ.ดร.ชูลี ยมภักดี

รศ.จิราภรณ์ ธนियวัน

ผศ.ดร.ณัฐชนัน ติพิพัฒน์ไพบูลย์

สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปี 2548 - 2550

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ประสานงานในการเก็บตัวอย่างลูกแบ่งสุราจากจังหวัดน่าน
ดังนี้

คุณ ขนิษฐา วงศ์วิเศษ	ศูนย์การเรียนรู้โครงการขยายโอกาส จ.น่าน
คุณ ศาสตรา สิ้นันตา	ศูนย์ประสานงานประชาคม จ.น่าน
คุณ ประเสริฐ ศรีสบานงา	ประธานเครือข่ายสุราพื้นบ้านประจำจังหวัดน่าน
คุณ นันทมิตร นันทเสน	สถานีอนามัยไหล่น่าน จ. น่าน
คุณ รัตนา ศรีสุขคำ	โรงเรียน ศรีสวรรค์

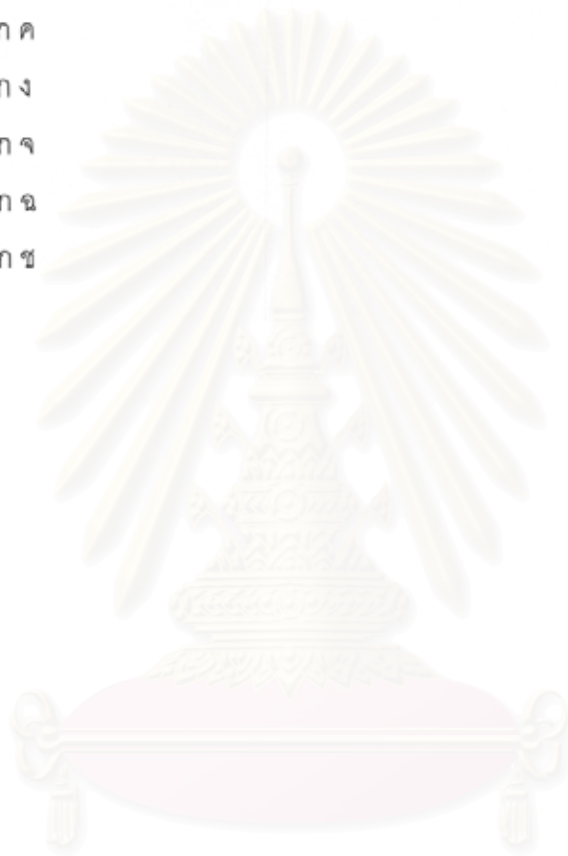


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
สารบัญ	ii
สารบัญรูป	iii
สารบัญตาราง	iv
บทคัดย่อ	v
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	vi
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	24
วิธีการดำเนินการทดลอง	25
1. การเก็บตัวอย่างลูกแป้ง	25
2. การผลิตสาโทในห้องปฏิบัติการ	25
3. การแยกยีสต์และราจากตัวอย่างลูกแป้งสุรา	25
4. การจำแนกชนิดยีสต์และราที่อยู่ในลูกแป้งสุราโดยใช้ฐานฐานวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคอนุชีววิทยา	26
5. การศึกษาเอกทิวติของแอลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลสในราที่แยกได้	29
6. การศึกษาความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอลจากยีสต์	29
7. การวิเคราะห์กลิ่นรสในตัวอย่างสาโท	30
8. การวิเคราะห์สารอินทรีย์บางชนิดในตัวอย่างสาโท	32
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	34
1. การเก็บตัวอย่างลูกแป้ง	34
2. การคัดเลือกลูกแป้งสุราที่ดี	38
3. การคัดแยกยีสต์และราจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้	41
4. การจำแนกชนิดยีสต์และราที่อยู่ในลูกแป้งสุรา	42
5. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรของราและยีสต์ในลูกแป้งที่คัดเลือกได้	50
6. การคัดเลือกราบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดี	57
7. การคัดเลือกยีสต์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอลได้ดี	59
8. การศึกษากลิ่นรสโดยการชิมและปริมาณของสารอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกลิ่นรสของสาโท	60
9. การศึกษาความสามารถในการผลิตสารอินทรีย์อื่นๆ	69

	หน้า
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	79
เอกสารอ้างอิง	95
ภาคผนวก	101
ภาคผนวก ก	102
ภาคผนวก ข	103
ภาคผนวก ค	107
ภาคผนวก ง	116
ภาคผนวก จ	118
ภาคผนวก ฉ	121
ภาคผนวก ช	126



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 1 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท	9
รูปที่ 2 การเจริญของยีสต์ 2 ชนิด จากลูกแป้งสุราจากผู้ผลิต 3 แห่ง ระหว่างการหมักสาโท	9
รูปที่ 3 กระบวนการเปลี่ยนแปลงกลูโคสเมื่อเข้าสู่เซลล์	11
รูปที่ 4 The Embden-Meyerhof-Parnas glycolytic pathway for glucose metabolism	12
รูปที่ 5 แสดง The Citric Acid Cycle	17
รูปที่ 6 โครงสร้างของวิตามินบี 1(ไทอามินไฮโดรคลอไรด์)	19
รูปที่ 7 โครงสร้างของกรดแพนโทธีนิก (Pantothenic acid)	20
รูปที่ 8 แสดงบริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) ของ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
รูปที่ 9 แหล่งของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่เก็บได้จากอำเภอต่างๆในจังหวัดน่าน	34
รูปที่ 10 แสดงตัวอย่างของลักษณะลูกแป้งที่สามารถเก็บได้	35
รูปที่ 11 แสดงตัวอย่างของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์ที่แยกได้	44
รูปที่ 12 ตัวอย่างของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีสต์ที่แยกได้ ก) ตัวอย่างลูกแป้ง NN101Y02 - NN104Y02 ข) ตัวอย่างลูกแป้ง NN104Y03 - NN110Y02	45
รูปที่ 13 แสดงตัวอย่างของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีสต์ที่แยกได้ ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ที่จำเพาะ ก) เอนไซม์ที่จำเพาะ <i>HinFI</i> ข) เอนไซม์ที่จำเพาะ <i>HaellI</i> และ ค) เอนไซม์ที่จำเพาะ <i>HhaI</i>	47
รูปที่ 14 การเปลี่ยนแปลงประชากรของราและยีสต์ระหว่างการหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วทั้ง 3 แหล่ง ก) NN6 ข) NN25 ค) NN27	52
รูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราแต่ละสปีชีส์ระหว่างการหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือก 3 แหล่ง ก) NN6 ข) NN25 และ ค) NN27	56
รูปที่ 16 แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า	61
รูปที่ 17 การต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (Total antioxidant activity) ของข้าวเหนียวนึ่ง	73
รูปที่ 18 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing capacity) ของตัวอย่างสาโท	75
รูปที่ 19 การวิเคราะห์ Free radical scavenging activity ของตัวอย่างสาโท	77
รูปที่ 20 การวิเคราะห์ Superoxide anion scavenging activity ของตัวอย่างสาโท	78
รูปที่ 21 แสดงตำแหน่งของอำเภอต่างๆ ในจังหวัดน่านที่เป็นแหล่งของตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้วและชนิดของราและยีสต์ที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งนั้นๆ	84

	หน้า
รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และน้ำตาลกลูโคส	116
รูปที่ 22 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ และร้อยละของเอทานอล	117
รูปที่ 23 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟของสารละลาย	112
กรดซัลฟอนิกมาตรฐานต่อความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	122
รูปที่ 24 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟของสารละลาย	
กรดซัลฟอนิกมาตรฐานต่อความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	122
รูปที่ 25 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของวิตามิน	124
รูปที่ 26 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของกรดอินทรีย์	125



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 หัวเชื้อชนิดต่างๆ และชื่อไวน์ข้าวที่เรียกกันในแต่ละประเทศ	1
ตารางที่ 2 ปริมาณวิตามินที่อยู่ในไวน์ข้าวของ Poko	18
ตารางที่ 3 จำนวนแหล่งที่มาของตัวอย่างลูกแป้งสุราจากอำเภอต่างๆในจังหวัดน่าน	35
ตารางที่ 4 รหัสของตัวอย่างลูกแป้งที่เก็บจากอำเภอต่างๆในจังหวัดน่าน	36
ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว (liquefaction) ปริมาณกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร) และร้อยละของแอลกอฮอล์ในสาโท ที่ผลิตได้จากแหล่งตัวอย่างลูกแป้งทั้งหมดที่เก็บได้จากจังหวัดน่าน	38
ตารางที่ 6 จำนวนของยีสต์และราจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้ โดยทำการแยกเชื้อในวันที่ 0,3 ก่อนและหลังการผ่านน้ำ, 5, 7 และ 9	41
ตารางที่ 7 ผลการจำแนกราในลูกแป้งสุราโดยสันฐานวิทยา (อ้างอิงตาม Samson และคณะ, 2002; de Hoog และคณะ, 2000)	42
ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของรา	43
ตารางที่ 9 การแบ่งกลุ่มยีสต์ที่แยกได้ตามรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8srDNA-ITS2 โดยวิธี PCR-RFLP	48
ตารางที่ 10 การจำแนกชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA เทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank	49
ตารางที่ 11 การจำแนกชนิดของยีสต์โดยใช้ลักษณะทางชีวเคมี	50
ตารางที่ 12 ชนิดและจำนวนของยีสต์ ที่แยกได้จากแหล่งตัวอย่างที่คัดเลือกได้ในระหว่างการหมักสาโท	54
ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว (liquefaction) เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) ของราที่แยกจากตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้วจากจังหวัดน่าน	58
ตารางที่ 14 สรุปปริมาณสารให้กลิ่นของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า เปรียบเทียบกับปริมาณที่พบในไวน์องุ่นทั่วไป	65
ตารางที่ 15 ปริมาณสารอินทรีย์ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างสาโทโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	69
ตารางที่ 16 ปริมาณวิตามินที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างสาโทโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	71
ตารางที่ 17 ชนิดและปริมาณของสารประกอบที่สำคัญที่พบในไวน์ผลไม้	91

บทคัดย่อ

สาโท คือ ไวน์ข้าวชนิดหนึ่งซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านของไทยที่นิยมผลิตกันมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ น่านเป็นจังหวัดหนึ่งที่ตั้งอยู่ในภาคเหนือตอนล่างที่อุดมไปด้วยป่าไม้ ซึ่งน่าจะมีความหลากหลายทางชีวภาพที่สูง กล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เรียกว่า ลูกแป้งถูกใช้ในการหมักข้าวเหนียวเพื่อผลิตเป็นสาโท มีราและยีสต์เป็นจุลินทรีย์หลักในลูกแป้งที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการผลิตสาโท ที่ผ่านมามีอุตสาหกรรมการผลิตสาโท ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากขาดความสม่ำเสมอในคุณภาพของสาโทในแต่ละชุดการผลิต ในงานวิจัยนี้มุ่งหมายในการศึกษาความหลากหลายของราและยีสต์ในลูกแป้งที่ดีที่คัดเลือกจากทั่วจังหวัดน่าน ตลอดจนศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรของราและยีสต์ในระหว่างการผลิตสาโทและเพื่อเปรียบเทียบคุณภาพของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งที่ได้รับคัดเลือก กับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลูกแป้งดังกล่าว เพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้ไปสู่การปรับปรุงคุณภาพของสาโท รวมถึงความสม่ำเสมอในคุณภาพของสาโทที่ได้ในแต่ละชุดการผลิตต่อไป จากลูกแป้ง 41 แหล่งตัวอย่างที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดน่าน ทำการคัดเลือกได้ลูกแป้ง 3 แหล่ง ตัวอย่าง ได้แก่ NN6 NN25 และ NN27 ซึ่งมีกิจกรรมของราและยีสต์ในลูกแป้งดี รวมถึงเมื่อนำมาผลิตเป็นสาโทได้คุณภาพด้านกลิ่นรสที่ดี และได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักในวันต่างๆ ในระหว่างกระบวนการหมักสาโทเพื่อแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของราและยีสต์ที่แยกได้ โดยวิธีสัณฐานวิทยา ชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล พบความหลากหลายของราและยีสต์จากลูกแป้งที่คัดเลือกได้มีไม่สูงนัก ในระหว่างกระบวนการหมักสาโท พบราและยีสต์ชนิด *Non-Saccharomyces* เป็นจุลินทรีย์เด่นในช่วงต้น(วันที่ 0 – 3)ของการหมัก จากนั้นจุลินทรีย์เหล่านี้จะถูกแทนที่ด้วย ยีสต์ชนิด *Saccharomyces cerevisiae* ในระหว่างการหมักต่อมาจนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมัก จากการเปรียบเทียบคุณภาพของสาโทระหว่างสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งที่คัดเลือกแล้ว กับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลูกแป้งนั้น ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบทางประสาทสัมผัส และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ สารประกอบให้กลิ่นกรดอินทรีย์ และวิตามิน บางชนิด พบความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ดังนั้นสาโทที่หมักจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมจึงมีคุณภาพใกล้เคียงกับสาโทที่หมักจากลูกแป้งที่คัดเลือกได้ ผลจากงานวิจัยนี้จะเป็นแนวทางของการใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่คัดเลือกแล้ว ในการผลิตสาโทในเชิงอุตสาหกรรมให้มีคุณภาพเท่ากันในทุกครั้งการผลิตได้ ต่อไป

Abstract

Traditional Thai rice wine, Sato, is usually produced in Northern and North Eastern part of Thailand. Nan is a forest enriched province, thus making the area high in diversity of living organisms. Production of Sato used an amylolytic starter, loogpang, as a source of microorganisms to ferment glutinous rice to rice wine. Molds and yeasts in the starter play major roles in production process. Commercial Sato production was not successful because of the quality inconsistency. This study aims at studying diversity and fermentation dynamics of molds and yeasts during Sato production process and comparison on the quality between products fermented from selected loogpangs and those from a mixture of pure cultures isolated from them so as to future improve in the quality consistency and/or the quality on flavor of Sato. Three of 41 Loogpang samples, NN6 NN25 and NN27, from Nan province were selected for the activities of the yeasts and molds and the flavor of the produced Sato. Samples were taken from each Sato during fermentation period for mold and yeast isolations followed by identifications using morphological, biochemical and molecular methods, respectively. Not so high in diversity of molds and yeasts in selected loogpangs were observed. During Sato fermentation, molds and non-*Saccharomyces* yeasts were dominated only in the early stage (day 0-3), then were replaced by the yeast *S. cerevisiae* at the later fermentation process. On comparison on quality of Sato produced from the selected loogpangs and those from the mixed pure cultures isolated from the loogpangs, no significant difference was detected by sensory tests. Only slight difference in quantity of organic compounds such as volatile compounds, organic acids and vitamins could be noted. This study emphasizes the use of selected mixed pure cultures to replace the use of loogpang for industrial scale of Sato production so as to improve on the quality consistency between bateches and/or the flavor of Sato.

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีผลผลิตทางการเกษตรตลอดปี ผลผลิตที่มีความสำคัญอันดับหนึ่งก็คือ ข้าว ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจของไทยและเป็นอาหารหลักประจำชาติ สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นเครื่องต้มหมักพื้นบ้าน ซึ่งเกิดจากภูมิปัญญาชาวบ้านของไทย โดยมีชื่อเรียกต่างๆกันไปตามแต่ละท้องถิ่น เช่น กระแช่ อู น้ำขาว น้ำแดง สาโท เป็นต้น อีกทั้งประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราจึงเป็นที่มาของกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อยีสต์และรา เนื่องจากเราสามารถย่อยแป้งหรือคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง

เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ในปัจจุบันมีต้นกำเนิดจากกระบวนการหมักดั้งเดิมเพื่อสร้างแอลกอฮอล์ เช่นในการผลิตสุราพื้นบ้าน เป็นต้น โดยเครื่องต้มแอลกอฮอล์จะมีบทบาทสำคัญต่อวัฒนธรรมและวิถีชีวิตของคน ทั้งในแถบซีกโลกตะวันออกและตะวันตก ขณะที่ประเทศในแถบทวีปยุโรป และตะวันออกกลาง นิยมผลิตเครื่องต้มแอลกอฮอล์จากผลไม้ แต่ประเทศในแถบเอเชียแปซิฟิกจะนิยมผลิตเครื่องต้มแอลกอฮอล์จากธัญพืช (Cereals) ซึ่งเบียร์ที่ผลิตจากยุโรปใช้ข้าวบาร์เลย์และมอลต์เป็นวัตถุดิบในการผลิต ในขณะที่เบียร์ (Rice wine) จากทวีปเอเชียใช้ข้าวที่มีราและยีสต์เป็นหัวเชื้อในการหมัก

กระบวนการผลิตไวน์ข้าวของแต่ละประเทศจะมีความแตกต่างกันทั้งวัตถุดิบ สัดส่วน อุณหภูมิ และระยะเวลา แต่โดยรวมแล้วเป็นการหมักแบบธรรมชาติโดยใช้ธัญพืชเป็นวัตถุดิบหลักโดยแต่ละแห่งมีการทำก่อนแบ่งหัวเชื้อ (Starter) ด้วยส่วนผสม รูปร่าง และเชื้อจุลินทรีย์แตกต่างกัน และมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 หัวเชื้อชนิดต่างๆ และชื่อไวน์ข้าวที่เรียกกันในแต่ละประเทศ

ประเทศ	ชื่อหัวเชื้อ	ส่วนผสมหลัก	รูปร่าง	เชื้อ	ชื่อไวน์ข้าว
จีน	Chu	Wheat, Barley, Millet, Rice (Whole grain, Grits or Flour)	ก้อน หรือก้อนเล็ก	<i>Rhizopus</i> sp. <i>Amylomyces</i> sp.	Shao-Shin-Chu
เกาหลี	Nuruk	Wheat, Rice, Barley (Whole grain, Grits or Flour)	ก้อนขนาดเล็กใหญ่	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp. Yeast	Makkari
	Meju	Soybean (Whole seed)	ก้อนขนาดใหญ่	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ประเทศ	ชื่อหัวเชื้อ	ส่วนผสมหลัก	รูปร่าง	เชื้อ	ชื่อไวน์ข้าว
ญี่ปุ่น	Koji	Wheat, Rice (Whole grain, Grits or Flour)	ก้อนเล็ก-ผง	<i>Aspergillus</i> sp.	Sake, Amazake
อินโดนีเซีย	Ragi	Rice (Flour)	ก้อนเค็ทขนาด เล็ก	<i>Amylomyces</i> sp. <i>Endomycopsis</i> sp.	Brem
ฟิลิปปินส์	Bubod	Rice, Glutinous rice (Flour)	ก้อนเค็ทขนาด เล็ก	Mucor Rhizopus Saccharomyces	Tapuy
ไทย	Lookpang	Rice bran	ก้อนเล็ก-ผง	<i>Amylomyces</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.	กระแช่, น้ำขาว, สาโท, อุ
อินเดีย	Marcha, Murcha	Rice	ก้อนเค็ทชนิด แบน	<i>Hansenula anomala</i> <i>Mucor fragilis</i> <i>Rhizopus arrhizus</i>	Shonti, Murcha

ไวน์ข้าวแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะความใสของผลิตภัณฑ์ (Yoshizawa, 1985) คือ

1. Alcoholic beverage เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีลักษณะใส ได้แก่ สาเก และ Shao-Shin-Chu เป็นต้น
2. Miscellaneous alcoholic drinks เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีลักษณะขุ่น อันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ และของแข็งที่เหลือตกค้างอยู่ ได้แก่ Tapuy, Baside, Tapay, Amazake และสาโท เป็นต้น

ไวน์ข้าวที่รู้จักกันดี และเป็นที่ยอมรับไปทั่วโลก คือ สาเก เนื่องจากมีการพัฒนาการผลิตมากกว่าไวน์ข้าวชนิดอื่นๆ (ลูกจันทร์ ภัคศรีพันธุ์, 2535) ไวน์ข้าวของไทยหรือที่เรียกกันว่า สาโท จัดเป็นสุราแช่ตามความหมายในพระราชบัญญัติสุรา พ.ศ.2492 มาตรา 4 ซึ่งให้คำนิยามว่า "สุราแช่" หมายถึงสุราที่ไม่ได้กลั่น และให้ความหมายรวมถึงสุราแช่ที่ได้ผสมกับสุรากลั่นแล้ว แต่ยังคงมีความแรงแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรีด้วย คำว่า แรงแอลกอฮอล์ (Alcohol strength) หมายถึง ดีกรีหรือหน่วยวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในสุรา คิดเป็นร้อยละโดยปริมาตร (มาตรฐานอุตสาหกรรม, 2516) วัตถุประสงค์หลักที่ใช้ในการผลิตสาเก คือ ข้าวและน้ำ เช่นเดียวกับสาโทของประเทศไทย แต่แตกต่างกันที่สาเก ดำเนินการหมักโดยโคจิ (Koji) ซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์ของ *Aspergillus oryzae* ที่เจริญบนข้าวสุก และเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์ *Saccharomyces sake* แต่สาโทดำเนินการหมักโดยเชื้อในลูกแป้งสุรา ซึ่งเป็นกล้าเชื้อผสมของจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย (นภา โล่ห์ทอง, 2535) ดังนั้นคุณภาพของสาโท จึงขึ้นกับคุณภาพของลูกแป้งสุราเป็นสำคัญ

การผลิตสุราแช่พื้นบ้านไทยมีมาช้านานแล้ว ได้จากการหมักข้าวเหนียวในโองหรือไหดินเผา ขั้นตอนการผลิตและส่วนผสมแตกต่างกันไป นับตั้งแต่การทำลูกแป้งสุราหรือก้อนแป้งหัวเชื้อที่ใช้แป้งข้าวเหนียวผสมกับสมุนไพรหลายชนิด โดยมีเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรียชนิดต่างๆกันไปในแต่ละท้องถิ่นของประเทศ จนกระทั่งถึงกระบวนการหมัก โดยใช้ข้าวเหนียวหนึ่งผสมกับลูกแป้งสุราและน้ำ เพื่อให้ได้สุราที่เรียกว่า สาโท หรือเหล้าโท หรือน้ำข้าว ซึ่งนิยมผลิตกันมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ สาโทที่ผลิตได้มีลักษณะเป็นของเหลวสีขุ่นหรือสีตามข้าว รสหวานหอม เมื่อนลิ้มน้อยๆ ถ้ามักจากข้าวเหนียวดำจะมีสีดำมีรสชาติดีกว่าหมักด้วยข้าวเหนียวขาว ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ อาจมีการใช้ข้าวเจ้าในการผลิตสาโทแต่ไม่ค่อยเป็นที่นิยมบางชุมชนจะใช้การหมักข้าวเหนียวหนึ่งผสมกับลูกแป้งสุราและน้ำในไห เรียกสุราแช่ประเภทนี้ว่า อุ หรือเหล้าแกลบ หรือเหล้าไห หรือซ้าง รสชาติของสาโทขึ้นอยู่กับความเหนียวของข้าว ยิ่งข้าวมีความเหนียวมากเท่าใด ก็ยิ่งทำให้สาโทมีรสชาตินุ่มนวล โดยเฉพาะหากมีความหอมของข้าวด้วยแล้วจะทำให้สาโทเกิดกลิ่นหอมยิ่งขึ้น (สุพัฒน์ กุมพิทักษ์ และ กำพล กาหลง, 2545) นอกจากนี้ก็ยังมีปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของสาโทด้วย

การทำสาโทของชาวบ้านเป็นการทำตามภูมิปัญญาท้องถิ่นที่ได้รับการถ่ายทอดกันมาหลายชั่วอายุคน ลูกแป้งสุราในแต่ละหมู่บ้านมีสูตรเฉพาะเป็นของตนเอง และส่วนใหญ่ถูกปกปิดเป็นความลับ ไม่เผยแพร่แก่ผู้อื่น โดยภูมิปัญญาท้องถิ่นยังเชื่อมโยงกับสภาพแวดล้อม หรือความหลากหลายทางชีวภาพ เช่น สมุนไพร ที่นำไปทำเป็นหัวเชื้อ เป็นต้น สูตรการทำลูกแป้งสุราของแต่ละแหล่งจะมีความแตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์และสรรพคุณของสมุนไพร แต่โดยรวมจะคล้ายคลึงกันซึ่งจะประกอบด้วยสมุนไพรหลากหลายชนิด ได้แก่ กระเทียม ข่า ดีปลี พริกแดง ปิตปิวแดง เป็นต้น นำมาบดรวมกัน ผสมกับแป้งข้าวเหนียว และลูกแป้งสุราเก่าที่มียีสต์และรา

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโท

1. ข้าว

เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตสาโท มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ คือ *Oryza 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 แป้งมีสูตรทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ มีค่า n ไม่น้อยกว่า 1,000 โดยโมเลกุลของแป้งจะประกอบด้วย β -D-glucopyranose ซึ่งต่อกันเป็นลูกโซ่ด้วย 1,4- glycosidic linkage โดยการสร้าง Oxygen bridge ขึ้นมาระหว่างอะตอม

ของคาร์บอนตัวที่หนึ่งกับคาร์บอนตัวที่สี่ของกลูโคสโมเลกุลถัดไป แบ่งส่วนใหญ่เป็นสาร Heterogeneous ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของกลูโคส ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ Amylose และ Amylopectin ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน

- Amylose เป็นสายตรง ประกอบด้วย 70-2,100 หน่วยของน้ำตาลกลูโคส ต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic linkage ซึ่งในแง่ทั่วไปจะมีพันธะแบบนี้ได้ 90 ถึงเกือบ 100%
- Amylopectin เป็นโพลีเมอร์ที่มีการแตกแขนง ส่วนที่เป็นแขนงจะต่อกันด้วยพันธะ β -1,6 glycosidic linkage แต่ส่วนกลูโคสหน่วยอื่นๆต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic linkage

ปริมาณ Amylose ในข้าวเหนียวยังขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวอีกด้วย เช่น ข้าวเหนียวดำมี 5.7% ข้าวเหนียวสันป่าตอง 2.8% และข้าวเหนียวดำไผ่41มี 5.2% เป็นต้น การที่ข้าวมี Amylose มากน้อยแตกต่างกัน ทำให้ลักษณะของข้าวเมื่อสุกแล้วแตกต่างกันด้วย คือ ข้าวที่มีปริมาณ Amylose สูง จะมีความเหนียว (sticky) และมีความชื้นน้อยกว่าข้าวที่มีปริมาณ Amylose ต่ำ และข้าวเหนียวมีเมล็ดแข็งกว่าข้าวเจ้า และแบ่งข้าวเหนียวจะมีความหนืดมากกว่าแบ่งข้าวเจ้า

การแบ่งประเภทของข้าว

จำแนกตามลักษณะการบริโภค หรือชนิดของแป้ง (สุกมาส ไข่ม้า, 2544)

1.1 ข้าวเจ้า (Non glutinous rice) มี Amylose อยู่ประมาณ 7-33% ที่เหลือเป็น Amylopectin เมล็ดข้าวจะมีสีขาวใส และเมื่อหุงสุกแล้วเมล็ดจะร่วนกว่าข้าวเหนียว ข้าวเจ้าแต่ละพันธุ์มีความนุ่มเหนียวแตกต่างกัน

1.2 ข้าวเหนียว (Glutinous rice หรือ Waxy rice) ประกอบด้วย Amylopectin 98% และมี Amylose อยู่เพียง 0-2% เมล็ดข้าวสารจะมีสีขาวขุ่น เมื่อนึ่งแล้วจะได้ข้าวสุกที่จับตัวเหนียวติดกัน และมีลักษณะใส

การทำสาโทนิยมใช้ข้าวเหนียวขาว หรือข้าวเหนียวดำ เป็นวัตถุดิบมากกว่าข้าวเจ้า เนื่องจากข้าวเหนียวให้กลิ่นและรสที่ดีกว่า และจุลินทรีย์ในลูกแป้งสุราสามารถย่อยแป้งข้าวเหนียวได้ดีกว่าแบ่งข้าวเจ้า (มนตรี เชาวสังเกต, 2521) องค์ประกอบภายในเมล็ดข้าว ส่วนใหญ่คือ Starch ซึ่งประกอบด้วย Amylose และ Amylopectin เป็นองค์ประกอบหลัก และจะมีผลต่อคุณสมบัติของข้าวเมื่อนึ่งสุกแล้ว โดยข้าวที่มี Amylose ต่ำจะสามารถดูดน้ำและขยายตัวได้น้อยกว่าข้าวที่มี Amylose สูง เมื่อนึ่งสุกข้าวจะเหนียวนุ่มกว่า จึงทำให้การแทงเส้นใยของเชื้อราเข้าสู่ภายในเมล็ดข้าวได้ง่าย (เชื้อราเจริญเติบโตได้ดี) และองค์ประกอบของข้าวเหนียว พบว่า มี Amylose น้อยมากจนแทบไม่มีเลย ดังนั้นข้าวเหนียวจึงเหมาะที่จะนำมาทำสาโทมากกว่าข้าวเจ้า (สุกมาส ไข่ม้า, 2544) ส่วนการขัดสีข้าว

ก็อาจมีผลต่อคุณภาพและการหมักสาโท หากใช้ข้าวที่ยังมีรำข้าวเหลืออยู่บ้างอาจช่วยให้มีการหมักดีขึ้น เนื่องจากมีสารอาหารให้จุลินทรีย์มากกว่าข้าวขัดขาว

2. น้ำ

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

3. ลูกแป้งสุรา

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

ลักษณะทั่วไปของลูกแป้งสุราที่ดีคือ จะมีลักษณะโปร่งเบา สีขาวนวล (Grey-white) ไม่มีรอยแตกร้าว ก้อนแป้งเป็นรูพรุน ซึ่งเกิดจากการฟูของแป้งขณะบ่ม เมื่อขยี้จะยุ่ยเป็นผงละเอียด ไม่มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว ลูกแป้งสุราที่ผลิตจากแต่ละแหล่งจะมีประสิทธิภาพการหมักต่างกัน (นภา ไล่ห์ทอง, 2535) โดยลูกแป้งสุราที่นำมาใช้ในการผลิตสาโทนั้น จะใช้ลูกแป้งสุราสุรา

บทบาทสำคัญของจุลินทรีย์ในลูกแป้งสุราต่อกระบวนการหมัก มี 2 ประเภท คือ

- 1) การเปลี่ยนแป้งในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาล โดยรา เช่น *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus spp.* จะสร้างเอนไซม์ amylase ชนิด α -Amylase และ Glucoamylase
- 2) การหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้น ให้เป็นเอธานอลกับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยยีสต์ เช่น *S. cerevisiae* ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอธานอล (นภา ไล่ห์ทอง, 2535)

กระบวนการที่เกิดขึ้นในสาโท มีดังนี้

1. กระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล มีกระบวนการดังนี้

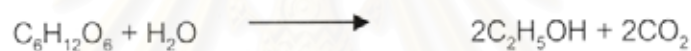
1.1 Gelatinization เป็นขั้นตอนการทำให้แป้งสุก เม็ดแป้งในข้าวเมื่อได้รับความร้อนขึ้นทำให้โครงสร้างของแป้งขยายตัวและเกิด Gelatinization ทำให้แป้งมีลักษณะนุ่มเหนียวเหมาะต่อการทำกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Tester และ Morrison, 1990)

1.2 Liquefaction เป็นขั้นตอนเพื่อลดความหนืดของแป้งที่ gelatinize แล้ว โดยเอนไซม์จะทำการย่อยโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม(Random hydrolysis) เมื่อการไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นจะทำให้ Polymer ของกลูโคส ถูกตัดเป็นสายสั้นๆ มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ทำให้มีความหนืดลดลง

1.3 Saccharification เป็นการไฮโดรไลซิสแป้งให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาล ดังนั้นหลังการย่อยแล้วจะได้ Monosaccharide หรือ Disaccharide หรือ น้ำตาลที่มีโมเลกุลสูงกว่าบ้างเล็กน้อย จะได้เป็นน้ำตาลกลูโคส มอลโทส หรือ มอลโทโทรโอส

2. กระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดยจุลินทรีย์

การหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาล แสดงได้เป็นสมการดังนี้



การหมักแอลกอฮอล์จากแป้งมีความจำเป็นที่ต้องใช้เชื้อราในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ปัจจุบันการผลิตแอลกอฮอล์นิยมใช้เอนไซม์ α -Amylase และ Glucoamylase จากรา การใช้ราย่อยแป้งเพื่อผลิตแอลกอฮอล์หรือที่เรียกว่า Amylo process (Inui และคณะ, 1965) นั้น ใช้เชื้อราในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล และเชื้อราเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้เล็กน้อย ดังนั้นการหมักแอลกอฮอล์จึงจำเป็นต้องเติม ยีสต์ร่วมด้วย เพื่อจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์

การย่อยแป้งมีกระบวนการทำได้ ดังนี้ (Grace, 1977)

1. การย่อยแป้งด้วยกรด มีกรดอยู่หลายชนิดที่สามารถย่อยแป้งได้ โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมีชนิดหนึ่งซึ่งส่งผลให้แป้งมีโมเลกุลเล็กลง กรดดังกล่าว ได้แก่ กรดเกลือ(HCl), กรดคาร์บอนิก(H_2CO_3), กรดกำมะถัน(H_2SO_4), กรดไนตริก(HNO_3) และพบว่ากรดไนตริก สามารถย่อยสลายแป้งได้ดีกว่ากรดเกลือ หรือกรดชนิดอื่น แต่อาจมีผลอย่างอื่นเกิดขึ้นด้วย ปัจจุบันในต่างประเทศเลิกใช้กรดในการย่อยแป้งในอุตสาหกรรมแล้ว เพราะการใช้กรดทำให้ pH ต่ำ ซึ่งต้องทำให้เป็นกลางโดยการใช้ด่าง ผลที่ได้คือ เกลือซึ่งมีผลต่อรสชาติผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังสิ้นเปลืองในการใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อความเป็นกรดสูงอีกด้วย
2. การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ เริ่มใช้ในปี 1930 การผลิตน้ำตาลจากแป้งโดย ใช้เอนไซม์ เป็นวิธีที่สามารถควบคุมคุณภาพของน้ำตาลได้ดีกว่า คือ มีสารเคมีชนิดอื่นปนเปื้อนน้อย สามารถเพิ่ม

การผลิตน้ำตาลได้มากกว่าการย่อยด้วยกรด(กรดสามารถย่อยได้ประมาณ 87%, เอนไซม์สามารถย่อยได้ปริมาณ 96%) และไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ทนต่อความเป็นกรด และทนต่อความดันในการผลิต ปัจจุบันเอนไซม์ที่นิยมใช้ย่อยแป้ง ได้แก่ α -Amylase และ β -Amylase

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการหมักสาโท

เอนไซม์ที่มีความสำคัญมากในการหมักสาโท คือ เอนไซม์ Amylase ซึ่งเป็น Extra cellular enzyme มีความสามารถในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจากการสร้างของจุลินทรีย์หลายชนิด

เอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยแป้ง สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดตามตำแหน่งการย่อยแป้งดังนี้

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

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

- α -Amylase จะย่อยแป้งที่ตำแหน่ง β -D-(1,4) glycosidic linkage เข้าไปที่ละ 2 หน่วยของกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยพันธะที่ต่อแบบ β -D-(1,6) glycosidic linkage ได้ ผลที่ได้จากการย่อย คือ น้ำตาลมอลโตส และเดกสตรินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เอนไซม์ชนิดนี้ พบได้ในพืชชั้นสูง เช่น ธัญพืช มันเทศ และแบคทีเรียบางชนิด

- Glucoamylase เป็นเอนไซม์ที่พบครั้งแรกในจุลินทรีย์ และพบว่ามีในเนื้อเยื่อของสัตว์ด้วย โดยสามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์จากทางด้าน Non-reducing end ที่ตำแหน่ง β -D-(1,4) glycosidic linkage เข้าไปที่ละ 1 หน่วยกลูโคส แล้วยังสามารถย่อยที่ตำแหน่ง β -D-(1,6) glycosidic linkage และ β -D-(1,3) glycosidic linkage ได้ดีพอๆกับ β -D-(1,4) glycosidic linkage อีกด้วย ดังนั้นผลการย่อยที่สมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคส(D-glucose) เพียงอย่างเดียว

จุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในลูกแป้งสุรา ประกอบด้วย

- เชื้อรา ได้แก่ *Amylomyces rouxii* *Mucor* spp. *Rhizopus* spp. และ *Aspergillus* sp. ปริมาณที่พบมาน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของลูกแป้งสุรา

- ยีสต์ที่พบในลูกแป้งสุราสุรา ส่วนใหญ่จะพบ *Saccharomyces cerevisiae* ในปริมาณมากกว่า *Endomycopsis* spp. (นภา โล่ห์ทอง, 2535) นอกจากนี้ยังมียีสต์อื่นที่พบในลูกแป้งสุราเฉพาะแหล่ง ได้แก่ *Candida* spp. *Pichia* spp. และ *Torulopsis* spp.
- แบคทีเรีย ตรวจพบแบคทีเรียแลคติก ซึ่งส่วนใหญ่ ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* และอาจพบ *Lactobacillus* spp. (นภา โล่ห์ทอง, 2535)

จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ Amylase

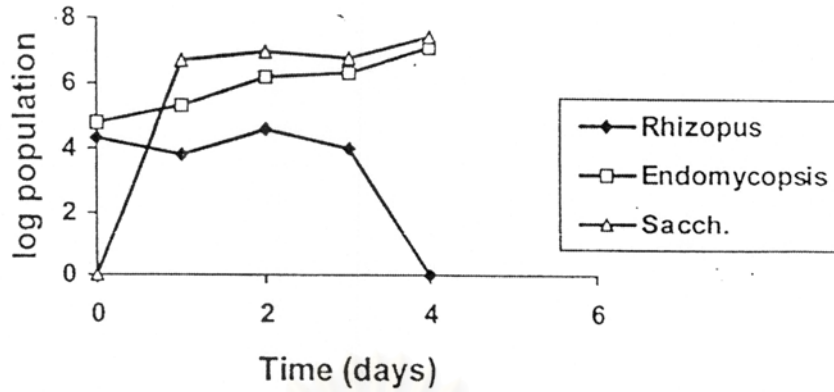
จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ Amylase ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา

- แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ *amylase* ได้แก่ *Bacillus subtilis* (Beckord และคณะ, 1945) *Bacillus mesentericus* (Porter และคณะ, 1937) *Aerobacillus macerans*, *Aerobacillus polymyxa*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus macerans*, *Bacillus polymyxa* (Porter และคณะ, 1937) *Bacillus diastaticus* (Peltier และคณะ, 1945; Walter และคณะ, 1965) *Actinomyces* sp. (Peltier และคณะ, 1945)
- ยีสต์ที่สามารถย่อยแป้งที่สำคัญ คือ *Endomycopsis fibuligera* ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ *glucoamylase* ได้ในปริมาณมาก ส่วนยีสต์อื่นๆที่ผลิต *amylase* ได้ดี คือ *Endomycopsis hordei*, *Endomycopsis lindneri* และ *Endomycopsis javanensis* (จิราภรณ์ สุขุมาวาสี, 2518)
- ราที่สร้างเอนไซม์ *amylase* ได้แก่ *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Monilia* sp. (Le Minse และคณะ, 1947; Sukumavasi, 1973) และราในกลุ่ม *Mucoraceous Fungi* เช่น *Mucor* sp., *Amylomysis* sp. และ *Rhizopus* sp. (Ellis, 1974)

การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท

1. รา

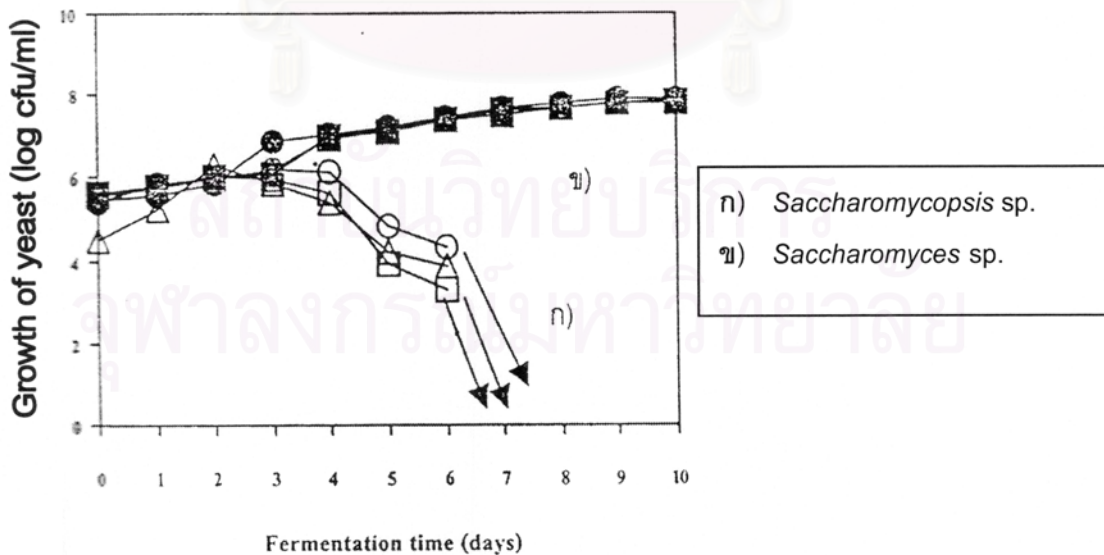
ในระหว่างการหมักสาโท เชื้อราจะเจริญในช่วง 2-3 วันแรกของการหมัก ซึ่งเป็นสภาพการหมักที่ใช้อากาศ เนื่องจากการบรรจุข้าวในถังหมัก จะบรรจุเพียง 1 ใน 4 ของปริมาตร ทำให้ราได้รับออกซิเจนจากอากาศอย่างทั่วถึง จากนั้นเมื่อเกิดน้ำต้อย(น้ำเชื่อมข้าว)ขึ้น และยีสต์เริ่มการหมัก ทำให้มีปริมาณแอลกอฮอล์ และสภาพไร้ออกซิเจน ซึ่งเกิดจากการที่ยีสต์ปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ทำให้ราตายไป ดังกราฟในรูปที่ 1



รูปที่ 1 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท
ที่มา: เจริญ เจริญชัย (2545)

2. ยีสต์

แม้ว่าในลูกแป้งสุราจะมีทั้งยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. และ *Saccharomyces* sp. (นภา โล่ห์ทอง, 2535) แต่ในระหว่างการหมักสาโท *Saccharomycopsis* sp. จะเจริญเพียงช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้นแล้วจะตายไป แต่ยีสต์ *Saccharomyces* sp. จะเจริญเพิ่มขึ้นและทำหน้าที่ในการหมักต่อไป ดังกราฟในรูปที่ 2 โดยยีสต์ *Saccharomyces* sp. จะมีความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ได้ดีกว่า และทนปริมาณแอลกอฮอล์ได้สูงกว่า แหล่งที่มาของยีสต์ที่ทำให้เกิดการหมักนี้ยังไม่ทราบเป็นที่แน่นอน แต่อาจมาจากลูกแป้งสุราเช่นกัน แต่มีอยู่ในลูกแป้งสุราในปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ในสภาพที่เหมาะสมของการหมักสาโท



รูปที่ 2 การเจริญของยีสต์ 2 ชนิด จากลูกแป้งสุราจากผู้ผลิต 3 แห่ง ระหว่างการหมักสาโท

ที่มา: เจริญ เจริญชัย (2545)

การที่ในลูกแป้งสุรามัยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. ซึ่งสามารถย่อยแป้งได้นั้น อาจเป็นเพราะเอนไซม์ของเชื้อราไม่สามารถย่อยแป้งได้หมด เพราะราจะตายไปหลังจากการหมักเพียง 3 วัน ดังนั้นจึงต้องอาศัยเอนไซม์ของยีสต์นี้ ช่วยย่อยแป้งที่เหลือเพื่อให้เกิดเป็นน้ำตาล เพื่อยีสต์จะได้ใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ต่อไป

3. แบคทีเรีย

ปัจจุบันไม่พบรายงานการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการหมักสาโท ทั้งนี้เนื่องจากในการหมักสาโท รา และยีสต์ มีบทบาทมากกว่า

อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียที่สำคัญต่อการหมักสาโทดังนี้

3.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก มีความสำคัญต่อการหมักสาโท ใน 2 ลักษณะคือ แบคทีเรียเหล่านี้มีส่วนในการทำให้สาโทเสื่อมเสียและทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะของผลิตภัณฑ์

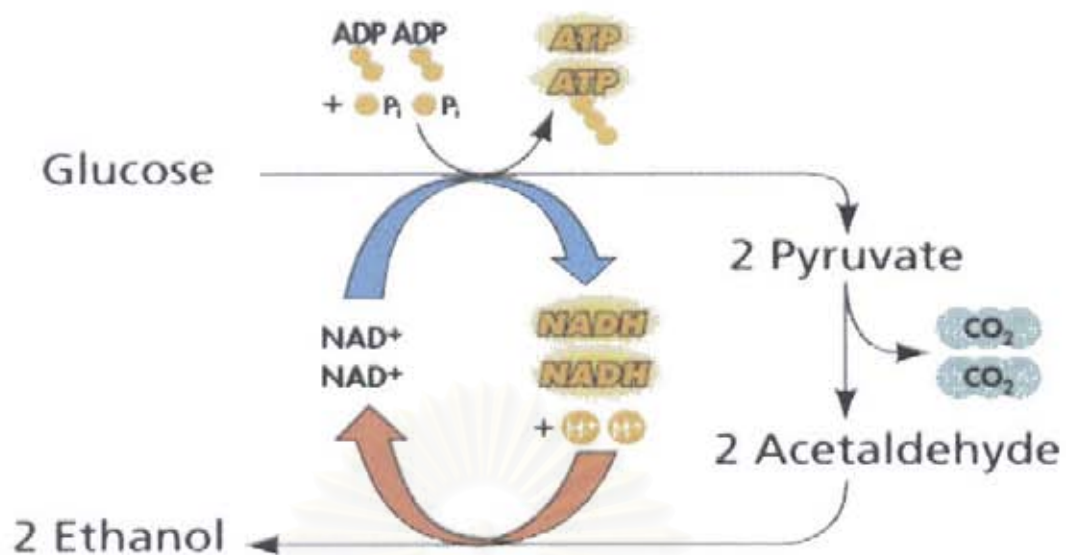
3.2 แบคทีเรียกรดอะซิติก

แบคทีเรียกรดอะซิติก หรือที่เรียกว่า แบคทีเรียกรดน้ำส้ม เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง (rod shaped) ที่สามารถออกซิไดซ์ เอธานอล ให้เป็นกรดอะซิติก (กรดน้ำส้มสายชู) แบ่งเป็น 2 genera คือ *Acetobacter* sp. และ *Gluconobacter* sp. ซึ่งทำให้เกิดการเสื่อมเสียของสาโทเป็นรสเปรี้ยวของน้ำส้มสายชู

กระบวนการหมักของยีสต์

กลูโคสในอาหารที่เลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* จะเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการออสโมซิส (osmosis) ซึ่งอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเข้าสู่เซลล์แล้วจะเปลี่ยนแปลงไป ดังรูปที่ 3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



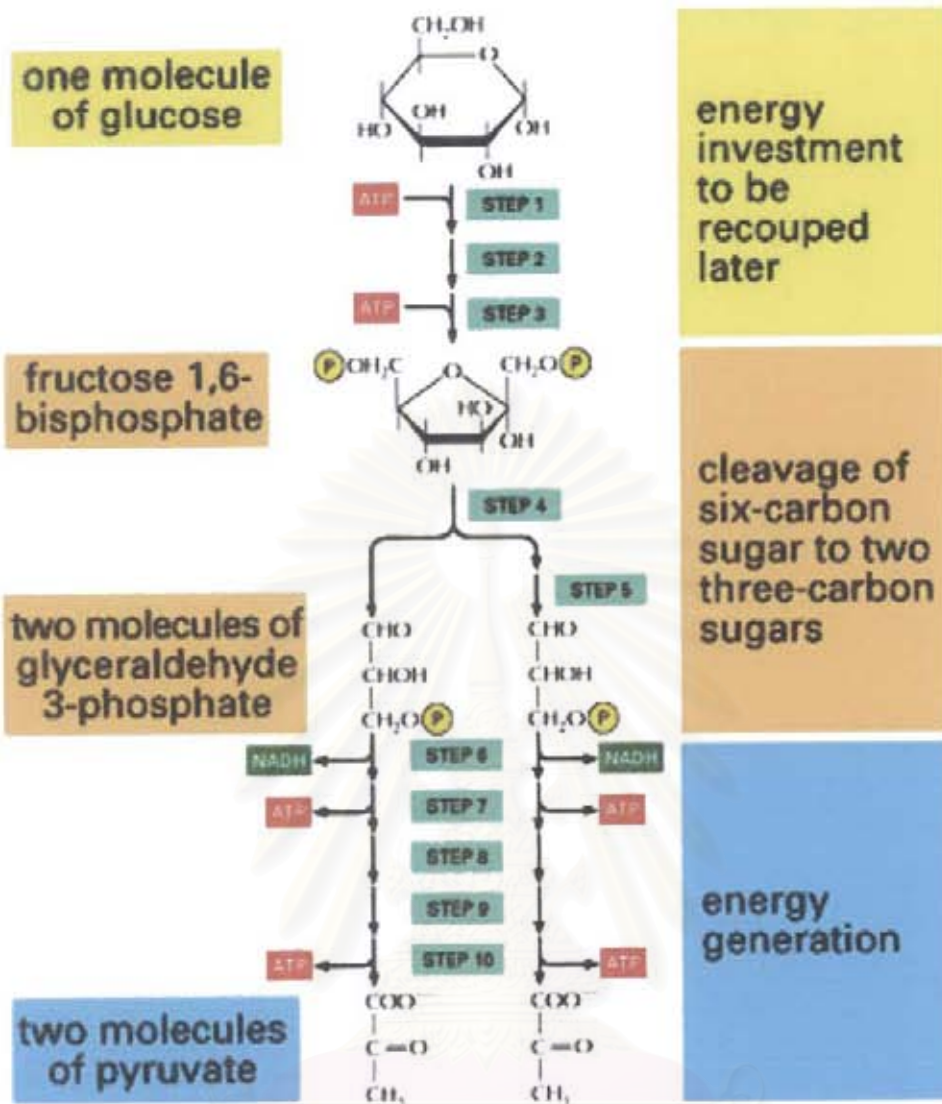
รูปที่ 3 กระบวนการเปลี่ยนแปลงกลูโคสเมื่อเข้าสู่เซลล์

ที่มา: <http://fungifood.tripod.com>

กระบวนการนี้จะทำให้เกิดการสังเคราะห์ ATP ขึ้นมา 2 โมเลกุล ซึ่ง ATP นี้นำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ (biosynthesis) เพื่อให้เซลล์เจริญต่อไป ถ้าขาดแหล่งไนโตรเจน กลูโคสจะถูกสะสมอยู่ในเซลล์ กล่าวคือ ประมาณ 70% ของกลูโคสจะถูกใช้ไป อีก 30% จะถูกสะสมไว้ และยีสต์จะใช้อาหารที่สะสมไว้อย่างช้าๆ ระหว่างการบ่มหรือการเพาะเลี้ยง เรียกว่าเกิดการหมักภายใน (endogenous fermentation)

กระบวนการผลิตแอลกอฮอล์นั้นเป็นกระบวนการย่อยสลายน้ำตาลไปเป็น เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นกระบวนการที่อาศัย The Embden-Meyerhof-Parnas pathway ซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)

รูปที่ 4 The Embden-Meyerhof-Parnas glycolytic pathway for glucose metabolism

ที่มา : <http://fig.cox.miami.edu>

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์

1) ธาตุอาหาร, เกลือแร่ และวิตามิน

- ไนโตรเจน: ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 10% ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็น

- ซัลเฟอร์: ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบประมาณ 0.4% ของน้ำหนักแห้ง โดยอยู่ในรูปของ methionine แต่เนื่องจาก methionine มีราคาแพงมาก ดังนั้นจึงใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแทน

- ฟอสฟอรัส: โดยมากใช้ในรูปของเกลือฟอสเฟต มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ฟอสเฟตจึงเป็น Ionic factor ที่สำคัญที่สุดในการหาอัตราการหมัก

- แร่ธาตุต่างๆ: มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

1. Macroelements ได้แก่ K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn, Cl ยีสต์ต้องการ 0.1-1 มิลลิโมลาร์

2. Microelements ได้แก่ Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni, Na ยีสต์ต้องการในระดับ 0.1-100 ไมโครโมลาร์

3. Inhibitors ได้แก่ Ag, As, Bd, Hg, Li, Ni, Os, Pd, Se, Te ถ้ามีในระดับความเข้มข้นสูงกว่า 10-100 ไมโครโมลาร์ จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการหมักของยีสต์

- วิตามิน: เป็นตัวควบคุม Metabolism ของยีสต์ โดยจะควบคุม Enzyme ที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพราะวิตามินเป็น Coenzyme หรือสารเริ่มต้น (Precursor) ที่ทำให้ Enzyme สามารถทำงานได้เต็มที่ วิตามินที่ยีสต์ต้องการนั้นส่วนใหญ่เป็น Biotin และ Pantothenic acid นอกจากนี้ความต้องการวิตามิน ชนิดอื่นๆขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์

- Growth promoting factor ได้แก่ Amino acid, Nucleic acid, Fatty acid และ Steroid ซึ่งสารเหล่านี้ถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณเอธานอล ในบางกรณีความต้องการ Growth factor ของยีสต์ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม

2) อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีความสำคัญมากในการหมัก ระดับที่ใช้กันในโรงงานอุตสาหกรรมอยู่ที่ประมาณ 30-35°C และทนได้ถึงประมาณ 37°C แต่ถ้าสูงกว่า 40°C ส่วนใหญ่การเจริญเติบโตจะหยุดชะงัก ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการหมักให้ดี เนื่องจากในระหว่างการหมักอุณหภูมิอาจสูงขึ้นอันเนื่องมาจากกิจกรรมของยีสต์ ทำให้เกิดความร้อนแบบ Exothermic energy ทำให้น้ำหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้นได้ เมื่ออุณหภูมิที่หมักสูงขึ้น สาร Secondary metabolites (กลีเซอรอล) ที่จะเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์จะมีปริมาณสูงขึ้นด้วย และพบว่าผลที่ได้ของแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิต่ำมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิสูง

3) พีเอช (pH)

ยีสต์ชอบเจริญในสภาพที่เป็นกรดพอสมควร คือ ในระดับ 3.5-3.8 ถ้า pH ต่ำกว่า 3.5 การเจริญจะลดลง ถ้า pH ต่ำถึง 3.0 หรือ มากกว่านั้นจะไม่มี การเจริญ ดังนั้นจึงมักนิยมปรับ pH ให้อยู่ในช่วงประมาณ 4.0-4.5 ซึ่งสามารถช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียส่วนใหญ่ด้วยการติดตามวัดค่า pH ในช่วงหมักเป็นสิ่งจำเป็น บ่อยครั้งสามารถบอกถึงความผิดปกติในระหว่างการหมักได้

4) ความเข้มข้นของน้ำตาล

สามารถคำนวณปริมาณแอลกอฮอล์ที่ควรหมักได้เมื่อทราบความเข้มข้นของน้ำตาล โดยปกติเราจะใช้ค่าเปอร์เซ็นต์น้ำตาลคูณด้วย 0.55 หรือถ้าประสิทธิภาพของการหมักไม่ดีนัก จะหมักแอลกอฮอล์ 15% ในสภาพปกติ ถ้าต้องการหมักให้ได้แอลกอฮอล์สูงกว่านั้นต้องหมักในที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15°C และเติมน้ำตาลให้ทีละน้อยๆในช่วงการหมักซึ่งจะเป็นไปอย่างช้าๆและใช้เวลามากกว่า 1 สัปดาห์ การหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์สูง นิยมหมักในเครื่องตีประเภทไวน์และสาเก แต่เครื่องตีประเภทกลั่น จะหมักแอลกอฮอล์ในช่วง 8-10% ภายใน 1 หรือ 2 ชั่วโมง ดังนั้นการหมักให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำ แต่ใช้ระยะเวลาสั้นจะให้ผลคุ้มค่าทางเศรษฐกิจมากกว่า การหมักแอลกอฮอล์ต่ำกว่า 8% จะทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น โดยเฉพาะต้นทุนที่เกี่ยวกับการใช้น้ำและการกำจัดของเสีย

น้ำตาลสำหรับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มักอยู่ในรูปของน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโทส แมนโนส ซูโครส มอลโทส กาแลคโทส และราฟไฟโนส ซึ่งหมักได้ 1/3 ของโมเลกุล

การหมักแอลกอฮอล์ที่มีปัญหา ส่วนใหญ่ มาจากน้ำตาลที่มีคุณภาพต่ำ เพราะเก็บไว้นานและมีแบคทีเรียที่สร้างกรดอยู่มาก

5) ความเข้มข้นของเอธานอล

เอธานอลที่ได้จากการหมักอาจมีผลมายับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์ จะเห็นได้ว่าถ้าเอธานอลที่ได้มีความเข้มข้นสูง อัตราการเจริญของยีสต์จะลดลง ซึ่งจะทำให้อัตราการหมักลดลงไปด้วย ทั้งนี้เนื่องจากเอธานอลไปมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase และ Hexokinase และยังมีผลต่อสรีรวิทยาของ membrane ของเซลล์ยีสต์ กล่าวคือ อาจมีการทำลายหรือทำให้ membrane เปลี่ยนแปลงไป

กรดอินทรีย์ (Organic acid) ที่พบในไวน์

กรดต่างๆที่พบในไวน์ส่วนใหญ่มาจากผลองุ่นโดยตรง อย่างไรก็ตามกรดอินทรีย์ที่ได้มีปริมาณน้อยมากและจะถูกผลิตขึ้นมาในระหว่างขั้นแรกของกระบวนการหมัก ปริมาณกรดที่ควรพบในไวน์อยู่ในช่วง 0.55 – 0.85 % และปริมาณกรดที่พึงปรารถนาขึ้นอยู่กับลักษณะและน้ำตาลที่เหลือจากกระบวนการหมักควรอยู่ในช่วง 0.65 – 0.85 % อย่างไรก็ตามองุ่นที่ปลูกบริเวณอากาศเย็นจะให้กรดออกมาในปริมาณที่สูงและถ้าปลูกในเขตอบอุ่นจะทำให้ได้ปริมาณกรดต่ำ ขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งในการทำไวน์มีการปรับกรดก่อนที่จะมีกระบวนการหมักขึ้นเพื่อให้ผลผลิตสุดท้ายมีปริมาณกรดที่เพียงพอเพื่อให้ไวน์เกิดสมดุล กรดอินทรีย์มีความสำคัญในกระบวนการหมักมีอิทธิพล

โดยตรงต่อกลิ่นและสีของไวน์ ต้องมีการควบคุมอย่างระมัดระวังเพื่อให้แน่ใจว่าอยู่ในช่วงของการหมัก และป้องกันไม่ให้เกิดการเน่าเสีย

1. กรดซิตริก (Citric acid)

กรดซิตริกในองุ่นมีปริมาณน้อยมากเพียง 5% ของกรดทั้งหมดซึ่งคล้ายกับกรดมาลิก กรดซิตริกสามารถเปลี่ยนเป็นสารอื่นได้ง่ายโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในไวน์ ตัวอย่างเช่น กรดซิตริกสามารถถูกหมักให้เป็นกรดแลคติกได้และแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกบางชนิดสามารถหมักกรดซิตริกให้เป็นกรดอะซีติกได้เช่นกัน แต่ปริมาณกรดอะซีติกที่มากเกินไปก็ไม่ใช่สิ่งที่ประสงค์ในไวน์ ดังนั้นการที่กรดซิตริกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซีติกจึงประสบปัญหาบ่อย ทำให้ไม่ค่อยพบการนำกรดซิตริกไปปรับน้ำองุ่นให้เป็นกรดมากขึ้นก่อนนำไปสู่กระบวนการหมักไวน์ แต่หลังจากกระบวนการหมักไวน์สิ้นสุดจะมีการเติมกรดซิตริกลงในไวน์เล็กน้อยเพื่อเพิ่มรสและสีในไวน์ทำให้ไวน์มีสีแดงขึ้นแต่ไม่นิยมใช้ในไวน์แดง นอกจากนี้ ปริมาณกรดมีความสำคัญต่อกระบวนการหมักและคุณภาพของไวน์ คือ

- ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ
- มีคุณสมบัติเป็นตัวป้องกันการเกิดออกซิเดชันของซัลเฟอร์ไดออกไซด์
- ทำให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ต้องการเพิ่มขึ้น
- ทำให้ไวน์ใสขึ้น
- ช่วยปรับภาวะสมดุลของไวน์(Rankine, 1989)

2. กรดซัคซินิก (Succinic acid)

กรดซัคซินิกถูกผลิตขึ้นมาโดยยีสต์ พบว่ามีปริมาณน้อยและถูกผลิตขึ้นมาในระหว่างขั้นแรก ของกระบวนการหมัก การผลิตกรดซัคซินิกจะหยุดเมื่อกระบวนการหมักแอลกอฮอล์เกิดแบบสมบูรณ์ กลิ่นที่เกิดจากกรดซัคซินิกจะเป็นการผสมของกลิ่นเปรี้ยว เค็มและขม นอกจากนี้กรดซัคซินิกยังตอบสนองต่อรสชาติของกระบวนการหมักเครื่องดื่มด้วย กรดซัคซินิกมีความเสถียรมากและไม่ค่อยรบกวนการทำงานของแบคทีเรีย

3. กรดแลคติก (Lactic acid)

องุ่นมีปริมาณของกรดแลคติกน้อยมาก กรดแลคติกที่อยู่ในไวน์มี 3 ระดับที่แตกต่างกัน คือ

1. กรดแลคติกที่ปริมาณน้อยมากจากน้ำตาลเกิดโดยยีสต์พบในกระบวนการหมักขั้นแรก
2. กรดแลคติกที่ปริมาณมากซึ่งถูกเปลี่ยนมาจากกรดมาลิกโดยแบคทีเรียในกระบวนการหมักมาโลแลคติกแบคทีเรีย
3. แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดสามารถผลิตได้ทั้งกรดแลคติกและกรดอะซีติกจากน้ำตาล กลีเซอรอลและกรดทาร์ทาริกในไวน์

Lactic souring เป็นรูปแบบที่พบเมื่อน้ำตาลถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกโดยแบคทีเรีย ลักษณะเช่นนี้จะทำให้ไวน์เกิดการเน่าเสีย lactic souring เป็นปัญหาสำหรับผู้ผลิตไวน์มากก่อนที่จะมีการนำซัลเฟอร์ไดออกไซด์มาใช้แก้ปัญหาดังกล่าวกันอย่างแพร่หลายดังเช่นในปัจจุบัน

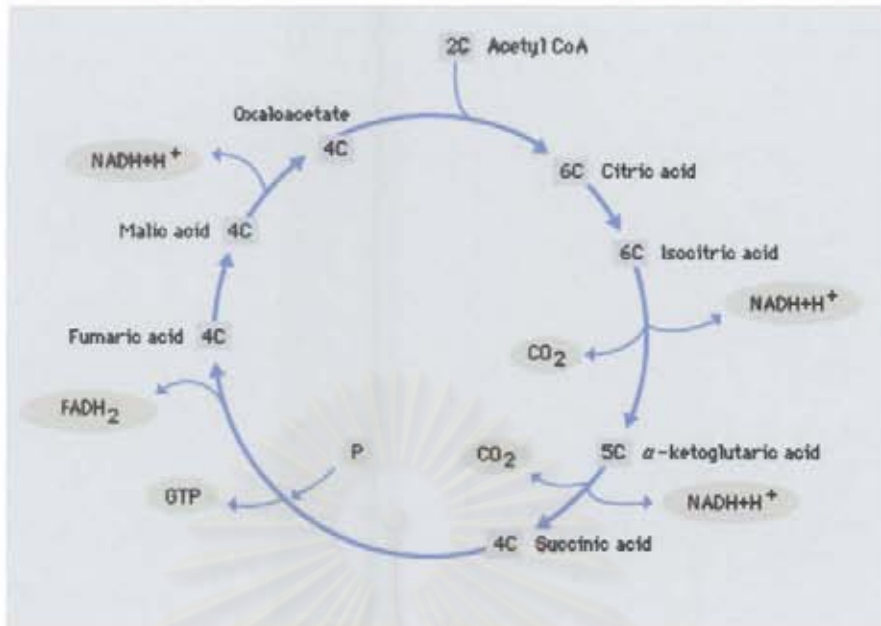
กรดแลคติกสามารถพบได้ทั้งรูปแบบ L-form และ R-form กรดแลคติกที่ผลิตโดยยีสต์จะอยู่ในรูปแบบ L-form และกรดแลคติกที่ผลิตโดยแบคทีเรียจะอยู่ในรูปแบบ R-form ซึ่งกรดแลคติกที่อยู่ในรูปแบบ R-form นั้นสามารถเปลี่ยนไปเป็นรูปแบบ L-form ได้ง่ายในห้องทดลอง ดังนั้นผู้ผลิตไวน์สามารถตรวจสอบปริมาณและชนิดของแบคทีเรียซึ่งทำได้ง่ายกว่าการวัดกรดแลคติกทั้งสองรูปแบบ

4. กรดอะซิติก (Acetic acid)

กรดทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นเป็นกรดที่ระเหยยาก (Fixed acid) ค่อนข้างที่จะเสถียรกล่าวคือมีความดันไอต่ำ ไม่ระเหยง่าย เมื่อไวน์เดือดสารเหล่านี้จะไม่เดือดตามไปด้วยและจะยังคงอยู่ในไวน์และไม่มีความสำคัญต่อกลิ่นอย่างชัดเจน กรดอะซิติกต่างจากกรดที่เสถียรที่กล่าวมาข้างต้น กรดอะซิติกจัดเป็นกรดที่ระเหยง่าย (volatile acid) มีความดันไอสูงและยังเป็นกรดที่ระเหยได้ง่าย มีลักษณะของกลิ่นที่เฉพาะ เมื่อไวน์เดือด กรดอะซิติกจะเดือดอย่างรวดเร็วและจะหายไปสู่อากาศมากเหมือนน้ำและแอลกอฮอล์ พบว่าในองุ่นที่มีคุณภาพดีจะพบกรดอะซิติกในปริมาณน้อย และมีปริมาณหลายระดับที่แตกต่างกัน ดังนี้

1. อยู่ในรูปของยีสต์ มีปริมาณน้อย พบในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์
2. บางรูปแบบพบในระหว่างกระบวนการหมักแบบมาโลแลคติกและแบคทีเรียที่ทำการหมักในไวน์ก็สามารถเปลี่ยนกรดซิดริกไปเป็นกรดอะซิติกได้
3. ในกระบวนการหมักแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถย่อยน้ำตาลให้เป็นกรดอะซิติกได้
4. acetobacter สามารถเปลี่ยน ethyl alcohol ในไวน์ให้เป็นกรดอะซิติกได้และผลิตได้ปริมาณมากด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 แสดง The Citric Acid Cycle

(<http://sciences.aum.edu/bi/BI4523/student/cardwell/kreb.gif>)

วิตามินในไวน์

ปัจจุบันสังคมให้ความสนใจในเรื่องการดูแลสุขภาพมากยิ่งขึ้น มีความสนใจในอาหารเสริมตลอดจนคุณค่าของสารอาหารในอาหารและเครื่องดื่มที่บริโภคมากขึ้น ประเทศเนปาลได้มีการผลิตไวน์ข้าวที่เรียกว่า Poko โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus chinensis* และ *Pediococcus pentosaceus* เมื่อนำ Poko มาวิเคราะห์พบว่าการเพิ่มขึ้นของวิตามินชนิดต่างๆ เช่น pyridoxine, thiamine, vitamin B12 และ niacin เป็นต้น (Shrestha, 2003) ดังตารางที่ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ปริมาณวิตามินที่อยู่ใน Poko ไร่ข้าวของประเทศเนปาล (Shrestha, 2003)

Vitamins	Control rice	<i>Poko</i> with TS*	<i>Poko</i> with DS*
Thiamine(mg%)	0.31 ± 0.06	0.36 ± 0.08	0.41 ± 0.09
Riboflavin(mg%)	0.44 ± 0.06	ND	ND
Pyridoxine(mg%)	0.22 ± 0.08	0.33 ± 0.09	0.35 ± 0.08
Vitamin B12 (mcg%)	0.17 ± 0.09	0.20 ± 0.09	0.26 ± 0.02
Niacin (mg%)	0.52 ± 0.03	1.42 ± 0.03	1.13 ± 0.02

TS – traditional starter , DS – defined starter , ND – not detected

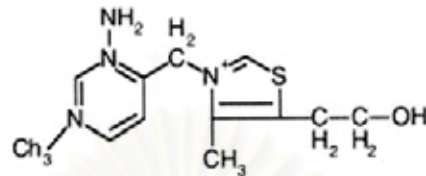
วิตามินเป็นสารอินทรีย์ที่ร่างกายต้องการในปริมาณน้อยแต่มีความจำเป็น ต่อการทำงานของร่างกายนับตั้งแต่การหายใจของเซลล์ การนำโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ไปใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อและผลิตพลังงานสำหรับการดำรงชีวิต นอกจากนี้วิตามินยังเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการทำงานของอวัยวะต่างๆ เช่นการสร้างเม็ดเลือดแดง, การแข็งตัวของเลือด, การสร้างกระดูก การมองเห็นและการทำงานของระบบประสาท วิตามินจึงเป็นตัวจักรเล็กๆแต่มีความสำคัญอย่างยิ่งซึ่งร่างกายจะขาดไม่ได้ ความหมายของวิตามิน (Vitamin) ซึ่งมาจากคำว่า Vita หมายถึง ชีวิต รวมกับคำว่า Amin ซึ่งหมายถึง สารประกอบเคมีหรือสารอินทรีย์ ดังนั้น วิตามิน จึงหมายถึง สารอินทรีย์ที่สำคัญต่อชีวิต (Vita for life)

วิตามินบี1 (Thiamine)

เป็นวิตามินชนิดแรกในวิตามินบีรวมที่เตรียมได้ ชื่อ วิตามินบี1 ตั้งขึ้นในปี ค.ศ. 1927 มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งด้วยเช่น แอนตีนิวริติกแฟคเตอร์ (antineuritic factor) ซึ่งเป็นวิตามินที่ละลายในน้ำ และถูกทำลายด้วยความร้อน ถ้าอยู่ในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นด่างหรือเป็นกลาง ทนได้ถึง 12 องศาเซลเซียสในสารละลายที่เป็นกรด การศึกษาเกี่ยวกับวิตามินบี 1 เริ่มต้นจากการค้นหาสาเหตุของโรคเหน็บชา (beriberi) ในคน และโรคโพลีนิวไรติส (polyneuritis) ในไก่ และสามารถพบว่าโรคนี้รักษาให้หายได้ด้วยสารที่มีไนยีสต์ เมล็ดข้าวสาลี และนม

โครงสร้างและสมบัติ

วิตามินบี1 คือ ไธอามีนไฮโดรคลอไรด์ มีสูตรดังนี้



รูปที่ 6 โครงสร้างของวิตามินบี 1(ไธอามีนไฮโดรคลอไรด์)

วิตามินบี1เป็นผลึกสีขาวละลายในน้ำและแอลกอฮอล์ได้ถึง 70% ไม่ละลายในไขมันและตัวทำละลายไขมัน ถูกทำลายได้ด้วยความร้อนในสารละลายที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง ในสารละลายที่เป็นกรดจะทนความร้อนได้ถึง 150 องศาเซลเซียส

วิตามินบี1 ถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็ก ผ่านเข้าสู่กระแสโลหิตแล้วกระจายไปตามเนื้อเยื่อต่างๆทั่วร่างกาย วิตามินบี1 ประมาณร้อยละ 50 อยู่ที่กล้ามเนื้อลาย ส่วนที่เหลือในร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ของไธอามีน โดยที่ร้อยละ 80 อยู่ในรูปไธอามีนไพโรฟอสเฟต (TPP) นอกจากนี้ก็ยังอยู่ในรูปของไธอามีนไดรฟอสเฟต ไธอามีนโมโนฟอสเฟต และไธอามีนส่วนที่เหลือจากการสะสมก็จะถูกขับออกทางปัสสาวะ เนื่องจากร่างกายมีความสามารถจำกัดในการสะสมวิตามินบี 1 ดังนั้นร่างกายจึงจำเป็นต้องได้รับวิตามินนี้อย่างสม่ำเสมอ วิตามินบี 1 มีความจำเป็นต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และการสังเคราะห์ของกรดอะมิโนบางชนิด การขาดวิตามินบี 1 จะทำให้เบื่ออาหาร ร่างกายไม่เจริญเติบโตน้ำหนักลดลง ถ้ายังขาดแคลนวิตามินบี 1 ต่อไปอีกจะทำให้เกิดโรคเหน็บชา

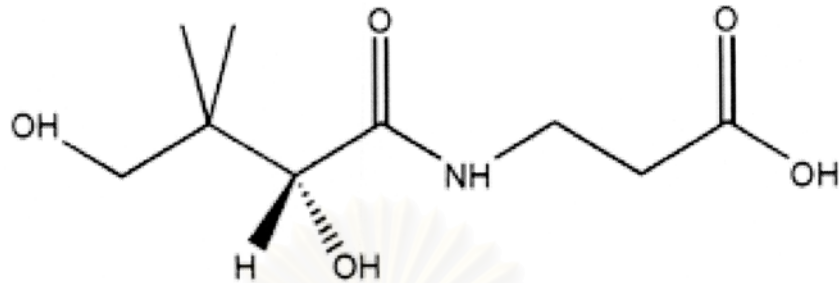
วิตามินบี 1 มีในเมล็ดพืช และผัก เนื้อสัตว์ ตับ ไข่

กรดแพนโทธีนิก (Pantothenic acid)

ชื่อ กรดแพนโทธีนิก มาจากภาษากรีกเรียกว่า แพนโทส (panthos) ซึ่งหมายถึง “มาจากทุกหนทุกแห่ง” (from everywhere)

โครงสร้างและสมบัติ

สูตรของกรดแพนโทธีนิก มีดังนี้



รูปที่ 7 โครงสร้างของกรดแพนโทธีนิก (Pantothenic acid)

กรดแพนโทธีนิกมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองเหนียวละลายในน้ำ ไม่ละลายในน้ำมันหรือตัวทำละลายไขมัน เช่น คลอโรฟอร์ม ไม่ถูกทำลายในสารละลายกรดและด่าง เป็นส่วนประกอบของโคเอนไซม์ เอ ซึ่งเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน และเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลและฮอร์โมนบางชนิด มีในอาหารทั่วไปพบมากในยีสต์ ตับ ไข่ ข้าวสาลี และถั่ว ในน้ำนมคนมีกรดแพนโทธีนิกอยู่ในปริมาณ 2.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนนมวัวมี 3.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

การสูญเสียกรดแพนโทธีนิกเนื่องจากการแปรรูปและการแช่แข็งอาจสูงถึงร้อยละ 50 ดังนั้นจึงมีการใช้แคลเซียมแพนโทธีเนตเป็นวิตามินเสริม อย่างไรก็ตามถ้าได้รับประทานอาหารอย่างถูกหลักโภชนาการแล้วก็ไม่จำเป็นต้องรับประทานวิตามินเสริม คนที่ขาดวิตามินนี้จะมีอาการอ่อนเพลีย ปวดศีรษะ ปวดท้อง ปลายประสาทอักเสบ นอนไม่หลับและการสร้างสารต้านทานเชื้อโรคในร่างกายลดลง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของสาโทที่ผลิตได้

1. ลูกแป้งสุรา กล่าวคือ ในลูกแป้งสุรามีจุลินทรีย์ทั้งชนิดที่จำเป็นและไม่จำเป็นต่อการหมัก ลูกแป้งสุราที่ผลิตในแหล่งที่ต่างกันจะมีชนิดของจุลินทรีย์ที่ต่างกัน ดังนั้นการคัดเลือกลูกแป้งสุรจากแหล่งต่างๆที่ให้กลิ่นและรสชาติของสาโทก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ
2. สายพันธุ์ของข้าวที่ใช้ในการหมัก ข้าวแต่ละสายพันธุ์จะมีคุณสมบัติต่างๆ เช่น ความเหนียวของข้าว กลิ่นหอมของข้าว และรสชาติที่แตกต่างกันไป อันจะส่งผลให้เกิดกลิ่นและรสชาติในสาโทแตกต่างกัน
3. ระยะเวลาในการหมัก
4. การเก็บรักษาหลังการหมัก หากเก็บในภาชนะที่ไม่ดี จะมีผลทำให้กลิ่นและรสชาติที่ดีของสาโทเสียไปได้

เนื่องจากจุลินทรีย์ในลูกแป้งสุรามีความสำคัญต่อคุณภาพของไวน์ข้าว จึงมีรายงานการศึกษาจุลินทรีย์ในหัวเชื้อสำหรับผลิตไวน์ข้าวจากประเทศต่างๆ ดังนี้

Lee และ Fujio (1999) ได้รายงานว่า สามารถแยกยีสต์และราจาก Banh men ซึ่งเป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิต ruou nep ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านของประเทศเวียดนาม และทำการจำแนกโดยใช้สัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี พบว่าราที่แยกได้เป็น *Rhizopus oryzae*, *Mucor indicus*, *Mucor circinilloides* และ *Amylomyces rouxii* ส่วนยีสต์ที่แยกได้เป็น *Saccharomyces cerevisiae*, *Hyphopichia burtonii*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Pichia anomala* และ *Candida* sp.

Sujiya (2004) ได้รายงานเกี่ยวกับ Brem ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านของประเทศอินโดนีเซีย สามารถจำแนกยีสต์โดยใช้วิธีทางอนุชีววิทยาได้ถึง 4 ชนิด คือ *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Pichia anomala* และ *Issatchenkia orientalis* และพบว่า *Saccharomyces cerevisiae* บางสายพันธุ์ (karyotype 3) มีความสามารถในการใช้น้ำตาลในการสร้างเอทานอล และสร้างกรดซักซินิก มากกว่า *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์อื่นๆ (karyotype อื่นๆ)

Tsuyoshi และคณะ (2004) ได้รายงานว่าใน Marcha ซึ่งเป็นไวน์ข้าวจากประเทศอินเดีย โดยทั่วไปพบว่ามี microflora ทั้งราและยีสต์ ได้แก่ *Mucor circinelloides*, *Rhizopus chinensis*, *Saccharomycopsis fibuligella* และ *Pichia anomala* แต่ Marcha ในแคว้นสิกขิม สามารถแยกชนิดของยีสต์เพิ่มขึ้นโดยใช้วิธีทางอนุชีววิทยา สัณฐานวิทยา ชีววิทยา พบยีสต์ถึง 6 ชนิดคือ *Saccharomyces bayanus*, *Candida glabrata*, *Pichia anomala*, *Saccharomycopsis*

fibuligella, *Saccharomycopsis capsularis*, *Pichia burtonii* ซึ่งบางสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลและบางสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้น้ำตาลในการสร้างเอทานอล

การจำแนกราและยีสต์

เดิมการจำแนกราและยีสต์นิยมใช้วิธีทดสอบทางชีวเคมีและสรีระวิทยา ดังเช่น Lee และ Fujio (1999) ทำการจำแนกราและยีสต์จากบารห์เมนซึ่งเป็นหัวเชื้อสำหรับการหมักเบียร์ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ของประเทศเวียดนาม โดยการจำแนกยีสต์และราโดยใช้วิธีทดสอบทางชีวเคมีและสรีระวิทยา เป็นต้น ต่อมาเมื่อมีการพัฒนาทางด้านอนุชีววิทยา จึงได้มีการนำมาใช้ร่วมกับวิธีการจำแนกแบบดั้งเดิม เพื่อการจำแนกยีสต์และรา ดังเช่น Tsuyoshi และคณะ(2005) ได้ทำการคัดแยกยีสต์จากมาร์ชาซึ่งเป็นหัวเชื้อสำหรับการหมักจาร์นซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ของบริเวณเทือกเขาหิมาลัยประเทศอินเดีย เนปาล และภูฏาน โดยในการจำแนกยีสต์ได้ใช้วิธีทดสอบทางชีวเคมีและสรีระวิทยา ร่วมกับการหาลำดับเบสในบริเวณ 18s rDNA ของตัวแทนกลุ่มที่ได้จากการทดสอบทางชีวเคมี แล้วจึงจัดทำเป็นแผนภูมิวิวัฒนาการที่มีรูปร่างแบบต้นไม้ ด้าน Sipiczki และคณะ (2001) ทำการคัดแยกยีสต์ที่มีอยู่ในบริเวณที่ทำกรหมักไวน์ซึ่งใช้วิธีทดสอบทางชีวเคมีและสรีระวิทยา ร่วมกับการใช้การแยกลำดับพันธุกรรม 2 มิติ ต่อมาได้มีการนำวิธี การตัดชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP) ดังเช่น Torija และคณะ (2001) ได้ทำการจำแนกยีสต์ในระหว่างการหมักไวน์โดยไม่ใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ ได้ใช้วิธีการตัดชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP) ในบริเวณ Internal Transcribed spacer (ITS) ร่วมกับการตัดชิ้นส่วนสารพันธุกรรมในไมโตคอนเดรียโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้

การศึกษาจุลินทรีย์ที่แยกได้ในลูกแป้งและสาโทในประเทศไทย

มนตรี เชาว์สังเกต (2521) รายงานว่า สามารถแยกกราและยีสต์จากตัวอย่างข้าวหมาก ลูกแป้งสุรา ข้าวหมาก น้ำข้าว อุ ลูกแป้งสุรา และลูกแป้งอุ 76 ตัวอย่าง ได้ *Rhizopus* spp. 59 ไอโซเลต, *Amylomyces* spp. 28 ไอโซเลต, *Mucor* spp. 61 ไอโซเลต *Saccharomyces* spp. 79 ไอโซเลต และยีสต์ที่มีสายใย (Filamentous yeast) 55 ไอโซเลต เมื่อใช้ *Amylomyces* sp. MM-136 กับ *Saccharomyces cerevisiae* MS50 ในการหมักสาโทจะทำให้สาโทที่ได้มีปริมาณเอทานอลสูง มีปริมาณกรดต่ำ และใช้เวลาในการหมักน้อยกว่าการใช้ลูกแป้งสุราหมักสาโท

สมพร สันธารา(2544) รายงานว่า จากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 38 ตัวอย่าง และ ลูกแป้งสุรา 19 ตัวอย่าง สามารถแยกยีสต์ได้ 43 ไอโซเลต แยกกราได้ 91 ไอโซเลตจากตัวอย่างลูกแป้งข้าว

หมาก และสามารถแยกยีสต์ได้ 49 ไอโซเลต ราได้ 35 ไอโซเลตจากตัวอย่างลูกแป้งสุรา และพบว่า ยีสต์ที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็น *Saccharomycopsis fibuligera* ราที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็น *Rhizopus* spp. และ *Amylomyces* spp. และยังพบอีกว่ายีสต์และราดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้ นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์เกือบทุกไอโซเลตหมักเอทิลแอลกอฮอล์จากกลูโคสได้ในปริมาณต่างๆกัน

จะเห็นได้ว่าการจำแนกยีสต์และราในลูกแป้งของประเทศไทยที่ผ่านมา ใช้วิธีการจำแนกแบบดั้งเดิม โดยการจำแนกราโดยใช้วิธีสัณฐานวิทยา และมีรายงานการจำแนกราในระดับจีโนม เป็นส่วนใหญ่ ส่วนการจำแนกยีสต์ใช้วิธีทางชีวเคมีเท่านั้น

ความหลากหลายของสายพันธุ์ยีสต์และรามีมีความสำคัญต่อความสามารถในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ความสามารถในการใช้น้ำตาลในการสร้างเอทานอล และกลิ่นรสของไวน์ข้าวอีกด้วย ทำให้การศึกษาและจัดจำแนกยีสต์และรามีมีความสำคัญ ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาในแง่ของความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในลูกแป้งสุรามาก่อน

ในกระบวนการหมักโดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่ปฏิบัติกันมาแต่เดิมนั้น มักจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพไม่แน่นอน เช่น มีเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ต่ำหรือสูงเกินไป หรืออาจมีกลิ่นรสที่ไม่ชวนดื่ม ตลอดจนปัญหาอื่นๆอีกมาก ซึ่งส่วนหนึ่งของปัญหาเกิดขึ้นเนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในลูกแป้งสุรา ทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณภาพตลอดจนปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักหรือขยายกำลังการผลิตให้สูงขึ้นจากเดิมได้ หากสามารถศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของชนิดของยีสต์และราในลูกแป้งสุรา และมีการทำ culture collection ก็จะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติที่ดีเพื่อการปรับปรุงคุณภาพของสาโทในด้านต่างๆเช่น ให้มีกลิ่นและรสชาติดีขึ้น การทนต่อ pH ที่เป็นกรด การทนต่ออุณหภูมิสูง เป็นต้น ซึ่งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาเพื่อการผลิตสาโทในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

จังหวัดน่านมีลักษณะภูมิประเทศเป็นที่ราบหุบเขาและป่าที่อุดมสมบูรณ์และมีพื้นที่ป่า 5 ล้านไร่จากพื้นที่จังหวัดทั้งหมด 7 ล้านไร่ ซึ่งน่าจะมีความหลากหลายทางชีวภาพมาก อีกทั้งในจังหวัดน่านนิยมผลิตสาโทกันอย่างแพร่หลายจึงน่าจะมีความหลากหลายทางชีวภาพของชนิดของยีสต์และราในลูกแป้งสุรา ทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์พิเศษเพื่อการปรับปรุงคุณภาพของสาโทได้ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีสต์ และราที่อยู่ในลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้จากจังหวัดน่าน
2. เพื่อแยก และ จำแนกชนิดยีสต์ และ รา ที่พบให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์เพื่อทำเป็น culture collection ของยีสต์และราในลูกแป้งสุรา
3. ศึกษาความสามารถในการย่อยแป้ง(amyolytic activity), ความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ ตลอดจนวิเคราะห์สารอินทรีย์บางชนิดที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งที่คัดเลือกได้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างลูกแป้ง

รวบรวมตัวอย่างลูกแป้งจากอำเภอต่างๆในจังหวัดน่านโดยไปเก็บตัวอย่างด้วยตนเองหรือประสานงานกับบุคคลต่างๆในจังหวัดน่าน

เก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนตุลาคม 2547 ถึง มิถุนายน 2548 โดยเก็บลูกแป้งสุราแหล่งละ 10 ลูก และเก็บรักษาในถุงพลาสติกซิปล็อค แยกไม่ให้ปะปนกัน หลังจากนั้นนำลูกแป้งสุรามากำหนดรหัส และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปแยกเชื้อต่อไป

2. การผลิตสาโทในห้องปฏิบัติการ

เพื่อการคัดเลือกลูกแป้งสุราที่สามารถนำไปผลิตสาโทที่มีคุณภาพดี จึงผลิตสาโทโดยใช้ลูกแป้งสุราจากแหล่งตัวอย่าง 41 แหล่ง บดตัวอย่างลูกแป้งสุรา 2 กรัม ใส่ในข้าวเหนียวหนึ่ง 100 กรัม ที่บรรจุขวดขนาด 500 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้เข้ากัน เติมน้ำในช่วงการหมักวันที่ 3 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างน้ำหมักในทุกวันที่ 3 และ 10 เพื่อคัดเลือกลูกแป้งที่มีความสามารถในการเปลี่ยนของแข็ง(ข้าวเหนียวหนึ่ง)ให้กลายเป็นของเหลว(น้ำต้อย) ปริมาณกลูโคส(มิลลิกรัมต่อลิตร) และ ร้อยละของแอลกอฮอล์ในสาโท

3 .การแยกยีสต์และราจากตัวอย่างลูกแป้งสุรา

เพื่อให้สามารถแยกยีสต์และราได้ทุกชนิดทั้งที่มีจำนวนมากและน้อยในลูกแป้งให้ได้ทั้งหมด จึงแยกโดยใช้วิธี enrichment technique โดยบดตัวอย่างลูกแป้งสุรา 2 กรัม ใส่ในข้าวเหนียวหนึ่ง 100 กรัม ที่บรรจุขวดขนาด 500 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้เข้ากัน โดยเติมน้ำในช่วงการหมักวันที่ 3 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างน้ำหมักในทุกวันที่ 0 , 3, 5, 7 และ 9 ทำการคัดแยกราและยีสต์โดยเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ใส่ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร เจือจางในระดับต่างๆ หยดสารละลายที่ได้ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM (สำหรับเลี้ยงยีสต์ และ Rose bengal agar สำหรับเลี้ยงรา เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารและปมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 -3 วัน แยกจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วเก็บไว้ศึกษาต่อไป โดยยีสต์จะเก็บใน YM agar ผิวหน้าเอียงในหลอดทดสอบ ที่ 4 องศาเซลเซียส และราจะเก็บในหลอดอาหาร PDA ที่ผิวหน้าเอียง ที่ 4 – 10 องศาเซลเซียส

4. จำแนกชนิดยีสต์และราที่อยู่ในลูกแป้งสุราโดยใช้ฐานฐานวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคอณูชีววิทยา

4.1 การจำแนกยีสต์

เนื่องจากยีสต์ที่แยกได้มีจำนวนมาก การจำแนกโดยวิธีทางชีวเคมี ต้องใช้แรงงาน และสิ้นเปลืองเวลาสูง อีกทั้งชุดตรวจทางชีวเคมี (Biochemical test kit) มีราคาสูงมาก คณะผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนแผนการดำเนินการจำแนกยีสต์ จากเดิมที่จะใช้วิธีการตรวจทางชีวเคมีกับทุกๆ ไอโซเลตของยีสต์ มาเป็นวิธีทางอณูชีววิทยา โดยใช้เทคนิค PCR- RFLP เพื่อช่วยจัดกลุ่มของยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งสุราก่อน จากนั้นจะเลือกตัวแทนของยีสต์จากแต่ละกลุ่มเพื่อนำไปทดสอบทางชีวเคมี และหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ต่อไป

เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) เป็นเทคนิคหนึ่งทางอณูชีววิทยา เพื่อศึกษารูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (PCR product) เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ (Restriction enzyme) โดยในงานวิจัยนี้จะใช้เทคนิค PCR- RFLP เพื่อจัดกลุ่มของยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้

4.1.1. สกัดดีเอ็นเอของยีสต์โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว YEPD ที่ 30 องศาเซลเซียส 2-3 วัน บั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วล้างเซลล์โดยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 500 ไมโครลิตร บั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที อีกครั้ง นำเซลล์ที่ได้ใส่ในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำละลาย A 200 ไมโครลิตร (น้ำละลาย A ประกอบด้วย 2 % Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0 และ 1mM EDTA) เติมน้ำ Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25/24/1) 200 ไมโครลิตร และเม็ดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.52-0.45 ไมครอน 0.3 กรัม หลังจากนั้น เขย่าผสมโดยใช้เครื่องเขย่าผสมเป็นเวลา 3 นาที 30 วินาที แล้วจึงเติม TE บัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตร บั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาสกัดด้วย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25/24/1) บั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาเติมเอทานอลบริสุทธิ์ 1 มิลลิลิตร บั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ มาเติม TE บัฟเฟอร์ pH 8.0 400 ไมโครลิตร และ RNase A 30 ไมโครกรัม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเติม แอมโมเนียมอะซิเตต ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอทานอลบริสุทธิ์ 1 มิลลิลิตร และไกลโคเจน ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บ่มที่ 0 - 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงบั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14,000

รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาล้างด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วจึงละลายตะกอนด้วย TE บัฟเฟอร์ 50 ไมโครลิตร

4.1.2. นำดีเอ็นเอมาเพิ่มจำนวนบริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ซึ่งบริเวณ ITS เป็นบริเวณที่อยู่ระหว่าง 18 S rDNA และ 26 S rDNA บริเวณ ITS จะรวมถึง 5.8 S rDNA ด้วยดังรูปที่ 5 บริเวณ ITS เป็นบริเวณที่นิยมใช้ในการจำแนกยีสต์และรา (Heras-Vazquez และคณะ, 2003 ; Granchi และคณะ, 1999 ; Sabate และคณะ, 2002 ; Cappello และคณะ, 2004) ในเทคนิคลูกโซ่พอลิเมอเรส ได้ใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ซึ่งเป็น universal primers ของบริเวณ ITS โดยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 มีลำดับเบสดังนี้ 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' และ 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' ตามลำดับ โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 15 นาที ; 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที เพื่อแยกเส้นดีเอ็นเอต้นแบบเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยว 57 องศาเซลเซียส 30 วินาที ลดอุณหภูมิลงมาให้ primer สามารถจับกับลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันบนดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวได้ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 35 รอบ เกิดการสังเคราะห์เส้นดีเอ็นเอต่อจาก primer 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ -20 องศาเซลเซียส



รูปที่ 8 แสดงบริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) ของ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา: homepages.uni-tuebingen.de

4.1.3 นำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาตัดด้วย *Hin*FI, *Hha*I และ *Hae*III แล้วจึงจัดกลุ่มยีสต์ที่แยกได้ตามรูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรม Quality one จากเครื่อง Gel doc (Bio-rad, USA) ในการวิเคราะห์ผล ผลที่ได้จะเป็นรูปแบบที่แตกต่างกันของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ สามารถจัดกลุ่มโดยรูปแบบที่เหมือนกันจัดเป็นกลุ่มเดียวกัน

4.1.4 สุ่มตัวอย่างของยีสต์จากแต่ละกลุ่มมาทดสอบทางชีวเคมี ซึ่งมีการทดสอบดังนี้

ก. การใช้แหล่งอาหารคาร์บอน โดยลงเชื้อจำนวน 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 500 ไมโครลิตรลงในอาหารยีสต์ในโตรเจนเบสที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน 10 ชมิต ได้แก่ กลูโคส กาแลกโตส ซอร์บิต กลูโคซามีน ไรโบส ซูโครส กลีเซอรอล มอลโทส เมทานอล และแรมโนส

ข. การใช้แหล่งอาหารไนโตรเจน โดยลงเชื้อจำนวน 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ลงในอาหาร ยีสต์คาร์บอนเบสที่เติมแหล่งไนโตรเจน คือ กลูโคซามีน

ค .การหมักแหล่งอาหารคาร์บอน โดยลงเชื้อจำนวน 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร 500 ไมโครลิตร ลงในอาหารยีสต์ในโตรเจนเบสที่มีหลอดดักก๊าซ (Durham's tube) และเติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน 4 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลกโตส มอลโทส และซูโครส

ง .การสร้างสปอร์ ทำได้โดยเลี้ยงยีสต์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออะซิเตต บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงนำมาส่งด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูรูปแบบของสปอร์ที่สร้างขึ้น

4.1.5 ทำการสุ่มตัวอย่างของยีสต์จากแต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ บริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ

4.2 จำแนกรายโดยใช้ฐานานวิทยา อ้างอิงตาม Introduction to food and airborne fungi (Samson และคณะ, 2002) ทำการศึกษาฐานานวิทยาทั้งภายใต้กล้องและดูด้วยตาเปล่า โดยศึกษาขนาดและลักษณะของสปอร์ ขนาดก้านสปอร์ การมีไรซอยด์ การมีคลามัยโดสปอร์ ขนาดของคอแลเมลลา ขนาดของสปอร์แรงเจียม ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato dextrose agar) และ อาหารเลี้ยงเชื้อ MEA (Malt extract agar) แต่ยังมีรายบางสายพันธุ์ที่ยังไม่สามารถจำแนกได้โดยฐานานวิทยา จึงจำเป็นต้องนำเทคนิคทางอนุชีววิทยาเข้ามาร่วมด้วย โดยมีขั้นตอนการทำงานดังนี้

4.2 .1 สกัดดีเอ็นเอของราโดยวิธีเลี้ยงรบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งPDA บ่มที่30 องศาเซลเซียส 3-2 วัน ใช้ cock borer เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่เชื้อเจริญ นำสายใยที่ได้ใส่ในหลอดไมโครพิวล์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Lysis buffer 600 ไมโครลิตร (สารละลาย Lysis buffer ประกอบด้วย 2% CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris pH 8.0 และ 25 mM EDTA) และ Proteinase K (10mg/ml) 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องเซนติพิวล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ เติม Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25/24/1) 1 เท่าของชั้นน้ำ บั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องเซนติพิวล์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาสกัดด้วย Phenol/Chloroform/ Isoamyl alcohol (25/24/1) อีกครั้ง บั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องเซนติพิวล์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาเติม Isopropanol 1 มิลลิลิตร บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที บั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ มาเติม TE บัฟเฟอร์ pH8.0 400 ไมโครลิตร และ RNase A 30 ไมโครกรัม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเติม แอมโมเนียมอะซิเตต ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมเอทานอลบริสุทธิ์ 1 มิลลิลิตร และไกลโคเจน ความ

เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บ่มที่ 0-2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาล้างด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วจึงละลายตะกอนด้วย TE บัฟเฟอร์ 50 ไมโครลิตร

4.2.2 นำดีเอ็นเอมาเพิ่มจำนวนของบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ดังข้อ 4.1.2

4.2.3 นำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ

5. ศึกษาเอกทิวติของแอลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลสในราที่แยกได้

เพื่อคัดเลือกราที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดี โดยทำการเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยแป้งโดยวิธีต่างๆกัน 3 วิธี ดังนี้

5.1 ทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งเป็นของเหลว (Liquefaction) ของราบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยนำราบริสุทธิ์ที่แยกได้ 3 คอร์กบอร์เรอร์ ใส่ในข้าวเหนียวหนึ่ง 100 กรัม ที่บรรจุขวดขนาด 500 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยนของแข็ง(ข้าวเหนียวหนึ่ง)ให้กลายเป็นของเหลว(น้ำต้อย)

5.2 ศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Starch agar) โดยถ่ายรา 1 คอร์กบอร์เรอร์ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

5.3 ศึกษาเอกทิวติของแอลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลสในราที่แยกได้ โดยเลี้ยงราได้ในอาหารเหลว Starch medium ซึ่งประกอบด้วย Soluble starch ความเข้มข้น 3%, ยีสต์เอ็กแทรกซ์ 3 กรัม เปปโตน 3 กรัม และน้ำตาลกลูโคส 5 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตรบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน

5.3.1 ศึกษาเอกทิวติของแอลฟาอะมัยเลสทำได้โดย นำน้ำเลี้ยงเชื้อ 0.5 มิลลิลิตรมาเติมลงใน reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย soluble starch ความเข้มข้น 3% ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรใน 0.25 M sodium acetate buffer pH 5.0 บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNSA) (Miller, 1959) โดย 1 unit ของ α -amylase activity เทียบเท่ากับการปลดปล่อย 1 ไมโครโมล ของน้ำตาลรีดิวซ์ ในเวลา 1 นาที

5.3.2 ศึกษาเอกทิวติของกลูโคอะมัยเลส ทำได้โดย นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาเติมลงใน reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย 1% (w/v) soluble starch ซึ่งละลายใน 0.1 M citrate phosphate buffer,

pH 5.0 บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หาปริมาณกลูโคสโดยวิธี peroxidase/glucose oxidase assay (Cereia และคณะ, 2000) โดย 1 unit ของ glucoamylase activity เทียบเท่ากับการปลดปล่อย 1 ไมโครโมล ของ กลูโคส ในเวลา 1 นาที

6. ศึกษาความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอลจากยีสต์

คัดเลือกยีสต์ที่สามารถหมักให้ได้เอทานอล และทนเอทานอลได้ดี เนื่องจากยีสต์ที่หมักให้ได้เอทานอลสูงมาจากยีสต์ กลุ่ม *Saccharomyces sensu stricto* ผู้วิจัยจึงได้เลือกยีสต์ กลุ่ม *Saccharomyces sensu stricto* ที่แยกได้จากวันที่ 9 ของการหมักมาทำการศึกษา โดยลงเชื้อ *M. hiemalis* N6/0/9 ลงในข้าวเหนียวหนึ่ง 200 กรัม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เติมน้ำปลอดเชื้อ 400 มิลลิลิตร แบ่งน้ำหมักที่ได้ ใส่ลงในขวดปลอดเชื้อขวดละ 5 มิลลิลิตร แล้วจึงลงยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำน้ำหมักดังกล่าวมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) รุ่น 3800 Varian ใช้คอลัมน์ CP-WAX 52C ภายใต้สภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	:	แคปพิลลารี คอลัมน์ (capillary column) รุ่น CP-WAX 52CB เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มม .ความยาว 30 ม.
อุณหภูมิของ injector	:	250 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ Column	:	40 องศาเซลเซียส (4 นาที) เพิ่มอุณหภูมิให้เท่ากับ 130 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียสต่อนาที
อุณหภูมิของ Detector	:	250 องศาเซลเซียส (ใช้ detector ชนิด FID)
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	:	ก๊าซไนโตรเจน (อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที)
ปริมาณตัวอย่าง	:	1 ไมโครลิตร

คำนวณหาปริมาณเอทานอล (หน่วยเป็นร้อยละของเอทานอล) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอล

7. วิเคราะห์กลิ่นรสในตัวอย่างสาโท

7.1 ศึกษากลิ่นรสของสาโทโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัส (Sensory test)

นำสาโทที่หมักได้มาทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยคัดเลือกผู้ทดสอบที่มีความเชี่ยวชาญและคุ้นเคยกับการดื่มสาโท จำนวน 10 คน ทำการชิมและให้คะแนนในแบบทดสอบ (ภาคผนวก จ)

7.2 วิเคราะห์สารประกอบให้ก่ลิน (Volatile compound) ในตัวอย่างสาโทโดยใช้เทคนิค Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)

นำตัวอย่างสาโทที่ได้เก็บในหลอดฝาเกลียวที่ปราศจากเชื้อ ขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS) เก็บตัวอย่างสาร ให้ก่ลินบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อจัดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและ คำนวณกับสารมาตรฐาน ที่สภาวะดังนี้

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

7.3 วิเคราะห์กรดอินทรีย์ในตัวอย่างสาโทโดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำตัวอย่างสาโทที่ได้มากรองผ่านเซลลูโลสอะซีเตต pore size ขนาด 0.22 ไมโครเมตร วิเคราะห์ตัวอย่างสาโทโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์

Animex HPX-87H Ion Exclusion 300x7.8 mm โดยมี 20 mM H₂SO₄ เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที และ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

8. วิเคราะห์สารอินทรีย์บางชนิดในตัวอย่างสาโท

8.1 วิเคราะห์ปริมาณวิตามินบางชนิดในตัวอย่างสาโท

นำตัวอย่างสาโทที่ได้มากรองผ่านเซลลูโลสอะซีเตต pore size ขนาด 0.22 ไมโครเมตร วิเคราะห์ตัวอย่างสาโทโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ Column LC-3A UV detector ที่ 212 นาโนเมตร

ชนิดของ column	LC-3A
Flow rate	0.45 มิลลิลิตรต่อนาที
ชนิดของ detector	Ultraviolet detector (UV) ที่ 212 นาโนเมตร
ปริมาตรฉีด	100 ไมโครลิตร

8.2 วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในสาโท

8.2.1 วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (Total antioxidant activity)

นำตัวอย่างสาโท 100 ไมโครลิตร เติม 0.04 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (pH 7.0) ปริมาณ 400 ไมโครลิตร มาผสมกับ linoleic acid emulsion ใน 0.04 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (pH 7.0) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการหยุดปฏิกิริยา โดยทำการเติม 20 มิลลิโมลาร์ เฟอร์ริกคลอไรด์(FeCl₃) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และ แอมโมเนียมไธโอไซยาเนต(NH₄SCN) ความเข้มข้น 30% ปริมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร โดยมี BHA(Butyl Hydroxyl Anisole) 1 กรัมต่อลิตร วิตามินซี (Ascorbic acid) 0.1 กรัมต่อลิตร และ วิตามินอี(Tocopherol) 1 กรัมต่อลิตร เป็นชุดควบคุมผลบวก และใช้น้ำกลั่น เป็นชุดควบคุมผลลบ

8.2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing capacity)

นำตัวอย่างสาโท 60 120 และ 240 ไมโครลิตร ใน น้ำกลั่นปริมาตรสุดท้าย 500 ไมโครลิตร มาผสมกับ 0.2 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (pH 6.6) ปริมาณ 1.25 มิลลิลิตร และโพแตสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์(K₃Fe(CN)₆) ความเข้มข้น 1% ปริมาณ 1.25 มิลลิลิตร บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้น 10% ปริมาณ 1.25 มิลลิลิตร บ่ม เหยี่ยงด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ที่ความเร็ว 1,000 g เป็นเวลา 10 นาที ตูดชั้นบนมา 1.25 มิลลิลิตร ทำการเติม น้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร และ เฟอร์ริกคลอไรด์(FeCl₃) 0.25 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืน

แสงที่ 700 นาโนเมตร โดยมี BHA (Butyl Hydroxyl Anisole) 1 กรัมต่อลิตร วิตามินซี (Ascorbic acid) 0.1 กรัมต่อลิตร และ วิตามินอี (Tocopherol) 1 กรัมต่อลิตร เป็นชุดควบคุมผลบวก และน้ำแช่ข้าวเหนียวหนึ่ง เป็นชุดควบคุมผลลบ

8.2.3 วิเคราะห์ Free radical scavenging activity

นำตัวอย่างสาโท 60 120 และ 240 ไมโครลิตร ใส่ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 500 ไมโครลิตร มาผสม 0.1 มิลลิโมลาร์ 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl radical (DPPH radical) ปริมาณ 500 ไมโครลิตรในเอทานอล แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยมี BHA (Butyl Hydroxyl Anisole) 1 กรัมต่อลิตร วิตามินซี (Ascorbic acid) 0.1 กรัมต่อลิตร และ วิตามินอี (Tocopherol) 1 กรัมต่อลิตร เป็นชุดควบคุมผลบวก และน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุมผลลบ

8.2.4 วิเคราะห์ Superoxide anion scavenging activity โดยใช้วิธี แซนธิน-แซนธิน ออกซิเดส

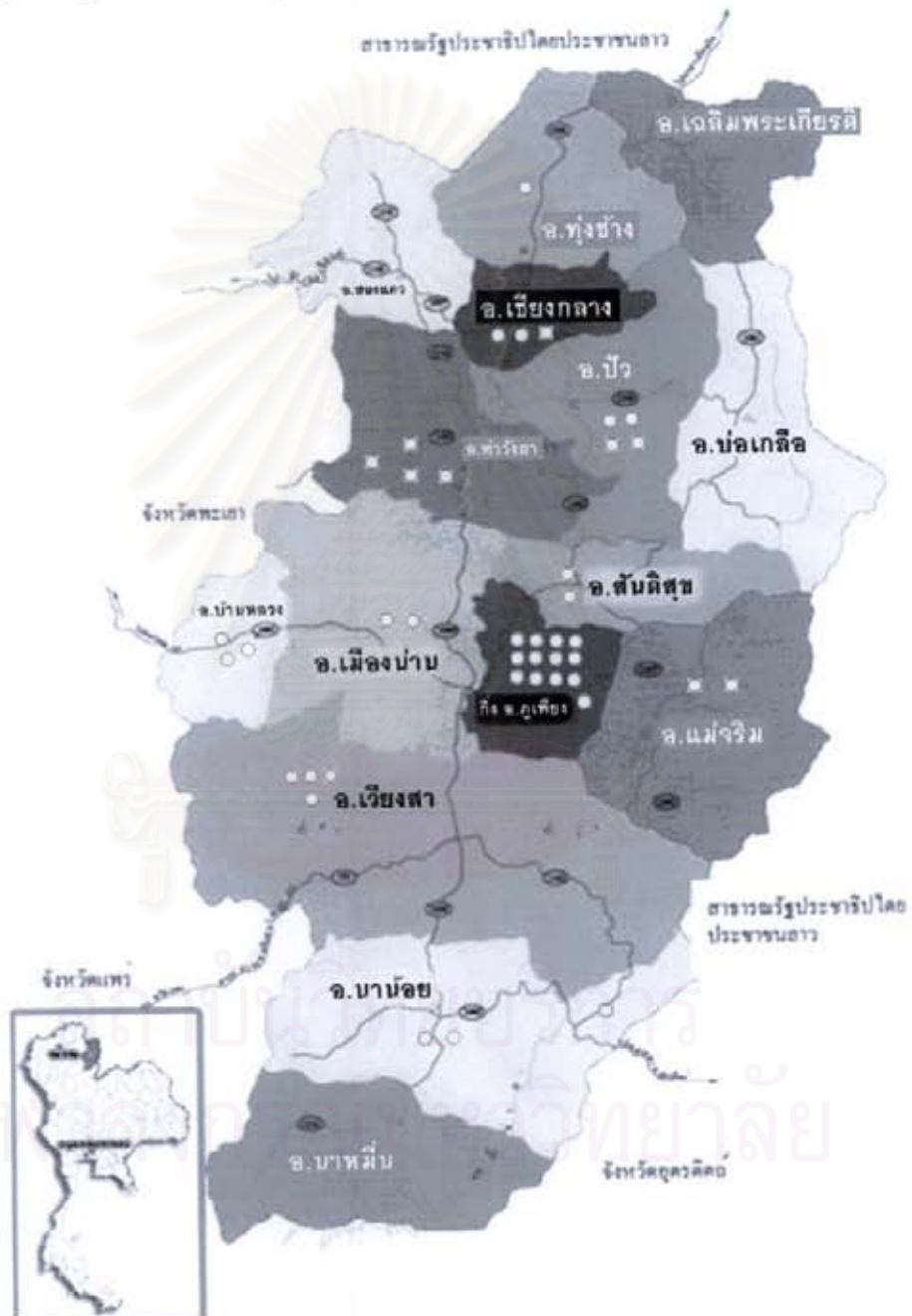
นำตัวอย่างสาโท 60 120 และ 240 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่นที่ปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 500 ไมโครลิตร มาผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของ สารผสม 0.4 มิลลิโมลาร์ แซนธิน (Xanthine) และ 0.24 มิลลิโมลาร์ ไนโตรบลู เตตระโซเดียม คลอไรด์ ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (pH 8.0) และ แซนธิน ออกซิเดส (0.049 U/ml) ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (pH 8.0) 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยทำการเติม 69 มิลลิโมลาร์ โซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต(SDS) 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร และโดยมีน้ำแช่ข้าวเหนียวหนึ่ง เป็นชุดควบคุมผลลบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างลูกแบ่ง

สามารถเก็บตัวอย่างลูกแบ่งจากอำเภอต่างๆในจังหวัดน่านได้ทั้งหมด 41 ตัวอย่าง โดยแหล่งของตัวอย่างลูกแบ่งสุราได้แสดงไว้ในรูปที่ 9 และตารางที่ 3



รูปที่ 9 แหล่งที่เก็บตัวอย่างลูกแบ่งสุราจากอำเภอต่างๆในจังหวัดน่าน
○ แสดงแหล่งที่เก็บตัวอย่างลูกแบ่งสุราจากอำเภอต่างๆในจังหวัดน่าน

ตารางที่ 3 จำนวนแหล่งที่เก็บตัวอย่างลูกแป้งสุราจากอำเภอต่างๆในจังหวัดน่าน

อำเภอ	จำนวนแหล่งที่มาของตัวอย่างลูกแป้งสุรา
กิ่ง อ.ภูเพียง	13
อ.เวียงสา	4
อ.บ้านหลวง	3
อ.เชียงกลาง	3
อ.ปัว	4
อ.เมือง	2
อ.ทุ่งช้าง	1
อ.นาน้อย	3
อ.ท่าวังผา	4
อ.แม่จริม	2
อ.สันติสุข	2
รวม	41

การที่มีแหล่งตัวอย่างลูกแป้งสุราจากกิ่ง อ. ภูเพียงเป็นจำนวนมากเนื่องมาจากในกิ่ง อ. ภูเพียง มีการส่งเสริมให้ทำสาโทเป็นหนึ่งในตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์(OTOP) ผู้ผลิตลูกแป้งจึงมีจำนวนมาก ส่วนใน อ. เจลิมพระเกียรติ และ อ. บ่อเกลือไม่มีตัวอย่างลูกแป้งเนื่องจากตามสภาพดินของทั้งสองอำเภอเป็นดินเค็มชาวบ้านจึงนิยมผลิตเกลือสินเธาว์มากกว่าการผลิตสาโท และใน อ.สองแควจะไม่นิยมผลิตสาโท จึงทำให้ไม่มีตัวอย่างลูกแป้ง

ลูกแป้งจากทุกตัวอย่างมีลักษณะคล้ายกันคือมีลักษณะกลมแบนสีขาวนวล ขนาดประมาณ 3.5-1.9 x 3-4 ลูกบาศก์เซนติเมตร มีเพียง 1 แหล่งตัวอย่างลูกแป้งได้แก่รหัส NN128 ที่มีลักษณะต่างออกไป คือมีลักษณะรีคล้ายเรือ ขนาดกว้าง 6 ซม.ยาว 10 ซม. มีสีขาวคล้ำเล็กน้อย



รูปที่ 10 แสดงตัวอย่างลักษณะลูกแป้งที่เก็บได้

ตารางที่ 4 รหัสของตัวอย่างลูกแป้งที่เก็บจากอำเภอต่างๆในจังหวัดน่าน

รหัส	แหล่งตัวอย่างลูกแป้งจากจังหวัดน่าน
NN1	ต.ทำน่าว กิ่ง อ.ภูเพียง
NN2	ต.น่าน้อย อ.น่าน้อย
NN3	ต.สวก อ.เมือง
NN4	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง
NN5	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง
NN6	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง
NN7	อ.บ้านหลวง
NN8	ต.สวด อ.บ้านหลวง
NN9	ต.นาเหลียง กิ่ง อ.ภูเพียง
NN10	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง
NN11	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง
NN12	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง
NN13	ต.น้ำมวบ อ.เวียงสา
NN14	ต.น้ำเกียน กิ่ง อ.ภูเพียง
NN15	ต.ส้าน อ.เวียงสา
NN16	ต.น้ำเกียน กิ่ง อ.ภูเพียง
NN17	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง
NN18	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง
NN19	ต.ทรายแก้ว กิ่ง อ.ภูเพียง
NN20	ต.สวด อ.บ้านหลวง
NN21	ต.น้ำมวบ อ.เวียงสา
NN22	ต.ปงสนุก อ.เวียงสา
NN23	ต.งอบ อ.ทุ่งช้าง
NN24	ต.พระพุทธบาท อ.เชียงกลาง
NN25	ต.เปือ อ.เชียงกลาง
NN26	ต.นาซาว อ.เมือง
NN27	ต.ศิลาแลง อ.ปัว

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัส	แหล่งตัวอย่างลูกแป้งจากจังหวัดน่าน
NN28	ต.ศิลาแลง อ.ปัว
NN29	ต.เขียงกลาง อ.เขียงกลาง
NN30	ต.วงนคร อ.ปัว
NN31	ต.แสนทอง อ.ท่าวังผา
NN32	ต.ผาตอ อ.ท่าวังผา
NN33	ต.สถาป อ.ปัว
NN34	ต.นาทะนุง อ.น่าน้อย
NN35	ต.นาทะนุง อ.น่าน้อย
NN36	ต.ดั่งจุม อ.ท่าวังผา
NN37	ต.จอมพระ อ.ท่าวังผา
NN38	ต.หม่อมเมือง อ.แม่จริม
NN39	ต.แม่จริม อ.แม่จริม
NN40	ต.ป่าแลวหลวง อ.สันติสุข
NN141	ต.ป่าแลวหลวง อ.สันติสุข

คณะผู้วิจัยได้ทำการแยกราและยีสต์จากตัวอย่างลูกแป้ง 41 แหล่งที่เก็บได้จากจังหวัดน่าน โดยทำการแยกเชื้อ 2 วิธี คือ การนำตัวอย่างลูกแป้งมาเจือจางและทำการเพาะเชื้อโดยตรง (Dilution plate count) และ การเพิ่มจำนวนของเชื้อโดยวิธีการหมักเพื่อผลิตสาโท(Enrichment method) โดยทั้งสองวิธีได้ทำการแยกเชื้อที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาไม่ซ้ำกัน จากการแยกเชื้อดังกล่าวสามารถแยกยีสต์ได้ 124 ไอโซเลต โดยยีสต์แต่ละไอโซเลตจะมีปริมาณตั้งแต่ 1×10^5 ถึง 1×10^8 cfu ต่อลูกแป้ง 1 กรัม ตัวอย่าง และสามารถแยกราได้ 75 ไอโซเลต โดยราแต่ละไอโซเลตจะมีปริมาณตั้งแต่ 1×10^4 - 4.5×10^6 cfu ต่อลูกแป้ง 1 กรัม หลังจากนั้นจึงทำการจัดกลุ่มของยีสต์โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ทำให้สามารถจัดกลุ่มของยีสต์ที่แยกจากลูกแป้งได้เป็นกลุ่มทั้งหมด 16 กลุ่ม ได้แก่ *S. cerevisiae*, *P. anomala*, *C. tropicalis*, *S. paradoxus* เป็นต้นและจำแนกราที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้ง มาจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกได้เป็น *Mucor hiemalis*, *Mucor racemosus*, *Mucor circinelloides*, *Mucor indicus* (*Amylomyces roxii*), *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus oryzae*, *Syncephalastrum recemosum*, *Penicillium* sp.

และ *Aspergillus* sp. จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่าสามารถพบยีสต์อย่างน้อย 16 ชนิด และพบราได้อย่างน้อย 10 ชนิด จากลูกแป้งสุราที่เก็บจากจังหวัดน่าน พบราอย่างน้อย 2 ชนิดคือ *Syncephalastrum recemosum* ซึ่งเป็นราที่พบได้ในดิน และ *Aspergillus* sp. ซึ่งจากการจำแนกเบื้องต้น พบว่าไม่ใช่ *Aspergillus oryzae* โดย *Aspergillus* sp. ที่พบน่าจะเป็นราที่ปนเปื้อนมาจากอากาศในขั้นตอนการผลิตลูกแป้งสุรา

2. การคัดเลือกลูกแป้งสุราที่ดี

เนื่องจากคณะผู้วิจัยมีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงและรักษาคุณภาพของสาโทให้ดีขึ้นหรือรักษาคุณภาพที่ดีอยู่ให้คงที่จึงจำเป็นต้องคัดเลือกและแยกแยะและยีสต์จากลูกแป้งสุราที่มีคุณภาพดี เพื่อศึกษาความหลากหลายของราและยีสต์เฉพาะในลูกแป้งที่คัดเลือกได้ และทำการอนุรักษ์ และปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไป จึงคัดเลือกลูกแป้งสุราจาก 41 ตัวอย่าง นำไปผลิตเป็นสาโทและวัดความสามารถในการเปลี่ยนของแข็ง (ข้าวเหนียว) เป็นของเหลว (น้ำต้อย) (Liquifaction) ในช่วง 3 วันแรกของการหมัก ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร) ทั้งในน้ำต้อยและสาโท และ ปริมาณเอทานอลในสาโท ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว (liquefaction) ปริมาณกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร) และร้อยละของแอลกอฮอล์ในสาโท ที่ผลิตได้จากตัวอย่างลูกแป้งทั้งหมดที่เก็บได้จากจังหวัดน่าน

รหัสลูกแป้งสุรา	ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว	ปริมาณกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ร้อยละของแอลกอฮอล์ในสาโท
		ในน้ำต้อย	ในสาโท	
NN1	+++	428.77	4.08	9.74
NN2	+++	169.78	2.24	9.20
NN3	+++	748.20	5.01	9.05
NN4	+++	273.38	3.37	10.83
NN5	++++	3292.08	6.35	9.11
NN6	+++++	2757.55	1.55	14.19
NN7	+++	1602.88	1.67	13.50
NN8	++++	2164.03	4.09	9.49
NN9	+++	1464.03	6.13	7.80

ตารางที่ 5 (ต่อ)

รหัสลูกแบ่งสุรา	ความสามารถในการ เปลี่ยนของแข็งให้ กลายเป็นของเหลว	ปริมาณกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ร้อยละของแอลกอฮอล์ในสาโท
		ในน้ำด้อย	ในสาโท	
NN10	++++	1484.89	3.65	9.59
NN11	+	1223.02	59.43	2.69
NN12	++++	1553.96	2.07	8.48
NN13	+++	595.68	6.13	7.65
NN14	+	892.50	14.07	5.95
NN15	+++	414.39	4.57	12.78
NN16	++++	1766.91	2.19	9.68
NN17	+++	1412.95	2.50	8.34
NN18	+++	725.18	2.91	9.07
NN19	+++	313.67	5.67	8.41
NN20	++	2089.21	3.45	9.25
NN21	++	1574.10	5.87	10.32
NN22	++	1317.99	3.86	8.15
NN23	++	1732.37	48.66	6.74
NN24	+++	161.15	3.54	9.15
NN25	++++	1309.35	3.42	8.14
NN26	+++	3271.94	54.33	6.94
NN27	+++	1335.25	5.27	7.90
NN28	++++	546.76	31.40	10.03
NN29	+++	610.07	1.67	10.21
NN30	++	926.62	3.31	7.62
NN31	++++	1201.88	1.18	8.24
NN32	++	1985.61	2.33	11.59
NN33	+++	246.75	3.11	8.7

ตารางที่ 5 (ต่อ)

รหัสลูกแบ่งสุรา	ความสามารถในการ เปลี่ยนของแข็งให้ กลายเป็นของเหลว	ปริมาณกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ร้อยละของแอลกอฮอล์ในสาโท
		ในน้ำต้อย	ในสาโท	
NN34	+++	241.72	3.28	8.05
NN35	+++	362.59	2.79	6.81
NN36	+++	2693.52	1.64	10.51
NN37	++++	1297.84	3.08	7.22
NN38	+++	500.72	1.67	9.22
NN39	++	1269.06	1.27	9.51
NN40	++++	351.08	3.05	6.74
NN41	+++	3162.58	4.06	7.71

+ → +++++ หมายถึง ปริมาณของของเหลว(น้ำต้อย)ที่ได้ จากน้อยไปมาก

เนื่องจากคณะผู้วิจัยต้องการคัดเลือกลูกแบ่งสุราที่มีจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ในการย่อยแบ่งให้เป็นน้ำตาลได้สูงในน้ำต้อย และมีกิจกรรมเอนไซม์ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้สูงในน้ำหมักสาโท รวมทั้งได้สาโทที่มีกลิ่นรสดี จากการดมและชิมจากผู้เชี่ยวชาญ ผลจากตารางที่ 4 ประกอบกับผลการดม และชิมสาโทที่ได้ ทำให้สามารถคัดเลือกลูกแบ่งสุราได้ 3 แห่งที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ได้แก่ ลูกแบ่ง NN6 (จากกิ่ง อ.ภูเพียง) NN25 (จาก อ.เชียงกลาง) และ NN27 (จาก อ.บัว) (ตารางที่ 4) เนื่องจากลูกแบ่งทั้งสาม ให้ค่าการเปลี่ยนของแข็งเป็นของเหลวได้สูง (+++ → +++) ได้ความเข้มข้นกลูโคสที่สูงในน้ำต้อย (1,309.35 – 2,757.55 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งบ่งบอกถึงการมีจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ รา ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ในการเปลี่ยนข้าวเหนียวเป็นน้ำต้อยได้ดี ในขณะที่ได้สาโทที่มีความเข้มข้นกลูโคสที่ต่ำ (1.55 – 5.27 มิลลิกรัมต่อลิตร) และปริมาณเอทานอลที่สูง (ร้อยละ 7.90 - 14.19) ซึ่งบ่งบอกถึงจุลินทรีย์โดยเฉพาะยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลและเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ดี เป็นที่น่าสังเกตว่าในตัวอย่างลูกแบ่งบางตัวอย่าง เมื่อหมักแล้วได้น้ำต้อยที่มีปริมาณกลูโคสสูง แต่พบว่าในสาโทที่ได้กลับมีปริมาณเอทานอลที่ต่ำ ทั้งนี้อาจเกิดจากในตัวอย่างลูกแบ่งนั้น มีราและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแบ่งได้ดี แต่มียีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลได้ไม่ดี ดังนั้นกลูโคสที่มีปริมาณสูงในน้ำต้อยจึงถูกยีสต์นำไปใช้เพื่อการเจริญและเปลี่ยนไปเป็นเมแทบอไลต์อื่นๆ แทน

3. การคัดแยกยีสต์และราจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้

จากตัวอย่างลูกแป้ง 3 แหล่งที่คัดเลือกได้ ได้นำมาผลิตสาโทเพื่อแยกยีสต์และรา ในวันที่ 0,3 ก่อนและหลังการผ่านน้ำ, 5, 7 และ 9 ได้ผลดังตารางที่ 5 ส่วนตารางที่ 6 แสดงจำนวนไอโซเลตของยีสต์และราที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกได้

จากตารางที่ 6 พบว่าสามารถแยกราได้เฉพาะวันที่ 0 ของการหมักจากทั้ง 3 ตัวอย่างลูกแป้ง โดยมีจำนวน 9×10^3 , 8×10^3 และ 3×10^4 cfu/g ตามลำดับ และมีการเจริญของยีสต์จาก 10^6 cfu/g ในวันที่ 0 จนถึง 10^9 cfu/ml ในวันที่ 9

ตารางที่ 6 จำนวนของยีสต์และราจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้ โดยทำการแยกเชื้อในวันที่ 0,3 ก่อนและหลังการผ่านน้ำ, 5, 7 และ 9

รหัสของลูกแป้งสุรา	วันที่ทำการแยกเชื้อ	จำนวนไอโซเลตของยีสต์	จำนวนของยีสต์ (cfu/g)	จำนวนไอโซเลตของรา	จำนวนของรา (cfu/g)
NN6 (จากกิ่ง อ.ภูเก็ต)	D0	30 (10^4)	0.003×10^6	9 (10^3)	9×10^3
	D3/1	36 (10^5)	3.6×10^6	NT(10^3)	NT(10^3)
	D3/2	64 (5×10^4)	3.2×10^6	NT(10^1)	NT(10^1)
	D5	66 (10^6)	66×10^6	NT(10^1)	NT(10^1)
	D7	57 (10^6)	57×10^6	NT(10^1)	NT(10^1)
	D9	43 (10^6)	43×10^6	NT(10^1)	NT(10^1)
NN25 (จาก อ.เชียงใหม่)	D0	32 (10^5)	0.32×10^7	8 (10^3)	8×10^3
	D3/1	37 (5×10^5)	1.85×10^7	NT(10^3)	NT(10^3)
	D3/2	24 (10^6)	2.4×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
	D5	29 (10^7)	29×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
	D7	34 (5×10^7)	170×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
	D9	31 (10^8)	310×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
NN27 (จาก อ.บัว)	D0	30 (5×10^5)	0.15×10^7	3 (10^4)	3×10^4
	D3/1	36 (10^6)	3.6×10^7	NT(10^3)	NT(10^3)
	D3/2	37 (10^6)	3.7×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
	D5	30 (10^7)	30×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
	D7	27 (10^7)	26.5×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
	D9	30 (10^7)	30×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
รวมจำนวนไอโซเลต		681		20	

NT= non detectable D=วันที่ทำการแยกเชื้อ D3/1 และ D3/2 = วันที่ 3 ก่อนและหลังการผ่านน้ำตามลำดับ

ตัวเลขในวงเล็บหมายถึง dilution factor

4. การจำแนกชนิดยีสต์และราที่อยู่ในลูกแป้งสุรา

4.1 การจำแนกชนิดของราโดยสัณฐานวิทยา

เมื่อนำราที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งจากข้อ 3 มาจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาทั้งภายใต้กล้องและด้วยตาเปล่า โดยศึกษา ขนาดและลักษณะของสปอร์ ขนาดก้านสปอร์ การมีไรซอยด์ การมีคลอมาทอยด์สปอร์ การมีโปรเจคชั่น และขนาดของสปอร์แรงเฉยัม ได้ผลการจำแนกดังตารางที่ 7 พบว่าสามารถจำแนกราที่แยกได้ เป็น *Mucor hiemalis* จำนวน 6 ไอโซเลต *Mucor racemosus* 10 ไอโซเลต และ *Mucor indicus* 4 ไอโซเลต

ตารางที่ 7 ผลการจำแนกรราในลูกแป้งสุราโดยสัณฐานวิทยา (อ้างอิงตาม Samson และคณะ, 2002; de Hoog และคณะ, 2000)

รหัสของรา	การมี projection	การมีคลอมาทอยด์สปอร์	ลักษณะก้านสปอร์	ขนาดของก้านสปอร์ (ไมโครเมตร)	การเจริญที่อุณหภูมิ 40 °C	ลักษณะสปอร์แรงจิออสปอร์			ชื่อสปีชีส์
						ลักษณะ	สี	ขนาด (ไมโครเมตร)	
NN6/0/1	-	+++	branch	72	-	Subglobose	Hyaline	5.2× 6.0	<i>Mucor racemosus</i>
NN6/0/2	-	+++	branch	75	-	Subglobose	Hyaline	6.5× 6.8	<i>Mucor racemosus</i>
NN6/0/3	-	+++	branch	74	-	Subglobose	Hyaline	4.9× 4.8	<i>Mucor racemosus</i>
NN6/0/4	-	-	unbranch	73	-	ellipsoidal	Hyaline	5.9× 3.4	<i>Mucor hiemalis</i>
NN6/0/5	-	-	unbranch	75	-	ellipsoidal	Hyaline	6.3× 3.9	<i>Mucor hiemalis</i>
NN6/0/6	-	-	unbranch	79	-	ellipsoidal	Hyaline	6.4×4.5	<i>Mucor hiemalis</i>
NN6/0/7	-	-	unbranch	75	-	ellipsoidal	Hyaline	6.8×5.1	<i>Mucor hiemalis</i>
NN6/0/8	-	-	unbranch	70	-	ellipsoidal	Hyaline	6.3×4.0	<i>Mucor hiemalis</i>
NN6/0/9	-	-	unbranch	71	-	ellipsoidal	Hyaline	6.5×4.1	<i>Mucor hiemalis</i>
NN25/0/1	-	+	branch	87	+	ellipsoidal	Hyaline	5.4×3.9	<i>Mucor indicus</i>
NN25/0/2	-	+++	branch	75	-	Subglobose	Hyaline	5.8× 6.5	<i>Mucor racemosus</i>
NN25/0/3	-	+++	branch	72	-	Subglobose	Hyaline	6.2× 6.8	<i>Mucor racemosus</i>
NN25/0/4	-	+++	branch	78	-	Subglobose	Hyaline	4.9× 5.2	<i>Mucor racemosus</i>
NN25/0/5	-	+++	branch	71	-	Subglobose	Hyaline	5.9× 6.2	<i>Mucor racemosus</i>
NN25/0/6	-	+++	branch	75	-	Subglobose	Hyaline	6.8× 7.0	<i>Mucor racemosus</i>
NN25/0/7	-	+++	branch	73	-	Subglobose	Hyaline	4.8× 5.4	<i>Mucor racemosus</i>
NN25/0/8	-	+++	branch	75	-	Subglobose	Hyaline	4.2× 5.5	<i>Mucor racemosus</i>
NN27/0/1	-	+	branch	84	+	ellipsoidal	Hyaline	4.2× 6.8	<i>Mucor indicus</i>
NN27/0/2	-	+	branch	76	+	ellipsoidal	Hyaline	4.9× 5.4	<i>Mucor indicus</i>
NN27/0/3	-	+	branch	95	+	ellipsoidal	Hyaline	4.6×5.2	<i>Mucor indicus</i>

4.2 การจำแนกชนิดของราโดยวิธีอณูชีววิทยา

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของตัวแทนกลุ่มราที่คัดแยกได้ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของรา

รหัส	สปีชีส์	% similarity กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล
NN6/0/1	<i>Mucor racemosus</i>	100
NN6/0/9	<i>Mucor hiemalis</i>	100
NN27/0/3	<i>Mucor indicus</i>	100

จากตารางที่ 8 พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ NN6/0/1 NN6/0/9 และ NN27/0/3 กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันจากฐานข้อมูล (www.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Mucor racemosus* *Mucor hiemalis* และ *Mucor indicus* เป็น 100 100 และ 100% ตามลำดับ

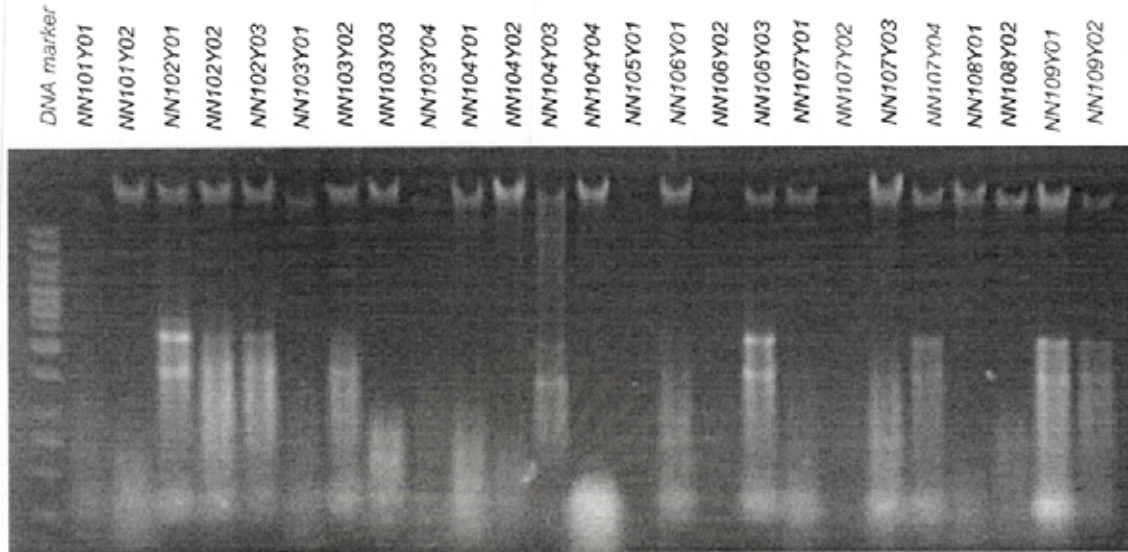
4.3 การจำแนกชนิดของยีสต์

เนื่องจากแยกได้ยีสต์จำนวนมาก จึงทำการจัดกลุ่มยีสต์ก่อนนำไปจำแนกต่อไป โดยอาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) มาช่วยจัดกลุ่มของยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งสุรา โดยนำยีสต์แต่ละไอโซเลต มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ ได้ผลดังรูปที่ 11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขนาด
กิโลเบส)

10---
9---
8---
7---
6---
5---
4---
3---
2.5---
2---
1---

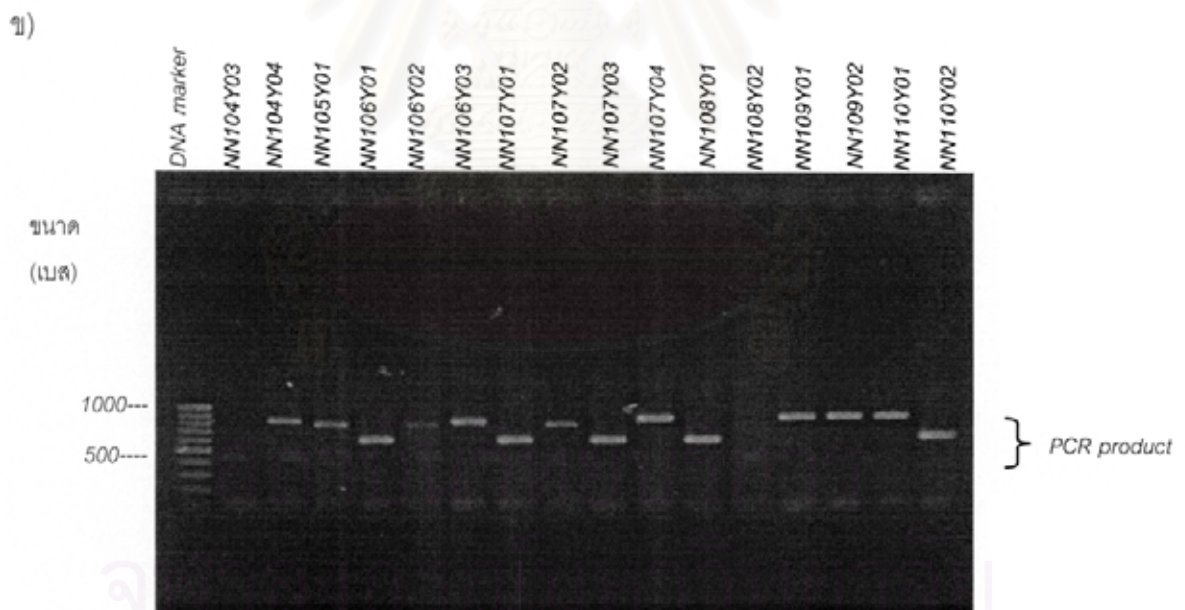
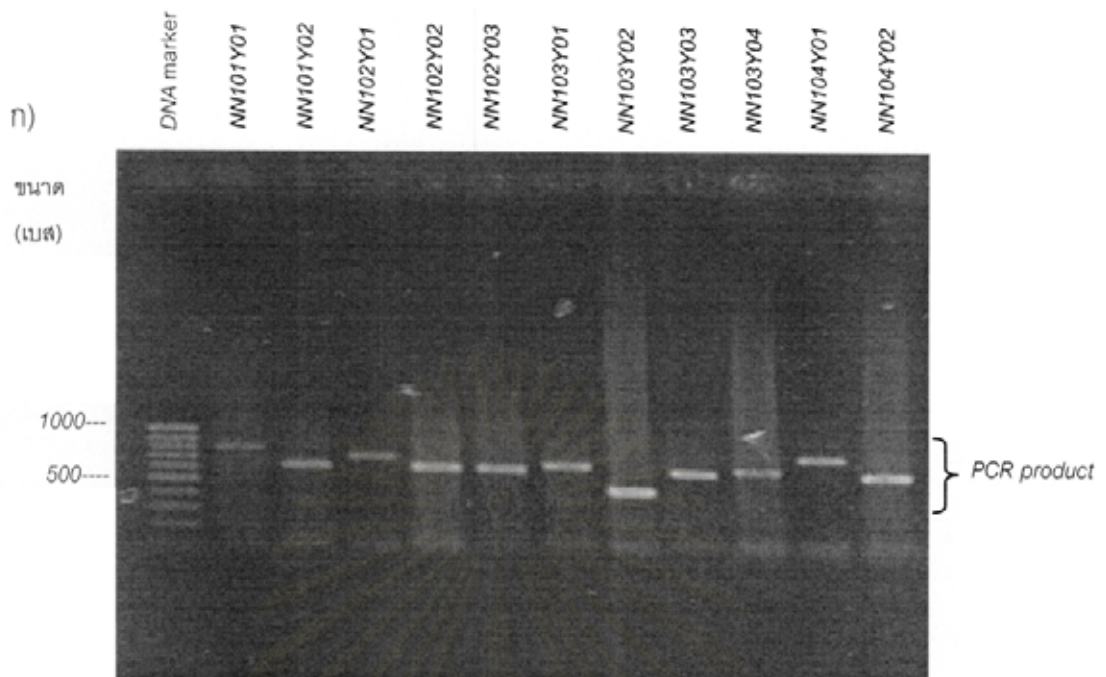


จีโนมิก
ดีเอ็นเอ

รูปที่ 11 แสดงตัวอย่างของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์ที่แยกได้

หลังจากนั้นใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ได้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นดังรูปที่ 12

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



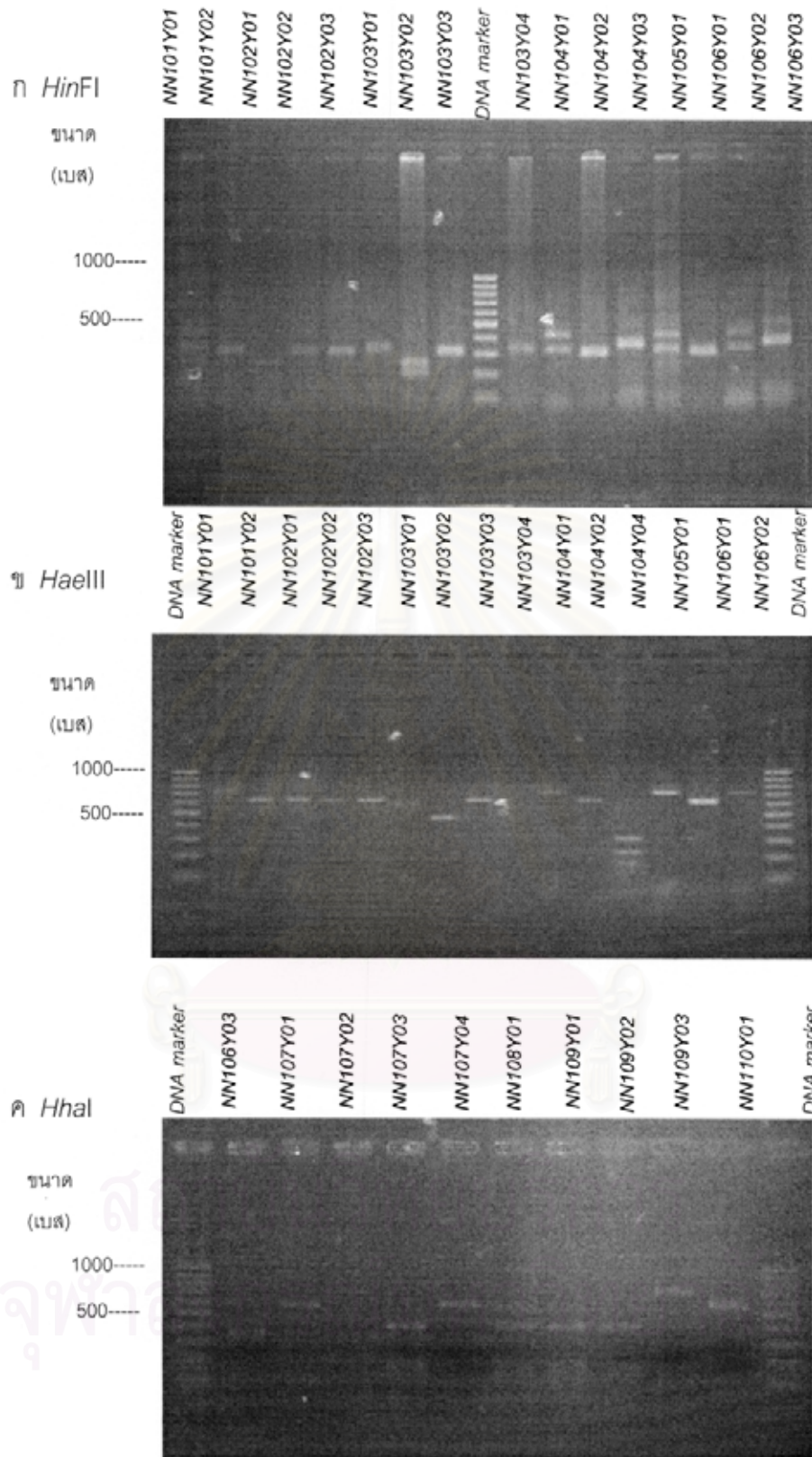
รูปที่ 11 ตัวอย่างของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีสต์ที่แยกได้ ก) ตัวอย่างลูกแบ่ง NN101Y02 - NN104Y02 ข) ตัวอย่างลูกแบ่ง NN104Y03 - NN110Y02

จากผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณไรโบโซมอลของยีสต์ไฮโซเลตต่างๆ พบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันมี 1 ผลิตภัณฑ์ จากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากยีสต์แต่ละไฮโซเลต โดยมีขนาดอยู่ระหว่าง 500- 880 เบส

เพื่อศึกษารูปแบบของชิ้นส่วนของไรโบโซมอลดีเอ็นเอจากยีสต์แต่ละไฮโซเลต เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ (restriction enzyme) จึงนำเอาผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ 3 ชนิด คือ *HinFI*, *HhaI* และ *HaeIII* ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 13



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 แสดงตัวอย่างของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีสต์ที่แยกได้ ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ที่จำเพาะ

ก) เอนไซม์ที่จำเพาะ *HinFI* ข) เอนไซม์ที่จำเพาะ *HaeIII* และ ค) เอนไซม์ที่จำเพาะ *HhaI*

จากรูปที่ 13 จะเห็นได้ว่า ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีสต์รหัส NN106Y03 ถึง NN110Y01 ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ที่จำเพาะ *HinFI*, *HhaI* และ *HaeIII* ได้รูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถจัดกลุ่มของยีสต์ที่แยกจากลูกแบ่งได้เป็นกลุ่มทั้งหมด 5 กลุ่ม ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การแบ่งกลุ่มยีสต์ที่แยกได้ตามรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8srDNA-ITS2 โดยวิธี PCR-RFLP

กลุ่ม	จำนวนไอโซเลต	ขนาดของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (เบส)	ขนาดของ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (เบส)		
			<i>HinFI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>
1	531	880	360,350,180	320,230,180,130	385,365
2	93	510	220,140	380	300,200,170
3	40	650	320,270	630	630
4	9	750	350,200,180	750	320,310,105
5	8	500	280,220	390	190

จากตารางที่ 9 บ่งบอกถึงการมีชนิดของยีสต์ที่ต่างกัน 5 ชนิดใน 3 ตัวอย่างลูกแบ่งที่คัดเลือกได้ จึงได้เลือกตัวแทนกลุ่มยีสต์แต่ละกลุ่มแบบสุ่มเพื่อนำไปยืนยันการจำแนกชนิดของยีสต์โดยวิธีทางชีวเคมีและวิธีทางอนุชีววิทยาต่อไป

4.3.2 การจำแนกชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8srDNA-ITS2

ทำการสกัดจีโนมดีเอ็นเอจากยีสต์ตัวแทนแต่ละกลุ่ม นำไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8srDNA-ITS2 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 นำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่ ไปวิเคราะห์ลำดับเบส และนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลจาก www.ncbi.nlm.nih.gov ชนิดของยีสต์ที่จำแนกได้ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การจำแนกชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA เทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

กลุ่มยีสต์	ชนิดของยีสต์	% Similarity กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูล GenBank	
		บริเวณ ITS1-5.8srDNA-ITS2	บริเวณ D1 และ D2 ของ 26s rDNA
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	ND
2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99	ND
3	<i>Pichia anomala</i>	100	ND
4	<i>Pichia anomala</i>	92% to <i>P. anomala</i>	99% to <i>P. anomala</i>
5	<i>Issatchenkia orientalis</i>	99	ND

ND = non determine

การจำแนกโดยใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ตารางที่10) พบว่า มีความคล้ายกับตัวแทนกลุ่ม 4(N6/3.2/12) ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Pichia anomala* เพียงร้อยละ 92 เท่านั้น เพื่อยืนยันว่าเป็นยีสต์ *Pichia anomala* หรือไม่จึงได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ D1-D2 ของ 26 srDNA ต่อไป

โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์ N6/3.2/12 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้คู่ไพรเมอร์ NL1 และ NL4 เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1-D2 ของ 26s rDNA ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันกับที่มีในฐานข้อมูล GenBank พบว่าตัวแทนของยีสต์ในกลุ่มที่ 4 มีร้อยละความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ D1-D2 ของ 26s ไรโบโซมอล ดีเอ็นเอกับของ *Pichia anomala* ถึงร้อยละ 99 แสดงว่ายีสต์ในกลุ่มที่ 4 เป็น *Pichia anomala* ด้วยเช่นกัน แต่มีพอลิมอร์ฟิซึมของยีสต์ในสปีชีส์เดียวกัน ซึ่งการมีพอลิมอร์ฟิซึมอาจเป็นผลจากสภาพสิ่งแวดล้อมได้

4.3.3 การจำแนกยีสต์โดยวิธีทางชีวเคมี

จากการจำแนกชนิดของยีสต์โดยใช้ลักษณะทางชีวเคมีได้ผลดังตารางที่ 11 โดยที่ N6/0/1 N6/9/1 27/0/30 N6/3.2/12 และ 25/7/3 เป็นตัวแทนของกลุ่มที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้จากการแบ่งกลุ่มยีสต์ที่แยกได้ตามรูปแบบขึ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8s rDNA-ITS2 โดยวิธี PCR-RFLP

ตารางที่ 11 การจำแนกชนิดของยีสต์โดยใช้ลักษณะทางชีวเคมี* (Barnet, 1999)

กลุ่มของยีสต์ (รหัสของยีสต์ตัวแทนกลุ่ม)	C-assimilation**										Fermentation**				N- assimilation** Gls	Ascospore	
	Glu	Gal	Sor	Gls	Rib	Su	Gly	mal	met	Rham	Glu	Gal	Mal	Su			
ชนิดของยีสต์ที่จำแนกได้																	
กลุ่ม 1 (N6/9/1) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Oval
	+	v	-	-	-	v	-	v	-	-	+	v	v	v	-	-	Oval
กลุ่ม 2 (N6/0/1) <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Hat shape
	+	-	-	-	v	v	+	+	-	-	v	-	v	-	-	-	Hat shape
กลุ่ม 3 (N6/3.2/12) <i>Pichia anomala</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	Hat shape
	+	v	-	-	v	+	+	v	-	-	+	v	v	v	-	-	Hat shape
กลุ่ม 4 (N27/0/30) <i>Pichia anomala</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	Hat shape
	+	v	-	-	v	+	+	v	-	-	+	v	v	v	-	-	Hat shape
กลุ่ม 5 (N25/7/3) <i>Issatchenkia orientalis</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Round
	+	-	-	v	v	-	v	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Round

* ลักษณะทางชีวเคมีที่สามารถแยกความแตกต่างของสปีชีส์ได้

** ตัวย่อน้ำตาลต่างๆ Glu=กลูโคส Gal= กาแลคโตส Sor= ซอร์บิต Gls= กลูโคซามีน Rib=ไรโบส Su= ซูโครส Gly= กลีเซอรอล mal=มอลโตส met= เมทานอล Rham=แรมโนส

*** + สามารถเจริญได้, - ไม่สามารถเจริญได้ และ v สามารถเจริญหรือไม่สามารถเจริญได้

จากตารางที่ 11 พบว่าตัวแทนยีสต์กลุ่มที่ 1, 2, 4 และ 5 (N6/9/1 N6/0/1 27/0/30 และ 25/7/3) มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน การหมักและรูปร่างสปอร์เหมือนกับ *Saccharomyces cerevisiae* *Saccharomycopsis fibuligera* *Pichia anomala* และ *Issatchenkia orientalis* ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถจำแนกกลุ่มที่ 1, 2, 4 และ 5 (ตารางที่8) ได้ว่าเป็น *Saccharomyces cerevisiae* *Saccharomycopsis fibuligera* *Pichia anomala* และ *Issatchenkia orientalis* ตามลำดับ ส่วนยีสต์ตัวแทนกลุ่มที่ 4 (N27/0/30) มีรูปแบบการใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และรูปร่างสปอร์คล้ายกับของยีสต์ตัวแทนกลุ่มที่ 3 (N6/3.2/12) แต่ต่างกันเฉพาะความสามารถในการใช้น้ำตาล galactose เท่านั้น เมื่อเทียบกับผลการจำแนกโดยวิธีชีวเคมี และวิธีอณูชีววิทยา ปรากฏว่าให้ผลสอดคล้องกัน และสามารถระบุชนิดได้ว่าเป็น *P. anomala* ทั้งสองกลุ่ม

5. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรของราและยีสต์ในลูกแบ่งที่คัดเลือกได้

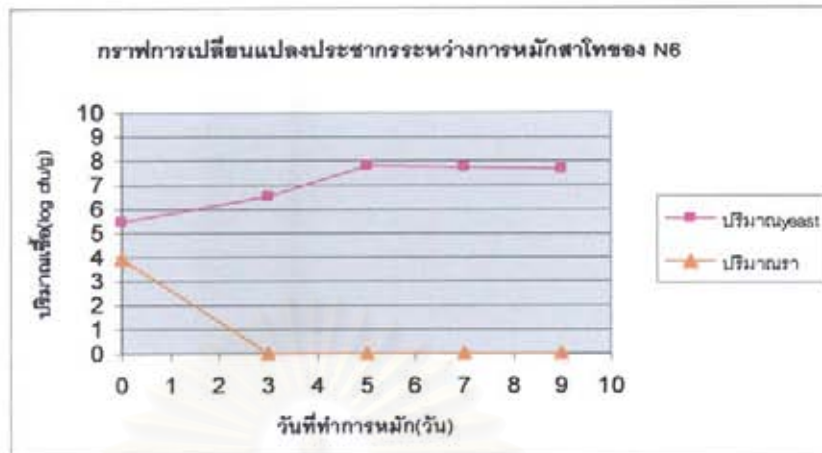
การศึกษากการเปลี่ยนแปลงประชากรของราและยีสต์ในลูกแบ่งที่คัดเลือกได้จะเป็นองค์ความรู้เพื่อความเข้าใจถึงบทบาทของยีสต์และราแต่ละชนิดที่มีต่อกระบวนการหมักสาโท ตลอดจนเพื่อนำไปสู่การปรับปรุงคุณภาพของสาโทต่อไป

จากผลการทดลองในตารางที่ 5 ทำให้ทราบถึงภาพรวมของการเปลี่ยนแปลงของประชากร
และยีสต์ในระหว่างการหมักสาโท ซึ่งสามารถแสดงดังรูปที่ 14

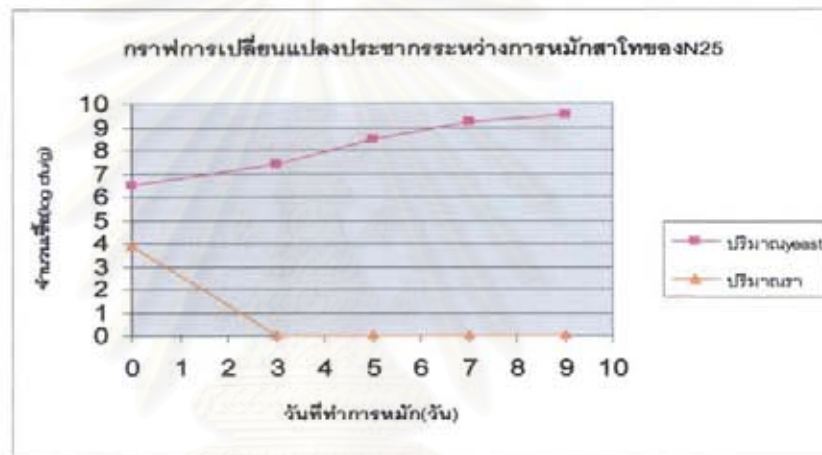


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

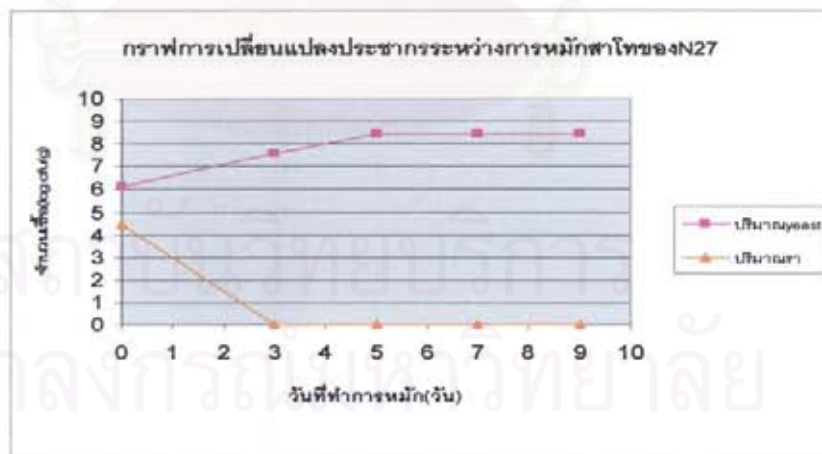
ก)



ข)



ค)



รูปที่ 14 การเปลี่ยนแปลงประชากรของราและยีสต์ระหว่างการทำหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วทั้ง 3 แห่ง ก) NN6 ข) NN25 ค) NN27

จากรูปที่ 14 พบว่าสามารถพบราได้ในเฉพาะในช่วงต้นของการหมัก กล่าวคือพบได้เฉพาะในวันที่ 0 ของการหมักจากทั้ง 3 ตัวอย่างลูกแป้งโดยมีจำนวน 8×10^3 และ 3×10^4 cfu/g ตามลำดับ และพบมีการเจริญของยีสต์ได้ตลอดในระหว่างการหมัก โดยยีสต์มีปริมาณจาก 10^6 cfu/g ในวันที่ 0 และจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามลำดับจนถึงวันที่ 5 ของการหมัก ซึ่งมีปริมาณ 10^8 - 10^9 cfu/g จากนั้นปริมาณจะค่อนข้างคงที่ (กรณีตัวอย่างลูกแป้ง NN6 และ NN27) หรือเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย (กรณีตัวอย่างลูกแป้ง NN25) เมื่อถึงปลายช่วงของการหมัก ในวันที่ 9 พบว่ามีปริมาณ 10^9 cfu/g ปริมาณราที่พบได้เฉพาะในช่วงต้นของการหมักสอดคล้องกับบทบาทของราในการย่อยข้าวเป็นน้ำตาลอ้อย หลังการเติมน้ำปริมาณ 2 เท่าของข้าวเหนียวหนึ่ง (ผ่านน้ำ) ลงไปในวันที่ 3 ของการหมัก ซึ่งทำให้สภาพการหมักที่มีออกซิเจนต่ำ และความเข้มข้นของกลูโคสที่สูง เหมาะแก่การเจริญและการสร้างเอทานอลโดยยีสต์ในช่วงหลังจากวันที่ 3-9 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบปริมาณของยีสต์ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก

เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์แต่ละชนิดในระหว่างการหมักสาโท จึงทำการแยกยีสต์จากลูกแป้งจากแต่ละแหล่งตัวอย่างจากลูกแป้ง NN6, NN25 และ NN27 โดยนำสารละลายเจือจางที่ dilution ต่างๆไปทำการเกลี่ยกระจายเชื้อ (spread plate) บนอาหาร selective medium ชนิด L-lysine เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างยีสต์กลุ่ม *Saccharomyces* และกลุ่ม *non-Saccharomyces* ซึ่งยีสต์กลุ่ม *Saccharomyces* จะไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ L-lysine เนื่องจากยีสต์กลุ่ม *Saccharomyces* ไม่สามารถใช้ L-lysine เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นจึงจำแนกชนิดของยีสต์ตามวิธีดังข้อ 4. ได้ผลการเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์แต่ละชนิดในระหว่างการหมักสาโท ดังแสดงในตารางที่ 12

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 ชนิดและจำนวนของยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งตัวอย่างที่คัดเลือกได้ในระหว่างการหมักสาโท

รหัสลูกแป้งสุรา	วันที่ทำการแยกเชื้อ	ชนิดของยีสต์	จำนวนไอโซเลต	ความเข้มข้นของยีสต์ (cfu/ml)
NN6 (จากกิ่งอ.ภูเพียง)	0	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	30	3×10^5
	3-1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	14	1.4×10^6
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22	2.2×10^6
	3-2	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	40	2×10^6
		<i>Pichia anomala</i> (gr4)	5	2.5×10^5
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11	5.5×10^5
	5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66	6.6×10^7
7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54	5.4×10^7	
9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37	3.4×10^7	
NN25 (จาก อ.เชียงกลาง)	0	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	28	2.8×10^6
		<i>Pichia anomala</i>	4	4×10^5
	3-1	<i>Pichia anomala</i>	3	1.5×10^6
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34	1.7×10^7
	3-2	<i>Pichia anomala</i>	23	2.3×10^6
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	1×10^5
	5	<i>Issatchenkia orientalis</i>	1	1×10^7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		28	2.8×10^8	
7	<i>Issatchenkia orientalis</i>	7	3.5×10^8	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26	1.3×10^9	
9	<i>Issatchenkia orientalis</i>	1	1×10^8	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	3×10^9	
NN27 (จาก อ.บัว)	0	<i>Pichia anomala</i>	30	1.5×10^7
	3-1	<i>Pichia anomala</i>	1	1×10^6
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	3.0×10^7
	3-2	<i>Pichia anomala</i>	2	2×10^6
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35	3.5×10^7
	5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	3.0×10^8
	7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27	2.7×10^9
9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	3.0×10^8	

ความเข้มข้นของยีสต์=จำนวนไอโซเลต×dilution factor

Pichia anomala (gr4) = *Pichia anomala* จากกลุ่มที่ 4 จากตารางที่ 10

วันที่ 3-1 หมายถึง ทำการแยกเชื้อในวันที่ 3 ก่อนผ่านน้ำ

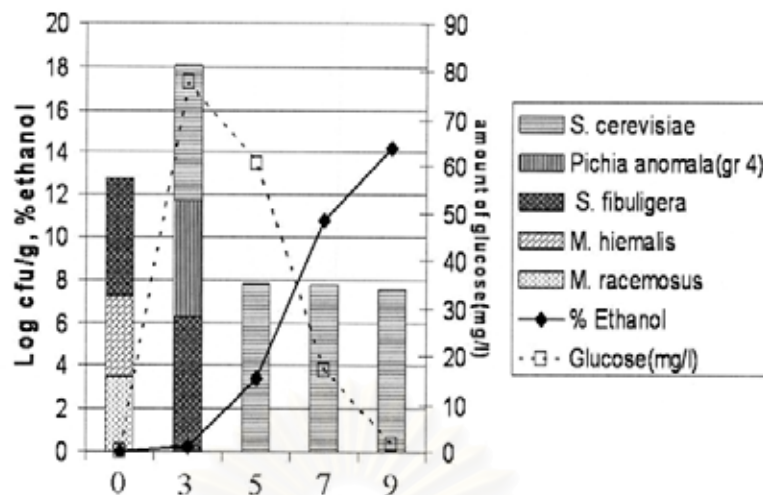
วันที่ 3-1 หมายถึง ทำการแยกเชื้อในวันที่ 3 หลังผ่านน้ำ

ผลจากตารางที่ 12 ทำให้ทราบถึงชนิดและจำนวนของยีสต์แต่ละชนิด ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือกได้ เมื่อนำไปรวมกับผลจากตารางที่ 5, 6, 7, 9 และ 10 ทำให้ทราบถึง การเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และรา แต่ละสปีชีส์ในระหว่างการหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วทั้ง 3 แหล่ง ดังแสดงในรูปที่ 15

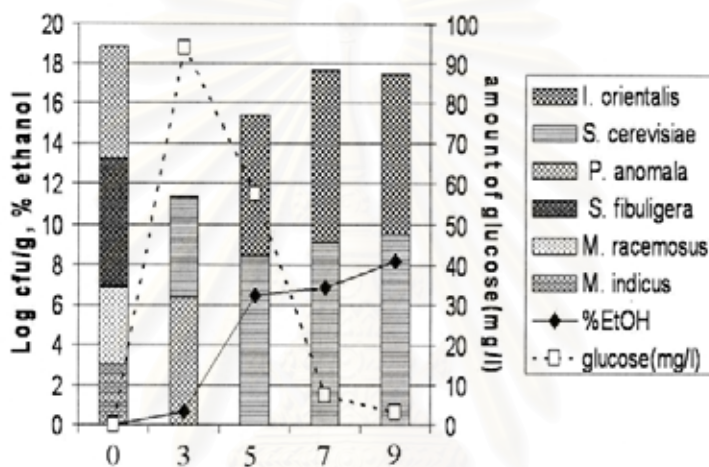


สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

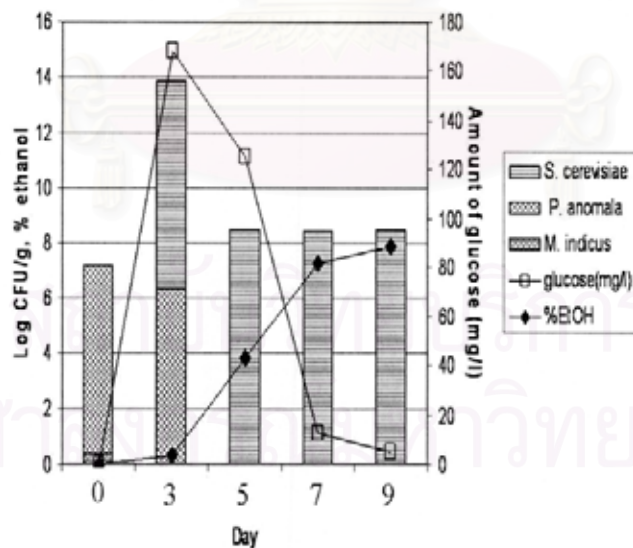
ก)



ข)



ค)



รูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราแต่ละสปีชีส์ระหว่างการหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือก 3 แห่ง ก) NN6 ข) NN25 และ ค) NN27

จากรูปที่ 15 พบว่าสามารถพบราได้ในเฉพาะวันที่ 0 ของการหมักจากทั้ง 3 ตัวอย่างลูกแป้ง โดยในตัวอย่างลูกแป้ง NN6 พบ *Mucor racemosus* และ *Mucor hiemalis* จำนวน 3×10^3 และ 6×10^3 cfu/g ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างลูกแป้ง NN25 พบ *Mucor racemosus* และ *Mucor indicus* จำนวน 7×10^3 และ 1×10^3 cfu/g ตามลำดับ และในตัวอย่างลูกแป้ง NN27 พบ *Mucor indicus* จำนวน 3×10^3 cfu/g

ในการหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN6 และ NN25 เป็นหัวเชื้อพบ *Saccharomycopsis fibuligera* ในช่วงแรกของการหมัก โดยในวันที่ 0 ของการหมักพบ *Saccharomycopsis fibuligera* 3×10^5 และ 2.8×10^6 cfu/g ตามลำดับ และพบเฉพาะวันที่ 0 ของการหมักเท่านั้น นอกจากนี้การหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN6 ยังพบยีสต์ *P.anomala* (gr4) ในวันที่ 3 ของการหมัก ส่วนการหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN25 พบ *Pichia anomala* ในวันที่ 0 และ 3 ของการหมักด้วย แต่การหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN27 ไม่พบ *Saccharomycopsis fibuligera* เลย พบแต่ *Pichia anomala* ในวันที่ 0 และ 3 ของการหมัก

ในส่วนของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* นั้นพบได้ตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 9 ของการหมักเหมือนกันทั้ง 3 ตัวอย่างลูกแป้ง โดยพบ *S. cerevisiae* เพิ่มจำนวนมากขึ้นในระหว่างการหมักจาก 5.5×10^5 - 5.4×10^7 , 1×10^5 - 31×10^8 และ 3.0×10^7 - 3.0×10^8 cfu/g ตามลำดับ

จากที่เคยมีรายงานว่ายีสต์จำพวก Non- *Saccharomyces* มักพบเฉพาะในช่วงต้นของการหมัก (ก่อนผ่านน้ำ) แต่จากรูปที่ 11 ก) ซึ่งพบ *Issatchenkia orientalis* ได้ในช่วงหลังของการหมักเท่านั้น (ในวันที่ 5 ถึง 9) จากตัวอย่างลูกแป้ง NN25 จึงน่าสนใจที่จะได้มีการศึกษาสมบัติของยีสต์ *Issatchenkia orientalis* ทั้งในแง่ของการทนต่อเอทานอลที่สูง และบทบาทที่มีต่อกระบวนการหมักสาโทต่อไป

6. การคัดเลือกราบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดี

ทำการคัดเลือกราที่แยกจากตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกได้ โดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของแข็งให้กลายเป็นของเหลว (Liquefaction) เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) บนจานเพาะเชื้อรา ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว (liquefaction) เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) ของราที่แยกจากตัวอย่างลูกแบ่งที่คัดเลือกแล้วจากจังหวัดน่าน

กลุ่ม	รหัสของรา	ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) (เซนติเมตร)	แอกทิวิตีของแอลฟาอะมีเลส unit(umol/min)	แอกทิวิตีของกลูโคอะมีเลส unit(umol/min)
1	NN6/0/9	+++++	9.0	0.174	0.032
	NN25/0/6	++++	9.0	0.134	0.032
	NN27/0/1	++++	9.0	0.210	0.034
2	NN6/0/4	+++	9.0	0.290	0.028
	NN6/0/5	+++	9.0	0.228	0.037
	NN6/0/6	+++	9.0	0.173	0.039
	NN25/0/1	+++	9.0	0.160	0.032
	NN25/0/2	+++	9.0	0.167	0.038
	NN25/0/3	+++	9.0	0.149	0.045
	NN25/0/4	+++	9.0	0.184	0.035
	NN25/0/5	+++	6.7	0.136	0.028
	NN25/0/7	+++	9.0	0.272	0.040
	NN27/0/2	+++	9.0	0.327	0.033
	NN27/0/3	+++	9.0	0.220	0.028
	3	NN25/0/8	++	9.0	0.320
NN6/0/1		+	9.0	0.201	0.030
NN6/0/2		+	5.2	0.198	0.014
NN6/0/3		+	5.5	0.178	0.040
NN6/0/7		+	6.0	0.249	0.034
NN6/0/8		+	9.0	0.209	0.037

+ → +++++ หมายถึง ปริมาณของของเหลว (น้ำด้อย) ที่ได้ จากน้อยไปมาก

จากตารางที่ 13 พบว่าแอกทีวิตีของอัลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลส และเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสบน starch agar ไม่มีความสอดคล้องกับความสามารถในการเปลี่ยนของแข็ง (ข้าวเหนียว) ให้กลายเป็นของเหลว(น้ำต้อย) ซึ่งความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว นั้น เป็นภาพรวมของประสิทธิภาพของเอนไซม์หลายชนิดจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ รา ในลูกแบ่งสุรา ที่สามารถย่อยข้าวเหนียวได้ ซึ่งน่าจะมีเอนไซม์มากกว่าอัลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลสที่สามารถย่อยข้าวเหนียวได้ นอกจากนี้ starch agar ที่ใช้ทดสอบ แม้จะได้ผลที่สอดคล้องกว่าค่า แอกทีวิตีของอัลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลส แต่ starch agar ยังไม่ใช่วัตถุบิโดยตรงสำหรับการผลิตสาโท ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้เกณฑ์ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว ซึ่งเปรียบเทียบความสามารถของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในลูกแบ่งแต่ละแหล่งตัวอย่าง ในการย่อยข้าวเหนียวซึ่งเป็นวัตถุบิโดยตรงสำหรับการผลิตสาโท มาคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแบ่งได้ดี ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มตามความสามารถของการย่อยแบ่งจากมากไปน้อยได้ 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 สามารถย่อยแบ่งเป็นน้ำต้อยได้ ++++ ถึง +++++ กลุ่มที่ 2 ได้ +++ และ กลุ่มที่ 3 ได้ + ถึง ++ ตามลำดับ ดังตารางที่ 13

จากตารางที่ 13 เมื่อใช้ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งเป็นของเหลว(Liquefaction)ได้ดีที่สุดเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกราที่มีความสามารถย่อยแบ่งได้สูงสุด ทำให้เลือกรหัส NN6/0/9 ซึ่งเมื่อทำการจำแนกชนิด พบว่าเป็น *Mucor heimalis* เมื่อทดสอบหาความสามารถในการย่อยแบ่งบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Starch agar) พบว่าได้เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) สูงที่สุดคือ 9.0 เซนติเมตร และมีแอกทีวิตีของอัลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลสเท่ากับ 0.174 และ 0.032 ยูนิตตามลำดับ โดยที่ 1 ยูนิต คือความสามารถในการเปลี่ยนสับสเตอร์ให้เป็นน้ำตาลปริมาณ 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที

7. การคัดเลือกยีสต์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการหมักให้ได้เปอร์เซ็นต์เอทานอลสูง

นำยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากน้ำหมักสาโทเฉพาะในวันที่ 9 มาทดสอบเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอลได้ดี โดยเฉพาะเชื้อ *M. hiemalis* N6/0/9 ลงในข้าวเหนียวหนึ่ง 200 กรัม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เติมน้ำปลอดเชื้อ 400 มิลลิลิตร แบ่งน้ำหมักที่ได้ ลงในขวดปลอดเชื้อขวดละ 5 มิลลิลิตร แล้วจึงลงยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ให้ด้วยความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำน้ำหมักดังกล่าวมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลโดยใช้ แก๊สโครมาโตกราฟี (GC) พบว่าผลเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลในน้ำหมักจากยีสต์ที่แยกได้จากวันที่ 9 ของการหมักจากทั้ง 3 แหล่งลูกแบ่งที่คัดเลือกแล้วทั้งหมด 91 ไอโซเลต มีความสามารถในการหมักได้เอทานอลตั้งแต่ร้อยละ 0.201-4.812

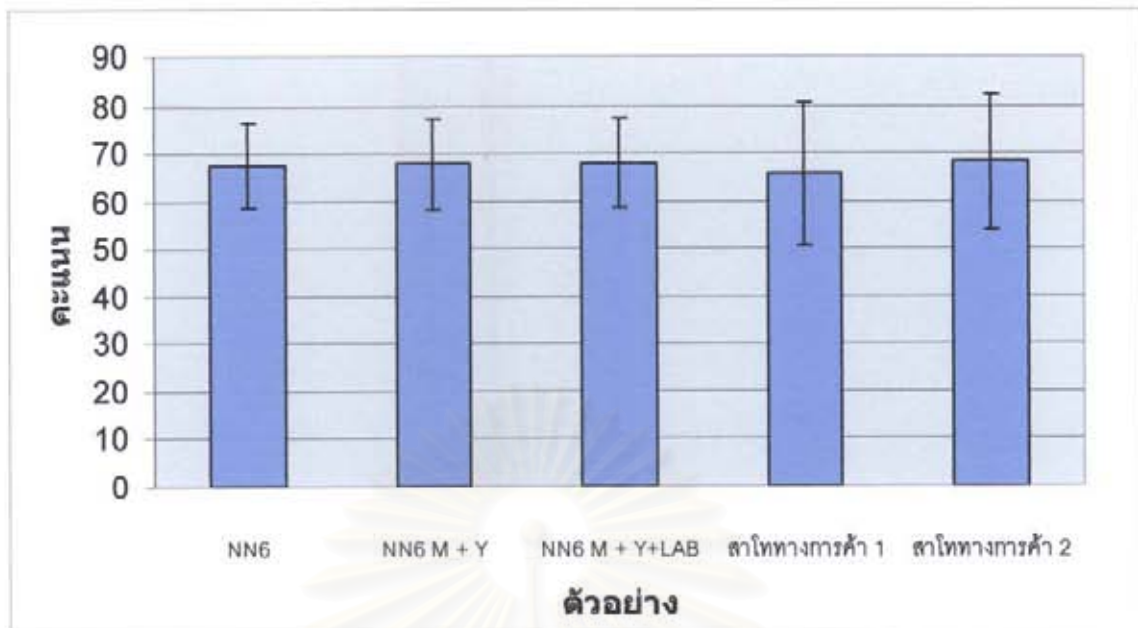
และยีสต์ *S. cerevisiae* N27/9/17 สามารถหมักได้เอทานอลสูงสุด คือร้อยละ 4.812 ซึ่งต่ำกว่า ปริมาณของเอทานอลที่พบในสาโทอาจเนื่องมาจาก ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่น้อยกว่าในการหมักสาโท หรือในการหมักสาโทมีเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักหลายชนิดซึ่งอาจผลิตสารที่เกี่ยวข้องกับการเจริญหรือ การหมักให้ได้เอทานอลมากกว่าการหมักโดยใช้เชื้อเพียงชนิดเดียว

8. การศึกษากลิ่นรสโดยการชิมและการวิเคราะห์ปริมาณของสารอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกลิ่น รสของสาโท

จากการทดลองการคัดเลือกลูกแป้งสุราจาก 41 อย่าง โดยนำไปผลิตเป็นสาโท และทำการวัด ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็ง (ข้าวเหนียว) เป็นของเหลว (น้ำด้อย) (Liquifaction) ความเข้มข้น ของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร) ทั้งในน้ำด้อยและสาโท และ ปริมาณเอทานอลในสาโท ได้ผลดังแสดง ในตารางที่ 5 และกลิ่นรสของสาโท พบว่า ตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 มีรสชาติดีที่สุด และลูกแป้งสุรา NN6 มีความสามารถในการเปลี่ยนของแข็ง (ข้าวเหนียว) เป็นของเหลว (น้ำด้อย) (Liquifaction) และ ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในน้ำด้อยสูงที่สุด และมีความเข้มข้น ของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในสาโทต่ำในขณะที่มีปริมาณเอทานอลในสาโทสูงที่สุด หลังจากนั้นจึง ทำการแยกยีสต์และราจากตัวอย่างลูกแป้งสุรา NN6 ดังวิธีทำในข้อ 3 และแยกแบคทีเรียโดยการ เกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เลี้ยงภายใต้ภาวะไม่มีอากาศที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 3 วัน หลังจากนั้นจึงทำการผลิตสาโทจากลูกแป้งและเชื้อบริสุทธิ์ผสม เพื่อทำการเปรียบเทียบ กลิ่นรส สารประกอบให้กลิ่น และกรดอินทรีย์ของสาโทที่ผลิตได้

8.1 การศึกษากลิ่นรสของสาโทโดยการชิม (Sensory test)

นำตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 (NN6) สาโทที่ผลิตจากราและยีสต์บริสุทธิ์ที่แยก ได้จากลูกแป้ง NN6 (NN6 M+Y) สาโทที่ผลิตจากรา ยีสต์และแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 (NN6 M+Y+LAB) และ สาโททางการค้า 2 ตัวอย่าง ไปทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบ ที่มีความคุ้นเคยกับสาโท จำนวน 10 ท่าน ให้คะแนนในใบให้คะแนนและวิธีการให้คะแนน (ภาคผนวก จ) เปรียบเทียบกับสาโททางการค้า



รูปที่ 16 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 และเสาโททางการค้า

พบว่า NN6 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับเสาโททางการค้า โดย NN6 มีคะแนนเฉลี่ย 67.45 คะแนน เป็นที่ยอมรับและจัดเป็นสาโทที่มีคุณภาพดี เมื่อเปรียบเทียบกับเสาโททางการค้า ส่วน NN6 M+Y และ NN6 M+Y+LAB ได้คะแนนเฉลี่ย 67.90 คะแนนทั้ง 2 ตัวอย่าง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเสาโททางการค้า 1 และ 2 ซึ่งได้คะแนน 66 และ 68 ตามลำดับ พบว่า NN6 M+Y และ NN6 M+Y+LAB ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับเสาโททางการค้า 1 และเสาโททางการค้า 2 ส่วนการเติมแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกนั้นไม่ได้เพิ่มรสชาติที่ดีแต่อย่างใด

8.2 การวิเคราะห์หาปริมาณของสารระเหยโดยใช้เครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

สารประกอบให้กลิ่น (Volatile compound) ที่เกี่ยวข้องกับการให้กลิ่นมีหลายชนิด ได้แก่ สารในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์และเอสเทอร์ ซึ่งถูกสร้างในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ปริมาณการเกิดของสารเหล่านี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สภาพวะในการหมัก สายพันธุ์ของยีสต์ องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหมัก และอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก เป็นต้น (Valero, 2002)

8.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณของฟูเซลแอลกอฮอล์

จากการวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 NN25 และ NN27 และเชื่อบริสุทธิ์ผสมพบว่าสามารถวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นได้ทั้งฟูเซลแอลกอฮอล์และเอสเทอร์

โดยฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบได้แก่ 1-โพรพานอล ไอโซบิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เอมีลแอลกอฮอล์ และฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ ดังแสดงในตารางที่ 16 โดยสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP1 มีปริมาณของ 1-โพรพานอล ไอโซบิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และ เอมีลแอลกอฮอล์ สูงกว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมในทุกชุดการทดลอง

1-โพรพานอล ในตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากลูกแป้ง NN6 มีปริมาณสูงสุด คือ 31.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณของ 1-โพรพานอลที่สาโทในการทดลองนี้ผลิตได้อยู่ในช่วง 8.69 - 31.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในช่วงที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไป โดยปริมาณของ 1-โพรพานอล ในระดับนี้ยังส่งผลให้ได้กลิ่นที่ดีแก่สาโทอยู่

ไอโซบิวทานอล ที่พบในสาโทจากการทดลองนี้อยู่ในช่วง 20.98 - 41.38 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในสาโททางการค้า 1 มีปริมาณของไอโซบิวทานอลสูงสุด คือ 41.38 มิลลิกรัมต่อลิตร ในทุกตัวอย่างพบปริมาณไอโซบิวทานอลอยู่ในช่วงของค่าที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไป

ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในการทดลองนี้พบว่าปริมาณของไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ที่พบในสาโทจากการทดลองนี้อยู่ในช่วง 23.68 - 42.42 มิลลิกรัมต่อลิตร สาโททางการค้า 1 มีปริมาณของไอโซเอมิลแอลกอฮอล์สูงสุด คือ 42.42 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการทดลองพบปริมาณเอมีลแอลกอฮอล์ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า มีปริมาณ 5.75 - 7.93 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย NN6+M+Y+LAB มีปริมาณสูงสุด คือ 7.93 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบปริมาณฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NN6 และสาโททางการค้ามีปริมาณ 13.12 - 35.54 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณสูงสุดพบได้ในการทดลองนี้คือใน NN6 โดยสามารถพบได้ถึง 70.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

1-บิวทานอล เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ที่ให้กลิ่นผลไม้ (www.flavornet.org/flavornet.html) ปริมาณที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไปคือไม่เกิน 150 มิลลิกรัม/ลิตร และจากการทดลองพบ 1-บิวทานอล เฉพาะใน NN6 NN6 M+Y และ NN6 M+Y+LAB เท่านั้นซึ่งมีปริมาณ 2.41 0.92 และ 1.36 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และไม่พบ 1-บิวทานอลในสาโททางการค้าทั้งสองตัวอย่าง

8.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณของเอสเทอร์

เอสเทอร์ เป็นสารที่มีความสำคัญในการให้กลิ่นรสที่ดีในไวน์ เป็นเมแทโบไลต์ทุติยภูมิ ที่ถูกสร้างโดยยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ในไวน์สามารถพบเอสเทอร์ได้หลายชนิด เช่น อะซิเตตเอสเทอร์ซึ่ง ได้แก่ เอทิลอะซิเตต ไอโซเอมิลอะซิเตต และไอโซบิวทิลอะซิเตต เป็นต้น เอทิลเอสเทอร์ ได้แก่ เอทิลคาโปรเอท เอทิลคาพิวเรต และเอทิลคาเพรท เป็นต้น ซึ่งเอสเทอร์เหล่านี้ให้กลิ่นผลไม้

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเอสเทอร์มีหลายปัจจัย เช่น วัตถุดิบที่ใช้และสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการหมัก (Rojas, 2004) ในไวน์จะสามารถพบเอสเทอร์ได้หลากหลายมีทั้งที่สามารถระเหยได้ และมีทั้งที่มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถ ระบุได้ ซึ่งเอสเทอร์ที่มีปริมาณเท่ากับหรือมากกว่าระดับ threshold นั้นจะให้กลิ่นผลไม้ ซึ่งมีความสำคัญยิ่งต่อกลิ่นรสของไวน์

เอทิลอะซิเตต เป็นเอสเทอร์ ที่ให้กลิ่นที่สำคัญของไวน์ โดยจะให้กลิ่นผลไม้ (fruity odor) สารกลุ่มนี้เกิดจากเอนไซม์ของเซลล์ยีสต์หรือแบคทีเรีย โดยเอนไซม์ esterase ในไวน์ที่เพิ่งหมักเสร็จจะเกิดปฏิกิริยา เอสเทอร์ฟิเคชัน และ ทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน อย่างช้าๆหลังการสูญเสียเอนไซม์ ซึ่งถ้ามีในปริมาณที่ต่ำกว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้กลิ่นที่น่าพอใจ แต่ถ้าปริมาณสูงกว่านี้จะให้กลิ่นน้ำส้มสายชูซึ่งเป็นกลิ่นที่ไม่ดี (Amerine และคณะ, 1979) จากการทดลองพบว่าปริมาณเอทิลอะซิเตตของ NN6 NN6 M+Y และ NN6 M+Y+LAB และสาโททางการค้ามีปริมาณเอทิลอะซิเตต 4.44 – 98.94 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในสาโททางการค้ามีปริมาณเอทิลอะซิเตตสูงกว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแบ่งสุรา และในกลุ่มสาโทที่ผลิตจากลูกแบ่งสุราและเชื้อบริสุทธิ์พบว่าสาโทที่ผลิตจากรา ยีสต์และแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกแบ่งสุรา NN6 มีปริมาณเอทิลอะซิเตตสูงสุดคือ 5.69 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งผลสอดคล้องกับรายงานของ Rojas และคณะ (2001) ซึ่งรายงานว่ายีสต์ในกลุ่ม Non-Saccharomyces มีบทบาทสำคัญในการสร้างเอทิลอะซิเตตเอสเทอร์ (Rojas และคณะ, 2001) ซึ่งในงานวิจัยนี้ Y3 เป็นยีสต์ในกลุ่ม Non-Saccharomyces

เอทิลคาโพรเอทในสาโทที่ผลิตจากลูกแบ่งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณ 0.036 – 0.066 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสาโททางการค้า 1 มีปริมาณสูงสุด

ไอโซเอมิลอะซิเตตในสาโทที่ผลิตจากลูกแบ่งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณ 0.43 - 0.87 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใน NN6 M+Y+LAB พบในปริมาณสูงสุด คือ 0.87 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอทิลคาพิวเรทในสาโทที่ผลิตจากลูกแบ่งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณเอทิลแคพิวเรต 1.41 - 2.96 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณอยู่ในระดับที่พบได้ทั่วไปในไวน์อองุ่น จากการทดลองพบว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแบ่งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณเอทิลคาพิวเรท 0.92 - 2.96 มิลลิกรัมต่อลิตร สาโททางการค้า 1 มีปริมาณเอทิลคาพิวเรทสูงสุด คือ 2.96 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนในกลุ่มของสาโทที่ผลิตจากลูกแบ่งสุรานั้นพบว่า NN6 มีปริมาณสูงสุดคือ 1.64 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอทิลคาเพรดในสาโทที่ผลิตจากลูกแบ่งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณอยู่ในช่วง 0.64 - 1.19 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าเกินกว่าที่พบได้ทั่วไปในไวน์อองุ่น จากการทดลองพบว่าในสาโทที่ผลิตจากลูกแบ่งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณเอทิลคาเพรด 0.77 – 1.98 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ NN6 M+Y+LAB มีปริมาณเอทิลคาเพรดสูงสุด คือ 1.98 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอทิลโพรพาโนเอทในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณเอทิลโพรพาโนเอท 0.04 – 0.11 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบในสาโททางการค้า 2 มากที่สุด คือ 0.11 มิลลิกรัม/ลิตร แต่ไม่พบเอทิลโพรพาโนเอทใน NN6 และ NN6 M+Y

นอกจากนี้ในการทดลองพบว่าสามารถพบสารประกอบให้กลิ่นชนิดอื่นๆ อีกแต่ไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้เนื่องจากไม่มีสารมาตรฐาน ดังตารางที่ 14 แสดงสารประกอบให้กลิ่นที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 สรุปปริมาณสารให้กลิ่นของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้าเปรียบเทียบกับปริมาณที่พบในไวน์องุ่นทั่วไป

สารประกอบให้กลิ่น	ปริมาณที่พบ ในไวน์องุ่น ทั่วไป(มก./ล.)	ความเข้มข้น (มก./ล.)				
		สาโทNN6	สาโทNN6 M*+Y**	สาโทNN6 M+Y+LAB***	สาโททาง การค้า 1	สาโททาง การค้า 2
ฟูเซลแอลกอฮอล์						
1-โพรพานอล	10 - 125	31.20	19.74	24.62	8.69	11.62
ไอโซบิวทานอล	2 - 150	24.19	20.98	29.58	41.38	26.64
ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์	20 - 350	28.94	23.68	33.13	42.42	25.40
เอมิล แอลกอฮอล์	1 - 300	5.70	5.91	7.93	7.76	5.46
ฟีนิลเอทิล แอลกอฮอล์	15 - 200	70.25	35.54	13.12	16.73	19.49
1-บิวทานอล	0 - 150	2.41	0.92	1.36	0	0
เอสเทอร์						
เอทิล อะซิเตต	9 - 257	4.44	5.06	5.69	33.58	98.94
เอทิล คาโพรเอท	0 - 3.4	0.041	0.036	0.041	0.066	0.041
ไอโซเอมิล อะซิเตต	0.1 - 8	0.540	0.429	0.866	0.721	0.607
เอทิล คาพิวเรท	0.2 - 3.8	1.64	0.92	2.28	2.96	2.67
เอทิล คาเพรท	0 - 0.3	0.90	0.77	1.98	1.19	1.09
เอทิล โพรพานอเอท	0 - 20	0	0	0.043	0.08	0.11

* M : รา ซึ่งได้แก่ *Mucor racemosus*, *Mucor hiemalis*

** Y : ยีสต์ ซึ่งได้แก่ *Sacchromycopsis fibuligera*, *Pichia anomala* และ *Saccharomyces cerevisiae*

***LAB : แบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลคติก

ประดิษฐ์ ครุวัฒนา (2546) รายงานปริมาณเอสเทอร์ที่พบในสาเกซึ่งเป็นไวน์ข้าว เช่นเดียวกับสาโท พบว่า มีปริมาณ เอทิลอะซิเตต ไอโซเอมิลอะซิเตต เอทิลคาโพรเอท เอทิลคาพิวเรท เอทิลคาเพรท และเอทิลบิวทิเรท 20 – 30, 2, 2, 5, 10 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเอสเทอร์เหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญทางด้านกลิ่นของสาเก

ซึ่งจากการทดลองพบว่าทั้งในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า สามารถพบปริมาณของเอสเทอร์ที่สำคัญเช่นเดียวกับที่พบในสาเก แต่เนื่องจากกระบวนการผลิต อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตและสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ตลอดจนวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารให้กลิ่น มีความแตกต่างกันจึงไม่อาจนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกันได้ การศึกษาเพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่จำเป็นต่อการหมักจากลูกแป้งสุรา และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในรูปของเชื้อบริสุทธิ์ผสม เพื่อเตรียมเป็นกล้าเชื้อใช้ในการผลิตไวน์ข้าวแทนการใช้ลูกแป้งสุรา จะเป็นหนทางหนึ่งในการผลิตให้ได้สาโทที่มีคุณภาพดีและสม่ำเสมอในระหว่างชุดการผลิต (วรรัตน์, 2539)

8.3 การวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอินทรีย์และกลีเซอรอลโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

กรดอินทรีย์ที่พบในกระบวนการหมักมีหลายชนิดโดยมีบทบาทช่วยให้ไวน์มีความคงทนและรักษาคุณภาพทางด้านสีและกลิ่นของไวน์ กรดทาร์ทริกและกรดมาลิกเป็นกรดหลักในไวน์อ่อน ส่วนกรดอื่นๆ ได้แก่ กรดซัคซินิก กรดซิตริก กรดแลคติก และกรดไพรูวิกจะมีปริมาณรองลงมา (Lamikanra, 1997) ส่วนกลีเซอรอลนั้นเป็นสารในกลุ่มพอลิแอลกอฮอล์ซึ่งถูกสร้างโดยยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลมีความเกี่ยวข้องกับรสชาติการลิ้มรสที่ดี และให้ความรู้สึกกลมกล่อมของไวน์ในปาก

จากการทดลองเมื่อทำการวิเคราะห์น้ำหมักสาโทพบว่า ทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้าไม่พบปริมาณกรดซิตริก ทั้งนี้อาจเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถใช้กรดซิตริกในการเจริญได้ (โชคชัย วนภู, 2546) ส่วนปริมาณกรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดแอซิติค และกลีเซอรอล ของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้และสาโททางการค้า

กรดอินทรีย์ที่พบในกระบวนการหมักมีหลายชนิด ถูกผลิตขึ้นมาในระหว่างกระบวนการหมักขั้นแรก ปริมาณกรดที่พึ่งปรารถนาขึ้นอยู่กับน้ำตาลที่เหลือจากกระบวนการหมัก เช่น กรดซิตริก สามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกได้และแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดสามารถหมักกรดซิตริกให้เป็นกรดอะซิติกได้ กรดไพรูวิกเป็นสารตั้งต้นของการผลิตเอทานอลและไอโซบิวทิลแอลกอฮอล์ กรดซัคซินิกจะหยุดสร้างเมื่อการหมักแอลกอฮอล์สิ้นสุดลง กลิ่นที่เกิดจะเป็นการผสมของกลิ่นเปรี้ยว เค็มและขม กรดแลคติกมาจากการที่ยีสต์หมักน้ำตาลแต่พบในปริมาณน้อย กรดอะซิติกไม่มีความสำคัญต่อ

กลิ่นอย่างชัดเจนแต่มีลักษณะที่เฉพาะ เป็นกรดที่ระเหยง่าย ในกระบวนการหมักแบบที่เรียกรดแลคติกสามารถย่อน้ำตาลให้เป็นกรดอะซิติกได้

จากการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ ทั้ง กรดซิตริก, กรดไพรูวิก, กรดซักซินิก, กรดแลคติก, กรดแอสติค และกลีเซอรอล ในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา พบว่าไม่พบกรดซิตริกในน้ำหมักสาโทของทั้งสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 NN25 และ NN27 และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมจากแต่ละลูกแป้ง ส่วนปริมาณกรดอินทรีย์อื่นๆ แสดงดังตารางที่ 15

กรดไพรูวิกเป็นสารตัวกลางที่สำคัญของกระบวนการเมแทบอลิซึมเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการไกลโคลิซิส กรดไพรูวิกสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็นสารตัวอื่นใน 2 ภาวะ คือ ในภาวะที่มีอากาศกรดไพรูวิกจะถูกเปลี่ยนเป็น อะเซทิลโคเอนไซม์เอ และเข้าสู่วัฏจักร TCA ซึ่งจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์จากเมแทบอลิซึมมากมายหลายชนิด เช่น กรดซักซินิก กรดแอสติค และ 2,3 บิวเทนไดออล เป็นต้น หรือถ้าอยู่ในภาวะที่ไม่มีอากาศกรดไพรูวิกจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติก ในกระบวนการหมักแลคเตทหรือจะถูกเปลี่ยนไปเป็น เอทานอลในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์

จากผลการทดลองในตารางที่ 15 พบว่าปริมาณกรดไพรูวิกมีค่าอยู่ในช่วง 0.273-127.30 กรัมต่อลิตร พบว่าตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 มีปริมาณกรดไพรูวิกมากที่สุด คือ 127.30 กรัมต่อลิตร และ ตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 มีปริมาณกรดไพรูวิก น้อยที่สุด คือ 0.273 กรัมต่อลิตร เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราบริสุทธิจะมีปริมาณกรดไพรูวิกสูงเช่น ในตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 NN25 และ NN27 ถูกตรวจพบปริมาณกรดไพรูวิก 127.30 76.64 และ 69.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างสาโททางการค้า 1 และสาโททางการค้า 2 พบปริมาณกรดไพรูวิก 58.2 และ 27.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนข้าวเหนียวที่หมักโดยปราศจากเชื้อมีปริมาณกรดไพรูวิก 0.543 กรัมต่อลิตร ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าสามารถพบกรดไพรูวิกสูงในตัวอย่างที่ได้จากการหมักโดยใช้ราบริสุทธิ ซึ่งจะมีปริมาณเอทานอลต่ำ (ตารางที่ 15) ตรงกับรายงานของยุพกนิษฐ์ พวงวีระกุล (2545) ได้รายงานว่า ว่าจะสร้างเอานไซม์ จำนวนมาก ออกมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล สร้างกรดอินทรีย์ และยังได้สารอาหารและวิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของยีสต์ ในการศึกษาพบว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมยีสต์ ปริมาณกรดไพรูวิกจะมีปริมาณลดลงเป็นอย่างมาก แต่เมื่อเปรียบเทียบกับในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรายังคงมีปริมาณกรดไพรูวิกคงเหลือน้อยกว่า แสดงให้เห็นว่า รา เปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นเอทานอลและสารประกอบอื่นๆ ได้ไม่ดีเท่ายีสต์

ปริมาณกรดซัลฟิวริกอยู่ในช่วง 0 – 0.298 กรัมต่อลิตร ซึ่งตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN25 มีปริมาณกรดซัลฟิวริกมากที่สุด คือ 0.298 กรัมต่อลิตร และตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 ไม่พบกรดซัลฟิวริก ส่วนตัวอย่างสาโททางการค้า1และสาโททางการค้า2 มีปริมาณกรดซัลฟิวริก 0.14 และ 0.177 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมมีค่าน้อยกว่า 2 มก./มล. ที่เป็นปริมาณปกติที่พบในไวน์องุ่นทั่วไป

ปริมาณกรดแลคติกอยู่ในช่วง 0.096 – 7.503 กรัมต่อลิตร ซึ่งตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 มีปริมาณกรดแลคติกมากที่สุด คือ 5.073 กรัมต่อลิตร และตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN25 พบกรดแลคติกน้อยที่สุด ส่วนตัวอย่างสาโททางการค้า1และสาโททางการค้า2 พบปริมาณกรดแลคติก 2.565 และ 7.503 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และไม่พบกรดแลคติกในตัวอย่างข้าวเหนียว และสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสม และลูกแป้งยกเว้นตัวอย่างที่ได้จากการหมักข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 มีค่าน้อยกว่าปริมาณที่พบได้ในไวน์องุ่นทั่วไป คือน้อยกว่า 5 มก./มล. ปริมาณกรดอะซิติกอยู่ในช่วง 0 – 0.977 กรัมต่อลิตร ซึ่งตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN27 มีปริมาณกรดอะซิติกมากที่สุด คือ 0.977 กรัมต่อลิตร และ ตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 ไม่พบกรดอะซิติก ส่วนตัวอย่างสาโททางการค้า1และสาโททางการค้า2มีปริมาณกรดอะซิติก 0.084 และ 0.872 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งยังคงมีอยู่ในปริมาณควบคุมคือ มีปริมาณน้อยกว่า 2 มก./มล. ซึ่งเป็นปริมาณที่พบในไวน์ทั่วไป ถ้าปริมาณสูงเกินกว่านี้อาจทำให้สาโทที่ผลิตได้มีรสเปรี้ยว

ปริมาณกลีเซอรอลอยู่ในช่วง 1.222 - 8.31 กรัมต่อลิตร ซึ่งตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับลูกแป้ง NN25 มีปริมาณกลีเซอรอลมากที่สุด คือ 0.298 กรัมต่อลิตร และ ตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 พบกลีเซอรอลเพียง 1.222 กรัมต่อลิตร ส่วนตัวอย่างสาโททางการค้า1และสาโททางการค้า2 พบปริมาณกลีเซอรอล 4.617 และ 6.405 กรัมต่อลิตร ตามลำดับและมีปริมาณต่ำกว่าปริมาณที่พบได้ในไวน์ทั่วไป คือน้อยกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 15 ปริมาณสารอินทรีย์ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างสาโทโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ตัวอย่างสาโท	ปริมาณสารอินทรีย์ (กรัมต่อลิตร)						ปริมาณเอทานอล (%)
	Citric acid	Pyruvic acid	Succinic acid	Lactic acid	Glycerol	Acetic acid	
ข้าวเหนียว	-	0.543	0	0	0.143	0.096	0.30
NN6 M	-	127.3	0.108	5.073	1.222	0	1.99
NN6 M+Y	-	0.273	0	4.818	3.701	0.459	9.41
NN25 M	-	76.64	0.178	3.17	2.502	0.601	4.35
NN25 M+Y	-	0.399	0.298	0.096	3.153	0.202	9.44
NN25 Sato	-	0.726	0.276	1.864	8.31	0.36	9.37
NN27 M	-	69.19	0.288	3.062	3.107	0.526	4.04
NN7 M+Y	-	0.56	0.223	3.154	2.782	0.977	9.77
NN27 Sato	-	0.302	0.221	3.374	4.33	0.167	10.31
สาโททางการค้า 1	-	58.2	0.14	2.565	4.617	0.084	8.25
สาโททางการค้า 2	-	27.21	0.177	7.503	6.405	0.872	10.31

หมายเหตุ ไม่มีตัวอย่าง NN6 Sato เนื่องจากตัวอย่างลูกแป้ง NN6 หหมด

9. การศึกษาความสามารถในการผลิตสารอินทรีย์อื่นๆ

9.1 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินต่างๆในน้ำหมักสาโทโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จากผลการทดลองวิเคราะห์วิตามินพบเพียง 2 ชนิด คือ Thiamine หรือวิตามิน B1 และกรดแพนโทเทนิค โดยปริมาณ Thiamine ที่วิเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 0 – 60.07 กรัมต่อลิตร โดยตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN27 มีปริมาณ Thiamine มากที่สุด คือ 60.07 กรัมต่อลิตร และตัวอย่างสาโททางการค้า 1 ไม่พบ Thiamine ดังตารางที่ 14

ปริมาณกรดแพนโทเทนิคอยู่ในช่วง 0.358 – 54.512 กรัมต่อลิตร ซึ่งตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN25 มีปริมาณกรดแพนโทเทนิคมากที่สุด คือ 54.512 กรัมต่อลิตร และ ตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 พบกรดแพนโทเทนิค 0.358 กรัมต่อลิตร ส่วนตัวอย่างสาโททางการค้า1และสาโททางการค้า2 มีปริมาณกรดแพนโทเทนิค 31.398 และ 0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

วิตามินบี 1 ที่ตรวจพบได้นั้นอาจเป็นเพราะวิตามินบี 1 เป็นส่วนประกอบของเซลล์ยีสต์ ซึ่งมีรายงานว่า น้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์ 100 กรัม มีปริมาณวิตามินบี 1 ถึง 2.33 มิลลิกรัม (www.foodcomp.dk/fcdb_detail.asp?FoodId=1057) วิตามินบี 1สามารถทนความร้อนได้ถึง 150 องศาเซลเซียสในภาวะที่เป็นกรดและในตัวอย่างสาโทมีสภาวะเป็นกรด (pH 3.15 – 3.62) ในขณะที่ไม่สามารถตรวจพบวิตามินชนิดอื่นเลยทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิตามินตัวอื่นๆ ได้แก่ Nicotinic Pyridoxine(B6) Cobalamine และ Riboflavin(B2) สามารถถูกทำลายได้ง่ายด้วยความเป็นกรดไป ในระหว่างกระบวนการหมักหรือการเก็บรักษา เช่น การถูกทำลายโดยแสง หรือ กระบวนการแปรรูป เป็นต้น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 ปริมาณวิตามินที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างสาโทโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ตัวอย่างสาโท	Thiamine(B1) (g/l)	Pantothenic acid (g/l)
ข้าวเหนียว	7.3833	0
NN6 M	39.8912	6.312
NN6 M+Y	38.2619	2.365
NN25 M	60.0693	24.865
NN25 M+Y	48.6261	5.547
NN25 Sato	31.239	54.512
NN27 M	46.5365	30.385
NN27 M+Y	0	11.382
NN27 Sato	34.5483	69.258
สาโททางการค้า1	0	42.791
สาโททางการค้า2	48.8997	0

หมายเหตุ ไม่มีตัวอย่าง NN6 Sato เนื่องจากตัวอย่างถูกแบ่ง NN6 หหมด

9.2 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในสาโท

9.2.1 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (Total antioxidant activity)

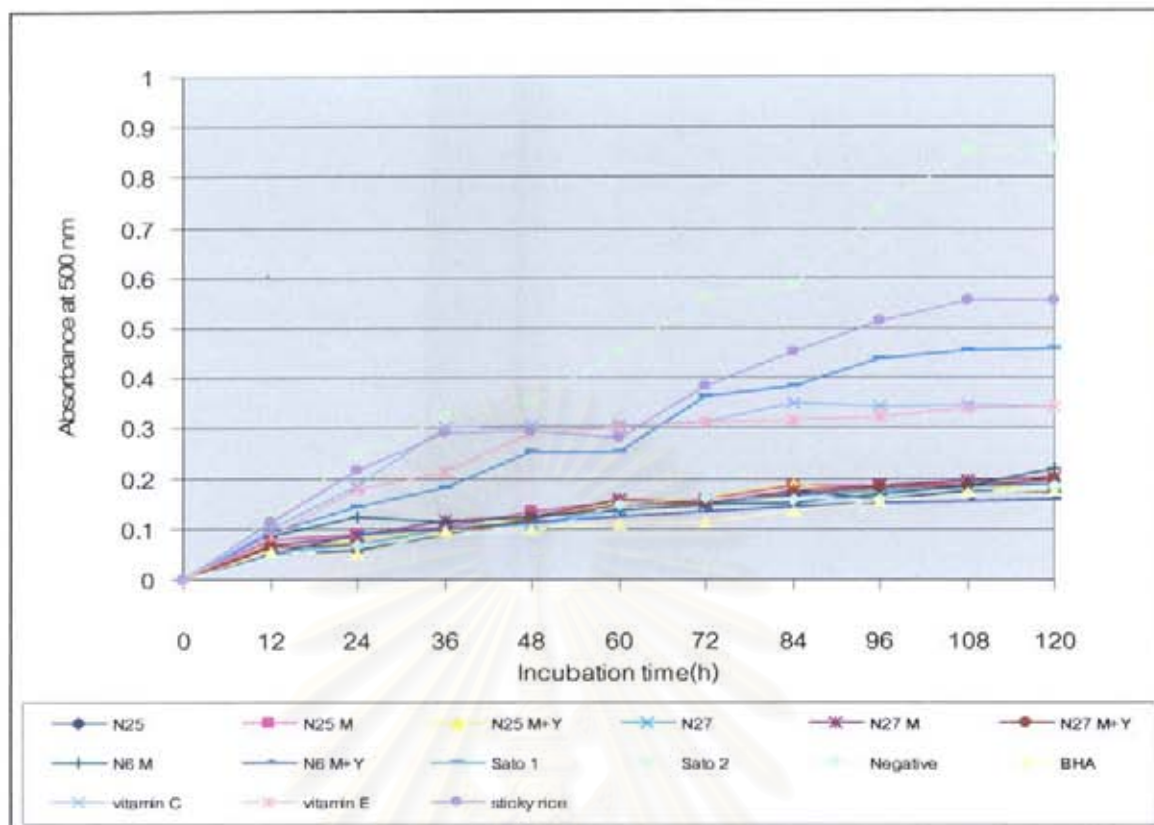
การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (Total antioxidant activity) มีหลักการว่าสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (Total antioxidant activity) ที่สามารถยับยั้งการสูญเสียพันธะคู่ของ linoleic acid ได้ โดยถ้ามีการสูญเสียพันธะคู่ของ linoleic acid เมื่อทำการเติมเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_2$) และ แอมโมเนียมไทโอไซยาเนต (NH_4SCN) แล้วเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_2$) จะมารับอิเล็กตรอนทำให้เปลี่ยนเป็น Fe^{3+} และทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียมไทโอไซยาเนต (NH_4SCN) จะได้ตะกอนสีแดงสามารถวัดปริมาณ Fe^{3+} ได้โดยนำหลอดทดลองดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (Total antioxidant activity) พบว่า ชุดควบคุมผลลบ (น้ำกลั่น) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดต่ำที่สุด รองลงมาคือข้าวเหนียวเขี้ยวงู สาโททางการค้า 1 วิตามินซี (ชุดควบคุมผลบวก) วิตามินอี (ชุดควบคุมผลบวก) สาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN25 และ NN27 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 NN25 และ NN27 สาโททางการค้า 2 และ BHA (ชุดควบคุมผลบวก) ตามลำดับ (ดังรูป 17)

พบว่าเมื่อนำข้าวเหนียวเขี้ยวงูมาหมักเป็นสาโทแล้ว จะสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งสาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN25 และ NN27 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 NN25 และ NN27 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดใกล้เคียงกับ BHA (1 กรัมต่อลิตร) และสูงกว่าวิตามินซี (0.1 กรัมต่อลิตร) และวิตามินอี (1 กรัมต่อลิตร) ซึ่งเป็นชุดควบคุมผลบวกซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มควบคุมผลลบ และสาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN25 และ NN27 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 NN25 และ NN27 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและไม่แตกต่างกับสาโททางการค้าอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (Total antioxidant activity) ของตัวอย่างสาโทที่หมักได้ โดยทดสอบด้วยวิธีกรดโลในเลอิก ตัวอย่างสาโทที่ทำการหมักจากลูกแป้งของทั้ง 2 ตัวอย่าง (NN25 และ NN27) ตัวอย่างสาโทที่ทำการหมักจากราบริสุทธ์จากลูกแป้งของทั้ง 3 ตัวอย่าง (NN6 M NN25 M และ NN27 M) ตัวอย่างสาโทที่ทำการหมักกราและยีสต์บริสุทธ์จากลูกแป้งของทั้ง 3 ตัวอย่าง (NN6 MY NN25 MY และ NN27 MY) BHA (Butyl Hydroxyl Anisole) 1 กรัมต่อลิตร วิตามินซี (Ascorbic acid) 0.1 กรัมต่อลิตร และ วิตามินอี (Tocopherol) 1 กรัมต่อลิตร เป็นชุดควบคุมผลบวก และ น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุมผลลบ

9.2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing capacity)

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing capacity) มีหลักการว่าสารที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ จะให้อิเล็กตรอนและยับยั้งการรีดิวซ์ของ Fe^{3+} ในโพแตสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$) ให้กลายเป็น Fe^{2+} ได้

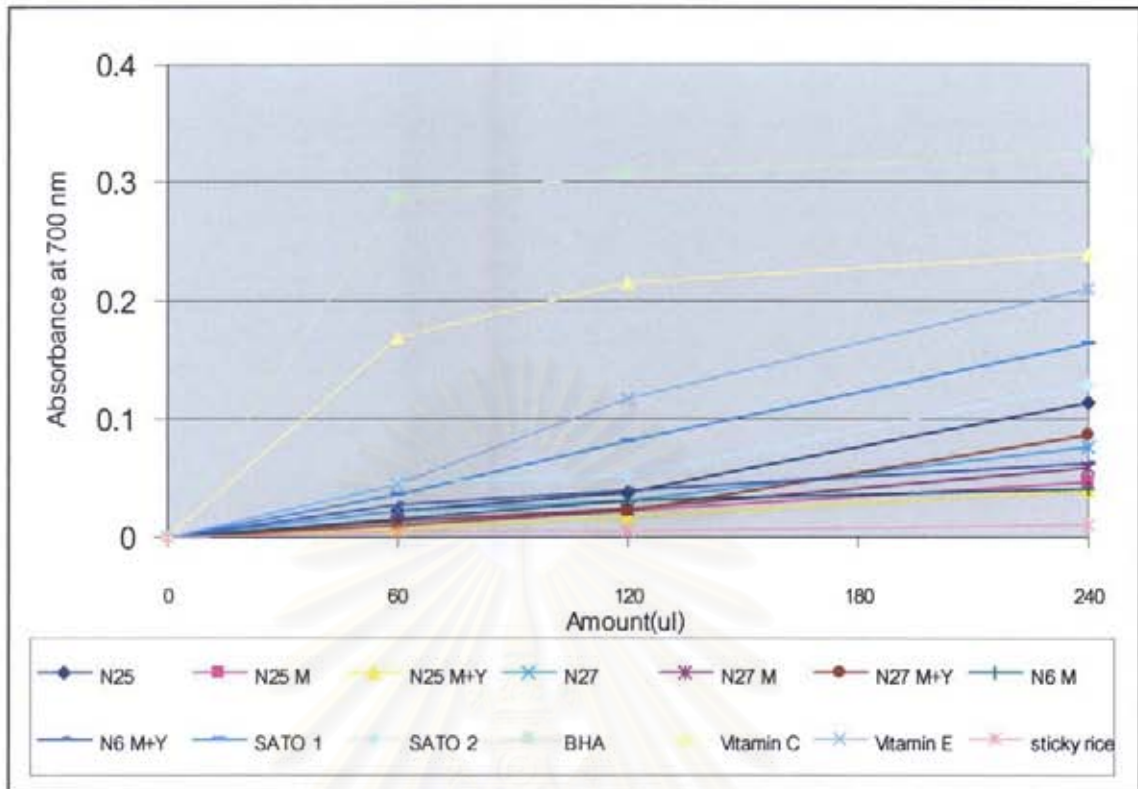
การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing capacity) พบว่า BHA 1 กรัมต่อลิตร มีความสามารถในการรีดิวซ์ สูงที่สุดรองลงมาเป็นวิตามินซี 0.1 กรัมต่อลิตร วิตามินอี 1 กรัมต่อลิตร สาโททางการค้า 1 สาโททางการค้า 2 สาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN25 สาโทที่หมักจากเชื้อราและ

ยีสต์บริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN27 สาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN27 สาโทที่หมักจากเชื้อรา และยีสต์บริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง N6 สาโทที่หมักจากเชื้อราบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN27 สาโทที่หมักจากเชื้อราบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN25 สาโทที่หมักจากเชื้อราบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 สาโทที่หมักจากเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง N25 และ ข้าวเหนียวเขี้ยวงู ตามลำดับ (ดังรูป18)

พบว่าเมื่อทำการหมักข้าวเหนียวเขี้ยวงูให้เป็นสาโทแล้ว จะสามารถเพิ่มความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing capacity) ซึ่งสาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN25 และ NN27 จะมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงกว่าสาโทที่หมักจากเชื้อราบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 NN25 และ NN27 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ สาโทที่หมักจากเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 NN25 และ NN27 และไม่แตกต่างกับสาโททางการค้าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing capacity) ของตัวอย่างสาโทที่หมักได้ 60 120 และ 240 ไมโครลิตร ของตัวอย่างสาโทต่างๆ ถูกนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ตามวิธีโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ตัวอย่างสาโทที่ทดสอบได้แก่ ตัวอย่างสาโทที่ทำการหมักจากลูกแป้งของทั้ง 2 ตัวอย่าง (NN25 และ NN27) ตัวอย่างสาโทที่ทำการหมักจากราบริสุทธิ์จากลูกแป้งของทั้ง 3 ตัวอย่างลูกแป้ง (NN6 M NN25 M และ NN27 M) ตัวอย่างสาโทที่ทำการหมักราและยีสต์บริสุทธิ์จากลูกแป้งของทั้ง 3 ตัวอย่าง (NN6 MY NN25 MY และ NN27 MY) BHA (Butyl Hydroxyl Anisole) 1 กรัมต่อลิตร วิตามินซี (Ascorbic acid) 0.1 กรัมต่อลิตร และ วิตามินอี (Tocopherol) 1 กรัมต่อลิตร เป็นชุดควบคุมผลบวก และ ข้าวเหนียวหนึ่งเป็นชุดควบคุมผลลบ

9.2.3 การวิเคราะห์ Free radical scavenging activity

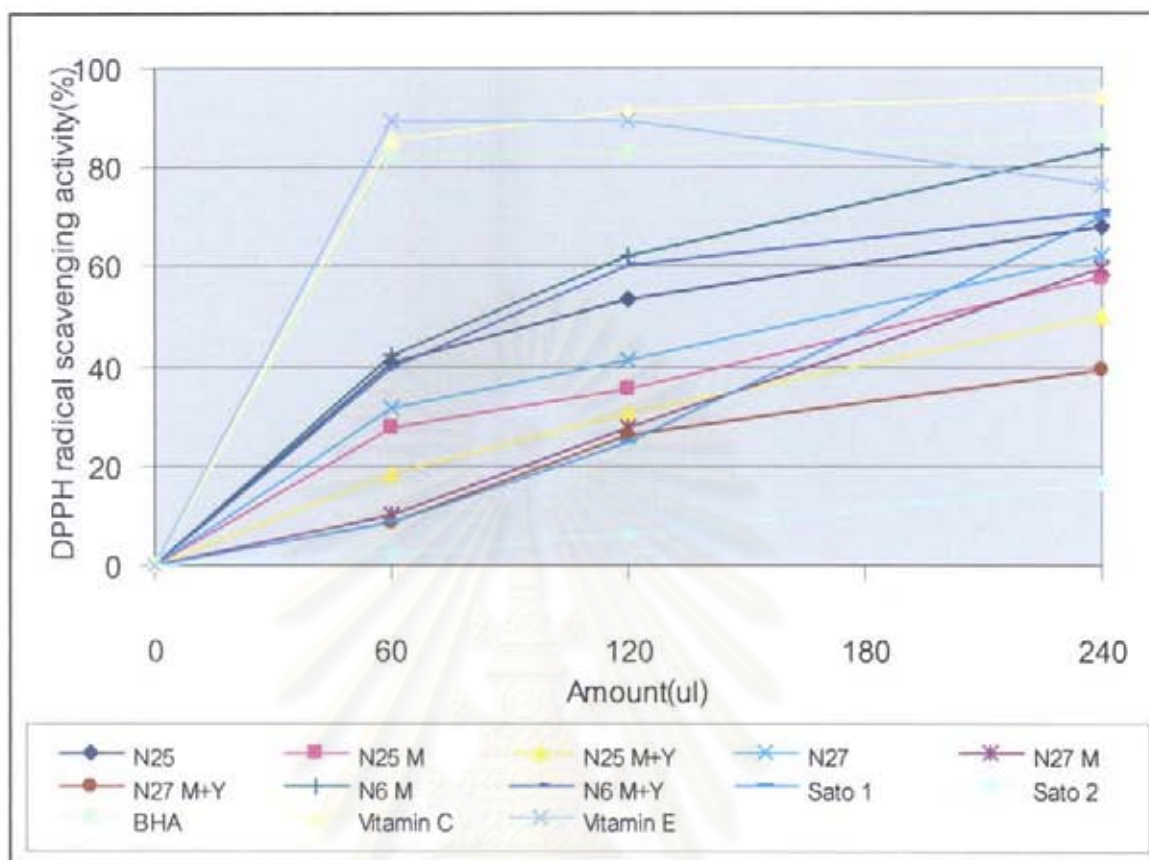
การวิเคราะห์ Free radical scavenging activity มีหลักการว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถให้อิเล็กตรอนกับ free radical ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ DPPH radical ทำให้ปริมาณ free radical ลดลง

การวิเคราะห์ Free radical scavenging activity พบว่า วิตามินซี วิตามินอี มี Free radical scavenging activity สูงที่สุด รองลงมาคือ BHA สาโทที่หมักจากเชื้อราบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 สาโทที่หมักจากเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 สาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN25 สาโททางการค้า 1 สาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN25 สาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN27 สาโทที่หมักจากเชื้อราบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN27 สาโทที่หมักจากเชื้อราบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN25 สาโทที่หมักจากเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN25 สาโทที่หมักจากเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN27 และ สาโททางการค้า 2 ตามลำดับ (ดังรูป19)

สาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN25 และ NN27 จะมี Free radical scavenging activity สูงกว่าสาโทที่หมักจากเชื้อราบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 NN25 และ NN27 และ สาโทที่หมักจากเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 NN25 และ NN27 เล็กน้อย และไม่แตกต่างกับสาโททางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



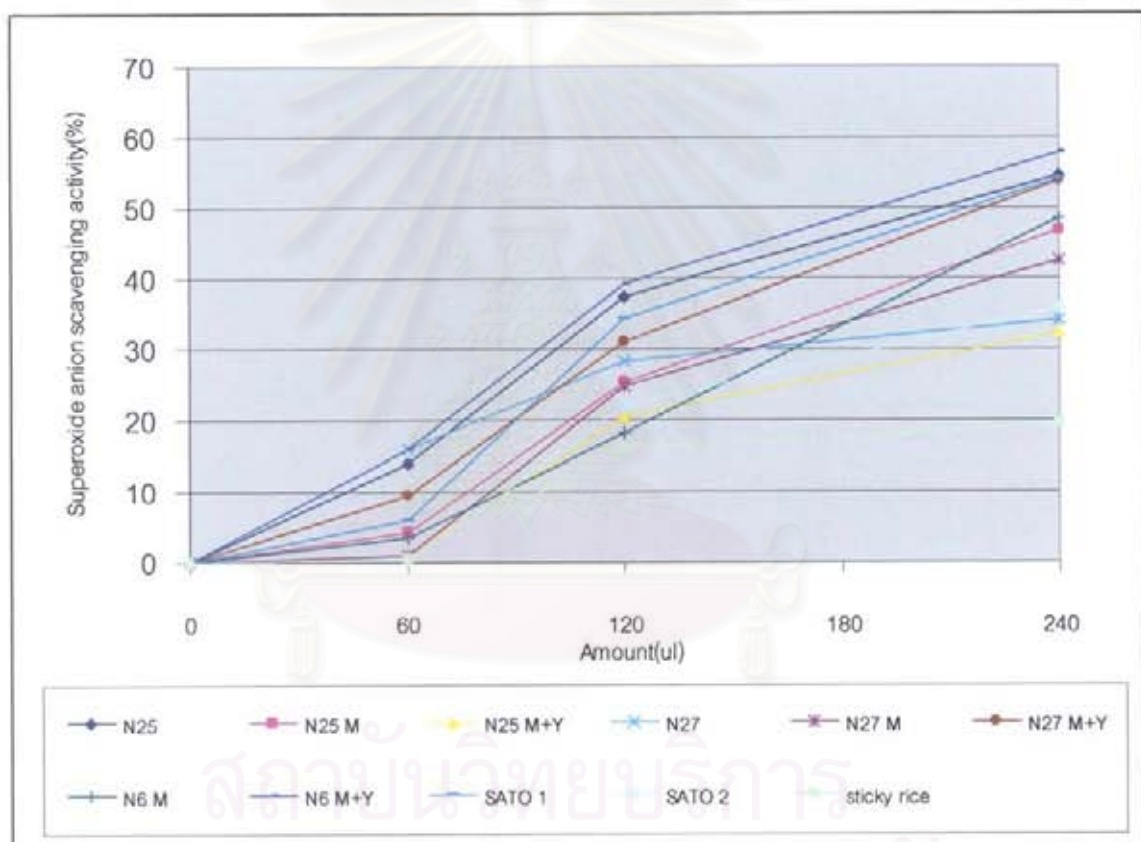
รูปที่ 19 การวิเคราะห์ Free radical scavenging activity ของตัวอย่างสาโทที่ทำการหมักจากลูกแป้งของทั้ง 2 ตัวอย่างลูกแป้ง (NN25 และ NN27) ตัวอย่างสาโทที่ทำการหมักราบริสุทธ์จากลูกแป้งของทั้ง 3 ตัวอย่างลูกแป้ง (NN6 M NN25 M และ NN27 M) ตัวอย่างสาโทที่ทำการหมักราและยีสต์บริสุทธ์จากลูกแป้งของทั้ง 3 ตัวอย่างลูกแป้ง (NN6 MY NN25 MY และ NN27 MY) BHA (Butyl Hydroxyl Anisole) 1 กรัมต่อลิตร วิตามินซี (Ascorbic acid) 0.1 กรัมต่อลิตร และ วิตามินอี (Tocopherol) 1 กรัมต่อลิตร เป็นชุดควบคุมผลบวก

9.2.4 การวิเคราะห์ Superoxide anion scavenging activity โดยใช้วิธี แชนธิน-แซนธิน ออกซิเดส

การวิเคราะห์ Superoxide anion scavenging activity พบว่าสาโทที่หมักจากเชื้อราและยีสต์บริสุทธ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 มี Superoxide anion scavenging activity สูงที่สุด รองลงมาคือ สาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN25 สาโททางการค้า 1 สาโทที่หมักจากเชื้อราและยีสต์บริสุทธ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN27 สาโทที่หมักจากเชื้อราบริสุทธ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง N6 สาโทที่หมักจากเชื้อราบริสุทธ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN25 สาโทที่หมักจากเชื้อราบริสุทธ์ผสมที่แยกได้

จากลูกแป้ง NN27 สาโททางการค้า 2 สาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN27 สาโทที่หมักจากเชื้อราและยีสต์
 บริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN25 และ ข้าวเหนียวเขียว ตามลำดับ (ดังรูป20)

พบว่าเมื่อทำการหมักข้าวเหนียวเขียวให้กลายเป็นสาโทแล้ว จะสามารถเพิ่ม
 Superoxide anion scavenging activity มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จาก
 กลุ่มข้าวเหนียวเขียว ส่วนสาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN25 และ NN27 มี Superoxide anion
 scavenging activity ไม่แตกต่างกับสาโทที่หมักจากเชื้อราบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6
 NN25 และ NN27 และ สาโทที่หมักจากเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 NN25
 และ NN27 และสาโททางการค้า อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



รูปที่ 20 การวิเคราะห์ Superoxide anion scavenging activity ของตัวอย่างสาโทที่ทำการหมักจาก
 ลูกแป้งของทั้ง 2 ตัวอย่างลูกแป้ง (NN25 และ NN27) ตัวอย่างสาโทที่ทำการหมักราบริสุทธิ์
 จากลูกแป้งของทั้ง 3 ตัวอย่างลูกแป้ง (NN6 M NN25 M และ NN27 M) ตัวอย่างสาโทที่ทำการ
 หมักราและยีสต์บริสุทธิ์จากลูกแป้งของทั้ง 3 ตัวอย่างลูกแป้ง (NN6 MY NN25 MY และ
 NN27 MY) และ ข้าวเหนียวหนึ่งเป็นชุดควบคุมผลลบ

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

1) การเก็บตัวอย่างลูกแป้ง

สามารถเก็บตัวอย่างลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ ได้เกือบทุกอำเภอ ยกเว้น อ. เจริญพระเกียรติ และ อ. ปอเกวียนไม่สามารถเก็บตัวอย่างลูกแป้งได้เนื่องจากตามสภาพดินของทั้งสองอำเภอเป็นดินเค็ม ชาวบ้านจึงนิยมผลิตเกลือสินเธาว์มากกว่าการผลิตสาโท และใน อ.สองแควนั้นไม่นิยมผลิตสาโท จึงทำให้ไม่มีตัวอย่างลูกแป้ง ส่วนกิ่ง อ. ภูเพียงสามารถเก็บได้หลายตัวอย่าง เนื่องจากในบริเวณดังกล่าว มีการส่งเสริมให้ทำสาโทเป็นผลิตภัณฑ์ในโครงการหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์(OTOP) ผู้ผลิตลูกแป้งสุราเพื่อทำสาโทจึงมีมากกว่าอำเภออื่นๆ โดยสำรวจพบว่าส่วนมากชาวบ้านจะทำสาโทกันเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือน และจะทำเมื่อว่างจากการปลูกพืชไร่ เวลาทำการผลิตลูกแป้งจะทำครั้งละไม่มาก จะเก็บไว้ไม่นาน เมื่อต้องการจึงเริ่มผลิตใหม่ ดังนั้นพบว่า การเก็บตัวอย่างลูกแป้งจึงหาได้ยากมีเฉพาะแหล่งเท่านั้น และแต่ละสูตรจะไม่เหมือนกัน ไม่มีความคงที่ของสูตร แล้วแต่ฤดูกาลหรือการผสมของสัดส่วนสมุนไพรจะแตกต่างกันตามความเหมาะสม เชื้อลูกแป้งก็มักอาศัยเชื้อลูกแป้งเก่าหรือเชื้อที่ยังคงมีอยู่ในบริเวณฟางที่อบลูกแป้ง เมื่อหมักสาโทเสร็จแล้วมักนิยมนำไปกลั่นเป็นสุราขาวไว้ส่งขายต่อไป จากการเก็บตัวอย่างลูกแป้งสุราจาก 11 อำเภอ ได้ทั้งหมด 41 แหล่งตัวอย่าง

2) ลักษณะของลูกแป้งที่เก็บได้มี 3 ขนาด

1. มีลักษณะกลมแบน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.0-2.8 เซนติเมตร มีสีขาวนวล หรือคล้ำเล็กน้อย
2. มีลักษณะกลมแบน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.6-3.4 เซนติเมตร สีขาวนวล
3. มีลักษณะรีคล้ายเรือกว้าง 6 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร สีขาวคล้ำเล็กน้อยและมีสมุนไพร

3) จากตัวอย่างลูกแป้งสุราที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมด 41 แหล่งตัวอย่าง จาก 11 อำเภอ ในจังหวัดน่าน เมื่อนำมาผลิตสาโทเพื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของราและยีสต์ในลูกแป้งในการผลิตสาโท ได้ผลดังตารางที่ 4 ประกอบกับผลการหมักสาโทที่ผลิตได้โดยผู้เชี่ยวชาญด้านการหมักไวน์และสาโทระดับประเทศ ทำให้คัดเลือกตัวอย่างลูกแป้งได้ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ NN6 (จากกิ่ง อ. ภูเพียง) NN25 (จาก อ. เชียงกลาง) และ NN27 (จาก อ. ปัว) สำหรับนำไปแยกยีสต์ และรา ในการทดลองต่อไป

4) จากลูกแป้งสุรา 3 แหล่งตัวอย่าง สามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 681 ไอโซเลตซึ่งยีสต์แต่ละไอโซเลต มีจำนวน $1 \times 10^5 - 10^8$ cfu ต่อลูกแป้ง 1 กรัม ได้ราทั้งหมด 20 ไอโซเลต ราแต่ละไอโซเลตมีจำนวนประมาณ 10^4 ต่อลูกแป้ง 1 กรัม ซึ่งผู้วิจัยไม่สามารถแยกราได้ในวันที่เหลือของการหมักสาโท ทั้งนี้

เนื่องจากภายหลังการผ่านน้ำ (การเติมน้ำปริมาณ 2 เท่าของข้าวเหนียวหนึ่งในวันที่ 3 ของการหมัก) จะเป็นการสร้างสภาพที่ขาด O_2 ซึ่งเหมาะกับกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยยีสต์ ซึ่งเป็นสภาพที่ไม่เหมาะต่อการเจริญของรา สำหรับในวันที่ 3/1 ไม่อาจตรวจพบราได้แม้ก่อนการผ่านน้ำ ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ stomacher ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อการแยกเชื้อ ซึ่งโดยปกติ stomacher เป็นเครื่องมือเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร ซึ่งการใช้ stomacher อาจทำให้สายใยของราฉีกขาดทำให้ไม่สามารถ แยกราได้

5) ลักษณะโคโลนีของราที่แยกได้

ลักษณะโคโลนีของราที่พบมักจะเป็นสีขาว หรือขาวเทา พูเหมือนปุยฝ้าย สปอร์สีดำ เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นลักษณะสายใย ก้านชูสปอร์ อับสปอร์ สปอร์หรือ conidia ของราแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ส่วนยีสต์จะพบว่ามีลักษณะโคโลนีสีขาว ขาวครีม หรือขาวนวล เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ส่วนใหญ่จะเห็นเป็นลักษณะเซลล์รูปกลมรี มีขนาดเล็ก

6) การจำแนกรา

การจำแนกราที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งมาจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาทั้งภายใต้กล้องและดูด้วยตาเปล่า โดยศึกษา ขนาดและลักษณะของสปอร์ ขนาดก้านสปอร์ การมีไรซอยด์ การมีคลอโรพลาสต์ ขนาดของคอแลนเจลลา ขนาดของสปอร์แรงเฉย และความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น *Mucor hiemalis* 6 ไอโซเลต *Mucor racemosus* 10 ไอโซเลต *Mucor indicus* 4 ไอโซเลต ซึ่งในงานวิจัยนี้ถือเป็นรายงานแรกที่ได้ทำการจำแนกราที่แยกได้จากลูกแป้งสุราของไทยถึงระดับสปีชีส์ ในงานวิจัยที่ใกล้เคียงกันได้แก่ รายงานของ Tsuyoshi และคณะ (2004) ที่สามารถจำแนกได้รา *Mucor circinellodes*, *Rhizopus chinensis* จาก Marcha ซึ่งเป็นไวน์ข้าวจากประเทศอินเดีย Lee และ Fujio (1999) ได้รายงานว่า สามารถแยกราจาก Banh men ซึ่งเป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิต ruou nep ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านของประเทศเวียดนาม และทำการจำแนกโดยใช้สัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี พบว่าราที่แยกได้เป็น *Rhizopus oryzae*, *Mucor indicus*, *Mucor circinilloides* และ *Amylomyces rouxii*

7) การจำแนกยีสต์

จากเดิมที่จะใช้วิธีทางชีวเคมี แต่เนื่องจากในงานวิจัยนี้แยกยีสต์ได้ถึง 681 ไอโซเลต ทำให้ต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายในการดำเนินการด้วยวิธีทางชีวเคมีสูง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิธีทางอณูชีววิทยา เข้ามาช่วยในการจัดจำแนกแบ่งกลุ่มของยีสต์ก่อน เพื่อเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มไปทดสอบทางชีวเคมีและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอต่อไป โดยวิธีทางอณูชีววิทยาที่เลือกใช้จะใช้วิธี Polymerase chain reaction – Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) โดยทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากยีสต์ไอโซเลตต่างๆ และเพิ่มจำนวนบริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน และทำการตัดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้เอนไซม์ที่จำเพาะ *HinFI*, *HhaI* และ *HaeIII* ได้รูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอทำให้สามารถจัดกลุ่มของยีสต์ที่แยกจากลูกแป้งได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม ดังนั้นการจัดกลุ่มโดยใช้วิธี PCR-RFLP จึงเป็นการจำแนกยีสต์ที่ได้อย่างรวดเร็ว (Rapid identification) โดยเปรียบเทียบกับรูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณเดียวกันกับที่เคยมีรายงานไว้ (Esteve-Zarzoso และคณะ, 1999) หลังจากนั้นจึงได้เลือกตัวแทนกลุ่มแบบสุ่มเพื่อยืนยันผลการจำแนกโดยวิธีทางชีวเคมีควบคู่กับนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8srDNA-ITS2 จากยีสต์ตัวแทน ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งก็พบว่าสำหรับการจำแนกรายโดยวิธีสัณฐานวิทยา และ ยืนยันผลการจำแนกโดยวิธีอณูชีววิทยาแล้วได้ผลตรงกัน ในส่วนของการจำแนกยีสต์ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน นั่นคือผลการจำแนกโดยวิธีชีวเคมีและวิธีอณูชีววิทยาให้ผล นั่นคือจำแนกได้ยีสต์ 4 ชนิด ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* *Saccharomycopsis fibuligera* *Pichia anomala* และ *Issatchenkia orientalis* การที่ได้ยีสต์ 4 ชนิด จากที่แบ่งโดยวิธี PCR-RFLP ซึ่งได้ 5 กลุ่ม เนื่องจากยีสต์กลุ่มที่ 3 ซึ่งถูกระบุได้ว่าเป็น *P. anomala* และยีสต์กลุ่มที่ 4 มีความคล้ายคลึงกับ *P. anomala* มากถึง 92% เมื่อเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 จากการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1 และ D2 ของ 26s rDNA พบว่าคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันของ *P. anomala* ถึง 99% ดังนั้นจึงสามารถระบุชนิดของยีสต์กลุ่มที่ 4 ว่าเป็น *P. anomala* เช่นกัน และยีสต์กลุ่มที่ 4 เป็น *P. anomala* ที่พบในลูกแป้ง NN6 ในขณะที่ลูกแป้ง NN25 และ NN27 พบเป็น *P. anomala* กลุ่มที่ 3 ดังนั้นยีสต์ *P. anomala* กลุ่ม 4 จึงน่าจะเป็น polymorphic form ของ *P. anomala* กลุ่ม 3 ซึ่งพบได้มากกว่า (มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ rDNA กับฐานข้อมูล มากกว่าคือ 99%)

8) การเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราชนิดต่างๆ ในระหว่างการหมักโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้วเป็นหัวเชื้อ

สามารถพบราได้ในเฉพาะวันที่ 0 ของการหมักจาก 3 ตัวอย่างลูกแป้ง (NN6 NN25 และ NN27) โดยในตัวอย่างลูกแป้ง NN25 พบ *Mucor racemosus* และ *Mucor indicus* จำนวน 7×10^3 และ 1×10^3 cfu/g ตามลำดับ และในตัวอย่างลูกแป้ง NN27 พบราเพียงชนิดเดียวคือ *Mucor indicus* จำนวน 3×10^3 cfu/g

ในการหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN6 และ NN25 เป็นหัวเชื้อพบ *Saccharomycopsis fibuligera* ในช่วงแรกของการหมัก แต่การหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN27 ไม่พบ *Saccharomycopsis fibuligera* แต่พบ *Pichia anomala* ในช่วงต้นของการหมัก (วันที่ 0 และ 3)

ในการหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN6 NN25 และ NN27 สามารถพบ *Saccharomyces cerevisiae* ได้ในช่วงหลังของการหมัก ตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 9 เหมือนกันทั้ง 3 ตัวอย่างลูกแป้ง นอกจากนี้ยังพบยีสต์ *P. anomala* จากตัวอย่างลูกแป้ง NN6 ในวันที่ 3 และ *Issatchenkia orientalis* จากตัวอย่างลูกแป้ง NN25 ในวันที่ 5 ถึง 9 ของการหมักสาโทด้วย

ผลจากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับที่ Perez-Nevado และคณะ (2006) ที่ได้รายงานว่าในช่วงแรกของการหมักไวน์จะมีการเจริญของยีสต์พวก non-*Saccharomyces* ได้ดี แต่เมื่อมีการเจริญของ *S. cerevisiae* ถึง 5×10^6 cfu/ml ขึ้นไป ยีสต์พวก non-*Saccharomyces* จะตายลงซึ่งอาจเป็นเพราะเมแทบอลิท์ของ *S. cerevisiae* ที่ยังไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าเป็นอะไร แต่ไม่ใช่ killer toxin

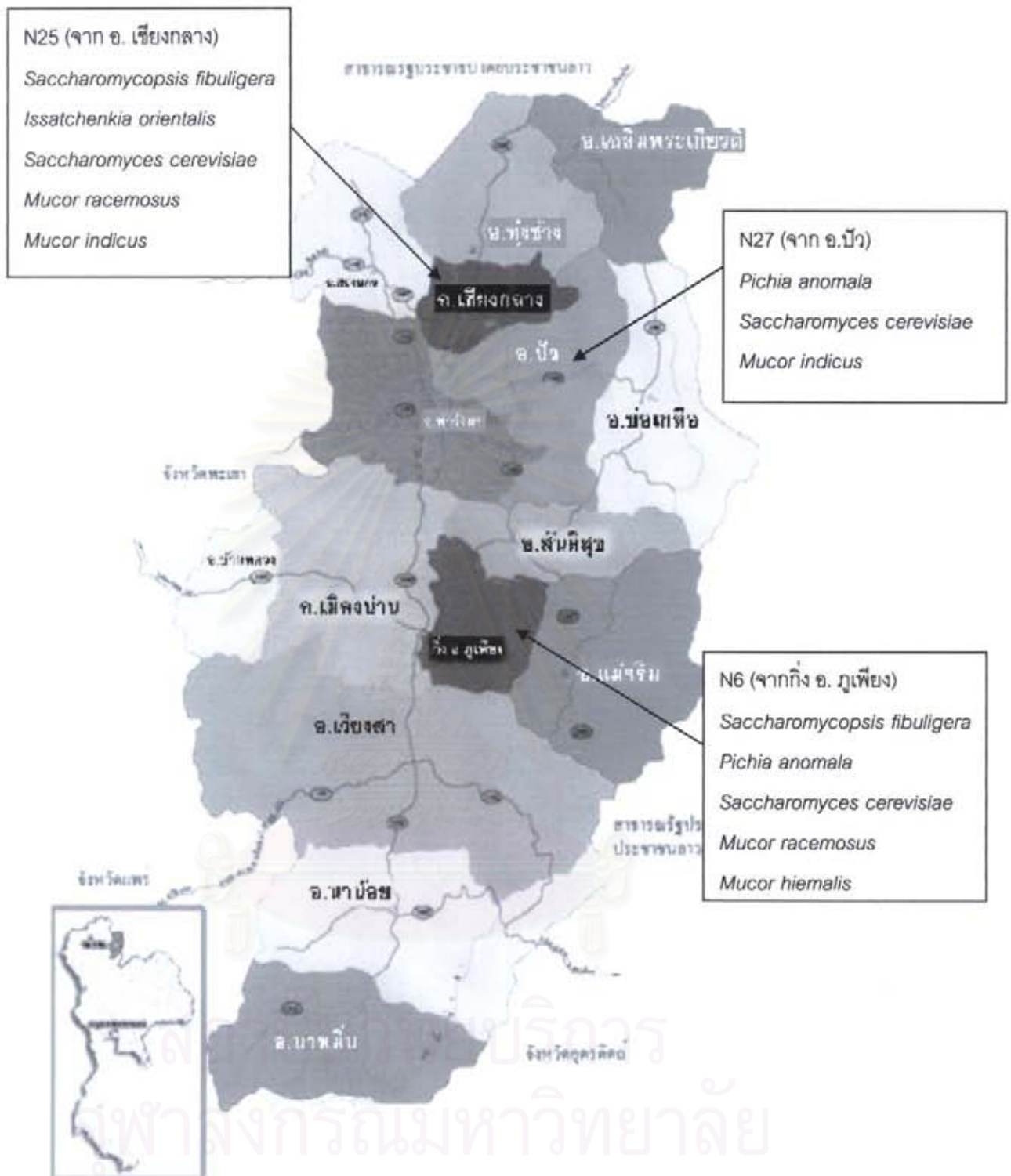
9) การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของราและยีสต์จากลูกแป้งจากจังหวัดน่าน

การศึกษาคความหลากหลายของชนิดของราและยีสต์จากลูกแป้งจากจังหวัดน่าน พบว่าตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้วภายในจังหวัดน่านซึ่งประกอบด้วย NN6 NN25 และ NN27 มีความหลากหลายทางชีวภาพดังนี้ ในตัวอย่างลูกแป้ง NN6 พบรา *Mucor racemosus* และ *Mucor hiemalis* ในตัวอย่างลูกแป้ง NN25 พบรา *Mucor racemosus* และ *Mucor indicus* และในตัวอย่างลูกแป้ง NN27 พบรา *Mucor indicus* เป็นที่สังเกตว่าราที่พบจากทั้ง 3 แหล่ง มีความซ้ำกันของชนิดของราที่แยกได้จากแหล่งที่ใกล้กัน ยกตัวอย่าง ตามสภาพภูมิประเทศ อำเภอบัวตองอยู่ระหว่าง กิ่งอำเภอภูเพียง และ อำเภอเชียงกลาง และพบว่า ราจากลูกแป้ง NN25 (จากอำเภอบัวตอง) มีชนิดที่พบได้จากลูกแป้งทั้งจากอำเภอเชียงกลาง และ จากกิ่งอำเภอภูเพียง ในที่นี้รา *Mucor racemosus* พบได้เช่นกัน ในลูกแป้ง NN6 (จากกิ่งอำเภอภูเพียง) ส่วนรา *Mucor indicus* พบได้เช่นกันในลูกแป้ง NN27 (จาก อำเภอบัวตอง) แต่ไม่พบ ราชนิดนี้ในลูกแป้ง NN6 ซึ่งมาจากแหล่งที่ไกลออกไป ส่วนชนิดของยีสต์ก็เป็นไปในทำนองเดียวกัน ยกเว้น *S. cerevisiae* ที่พบได้ในช่วงหลัง (ตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 9) ของการหมักในทุกตัวอย่างสาโท (รูปที่ 5.1)

ในส่วนของยีสต์จำพวก non-Saccharomyces พบ *Saccharomycopsis fibuligera* ในช่วงแรกของการหมักเมื่อใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN6 และ NN25 เป็นหัวเชื้อ ส่วนการหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN27 ไม่พบ *Saccharomycopsis fibuligera* แต่พบ *Pichia anomala* เช่นเดียวกันกับตัวอย่างลูกแป้ง NN25 นอกจากนี้ยังสามารถพบยีสต์ *Pichia anomala* และ *Issatchenkia orientalis* ในสาโทจากตัวอย่างลูกแป้ง NN6 และ NN25 ตามลำดับ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 21 แสดงตำแหน่งของอำเภอต่างๆ ในจังหวัดน่านที่เป็นแหล่งของตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้วและความหลากหลายของราและยีสต์ที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งนั้นๆ

10) การคัดเลือกกราและยีสต์ในการย่อยแป้งและหมักเอทานอลตามลำดับ

แอกทีวิตีของอัลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลส และเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสบน starch agar ไม่มีความสอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยนของแป้งให้กลายเป็นของเหลว ซึ่งความสามารถในการเปลี่ยนของแป้งให้กลายเป็นของเหลวเป็นภาพรวมของประสิทธิภาพของเอนไซม์หลายชนิดที่ย่อยแป้งได้ (ซึ่งมีนอกเหนือไปจากเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลส) อีกทั้งการเปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยนของแป้งเป็นของเหลวเป็นการเปรียบเทียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์จากจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คือ รา ในการเปลี่ยนวัตถุดิบในการผลิตสาโทโดยตรงคือ ข้าวเหนียวให้กลายเป็นน้ำต้อย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้เกณฑ์ความสามารถในการเปลี่ยนของแป้งให้กลายเป็นของเหลวมาคัดเลือกกราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งได้ดี และพบว่ารารหัส NN6/0/9 เมื่อทำการจำแนกชนิด พบว่าเป็น *Mucor heimalis* มีความสามารถในการเปลี่ยนของแป้งเป็นของเหลว (Liquefaction) ได้ดีที่สุดในเมื่อทดสอบหาความสามารถในการย่อยแป้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อแป้ง (Starch agar) พบเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) สูงที่สุดคือ 9.0 เซนติเมตร และมีแอกทีวิตีของอัลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลสเท่ากับ 0.174 และ 0.032 หน่วยตามลำดับ โดยที่ 1 หน่วย คือความสามารถในการเปลี่ยนสับสเตอร์ให้เป็นน้ำตาลปริมาณ 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ยีสต์ที่สามารถแยกได้จากวันที่ 9 ของการหมักจากทั้ง 3 แหล่งลูกแป้งที่คัดเลือกแล้วทั้งหมด 91 ไอโซเลต มีความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอลตั้งแต่ร้อยละ 0.201- 4.812 และยีสต์ *S. cerevisiae* N27/9/17 สามารถหมักให้ได้เอทานอลสูงสุด คือร้อยละ 4.812

11) การศึกษากลิ่นรสโดยการชิมและปริมาณของสารอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกลิ่นรสของสาโท

11.1 การศึกษากลิ่นรสของสาโทโดยการชิม (Sensory test)

พบว่าสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับสาโททางการค้า โดยสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NN6 มีคะแนนเฉลี่ย 67.45 คะแนน เป็นที่ยอมรับและจัดเป็นสาโทที่มีคุณภาพดี เมื่อเปรียบเทียบกับสาโททางการค้า ส่วนสาโทที่ผลิตจากราและยีสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 สาโทที่ผลิตจากรา ยีสต์และแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 ได้คะแนนเฉลี่ย 67.90 คะแนนทั้ง 2 ตัวอย่าง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสาโททางการค้า 1 และ 2 พบว่าสาโทที่ผลิตจากราและยีสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 สาโทที่ผลิตจากรา ยีสต์และแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับสาโททางการค้า 1 และสาโทสาโททางการค้า 2

11.2 การวิเคราะห์หาปริมาณของสารระเหยโดยใช้เครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

สารประกอบให้กลิ่น(Volatile compounds) ที่เกี่ยวข้องกับการให้กลิ่นมีหลายชนิด ได้แก่ สารในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์และเอสเทอร์ ซึ่งถูกสร้างในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ปริมาณการเกิดของสารเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สภาพะในการหมัก สายพันธุ์ของยีสต์ องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหมัก และอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก เป็นต้น (Valero, 2002)

11.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณของฟูเซลแอลกอฮอล์

ความเข้มข้นของฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีความสำคัญโดยพบว่าที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร จะช่วยทำให้เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิด นั้นมีกลิ่นรสที่ซับซ้อน แต่ถ้ามากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี อุ่น และกลบกลิ่นรสที่ดีของสารตัวอื่น (Ribereau-Gayon et al., 2000) นอกจากนี้ฟูเซลแอลกอฮอล์ ยังมีบทบาททางอ้อมในการพัฒนากลิ่นหอมของไวน์ โดยจะเกิดปฏิกิริยากับกรดอินทรีย์ ซึ่งจะทำให้เกิดเอสเทอร์โดยในระหว่างกระบวนการหมักจะมีการสร้างเอสเทอร์อย่างรวดเร็วภายใต้การควบคุมของเอนไซม์ของยีสต์ และจะต่อเนื่องไปในระหว่างการบ่มด้วย (Jackson, 2000)

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นของสาโทที่ผลิตจากลูกแบ่งสุราและสาโททางการค้าโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี –แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อจัดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐานผลแสดงในตารางที่ 13 แสดงปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแบ่งสุรา NN6 สาโทที่ผลิตจากราและยีสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแบ่งNN6 สาโทที่ผลิตจากรา ยีสต์และแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแบ่งNN6 และสาโททางการค้า 2 ตัวอย่าง พบสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของฟูเซลแอลกอฮอล์ ได้แก่ 1-โพรพานอล ไอโซบิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เอมิลแอลกอฮอล์ ฟีนิล และ-1 บิวทานอล ซึ่งสาโททุกตัวอย่างที่ทำการทดลองอยู่ในช่วงที่ควรพบในไวน์องุ่น ทำให้สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบยังทำหน้าที่เป็นสารให้กลิ่นที่ดี

ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานถึงปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ที่กำหนดในสาโท แต่จากงานวิจัยของ สุมัลลิกา โมรากุล (2545) ได้รายงานปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ 3 ชนิด ได้แก่ -1 โพรพานอล ,ไอโซบิวทานอล และ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ของสาโทที่ผลิตจากลูกแบ่งสุรามีปริมาณ 172.81 ,71.61 และ 183.35มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (สุมัลลิกา โมรากุล, 2545)

ประดิษฐ์ คุรุวัฒนา (2546)รายงานปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในสาเกซึ่งเป็นไวน์ข้าว เช่นเดียวกับสาโท พบว่า มีปริมาณ n-โพรพานอล ,ไอโซบิวทานอล, ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และฟีนิล

เอทิลแอลกอฮอล์ 170,64,120 และ 75 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งฟูเซลแอลกอฮอล์เหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญทางด้านกลิ่นของสาเก ปริมาณจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณกรดอะมิโน อุณหภูมิที่หมัก และสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ (ประดิษฐ์ ครุวัฒนา, 2546)

Likit และคณะ (2004) ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นหลักในสาโทตามท้องตลาดทั่วไป 10 ตัวอย่างวิเคราะห์โดยการฉีดน้ำหมักโดยตรงด้วยวิธี Gas Chromatography รายงานว่า มีปริมาณไอโซบิวทิลแอลกอฮอล์ 94-31 มิลลิกรัม/ลิตร ,ปริมาณไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 117.69-55.81 มิลลิกรัม/ลิตร และมีปริมาณฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ 53.6-21.66 มิลลิกรัม/ลิตร

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดฟูเซลแอลกอฮอล์นั้นมีหลายปัจจัย เช่น กระบวนการหมัก ลูกแป้งสุราที่ใช้ในการผลิตซึ่งมีจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันออกไป และข้าวซึ่งเป็นวัตถุดิบในการหมัก เป็นต้น

Rodriguez (2003) รายงานว่าฟูเซลแอลกอฮอล์ไม่ควรเกินกว่า 500 - 400 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งในจากการทดลองพบว่าปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์รวมของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้ามีปริมาณอยู่ในช่วง 89- 162.69 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งไม่เกินกว่าปริมาณที่กำหนด ฟูเซลแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจึงไม่ให้กลิ่นที่ไม่ดีแก่สาโท

11.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณของเอสเทอร์

เอสเทอร์ เป็นสารที่มีความสำคัญในการให้กลิ่นรสที่ดีในไวน์ เป็นเมแทโบไลต์ทุติยภูมิ ที่ถูกสร้างโดยยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ในไวน์ประกอบด้วยเอสเทอร์หลายชนิด เช่น อะซิเตตเอสเทอร์ ได้แก่ เอทิลอะซิเตต ,ไอโซเอมิลอะซิเตต และไอโซบิวทิลอะซิเตต เป็นต้น เอทิลเอสเทอร์ ได้แก่ เอทิลคาโพรเอท ,เอทิลคาพิวเรท และเอทิลคาเพรท เป็นต้น ซึ่งเอสเทอร์เหล่านี้จะให้กลิ่นผลไม้ ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเอสเทอร์มีหลายปัจจัย เช่น วัตถุดิบที่ใช้ในและสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการหมัก (Rojas, 2004) ในไวน์สามารถพบเอสเทอร์ได้หลากหลายมีทั้งที่สามารถระเหยได้ และมีทั้งที่มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถ ระบุได้ ซึ่งเอสเทอร์ที่มีปริมาณเท่ากับหรือมากกว่าระดับ threshold นั้นจะให้กลิ่นผลไม้ ซึ่งมีความสำคัญยิ่งต่อกลิ่นรสของไวน์

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้าโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐานผลแสดงในรูปที่ 14 แสดงปริมาณเอสเทอร์ ที่พบในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า พบว่า สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของเอสเทอร์ ที่พบได้แก่เอทิลอะซิเตต เอทิลคาโพรเอท ไอโซเอมิลอะซิเตต เอทิลคาพิวเรท เอทิลคาเพรท และ เอทิลโพพาโนเอท ซึ่งสาโททุกตัวอย่างที่ทำการ

ทดลองอยู่ในช่วงที่ควรพบในไวน์องุ่น ทำให้สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของเอสเทอร์ที่พบยังทำหน้าที่เป็นสารให้กลิ่นที่ดี

ประดิษฐ์ คุรุวัฒนา (2546) รายงานปริมาณเอสเทอร์ที่พบในสาเกซึ่งเป็นไวน์ข้าว เช่นเดียวกับสาโท พบว่า มีปริมาณ เอทิลอะซิเตต ,ไอโซเอมิลอะซิเตต ,เอทิลคาโพรเอท ,เอทิลคาพิวเรท ,เอทิลคาเพรท และเอทิลบิวทิเรท 10, 5, 2, 2, 20-30 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งเอสเทอร์เหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญทางด้านกลิ่นของสาเก (ประดิษฐ์ คุรุวัฒนา, 2546)

จากการทดลองพบว่าทั้งในสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุราและสาโททางการค้า สามารถพบปริมาณของเอสเทอร์ที่สำคัญเช่นเดียวกับที่พบในสาเก แต่เนื่องจากกระบวนการผลิต อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตและสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ ตลอดจนการวิเคราะห์กลิ่นมีความแตกต่างกันจึงทำให้ปริมาณที่ได้แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่จำเป็นต่อการหมักจากลูกแป้งสุรา และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในรูปของเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อเตรียมเป็นกล้าเชื้อใช้ในการผลิตไวน์ข้าวแทนการใช้ลูกแป้งสุรา เพื่อให้ได้สาโทที่มีคุณภาพดีและสม่ำเสมอในการผลิต (วรรัตน์, 2539)

11.3 การวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอินทรีย์และกลีเซอรอลโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ไม่พบกรดซิตริกในตัวอย่างสาโท ส่วนปริมาณกรดไพรูวิกมีค่าอยู่ในช่วง 0.273-127.30 กรัมต่อลิตร พบว่าตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 มีปริมาณกรดไพรูวิกมากที่สุด คือ 127.30 กรัมต่อลิตร และ ตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 มีปริมาณกรดไพรูวิกน้อยที่สุด คือ 0.273 กรัมต่อลิตร น่าสังเกตว่าตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราบริสุทซ์จะมีปริมาณกรดไพรูวิกสูง และมีปริมาณเอทานอลต่ำเช่น ในตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 NN25 และ NN27 มีปริมาณกรดไพรูวิก 127.30 76.64 และ 69.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณเอทานอล 1.99 4.35 และ 4.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างสาโททางการค้า 1 และสาโททางการค้า 2 มีปริมาณกรดไพรูวิก 58.2 และ 27.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณเอทานอล 8.25 และ 10.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ข้าวเหนียวมีปริมาณกรดไพรูวิก 0.543 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณเอทานอล 0.30 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองดังกล่าว พบว่าในตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราที่แยกได้จากลูกแป้งมีปริมาณกรดไพรูวิกสูง และมีปริมาณเอทานอลต่ำ ส่วนในตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งและตัวอย่างที่ได้จากการหมักข้าวเหนียวกับลูกแป้งมีปริมาณกรดไพรูวิกต่ำ และมีปริมาณเอทา

นอลสูง จึงอาจกล่าวได้ว่ายีสต์มีบทบาทในการเปลี่ยนกรดไพรูวิกให้เป็นสารอินทรีย์อื่นๆ โดยเฉพาะเอทานอล

กรดไพรูวิกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของกระบวนการไกลโคไลซิส สามารถเป็นสารตั้งต้นของทั้งกรดแลคติก กรดอะซิติก และเอทานอล โดยกรดไพรูวิกสามารถเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนซึ่งมี Lactic dehydrogenase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ส่วนในกระบวนการหมัก กรดไพรูวิกจะเปลี่ยนเป็น Acetadehyde ซึ่งอาจเปลี่ยนไปเป็น เอทานอลหรือกรดอะซิติกได้ โดย Acetadehyde จะเปลี่ยนไปเป็น เอทานอลโดยมี Pyruvate decarboxylase และ Alcohol decarboxylase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และ Acetadehyde จะเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกโดยมี acetic dehydrogenase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งกรดต่างๆเหล่านี้จะเป็นสารตั้งต้นของสารให้กลิ่น

ปริมาณกรดซัคซินิกอยู่ในช่วง 0 – 0.298 กรัมต่อลิตร ซึ่งตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN25 มีปริมาณกรดซัคซินิกมากที่สุด คือ 0.298 กรัมต่อลิตร และตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 ไม่พบกรดซัคซินิก ส่วนตัวอย่างสาโททางการค้า 1 และสาโททางการค้า 2 มีปริมาณกรดซัคซินิก 0.14 และ 0.177 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

กรดซัคซินิกเป็นกรดที่ถูกสร้างโดยยีสต์ในช่วงต้นของการหมักและจะหยุดเมื่อยีสต์สร้างแอลกอฮอล์เสร็จสิ้นแล้ว Lamikanra (1997) รายงานว่ากรดซัคซินิกเป็นกรดที่มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอินทรีย์อื่นใน table ไวน์ ทำให้ใน Muscadine wine ซึ่งมีปริมาณกรดซัคซินิกสูงมีปริมาณของเอสเทอร์ของกรดซัคซินิก ซึ่งก็คือสารเมทิล ซัคซิเนต ซึ่งให้กลิ่นผลไม้ (fruit odor) สูงเช่นกัน ทำให้ เป็นกลิ่นที่มีความโดดเด่นใน Muscadine wine กรดซัคซินิกเป็นสารตั้งต้นของสารให้กลิ่นในไวน์ 2 ชนิด คือ ไดเอทิลซัคซิเนต และ เมทิลซัคซิเนต ซึ่งให้กลิ่นผลไม้ (Lamikanra, 1995)

ปริมาณกรดแลคติกอยู่ในช่วง 0.096 – 7.503 กรัมต่อลิตร ซึ่งตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 มีปริมาณกรดแลคติกมากที่สุด คือ 5.073 กรัมต่อลิตร และตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN25 พบกรดแลคติกน้อยที่สุด ส่วนตัวอย่างสาโททางการค้า 1 และสาโททางการค้า 2 ถูกพบปริมาณกรดแลคติก 2.565 และ 7.503 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และไม่พบกรดแลคติกในตัวอย่างข้าวเหนียว

กรดแลคติกเป็นกรดที่ยีสต์สร้างได้ในปริมาณน้อย คือประมาณ 0.1 – 0.6 กรัมต่อลิตร ยีสต์ที่สามารถสร้างกรดแลคติกได้ดีนั้นจะจัดเป็นยีสต์ที่ดีเนื่องจากกรดแลคติก เป็นกรดที่เพิ่มความเป็นกรด

ใน ไวน์แต่ไม่เพิ่มรสชาติความเป็นกรด กรดแลกติกเป็นสารตั้งต้นของสารประกอบให้กลิ่น คือ เอทิลลอเรต (Delfini, 2001)

ปริมาณกลีเซอรอลอยู่ในช่วง 1.222 - 8.31 กรัมต่อลิตร ซึ่งตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับลูกแป้ง NN25 มีปริมาณกลีเซอรอลมากที่สุด คือ 1.222 กรัมต่อลิตร และ ตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 พบกลีเซอรอลเพียง 0.298 กรัมต่อลิตร ส่วนตัวอย่างสาโททางการค้า1และสาโททางการค้า2 มีปริมาณกลีเซอรอล 4.617 และ 6.405 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

กลีเซอรอล เป็นสารในกลุ่มโพลีไฮดรอกซีแอลกอฮอล์ซึ่งถูกสร้างโดยยีสต์ระหว่างกระบวนการหมัก จะมีค่าอยู่ในช่วง 3 – 11 กรัมต่อลิตร (Delfini, 2001) กลีเซอรอลมีความสำคัญทาง sensory เนื่องจากมีรสหวานและมีความเป็น oiliness (Amerine, 1972) จึงมีความเกี่ยวข้องกับบอดี้ของไวน์ และการให้ความรู้สึก กลมกล่อมของไวน์ในปาก (Jackson, 2000)

ปริมาณกรดอะซิติกอยู่ในช่วง 0 – 0.977 กรัมต่อลิตร ซึ่งตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN27 มีปริมาณกรดอะซิติกมากที่สุด คือ 0.977 กรัมต่อลิตร และ ตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 ไม่พบกรดอะซิติก ส่วนตัวอย่างสาโททางการค้า1และสาโททางการค้า2 พบปริมาณกรดอะซิติก 0.084 และ 0.872 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

กรดอะซิติก เป็นกรดระเหย เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ของเมแทโบไลต์ของยีสต์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ โดยยีสต์สร้างได้ในปริมาณน้อย (Jackson, 2000) กรดอะซิติกสามารถเพิ่มความซับซ้อน ให้ กับกลิ่นรสที่ดีในไวน์ (Delfini, 2001) เป็นสารตั้งต้นของสารในกลุ่มอะซิเตตเอสเทอร์ เช่น เอทิลอะซิเตต เป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรดอะซิติกและเอทานอล ซึ่งให้กลิ่นผลไม้ และ ไอโซเอมิลอะซิเตต ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรดอะซิติกและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ซึ่งให้กลิ่นกล้วย (สุมัลลิกการ ,2545)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆที่ได้จากตัวอย่างสาโท กับค่าที่เหมาะสมของไวน์องุ่นพบว่าปริมาณกรดอินทรีย์จากทุกตัวอย่างสาโทยังคงอยู่ในช่วงที่เหมาะสมของไวน์องุ่น(ดังตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 ชนิดและปริมาณของสารประกอบที่สำคัญที่พบในไวน์ผลไม้ (ดัดแปลงจาก:Wood,1998)

สารประกอบ	ช่วงความเข้มข้น (mg/l)	ปริมาณสารที่รับรสได้ (mg/l)
Alcohols		
ethanol	96,000 - 103,000	14,000
glycerol	3,200 - 16,500	3,800
n-propanol	0.7 - 125	750
isobutanol	2.7 - 131	200
phenylethanol	15 - 250	100
isoamyl alcohol	57 - 346	60
Acids		
acetic	31 - 742	175
succinic	500 - 2,000	350
lactic	100 - 6,000	400
malic	0 - 8,000	300
pyruvic	-	300
tartaric	1,000 - 4,000	270
citric	0 - 500	250
butyric	0.19 - 4.62	2.2
hexanoic	1.14 - 9.11	8
octanoic	1.29 - 13.95	13
decanoic	0.22 - 7.48	10

จากการทดลองนี้พบว่า ยีสต์ทำหน้าที่เปลี่ยนกรดไพรูวิกไปเป็นเมแทบอลิโทอื่นๆ เนื่องจากสาโทที่หมักจากลูกแบ้งและสาโทที่หมักจากราและยีสต์บริสุทธิ์ผสมของทุกตัวอย่าง (NN6 NN25 และ NN27) พบมีปริมาณกรดไพรูวิกต่ำกว่าสาโทที่หมักจากราบริสุทธิ์มากทั้งนี้เนื่องจากกรดไพรูวิกสามารถเปลี่ยนไปเป็นเมแทบอลิโทอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับสารให้กลิ่นได้

12) การวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบอินทรีย์

12.1 การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินในตัวอย่างสาโทโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จากผลการทดลองวิเคราะห์วิตามินพบเพียง 2 ชนิด คือ Thiamine หรือวิตามิน B1 และกรดแพนโทเทนิค โดยปริมาณ Thiamine ที่วิเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 0 – 60.07 กรัมต่อลิตร โดยตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN27 มีปริมาณ Thiamine มากที่สุด คือ 60.07 กรัมต่อลิตร และตัวอย่างสาโททางการค้า 1 ไม่พบ Thiamine ดังตารางที่ 4

ปริมาณกรดแพนโทเทนิคอยู่ในช่วง 0.358 – 54.512 กรัมต่อลิตร ซึ่งตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN25 มีปริมาณกรดแพนโทเทนิคมากที่สุด คือ 54.512 กรัมต่อลิตร และ ตัวอย่างข้าวเหนียวที่ทำการหมักกับราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 พบกรดแพนโทเทนิค 0.358 กรัมต่อลิตร ส่วนตัวอย่างสาโททางการค้า 1 และสาโททางการค้า 2 พบปริมาณกรดแพนโทเทนิค 31.398 และ 0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าพบ Thiamine ในสาโทที่มีการหมักจากทั้งลูกแป้งและเชื้อบริสุทธิ์ผสมเพิ่มขึ้นจากข้าวเหนียว 5-10 เท่า ส่วน Pantothenic acid สามารถพบได้มากเฉพาะในการหมักข้าวเหนียวจากราและยีสต์บริสุทธิ์ผสมเท่านั้น ส่วนในการหมักข้าวเหนียวจากราบริสุทธิ์ผสมพบว่า มี Pantothenic acid เพิ่มขึ้นจากข้าวเหนียวหนึ่ง (ไม่มี Pantothenic acid) เพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า Pantothenic acid ในสาโทนั้นอาจมีแหล่งที่มาจากยีสต์ โดยในรายงานของ Sarwar และคณะ(1985) รายงานว่ายีสต์ออกโตไลเสต(Yeast autolysate) เป็นแหล่งของ Pantothenic acid (B5) โดย Pantothenic acid เป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนชนิดอะลานีน และเป็นสารที่สำคัญในขบวนการเมแทบอลิซึมของไขมันและคาร์โบไฮเดรต(www.thefreedictionary.com/pantothenic+acid)

12.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

12.2.1 การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (Total antioxidant activity) พบว่าเมื่อทำการหมักข้าวเหนียวเชื้อยวูให้กลายเป็นสาโทแล้ว จะสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN25 และ NN27 และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง NN6 NN25 และ NN27 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดใกล้เคียงกับ BHA (1 กรัมต่อลิตร) และสูงกว่าวิตามินซี (0.1 กรัมต่อลิตร) และวิตามินอี (1 กรัมต่อลิตร) ซึ่งเป็นชุดควบคุมผลบวก และสาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN25 และ NN27 และเชื้อบริสุทธิ์

ผสมที่แยกได้จากลูกแบ่ง NN6 NN25 และ NN27 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและไม่แตกต่างกับสาโททางการค้าอย่างมีนัยสำคัญ($p < 0.05$)

13.2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing capacity) พบว่าเมื่อทำการหมักข้าวเหนียวเขี้ยวงูให้กลายเป็นสาโทแล้ว จะสามารถเพิ่มความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing capacity) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสาโทที่หมักจากลูกแบ่ง NN25 และ NN27 จะมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงกว่าสาโทที่หมักจากเชื้อราบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแบ่ง NN6 NN25 และ NN27 และ สาโทที่หมักจากเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแบ่ง NN6 NN25 และ NN27 และไม่แตกต่างกับสาโททางการค้าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

13.2.3 การวิเคราะห์ Free radical scavenging activity พบว่าสาโทที่หมักจากลูกแบ่ง NN25 และ NN27 จะมี Free radical scavenging activity สูงกว่าสาโทที่หมักจากเชื้อราบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแบ่ง NN6 NN25 และ NN27 และ สาโทที่หมักจากเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแบ่ง NN6 NN25 และ NN27 เล็กน้อย และไม่แตกต่างกับสาโททางการค้าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

13.2.4 การวิเคราะห์ Superoxide anion scavenging activity โดยใช้วิธี แชนธิน-แชนธิน ออกซิเดส พบว่าเมื่อทำการหมักข้าวเหนียวเขี้ยวงูให้กลายเป็นสาโทแล้ว จะสามารถเพิ่ม Superoxide anion scavenging activity อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสาโทที่หมักจากลูกแบ่ง NN25 และ NN27 จะมี Superoxide anion scavenging activity ไม่แตกต่างกับสาโทที่หมักจากเชื้อราบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแบ่ง NN6 NN25 และ NN27 และ สาโทที่หมักจากเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแบ่ง NN6 NN25 และ NN27 และสาโททางการค้า อย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้นจากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเมื่อทำการหมักข้าวเหนียวเขี้ยวงูให้กลายเป็นสาโทแล้ว จะสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้และสาโทที่หมักจากเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์ผสมมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ไม่แตกต่างกับสาโทที่หมักจากลูกแบ่ง โดยในผลการทดลองนี้จะพบว่า สาโทที่หมักได้จากลูกแบ่งและเชื้อบริสุทธิ์ผสมมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดสูงกว่าข้าวเหนียวหนึ่ง แต่มีความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing capacity) Free radical scavenging activity และ Superoxide anion scavenging activity ไม่สูง ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสาโทที่หมักได้จากลูกแบ่งและเชื้อบริสุทธิ์ผสมมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในภาพรวม แต่ในขณะนี้ตรวจไม่พบในการทดลองดังกล่าว (ความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing capacity) Free radical scavenging activity และ Superoxide anion scavenging activity) ดังนั้นจึงควรตรวจสอบปริมาณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้านอื่นๆ เพิ่มเติมต่อไป ซึ่งการตรวจพบ

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ตรงกับรายงานของ Que และคณะ (2006) ได้รายงานว่าเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านของประเทศจีนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้

14) จากผลการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ในสาโทที่หมักจากลูกแป้ง NN6 ที่คัดเลือกได้และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกจากลูกแป้ง NN6 พบว่าสารอินทรีย์ที่ทำการวิเคราะห์ทั้งกลีเซอรอลของสาโท ปริมาณของสารระเหย (ปริมาณของฟูเซลแอลกอฮอล์และเอสเทอร์) ปริมาณของกรดอินทรีย์ และวิตามินบางชนิด ในสาโทที่หมักจากลูกแป้งและเชื้อบริสุทธิ์แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าสาโทที่หมักจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมมีคุณภาพเทียบเท่ากับสาโทที่หมักจากลูกแป้ง

ดังนั้นจึงสามารถใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมซึ่งประกอบด้วยรา และยีสต์เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์หลักในการผลิตสาโทเพื่อเป็นการควบคุมการผลิตของสาโทให้มีคุณภาพเท่ากันในทุกครั้งของการผลิต

15) งานวิจัยนี้ทำการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ และราที่อยู่ในลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้จากจังหวัดน่าน โดยแยก และ จำแนกชนิดยีสต์ และ รา ที่พบและทำเป็น Culture collection ของยีสต์ และราในลูกแป้งสุราที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หลังจากนั้นทำการศึกษาความสามารถในการย่อยแป้ง (amylolytic activity), ความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ ตลอดจนวิเคราะห์สารอินทรีย์บางชนิดที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้และเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้งที่คัดเลือกได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- กฤษฎา ขุนแหลม. 2542 . ปัญหาพิเศษเรื่องการศึกษาประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- จิราภรณ์ สุขุมาวาลี. 2518 .การศึกษา กิจกรรมเอนไซม์ของลูกแป้ง วิทยานิพนธ์ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต แผนกวิชาจุลชีววิทยา คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เจริญ เจริญชัย. 2545 . เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตรการผลิตสุร่าพื้นบ้าน สำหรับผู้ประกอบการ ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมและเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล จ.ปทุมธานี และสมาคมผู้ผลิตไวน์ผลไม้และสุร่าพื้นบ้านไทย.
- โชคชัย วณู, นันทกร บุญเกิด, ลำไพโร ดิษฐวิบูลย์. 2546 . คนทำไวน์ : Winemaker I . พิมพ์ครั้งที่ 1 . กรุงเทพฯ: ซีเอ็ด ยูเคชั่น.
- นภา โล่ห์ทอง. 2535 . กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต กรุงเทพฯ: พันนี้ พับลิชชิง.
- ประดิษฐ์ คุ้มวัฒนา. 2546. ไวน์ : ศาสตร์และศิลป์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 52-64.
- มนตรี เขียวสังเกต. 2521 . การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และราเพื่อใช้ผลิตไวน์ข้าว วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มาตรฐานอุตสาหกรรมสุร่า. 2516 .กรุงเทพฯ : กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. กระทรวงอุตสาหกรรม.
- ยุพกนิษฐ์ พ่วงวีระกุล. กระบวนการผลิตสาโทและจุลชีววิทยาของสาโท. วารสารสถาบันอาหาร (NFI Journal) ปีที่ 5 ฉบับที่ 28 (มี.ค.-เม.ย. 2545) : 64-80.
- รุ่งตระการ จันทนพันธ์. 2549. สารประกอบอินทรีย์บางชนิดในสาโท. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์ 2535 .ข้าวสุไวน์ วารสารเกษตร 8 (1): 49-54.
- วรรรัตน์ โชติวรรณพร. 2539. การผลิตไวน์ข้าวเหนียวดำโดยการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2547. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่อง "การผลิตหัวเชื้อลูกแป้งสาโท" ณ ห้องประชุมชั้น 1 อาคารวิจัยและพัฒนา 1 เทคโนโลยี คลองห้า จ.ปทุมธานี วันที่ 30 พฤษภาคม 2547.
- สมพร สินธาวา. 2544 .การแยก การจัดจำแนก และการเก็บรักษายีสต์และราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้าในประเทศไทย วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุมลลิกา โมรากุล. 2545. การพัฒนากรรมวิธีการผลิตไวน์ข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมและการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุพัฒน์ กุมพิทักษ์ และกำพล กาหลง. 2545 . กรรมวิธีการผลิต อุ สาโท น้ำตาลเมา และเหล้ากลั่น เกษตรกรรมธรรมชาติ. ฉบับที่ 8/2545: บริษัทฐานการพิมพ์ จำกัด.
- สุภมาส ไขคำ. 2544. การศึกษาคุณภาพของสุรากลั่นพื้นบ้านที่ผลิตในเขตภาคเหนือตอนบน. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- อาจารย์ ปรีชากุล. 2550. การแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์จากลูกแป้งโดยใช้ปฏิกิริยาลูกไซโทลีเมอเรสเป็นพื้นฐาน. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Aidoo, K.E. Rob Nout, M.J. Sarkar, P.K. 2006. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermentation. FEMS Yeast Res. 6:30-39.
- 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.
- Barnett, J.A. Payne, R.W. and Yarrow, D. 1999. Yeast: Characteristics and identification. Cambridge University press. England.
- Cappello, M.S. Bleve, G. Grieco, F. Dellagio, F. and Zacheo, G. 2004. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. J. Applied Microbiol. 97:1274-1280.

- Cereia, M. Terenzi, H. F. Jorge, J. A. Greene, L. J. Rosa, J. C. De Lourdes, M. and Polizeli, T.M. 2000. Glucoamylase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. Biochemical and regulatory properties. J Basic Microbiol. 40(2):83 – 92.
- Ciani, M. Beco, L. Comitini, F. 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. Inter. J. Food Microbiol. 108:239-245.
- Clemente-Jimenez, J. M. Mingorance-Cazorla, L. Martiñez-Rodríguez, S. Heras-Vázquez, F. J. L. and Rodríguez-Vico F. 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. Food Microbiol. 21:149-155.
- de Hoog, G.S. , Guarro, J. , Gene J. and Figueras M.J. 2000. Atlas of clinical Fungi 2nd edition Centraalbureau voor Schimmelcultures Universitat Rovira i Virgili Netherlands.
- Delfini, C., Formica, J.V. 2001. Wine microbiology : science and technology. New York. USA: Marcel Dekker.
- Ellis, J. Wang, H. J. and Hesseltine. 1974. Rhizopus and chytrid strains surveyed for milk-clotting, amylolytic and antibiotic activities. Mycologia. 66 :593-599.
- Esteve-Zarzoso, B. Belloch, C. Uruburu, F. and Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Inter J Syst Bact. 49: 329–337.
- Grace, M.R. 1977. Cassava Starch and its Use. Cassavas Processing. Rome :FAO Consultant : 87-100.
- Granchi, L. Bosco, M. Messini, A. and Vincencini, M. 1999 . Rapid detection and qualification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rRNA ITS region. J. App. Microbiol. 87:949-956.
- Heras-Vázquez, F. J. L. Mingorance-Cazorla, L. Clemente-Jimenez, J. M. and Rodríguez-Vico, F. 2003. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. FEMS Yeast Res. 3:3-9.

- Inui, T. Takeda, Y. and Iizuka, H. 1965. Taxonomical studies on Genus *Rhizopus*. J Gen Appl Microbiol. 11:103-107.
- Jackson, R.S. 2000. Wine science : principle, practice, perception. 2nd ed. USA: Academic press.
- Lamikanra, O., Grimm, C.C., Inyang, I.D. 1995. Formation and occurrence of flavor components in Noble muscadine wine. J of Food Chem. 56 : 373-376.
- Lamikanra, O. 1997. Change in organic acid composition during fermentation and aging of Noble muscadine wine. J of Agri and food chem . 45 : 935-937.
- Le Mense, E. H. Van Lamem, J. M. and Langlykke A. P. 1947. Production of mold amylases in submerged culture. J. Bact. 54:144-159.
- Lee, A.C. and Fujio, Y. 1999. Microflora of banh men, a fermentation starter from Vietnam. World J Microbiol and Biotechnol. 15: 51-55.
- Maeres, 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.
- Nadal, D. Colomer, B. and Pina, B. 1996. Molecular Polymorphism Distribution in Phenotypically Distinct Populations of Wine Yeast Strains. Appl. Environment Microbiol. 1944-1950.
- Paraggio, M. 2004. Biodiversity of a natural population of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora uvarum* from Aglianico del vulture. Food Technol. Biotechnol. 42(3):165-168.
- Pérez-Nevado, F. Albergaria, H. Hogg, T. and Gírio, F. 2006. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Inter J Food Microbiol. 108 (3): 336-345.
- Peltier, G. L. and Beckord, L. D . 1945. Source of amylase producing bacteria. J. Bact. 50:711-714.
- Porter, R. Mc Cleskey, C. S. and Levine, M. 1937. The facultative assimilating bacteria producing gas from lactose. J. Bact. 33:163-182.

- Querol, A. and Fleet, G. 2006. Yeast in Food and Beverages. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Rodriguez, J.J., Conde, J.E., Garcia, 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. Inter J of Food microbiol, 70 : 283-289.
- Sabate, J. Cano J. Esteve-Zarzoso, B. and Guillamon, J.M. 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal gene and mitochondria DNA . Microbiol. Res, 157:267-274.
- Samson, R.A. Hoekstra, E.S. Frisvad, J.C. Filtenborg, O. 2002. Introduction to food-and airborne fungi. Centraalbeu voor Schimmelculture. Utrecht, Netherland.
- Sipiczic, M. Romano, P. Lipani, G. Miklos, I. and Antunovics, Z. 2001. Analysis of yeast derived from natural fermentation in a Tokaj winery. Antonie van Leeuwenhoek, 79:97-105.
- 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, Chiang Mai, Thailand.
- 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 J Microbiol and Biotechnol, 20: 143–150.
- Sukumavasi, J. Kato, K. and Harada, T. 1973. Glucoamylase of a strain of *Endomycopsis fibuligera* isolated from mold bran (Look Pang) of Thailand. J. Ferment. Technol, 53(8):559-565.
- Tamang, J.P. and Thapa, S. 2006. Fermentatopn Dynamics During Production of Bhaati Jaanr, a Treditional Fermented Rice Beverage of the Eastern Himalayas. Food Biotechnol, 20:251-261.

- Tester, R. F. Morrison, W. R. 1990. Swelling and gelatinization of cereal starches. I, Effects of amylopectin, amylose, and lipids. Cereal chemistry 67: 551-557.
- Toriya, M.J. Rozes, N. Poblet, M. Guillamon, J.M. Mas , A. 2001. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. Antonie van Leeuwenhoek.79: 345-352.
- Tsuyoshi, N. Fudou, R. Yamanaka, S. Kozaki, M. Tamang, N. Thapa, S. and Tamang J. P. 2005. Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amyolytic fermentation . Inter J Food Microbiol. 99:135-146.
- 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. J of Food Chem. 78 : 57-61.
- Walter, W. W. and Nagesh, S. M. 1965. Microbial amylase. Advances in Appli Microbiol. 7:273-304.
- Yoshizawa, K. 1985. Rice in brewing. In Juliano B. O. (ed.). Rice chemistry and technology. The American association of Cereal Chemists Inc. Minnesota.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การกำหนดรหัสลูกแบ่งโดยกำหนดทั้งรหัสจังหวัด ชนิดของลูกแบ่ง โดยกำหนดรหัสใช้เกณฑ์ดังต่อไปนี้

- อักษรภาษาอังกฤษ 2 ตัวอักษรแทนจังหวัด
 - ตัวเลข 2 หลักหลังใช้แทนลำดับที่ของลูกแบ่งจากจังหวัดเดียวกัน
- เช่น NN 1 หมายถึง ลูกแบ่งสุราตัวอย่างที่ 1 จากจังหวัดน่าน
NN28 หมายถึง ลูกแบ่งสุราตัวอย่างที่ 28 จากจังหวัดน่าน

การกำหนดรหัสเชื้อยีสต์และรา โดยใช้เกณฑ์ในการกำหนดรหัสดังนี้

- รหัส 3-4 ตัวแรกเป็นรหัสลูกแบ่งที่นำมาแยก
- ตัวเลขตัวกลางคือวันที่ทำการแยกเชื้อในระหว่างการหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแบ่งที่คัดเลือกแล้ว

- ใช้ Y ต่อจากรหัสลูกแบ่งแทน ยีสต์
- ใช้ M ต่อจากรหัสลูกแบ่งแทน รา
- ใช้ตัวเลข 2 หลักต่อจาก Y หรือ M แสดงลำดับที่ไอโซเลท

เช่น NN601 หมายถึง ยีสต์ไอโซเลทที่ 1 ทำการแยกเชื้อในระหว่างการหมักสาโทวันที่ 0 โดยใช้ตัวอย่างลูกแบ่งสุราตัวอย่างที่ 6 จากจังหวัดน่าน

NN101 หมายถึง ราไอโซเลทที่ 1 ทำการแยกเชื้อในระหว่างการหมักสาโทวันที่ 0 โดยใช้ตัวอย่างลูกแบ่งสุราตัวอย่างที่ 6 จากจังหวัดน่าน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato dextrose agar (PDA)

Potato starch	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล 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 ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล 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 ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วย สารละลายกรดแลคติกเข้มข้นร้อยละ 10 ให้มีความเป็นกรดต่างเป็น 4.8 แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Starch agar

Soluble starch	5	กรัม
Agar	20	กรัม

ละลายสารทั้งสองในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Acetate agar

Sodium acetate	4	กรัม
Agar	20	กรัม

ละลายสารทั้งสองในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Malt extract agar

Malt extract	5	กรัม
Agar	20	กรัม

ละลายสารทั้งสองในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

V8 medium

V8 juice	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	20	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ทำให้มีความเป็นกรดต่างเป็น 5.5 แล้วไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

นำมาผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2, 1:9 หรือ 1:19 แล้วจึงเติม Agar ให้เป็น 0.2 % แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

C-assimilation medium

Yeast nitrogen base	6.7	กรัม
---------------------	-----	------

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วไปกรองด้วยหัวกรอง 0.22 ไมครอนทำเป็น 10x base medium เมื่อใช้จริงให้เตรียม ดังนี้

10x base medium	0.5	มิลลิลิตร
-----------------	-----	-----------

น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	4.5	มิลลิลิตร
-------------------	-----	-----------

เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน 10 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลกโตส ซอร์โบส กลูโคซามีน ไรโบส ซูโครส กลีเซอรอล มอลโทส เมทานอล และแรมโนส ที่กรองด้วยหัวกรอง 0.22 ไมครอนแล้ว ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 มิลลิโมลาร์

N-assimilation medium

Yeast carbon base	11.4	กรัม
-------------------	------	------

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วไปกรองด้วยหัวกรอง 0.22 ไมครอนทำเป็น 10x base medium เมื่อใช้จริงให้เตรียม ดังนี้

10x base medium	0.5	มิลลิลิตร
-----------------	-----	-----------

น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	4.5	มิลลิลิตร
-------------------	-----	-----------

เติมแหล่งไนโตรเจนคือ กลูโคซามีนที่กรองด้วยหัวกรอง 0.22 ไมครอนแล้ว ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 มิลลิโมลาร์

Fermentation medium

Yeast extract	5	กรัม
---------------	---	------

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ใส่หลอด Durham ลงไปด้วย แล้วไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เติมแหล่งไนโตรเจนคือ กลูโคซามีน ที่กรองด้วยหัวกรอง 0.22 ไมครอนแล้ว ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 มิลลิโมลาร์

ภาคผนวก ค

1. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์ NN691 กับ
ฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ *Saccharomyces cerevisiae*

Score = 1360 bits (736), Expect = 0.0
Identities = 744/747 (99%), Gaps = 3/747 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      ttttttttGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGA 60
            |||
Sbjct 58      TTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGA 117

Query 61     GTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTC TTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGC 120
            |||
Sbjct 118     GTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGC GCGGTC TTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGC 177

Query 121    TATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTA AAAACCGTTTCAAT 180
            |||
Sbjct 178    TATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTA AAAACCGTTTCAAT 237

Query 181    ACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCG 240
            |||
Sbjct 238    ACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCG 297

Query 241    GGGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTA AATTTTGTCAAAAACA 300
            |||
Sbjct 298    GGGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTA AATTTTGTCAAAAACA 357

Query 301    AGAATTTTTCGTAAC TGGAAATTTTAAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 360
            |||
Sbjct 358    AGAATTTTTCGTAAC TGGAAATTTTAAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 417

Query 361    TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGT 420
            |||
Sbjct 418    TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGT 477

Query 421    GAATCATCGAATCTTTG AACGCACATTCGCGCCCTTGGTATTC CAGGGGCATGCCTGTT 480
            |||
Sbjct 478    GAATCATCGAATCTTTG AACGCACATTCGCGCCCTTGGTATTC CAGGGGCATGCCTGTT 537

Query 481    TGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAA 540
            |||
Sbjct 538    TGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAA 597

Query 541    CTTGAAATGCTGGCCTTTTCATTGGATGtttttttttCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGT 600
            |||
Sbjct 598    CTTGAAATGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTT-CCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGT 656

Query 601    GCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTT 660
            |||
Sbjct 657    GCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTT 716

Query 661    TATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGCTTAGGCGAACAATGTTCT 720
            |||
Sbjct 717    TATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGCTTAGGCGAACAATGTTCT 776

Query 721    TAAAGTT-GACCTCAAATCAGG-AGGA 745
            |||
Sbjct 777    TAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA 803
    
```

2. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์ NN601 กับฐานข้อมูล
ใน Genbank พบว่าเหมือนกับ *Saccharomycopsis fibuligera* strain 21511

Score = 1035 bits (560), Expect = 0.0
Identities = 560/560 (100%), Gaps = 0/560 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 4 TATTTGTTTTTAGACCTGCGCTTAACTGCGCGGTTAATAAACTCTTATACACAGTGT 63
      |||
Sbjct 5 TATTTGTTTTTAGACCTGCGCTTAACTGCGCGGTTAATAAACTCTTATACACAGTGT 64

Query 64 TTGTTTGCGAATTTGGTTTAGTTTGGTTGGTTTTTCATTCGAAAGGATGAAGATTGATTGCT 123
      |||
Sbjct 65 TTGTTTGCGAATTTGGTTTAGTTTGGTTGGTTTTTCATTCGAAAGGATGAAGATTGATTGCT 124

Query 124 AAATCTTATTCAGCTTTTTAACTCAGATCTCTTTTAAAGAGAAATGTATTTTTTAAAT 183
      |||
Sbjct 125 AAATCTTATTCAGCTTTTTAACTCAGATCTCTTTTAAAGAGAAATGTATTTTTTAAAT 184

Query 184 ACAACTAGTCGATTTTACAACTAAAAGTTAAAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGTTC 243
      |||
Sbjct 185 ACAACTAGTCGATTTTACAACTAAAAGTTAAAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGTTC 244

Query 244 TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGA 303
      |||
Sbjct 245 TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGA 304

Query 304 ATCATCGAATCTTTGAACGCATATTGCGCTCTATAGTATTCTATAGAGCATGCCTGTTG 363
      |||
Sbjct 305 ATCATCGAATCTTTGAACGCATATTGCGCTCTATAGTATTCTATAGAGCATGCCTGTTG 364

Query 364 AGCGTCATTTCTCTCTTAAACCTTTGGGTTTAGTATTGAAGGTTGTGTTAGCTTCTGCTA 423
      |||
Sbjct 365 AGCGTCATTTCTCTCTTAAACCTTTGGGTTTAGTATTGAAGGTTGTGTTAGCTTCTGCTA 424

Query 424 ACTCCTTTGAAATGACTTGGCAATTGATTGAGTTTCCATATATTTGCTTAAGGATTTAA 483
      |||
Sbjct 425 ACTCCTTTGAAATGACTTGGCAATTGATTGAGTTTCCATATATTTGCTTAAGGATTTAA 484

Query 484 TATTAGGTTCTACCAACTTATTAATACCCTTTTGCGAAGGACTTACTCGTGTATCAAGG 543
      |||
Sbjct 485 TATTAGGTTCTACCAACTTATTAATACCCTTTTGCGAAGGACTTACTCGTGTATCAAGG 544

Query 544 CCTTATAACTTTGTCATTAA 563
      |||
Sbjct 545 CCTTATAACTTTGTCATTAA 564

```

ศูนย์บริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์ NN27030 กับ
ฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ *Pichia anomala* strain WM 825 100%

Score = 1005 bits (544), Expect = 0.0
Identities = 544/544 (100%), Gaps = 0/544 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1 TCTATTGCCAGCGCTTAATTGCGCGGCGATAAACCTTACACACATTGTCTAGttttttttG 60
      |||
Sbjct 11 TCTATTGCCAGCGCTTAATTGCGCGGCGATAAACCTTACACACATTGTCTAGTTTTTTTG 70

Query 61 AACTTTGCTTTGGGTGGTGAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGGTCTAAACACAtttttttAA 120
      |||
Sbjct 71 AACTTTGCTTTGGGTGGTGAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGGTCTAAACACATTTTTTTTAA 130

Query 121 TGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTAAACAAAATTTAAATCTTCAAAAC 180
      |||
Sbjct 131 TGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTAAACAAAATTTAAATCTTCAAAAC 190

Query 181 TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT 240
      |||
Sbjct 191 TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT 250

Query 241 ATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCCCTCTGG 300
      |||
Sbjct 251 ATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCCCTCTGG 310

Query 301 TATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGGAGCGTCATTCTCTCTCAAACCTTCGGGTTTGGTAT 360
      |||
Sbjct 311 TATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGGAGCGTCATTCTCTCTCAAACCTTCGGGTTTGGTAT 370

Query 361 TGAGTGATACTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAA 420
      |||
Sbjct 371 TGAGTGATACTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAA 430

Query 421 GCAGTCTTTCTGAAATAATGTATTAGGTTCTTCCAACCTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTT 480
      |||
Sbjct 431 GCAGTCTTTCTGAAATAATGTATTAGGTTCTTCCAACCTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTT 490

Query 481 TAGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTAACAACAATAAACTAAAAGTTTGACCTCAAATCAGGT 540
      |||
Sbjct 491 TAGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTAACAACAATAAACTAAAAGTTTGACCTCAAATCAGGT 550

Query 541 AGGA 544
      |||
Sbjct 551 AGGA 554

```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์ NN6324 กับ
ฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ *Pichia anomala* strain WM 825 92%

Length=571

Score = 811 bits (439), Expect = 0.0
Identities = 532/573 (92%), Gaps = 22/573 (3%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1   ATTATAGTATTCCTATTGCCAGCGCTTAATTGCGCGGCGATAAACCTTACACACATTGTCT 60
          |||
Sbjct 1   ATTATAGTATTCCTATTGCCAGCGCTTAATTGCGCGGCGATAAACCTTACACACATTGTCT 60

Query 61  AG|tttttttGAACTTTGCTTTGGGTAGGCT-TTATGGC-T--TGCCCAGAGGACAACATA 116
          |||
Sbjct 61  AGTTTTTTTGAACCTTTGCTTTGGGT-GG-TGAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGG---TCTA 115

Query 117 AACACATTTTTTACAAATGTTTTAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAAATTTTTAAC-AA 175
          |||
Sbjct 116 AACACATTTTTT--TAATG-TTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAAATTTTTAACAAA 172

Query 176 AATTAAAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACG 235
          |||
Sbjct 173 AATTAAAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACG 232

Query 236 CAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAAC 295
          |||
Sbjct 233 CAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAAC 292

Query 296 GCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTGAGCGTCATTTCTCTCTCA 355
          |||
Sbjct 293 GCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTGAGCGTCATTTCTCTCTCA 352

Query 356 AACCTTTGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTGTAAATAGGGTTAACTTGAAATAATGTC 415
          |||
Sbjct 353 AACCTTCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTGTCAA---GGGTTAACTTGAAATAATGAC 409

Query 416 TTAGCAAGAGTGACTAATTTAT-ACGTCTTCTGAAATAATGTATTAGGTTCTTCCAAC 474
          |||
Sbjct 410 TTAGCAAGAGTGACTAATA-AGCA-GTCTTCTGAAATAATGTATTAGGTTCTTCCAAC 467

Query 475 TCGTTATATCAGCTAGGCAGATGAATA-GTATTTAGGCTCGGCTTAACAAT--TAAACT 531
          |||
Sbjct 468 TCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTAGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTAACAACAATAAACT 527

Query 532 AAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC 564
          |||
Sbjct 528 AAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC 560

```

บริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์ NN2573 กับ
ฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ *Issatchenkia orientalis*

Score = 907 bits (491), Expect = 0.0
Identities = 496/498 (99%), Gaps = 1/498 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 3      TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGTGATTTACTACTACACTGCGTGAGCGG 62
            |||
Sbjct 1      TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGG 60

Query 63     AACGAAAACAACAACACCTAAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAATCTAC 122
            |||
Sbjct 61     AACGAAAACAACAACACCTAAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAATCTAC 120

Query 123    GAAAAACAACAACAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGC 182
            |||
Sbjct 121    GAAAAACAACAACAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGC 180

Query 183    AGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGC 242
            |||
Sbjct 181    AGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGC 240

Query 243    ACATTGCGCCCCCTCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTCCATCTTGCG 302
            |||
Sbjct 241    ACATTGCGCCCCCTCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTCCATCTTGCG 300

Query 303    CGTGCGCAGAGTTGGGGGAGCGGAGCGGACGACG-TGTAAAGAGCGTCGGAGCTGCGACT 361
            |||
Sbjct 301    CGTGCGCAGAGTTGGGGGAGCGGAGCGGACGACGCTGTAAAGAGCGTCGGAGCTGCGACT 360

Query 362    CGCCTGAAAGGGAGCGAAGCTGGCCGAGCGAAGCTAGACTtttttttCAGGGACGCTTGGCG 421
            |||
Sbjct 361    CGCCTGAAAGGGAGCGAAGCTGGCCGAGCGAAGCTAGACTTTTTTTCAGGGACGCTTGGCG 420

Query 422    GCCGAGAGCGAGTGTGCGGAGACAACAAAAAGCTCGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCC 481
            |||
Sbjct 421    GCCGAGAGCGAGTGTGCGGAGACAACAAAAAGCTCGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCC 480

Query 482    GCTGAACTTAAGCATATC 499
            |||
Sbjct 481    GCTGAACTTAAGCATATC 498
    
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณ D1-D2 ของ 26srDNA ของยีสต์ NN6324 กับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ *Pichia anomala* strain DBVPG 3826 99%

Score = 918 bits (497), Expect = 0.0
 Identities = 501/503 (99%), Gaps = 0/503 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1 GCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTTGTAATTTGAAGAT 60
      |||
Sbjct 28 GCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTTGTAATTTGAAGAT 87

Query 61 GGTAACCTTGGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAG 120
      |||
Sbjct 88 GGTAACCTTGGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAG 147

Query 121 AATCCCGTCTGATGAGATGCCCATTCCTATGTAAGGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTT 180
      |||
Sbjct 148 AATCCCGTCTGATGAGATGCCCATTCCTATGTAAGGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTT 207

Query 181 GGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACC 240
      |||
Sbjct 208 GGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACC 267

Query 241 GATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAAGTTTAAAAGAGAGTGAAAAG 300
      |||
Sbjct 268 GATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAAGTTTAAAAGAGAGTGAAAAG 327

Query 301 TACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAGATCAGACTTGGTGTTTTATGATTATCTT 360
      |||
Sbjct 328 TACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAGATCAGACTTGGTGTTTTACGATTATCTT 387

Query 361 CTCTTCTTGAGTTGTGCACTCGTATTTCACTGGGCCAGCATCGATTCCGATGGCAAGATA 420
      |||
Sbjct 388 CTCTTCTTGAGTTGTGCACTCGTATTTCACTGGGCCAGCATCGATTCCGATGGCAAGATA 447

Query 421 ATGGTAGTTGAATGTGGCTTCACTTCGGTGGAGTGTATAGCTTCTGCTGATATTGCCTG 480
      |||
Sbjct 448 ATGGCAGTTGAATGTGGCTTCACTTCGGTGGAGTGTATAGCTTCTGCTGATATTGCCTG 507

Query 481 TCTGGATCGAGGGCTGCGTCTTT 503
      |||
Sbjct 508 TCTGGATCGAGGGCTGCGTCTTT 530
  
```

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของรา NN609 กับฐานข้อมูล
ใน Genbank พบว่าเหมือนกับ *Mucor hiemalis*

Score = 593 bits (321), Expect = 4e-168
Identities = 321/321 (100%), Gaps = 0/321 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1 TGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCCTCAATGGTATTCCATTG 60
      |||
Sbjct 1 TGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCCTCAATGGTATTCCATTG 60

Query 61 AGCACGCCTGTTTCAGTATCAAAAACACCCACATTCATAATTTTGTGTGAATGGAATT 120
      |||
Sbjct 61 AGCACGCCTGTTTCAGTATCAAAAACACCCACATTCATAATTTTGTGTGAATGGAATT 120

Query 121 GAGAGTTTCGGCTTTATGCTGAATTCTTTAAAATTATTAGGCCTGAACTATTGTCTTT 180
      |||
Sbjct 121 GAGAGTTTCGGCTTTATGCTGAATTCTTTAAAATTATTAGGCCTGAACTATTGTCTTT 180

Query 181 CTGCCTGAACAAttttttAATATAAAGGAATGCTCTAGTAAAAGACTATCTCTGGGGCC 240
      |||
Sbjct 181 CTGCCTGAACATTTTTTAATATAAAGGAATGCTCTAGTAAAAGACTATCTCTGGGGCC 240

Query 241 TCCCAAATAAATCATTCCTAAATTTGATCTGAAATCAGGCGGGATTACCCGCTGAACTTA 300
      |||
Sbjct 241 TCCCAAATAAATCATTCCTAAATTTGATCTGAAATCAGGCGGGATTACCCGCTGAACTTA 300

Query 301 AGCATATCAATAAGCGGAGGA 321
      |||
Sbjct 301 AGCATATCAATAAGCGGAGGA 321

```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของรา NN601 กับฐานข้อมูล
 ใน Genbank พบว่าเหมือนกับ *Mucor racemosus* strain UWFP 1084

Score = 1173 bits (635), Expect = 0.0
 Identities = 635/635 (100%), Gaps = 0/635 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATAATCAATAATCTTGGCTTGTCCATTAT 60
      |||
Sbjct 1 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATAATCAATAATCTTGGCTTGTCCATTAT 60

Query 61 TATCTATTTACTGTGAAGTGTATTATTATTGACGTTTGAGGGATGTTCCAATGTTATAA 120
      |||
Sbjct 61 TATCTATTTACTGTGAAGTGTATTATTATTGACGTTTGAGGGATGTTCCAATGTTATAA 120

Query 121 GGATAGACATTGGAGATGTTAACCAGATCATAATCAGGTTTAGGCCTGGTATCCTATTAT 180
      |||
Sbjct 121 GGATAGACATTGGAGATGTTAACCAGATCATAATCAGGTTTAGGCCTGGTATCCTATTAT 180

Query 181 TATTTACCAAATGAATTCAGAAATTAATATGTAACATAGACCTAAAAAATCTATAAAACA 240
      |||
Sbjct 181 TATTTACCAAATGAATTCAGAAATTAATATGTAACATAGACCTAAAAAATCTATAAAACA 240

Query 241 ACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCATAA 300
      |||
Sbjct 241 ACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCATAA 300

Query 301 CTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCCTCATTG 360
      |||
Sbjct 301 CTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCCTCATTG 360

Query 361 GTATTCCAATGAGCAGCCTGTTTCAGTATCAAAACAAACCTCTATCCAACCTTTGTTG 420
      |||
Sbjct 361 GTATTCCAATGAGCAGCCTGTTTCAGTATCAAAACAAACCTCTATCCAACCTTTGTTG 420

Query 421 TATAGGATTATTGGGGCCTCTCGATCTGTATAGATCTTGAAACCTTGAAATTTACTAA 480
      |||
Sbjct 421 TATAGGATTATTGGGGCCTCTCGATCTGTATAGATCTTGAAACCTTGAAATTTACTAA 480

Query 481 GGCCTGAACCTGTTTAAATGCCTGAACtttttttAATATAAAGGAAAGCTCTTGAATTG 540
      |||
Sbjct 481 GGCCTGAACCTGTTTAAATGCCTGAACTTTTTTTAAATATAAAGGAAAGCTCTTGAATTG 540

Query 541 ACTTTGATGGGGCCTCCCAAATAAATCTTTTTTAAATTTGATCTGAAATCAGGTGGGATT 600
      |||
Sbjct 541 ACTTTGATGGGGCCTCCCAAATAAATCTTTTTTAAATTTGATCTGAAATCAGGTGGGATT 600

Query 601 ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 635
      |||
Sbjct 601 ACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 635
  
```

9. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของรา NN2703 กับฐานข้อมูล
 ใน Genbank พบว่าเหมือนกับ *Mucor indicus* strain CBS 226.29

Score = 1013 bits (548), Expect = 0.0
 Identities = 548/548 (100%), Gaps = 0/548 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1 TCTGATAATTCAATAATTATCTTATTTACTGTGAACGTTTTTATTTATGACGTATAAGG 60
      |||
Sbjct 36 TCTGATAATTCAATAATTATCTTATTTACTGTGAACGTTTTTATTTATGACGTATAAGG 95

Query 61 GGATGTCTTTAGGCTATAAGGGTAGGCCATGGAATGTTAACCTAGTCATAGTCAAGCTT 120
      |||
Sbjct 96 GGATGTCTTTAGGCTATAAGGGTAGGCCATGGAATGTTAACCTAGTCATAGTCAAGCTT 155

Query 121 GATGCTTGGTACCCGATTATTACTTACCAAAAAGAATTCAGTTTAAAATATTGTAACATAG 180
      |||
Sbjct 156 GATGCTTGGTACCCGATTATTACTTACCAAAAAGAATTCAGTTTAAAATATTGTAACATAG 215

Query 181 ACCTAAAAATCTATAAAACAACCTTTTAAACAATGGATCTCTTGGTCTCGCATCGATGAA 240
      |||
Sbjct 216 ACCTAAAAATCTATAAAACAACCTTTTAAACAATGGATCTCTTGGTCTCGCATCGATGAA 275

Query 241 GAACGTAGCAAAGTGCAGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTT 300
      |||
Sbjct 276 GAACGTAGCAAAGTGCAGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTT 335

Query 301 GAACGCATCTTGCACTCAATGGTATTCCATTGAGTACGCCTGTTTCAGTATCAAAAACAA 360
      |||
Sbjct 336 GAACGCATCTTGCACTCAATGGTATTCCATTGAGTACGCCTGTTTCAGTATCAAAAACAA 395

Query 361 CCCTTATTCAAATTCtttttttGAATAGATATGAGTGTAGCAACCTTACAAGTTGAGAC 420
      |||
Sbjct 396 CCCTTATTCAAATTCtttttttGAATAGATATGAGTGTAGCAACCTTACAAGTTGAGAC 455

Query 421 ATTTTAAATAAAGTCAGGCCATATCGTGGATTGAGTGCCGATACTTTTTTAATTTTGAAA 480
      |||
Sbjct 456 ATTTTAAATAAAGTCAGGCCATATCGTGGATTGAGTGCCGATACTTTTTTAATTTTGAAA 515

Query 481 AGGTAAAGCATGTTGATGTCCGCTTTTTGGGCCTCCCAAATAACTTTTTAAACTTGATCT 540
      |||
Sbjct 516 AGGTAAAGCATGTTGATGTCCGCTTTTTGGGCCTCCCAAATAACTTTTTAAACTTGATCT 575

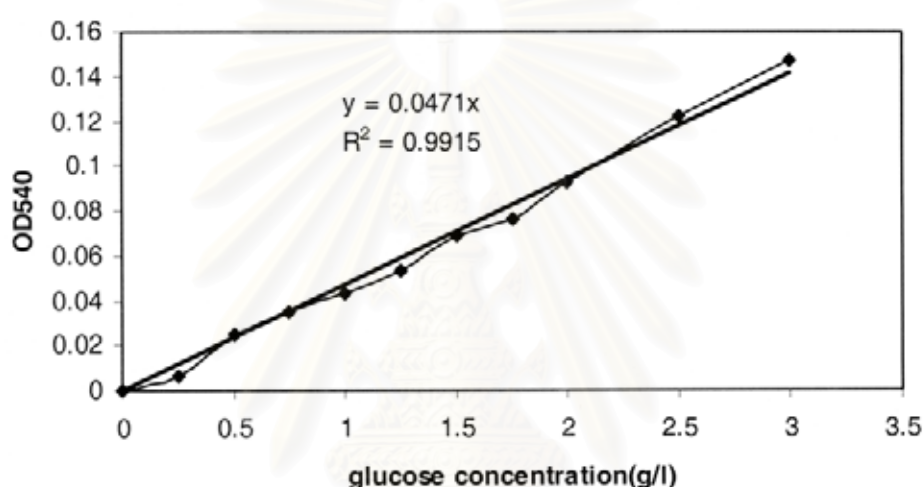
Query 541 GAAATCAG 548
      |||
Sbjct 576 GAAATCAG 583
    
```

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

1. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNSA) (Miller, 1959)

นำน้ำหมักที่ได้จากปฏิกิริยาการหาประสิทธิภาพของเอนไซม์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไธโอไซริลิก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำเย็น เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ) คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์(หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และน้ำตาลกลูโคส

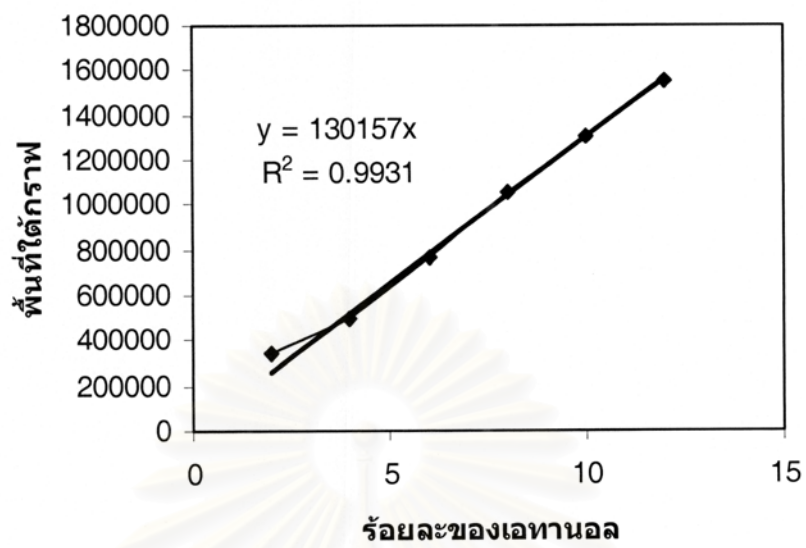
2. การหาปริมาณกลูโคสโดยวิธี peroxidase/glucose oxidase assay (Cereia และคณะ, 200 0)

นำน้ำหมักที่ได้จากปฏิกิริยาการหาประสิทธิภาพของเอนไซม์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร (ใช้สารละลายเอนไซม์เป็นตัวเปรียบเทียบ) คำนวณหาปริมาณกลูโคส(หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร) โดยเปรียบเทียบจากสมการมาตรฐานดังนี้

$$\frac{\text{Abs. Unknown} \times \text{Concentration of standard}}{\text{Abs. standard}} = \text{Glucose (mg/l)}$$

Abs. standard

3. การหาปริมาณเอทานอลโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี



รูปที่ 22 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ และร้อยละของเอทานอล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ใบให้คะแนนการชิมสาโท

ชื่อผู้ทดสอบ.....วันที่ทดสอบ.....

รหัส ตัวอย่าง	สี 10 คะแนน	กลิ่น 30 คะแนน	รส 40 คะแนน	ความยอมรับ หรือประทับใจ 20 คะแนน	รวม 100 คะแนน	ข้อดีและหรือข้อบกพร่อง

หมายเหตุ

คะแนนที่บ่งชี้คุณภาพไวน์: 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 ครูวัฒนา. 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		
	กลิ่นผลไม้หรือวัตถุดิบในสาขาโทแรงมาก		
	ชอบ บอกได้ทันที		26 – 30 คะแนน
	กลิ่นผลไม้หรือวัตถุดิบในสาขาโทแรง		
	ชอบ บอกได้โดยตมหลายครั้ง		22 – 25 คะแนน
	กลิ่นผลไม้หรือวัตถุดิบในสาขาโทแรง		
	พอบอกได้ ชอบกลิ่น		18 – 21 คะแนน
	กลิ่นผลไม้หรือวัตถุดิบในสาขาโทอ่อน		
บอกไม่ได้ แต่ชอบ		15 – 17 คะแนน	
กลิ่นผลไม้หรือวัตถุดิบในสาขาโทอ่อนหรือแรงเกินไป			
ไม่ชอบกลิ่น		10 – 14 คะแนน	
กลิ่นผลไม้หรือวัตถุดิบในสาขาโทอ่อน			
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 คุรุวัฒนา. ไลน์ : ศาสตร์และศิลป์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
2546. 154 -155.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์หาสารประกอบอินทรีย์ในน้ำหมักสาโทโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดซิตริก , กรดซัคซินิก , กรดแลคติก

โดยทำการชั่งสารตัวอย่างมาชนิดละ 50 มิลลิกรัม ใส่ลงในไมโครเซนตริฟิวทิวบ์ แยกกันแล้วเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

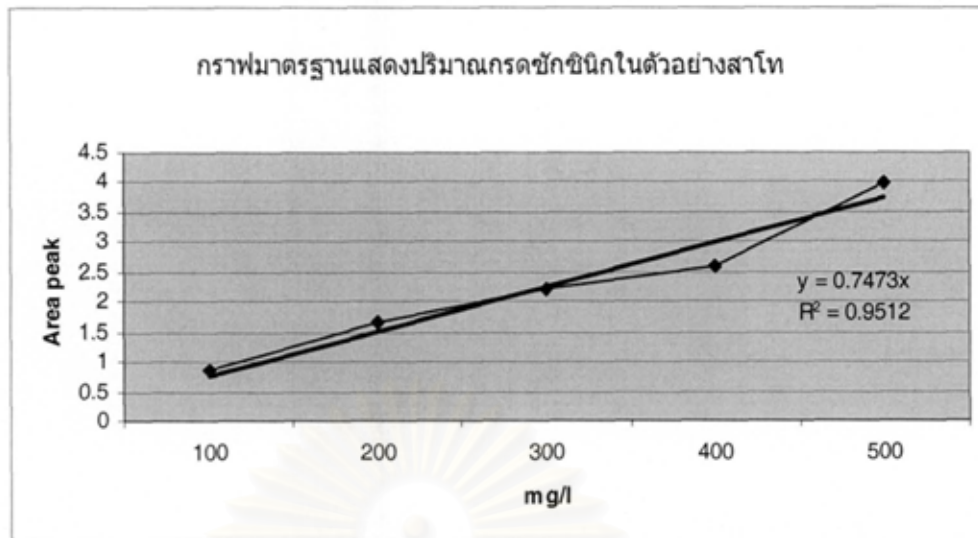
ปิเปตสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้มาผสมรวมกัน ตามปริมาณที่สามารถพบได้ในสาโท

ทำการกรองตัวอย่างสารละลายมาตรฐานที่ได้ และฉีดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร วิเคราะห์ด้วย HPLC ที่สภาวะดังนี้

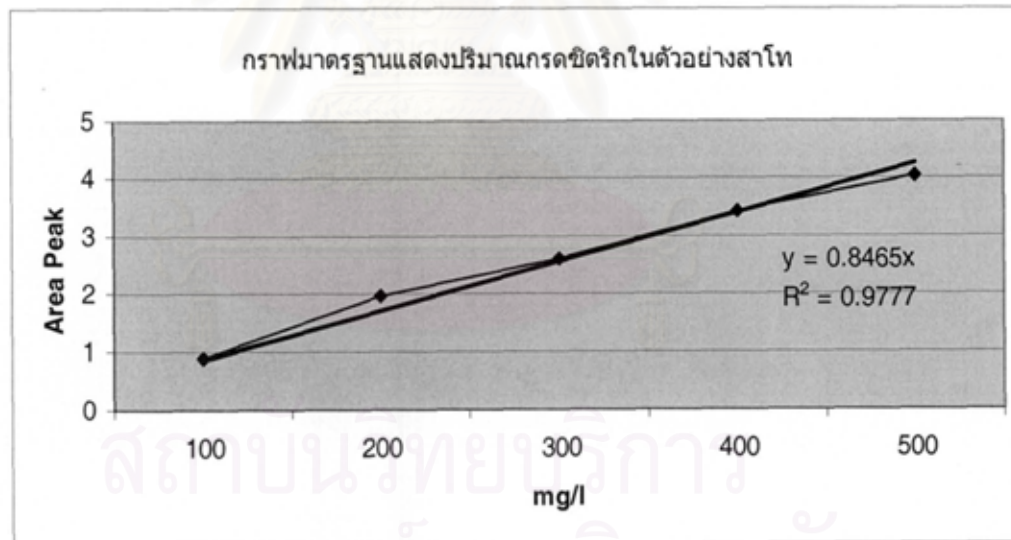
ชนิดของ column	Analysis column Animex HPX-87H Ion Exclusion Column
Flow rate	0.7 มิลลิลิตรต่อนาที
อุณหภูมิของ column	55°C
ชนิดของ detector	Refractive Index (RI)
ปริมาตรฉีด	10 ไมโครลิตร

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานต่อความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 23 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายกรดซึกซินิกมาตรฐานต่อความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)



รูปที่ 24 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายกรดซิตริกมาตรฐานต่อความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

วิเคราะห์ตัวอย่างสาโทโดยกรองตัวอย่างก่อนทุกครั้ง

การวิเคราะห์หาวิตามินในตัวอย่างสาโทโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

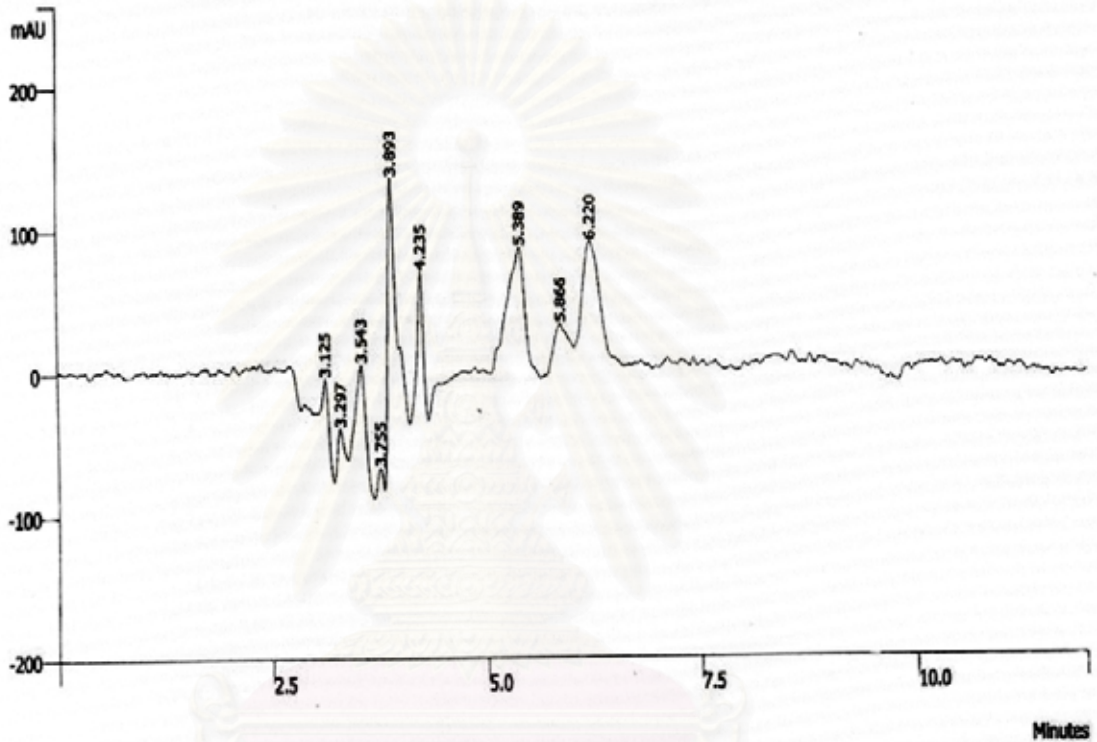
วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ Thiamine , Riboflavin , Panthothenic acid , Niacin , Pyridoxine โดยทำการชั่งสารตัวอย่างมาชนิดละ 1 มิลลิกรัม ใส่ลงในไมโครเซนตริฟิวทิวบ์ แยกกัน แล้วเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ผ่านเซลลูโลสอะซีเตต pore size ขนาด 0.22 ไมโครเมตร วิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

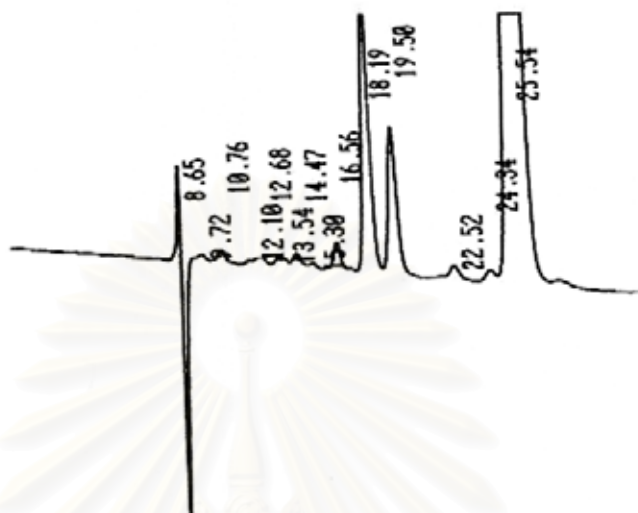
Data File: c:\star\data\15-01-07\mh2,100ul14;21;36 Operator (Calc): SUNAN
 Channel: 1 = 212 nm RESULTS Calc Date: 01/15/2007 02:33:31
 Sample ID: MH2,100ul Times Calculated: 1
 Operator (Inj): SUNAN Calculation Method: c:\star\water soluble vitamin.mth
 Injection Date: 01/15/2007 02:21:36 PM Instrument (Calc): Varian Star #1
 Injection Method: c:\star\water soluble vitamin.mth Run Mode: Analysis
 Run Time (min): 12.000 Peak Measurement: Peak Area
 Workstation: DISK1 Calculation Type: Percent
 Instrument (Inj): Varian Star #1 Calibration Level: N/A
 Verification Tolerance: N/A



Peak No	Peak Name	Result (mg/ml)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		3.6351	3.125	0.000	2316348	0.00	BP	3.1		0
2		1.9357	3.297	0.000	1233489	0.00	PB	0.0		0
3		9.8516	3.543	0.000	6277717	0.00	BB	6.9		0
4		0.6090	3.755	0.000	388076	0.00	BP	3.3		0
5		25.6351	3.893	0.000	16335336	0.00	PV	6.3		0
6		9.9917	4.235	0.000	6366940	0.00	VB	6.2		0
7		20.6231	5.389	0.000	13141545	0.00	BB	13.9		0
8		6.5640	5.866	0.000	4182779	0.00	BV	10.0		0
9		21.1547	6.220	0.000	13480337	0.00	VB	14.2		0
Totals		100.0000		0.000	63722568					

รูปที่ 25 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของวิตามิน

CHANNEL A INJECT 01/26/07 02:02:51 STORED TO BIN # 12



DATA SAVED TO BIN # 12

01/26/07 02:02:51 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 12 INDEX 12 BIN 12

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	3.831	8.65	329744 02
2	6.67	9.72	574141 03
3	0.21	10.76	18091 01
4	0.081	12.1	7015 02
5	0.222	12.68	19101 02
6	0.278	13.54	23945 02
7	0.33	14.47	28399 02
8	0.084	15.3	7245 03
9	0.493	16.56	42442 01
10	6.416	18.19	552283 02
11	3.672	19.5	316052 03
12	0.313	22.52	26971 01
13	0.296	24.34	25445 02
14	77.103	25.54	6636752 03
TOTAL	100.		8607626


รูปที่ 26 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของกรดอินทรีย์

ภาคผนวก ช

Output:

1. Taechavasonyoo A., Thaniyavarn J. and Yompakdee C. Diversity and population dynamics of molds and yeasts during production of sato, a traditional Thai rice wine. Submitted to Journal of Applied Microbiology.
2. Trinetra N, Thaniyavarn J, Leepipatpiboon N, Yompakdee C. The effect of some mold and yeast strains on the flavor of Sato. Manuscript in preparation.
3. Taechavasonyoo, A. Thaniyavarn,J. Yompakdee,C. 2007. Diversity and population dynamics of molds and yeasts during production of Sato, a traditional Thai rice wine from Nan province. In proceeding of The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Thammasart University. Pg.55 - 59 (Oral presentation).
4. Trinetra N, Thaniyavarn J, Yompakdee C, Leepipatpiboon N (2005) The effect of different rice strains on the flavor of Sato. Poster presentation at the 31st Congress on Science and Technology of Thailand (STT31) October 18-21, Nakhon Ratchasima, Thailand.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



Manuscript submitted to

The Journal of Applied Microbiology

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Diversity and population dynamics of molds and yeasts during production of sato, a traditional Thai rice wine

Apichaya Taechavasonyoo, Jiraporn Thaniyavarn and Chulee Yompakdee*

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

An abbreviated running headline: Fungal diversity and population dynamics in sato

*Corresponding author: Chulee Yompakdee

E-mail address: Chulee.y@chula.ac.th

Tel: +6622185070 Fax: +6622527576



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABSTRACT

Aims: To investigate the diversity and population dynamics of the molds and yeasts in loogpangs (starters) producing favorable sato (Thai rice wine).

Methods and Results: Six loogpangs were selected from 114 samples based on liquefaction and ethanolic fermentation activities and sato flavor. Samples were analyzed throughout the fermentation for mold and yeast quantification with identification using morphological, biochemical and molecular methods. PCR-RFLP patterns of the rDNA ITS1-IT2 region were used to pregroup the yeasts. At the species level, only five molds (*Mucor hiemalis*, *M. racemosus*, *M. indicus*, *Rhizopus microsporus* and *R. oryzae*) and six yeasts (*Saccharomycopsis fibuligera*, *Pichia anomala*, *Candida glabrata*, *Tolulaspora delbrueckii*, *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae*) were recorded. Sequential appearances of flora were observed during Sato fermentation with molds and most of the non-*Saccharomyces* yeasts dominant only in the early stages and were thereafter replaced by *S. cerevisiae*.

Conclusions: A limited diversity of molds and yeasts in the six selected loogpangs were observed. Molds and most non-*Saccharomyces* yeasts were prominent in the early phase and were substituted by *S. cerevisiae* as anerobic fermentation commenced.

Significance and Impact of Study: To help solve the problem of the inconsistency in quality between batches, whilst improving the diversity of flavors of sato.

Keywords: - Loogpang, Yeast, Mold, Diversity, Sato, Population Dynamics, Thailand

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INTRODUCTION

Microbial starters, in the form of dry powders or hard balls made from starchy cereals, are traditionally used to prepare food and alcoholic beverages, especially in Asia. These starter preparations have a variety of names, such as loogpang in Thailand, murcha or marcha in Nepal and India, ragi in Indonesia, bubod in the Philippines, and Chinese yeast cake in Taiwan (Aidoo et al., 2006). Despite nomenclature differences, starters from these countries have rather similar microflora at the level of genus and often species, and include mold species of *Rhizopus*, *Mucor* and *Amylomyces*, as well as yeast species of *Pichia*, *Saccharomycopsis*, *Hyphopichia*, *Saccharomyces* and *Candida*. Loogpang is a mixed culture starter of microorganisms such as molds, yeasts and bacteria used for the production of sato, a traditional Thai rice wine usually produced in north and northeastern regions of Thailand. The molds and yeasts, in particular, play major roles in the production of sato in terms of converting the glutinous rice into sugar, the resulting ethanol production and minor components essential to desirable taste and smell. The bacteria found in loogpang are principally lactic acid bacteria (LAB) (Tamang and Thapa, 2006). However, not much is known on the roles of LAB in the alcoholic beverage production. For example, in the related Hamei and Marcha starter cultures for rice fermentation in Northeastern India the lactic acid bacteria, although diverse and fairly common play no direct role in either saccharification or ethanol production (Tamang et al., 2007), and thus presumably give flavor and impart a slight sour-taste only. The starter for Thai sato production (loogpang) is a dry, round to flattened, creamy white to dusty white ball of 2.0 to 3.5 cm in diameter. To prepare loogpang, the glutinous rice starch is mixed with previously prepared loogpang and herbs such as the root of *Languas galangal* Sw., the trunk of *Tinospora crispa* L., the leaf of *Piper ribesoides* Wall, *Tiliacora triandra* Diel and *Plumbago rosea* Linn, pepper, red chilli and garlic. This provides the opportunity for considerable variation between batches in the initial starter microbe composition and subsequent competitive or complimentary population dynamics, and hence product quality and taste, both from local infusion (contamination) and from differential antimicrobial activities resulting from differences in herb additions.

During the production of sato, glutinous rice is cooked for 30 min in an open cooker, and the cooked rice is then spread on a tray to cool. About 2 % (w/w) of loogpang is mixed with the cool

cooked rice and kept in a vessel for three days at room temperature for saccharification. During that time, a sweet aroma is emitted. The remnant rice and glucose rich liquid of the saccharification process, called namtoi, is then diluted by the addition of water (about two fold the sticky rice weight) into the vessel which is then made airtight to initiate anaerobic fermentation over a period of 7-15 days, depending upon the temperature. The yellowish liquid, so called sato, at the end of the process can be consumed directly, or bottled for storage or marketing.

The microflora in loogpang thus consists of both the important microflora essential to catabolism of complex starch (typically molds) and the subsequent fermentation of the released glucose (typically yeasts), as well as lactic acid bacteria and any *de novo* 'contaminants', which may spoil the product or reduce its shelf life considerably whilst others may impart distinctive and desirable taste and odor qualities. Amongst these microbes, the most frequently found filamentous molds were species of *Rhizopus*, *Mucor* and *Amylomyces*, whilst the yeasts were species of *Pichia*, *Saccharomycopsis*, *Issatchenkia*, *Saccharomyces* and *Candida* (Aidoo et al., 2006; Limtong et al., 2002).

The production of sato used to be one of the famous local products in Thailand, especially in the north, northeast and the central parts of the country. However, commercial scale of sato production faces problems which largely stem from the inconsistency in the quality of sato produced from each batch. Clearly, the use of good pure mixed cultures of desirable molds and yeasts will provide a better source of microbial starter leading to the consistency in sato quality, whilst allowing investigation of subtle changes to develop slight flavor and aroma variants, again somewhat akin to that of the more understood and controlled, albeit complex, grape and especially Japanese rice (e.g. Nihonshu or Sake) wine fermentation technologies.

As a start, this study aimed to select the sources of loogpang which produced high quality sato and to then investigate the diversity and population dynamics of molds and yeasts in the selected sources of loogpang collected throughout Thailand. The establishment of this approach will serve as the basis for further strain characterization of beneficial microbes including bacteria in order to lead to a more controlled rice fermentation and thus consistent sato quality, as well as diversity of flavors and storage stability.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

114 samples of loogpang were collected from small scale factories and villages located in 10, 16 and 16 provinces in central, northern and northeastern Thailand, respectively (Fig. 1). Starters were coded and stored at 4 °C prior to screening for their properties.

Fermentation process

The traditional process for making rice wine was adapted to the laboratory as follows. Fifty g of glutinous rice were soaked in 60 ml of distilled water at room temperature for 4 h followed by steaming in an autoclave at 121 °C for 15 min. The gelatinized rice paste was cooled to 35–40 °C prior to mixing with 2 g of tested starter. After solid-state aerobic fungal fermentation at 30 °C for three days (namtoi, liquid from saccharification), 200 ml of sterile water was added to allow submerged alcoholic fermentation at 30 °C for seven days in the same bottle (sato, final fermentation product).

Analytical methods

The pH of final sato product was measured by a digital pH meter (Seven Easy, Mettler Toledo, USA). Glucose levels in namtoi and sato were analyzed by a glucose oxidase-peroxidase kit (Biotech, Thailand). The experiments were performed in at least triplicate repeats and the data are presented as the mean \pm 1SD. Ethanol concentration in sato was analyzed by gas chromatography (3800, Varian, USA) and the data are from single determinations per time point. Flavor of the final product, sato, was assessed by an expert panel.

Microbiological analysis

Samples of fermented broth from each sample of loogpang were taken on days 0, 3, 5, 7 and 9 after initiation of the process and transferred to a Stomacher bag to homogenize with 200 ml of sterile water in a Stomacher Lab-blender 400 (Seward 400, Emergo, England) for 15 min at high speed. Appropriate serial dilutions were made before spreading onto Rose Bengal Agar and Yeast Malt Extract Agar (pH 4.5) plates for enumeration of viable molds and yeasts, respectively. Plates were

ncubated at 30 °C for 2-4 days and colonies were counted and expressed as Colony Forming Unit (CFU) per gram of culture. The experiments were performed in triplicate repeats.

Identification of molds and yeasts

Mold isolates were identified based on both morphological and molecular methods. Morphological identification used macroscopic and microscopic morphology, size and structure of spores, sporangiophore, rhizoid, chlamydospore and sporangium, as well as culture properties, according to established taxonomic keys and descriptions (Samson et al., 2002). Molecular species identification was performed by phylogenetic comparison of DNA sequences of the internal transcribed spacer (ITS) region (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) with those available from known species at the GenBank database using the sequence similarity criteria of Sujaya et al. (2004). In addition, where stated, the sequence similarity approach of Peterson and Kurtzman (1991) using the D1-D2 region of the 26S rRNA gene was additionally performed.

Yeasts were grouped according to the patterns of DNA fragments of the same ITS region generated by PCR-RFLP (Las Heras-Vazquez et al., 2003). A representative isolate of each group was randomly selected for further identification by standard biochemical methods, as outlined by Barnett and Yarrow (2003), and by phylogenetic analysis of the ITS region (Las Heras-Vazquez et al., 2003) as described above for molds.

DNA isolation

The mold and yeast DNA isolation method was modified from that previously described (Burke et al., 2000). In brief, pure yeast or mold cultures of each isolate were grown in 5 ml of YPD or on PDA plates, respectively, at 30 °C for 2-3 days. Yeast cells were then collected by sedimentation at 6,000 g for five min at room temperature. Cells were resuspended in 500 µl of distilled water followed by centrifugation as described above. Mold mycelia were recovered by scraping with a sterile spatula. For both molds and yeasts, the pelleted cells / mycelia were resuspended in 200 µl of extraction buffer (2 % (v/v) Triton X-100, 1 % (w/v) sodium dodecyl sulfate, 100 mmol l⁻¹ NaCl, 10 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, 10 mmol l⁻¹ EDTA). To this was added 200 µl of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)

and 0.3 g of glass beads (0.45-0.52 μm in diameter) (Sigma, USA) and vortexed for three min. After the addition of 200 μl of TE buffer (pH 8.0), mixing and phase separation by centrifugation at 10,000 g for 10 min, the aqueous phase was harvested and DNA precipitated by standard ethanol precipitation, washing, drying and resuspension in TE.

PCR amplification

Amplification reaction of the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region was carried out as follows. The 50 μl reaction mixture containing 5-25 ng of template DNA, 10x PCR buffer, 0.2 mmol l^{-1} of each dNTP, 0.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of each primer and 1 U Deep Vent polymerase (New England Biolab). ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-CTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) were used as primers. Amplification was performed in Perkin Elmer Thermocycler 2400 programmed as follows: initial denaturation at 94 °C for 5 min; 35 cycles of 30 s 94 °C for denaturing, 30 s at 56 °C for annealing 1 min at 72 °C for synthesis; and a final extension step of 5 min at 72 °C. Samples were kept at -20 °C until further analysis. PCR amplification of the D1-D2 5' region of the large sub unit (26S) of the rDNA gene was performed as above, but with the primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG -3') and NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Kurtzman and Robnett, 1997).

Restriction fragment analysis

Separate aliquots (7 μl) of the PCR product were separately digested without further purification with 1 U of one of the three different restriction enzymes, *HhaI*, *HaeIII* or *HinFI* (NEB, UK) (Las Heras-Vazquez et al., 2003), in a 20 μl final reaction volume using the manufacturer's instructions and conditions. Digested products were analyzed by resolution through a horizontal 2 % (w/v) agarose TAE gel (Pronadisa, Spain) and, after ethidium bromide staining and uv-transillumination, the mobility of restriction fragments were compared to standard DNA markers (Fermentas, Canada) and their size estimated using the Quantity One Program (Bio-Rad, USA).

Phylogenetic analysis

The PCR products of the ITS region from above were purified using a PCR purification kit as per the manufacturers instructions (Qiagen, Germany) and direct sequenced commercially (out-house) by First Base Company (Singapore) on both the leading and lagging strands to obtain the consensus sequence.

Almost complete sequences of the representative sample from each of seven groups of 1,390 yeast isolates plus the 41 mold isolates were edited with the Bioedit program (Hall, 1999). To establish likely identity to species level, the sequences were searched against the GenBank database using the BLASTN program (Altschul et al., 1997). Sequences that showed the highest degree of sequence similarity (assumed closest relatives) were retrieved from GenBank. Multiple alignments of sequences, calculation of the corrected evolutionary distance based on Kimura's two-parameter model, and construction of a phylogenetic tree by the neighbor-joining distance method (Saitou and Nei, 1987) were performed using the CLUSTAL W program (Thompson et al., 1994). Branching tree patterns were evaluated by boot-strapping with 1,000 resamplings (Felsenstein, 1985). Alignment position with gaps and unidentified bases were excluded from the calculations. The trees were illustrated using TREEVIEW (Page, 1997). The ITS sequence data of the representative of each group of molds and yeasts have been deposited in the GenBank nucleotide sequence database with accession numbers: EU798694 (*Saccharomyces cerevisiae* isolate NN691), EU798695 (*Saccharomycopsis fibuligera* isolate NN2501), EU798696 (*Pichia anomala* isolate NN2703), EU798697 (*Pichia anomala* isolate NN632), EU798698 (*Issatchenkia orientalis* isolate NN2573), EU798699 (*Tolulasporea delbrueckii* isolate NK2324), EU798700 (*Candida glabrata* isolate NK2012), EU798701(D1-D2 region *Pichia anomala* isolate NN632), EU798702 (*M. racemosus* isolate NN601), EU798703 (*Mucor hiemalis* isolate NN609), EU798704 (*Rhizopus microsporus* isolate NP101), EU798705 (*R. oryzae*.isolate NK208) and EU798706 (*M. indicus* isolate NN2703), as shown for each isolate in figures 3 and 4.

RESULTS

Collection of samples and screening for good loogpang

From 42 provinces located in the north (16), northeast (16) and central (10) parts of Thailand (Fig. 1), 114 loogpang samples were collected. The absence of samples from Southern Thailand reflects the

scarcity of sato production in this region. Each loogpang sample was used as a starter for the production of sato. During the first three days of the process, the level of liquefaction (namtoi) of steamed glutinous rice and free glucose concentration in the namtoi from each sample was scored (e.g. Fig. 2A). At the end of the fermentation process, the final concentrations of glucose and ethanol were measured (e.g. Fig. 2B), and the flavor of each sato was evaluated by a small expert taste panel. Loogpangs that resulted in a high liquefaction and free glucose release into the namtoi, a high ethanolic fermentation efficiency, and resulted in a good flavor of the final sato produced, were selected. Using these criteria six sources of loogpang were selected for further studies (Fig. 2), and were comprised of samples NN6, NN25, NN27 from the Nan and LA1 from the Lampang provinces in the northern part of Thailand, and NP1 and NK2 from the Nakornpanom and Nongkhai provinces, respectively, in the northeastern part (Fig. 1). All six loogpangs showed a high namtoi production from steamed glutinous rice (28-55 ml / 50 g) which was rich in glucose (379-2,758 mg l⁻¹), yet the sato produced had a low glucose concentration (1.55-9.08 mg l⁻¹) and reasonably high final ethanol levels (7.9-14.19 % (v/v)), confirming the presence of suitable microbes for both starch catabolism to glucose and the subsequent anaerobic ethanolic fermentation as well as other microbes to induce desirable aroma and taste but not spoil the product.

Isolation of molds and yeasts from selected sources of loogpang

Each selected loogpang was used as a starter culture to produce sato and samples were taken at days 0, 3, 5, 7 and 9 during the fermentation process. Molds and yeasts were isolated from each sample as described in the methods section. The number of molds and yeasts in all samples ranged from 7×10^3 - 4×10^5 and 3×10^5 - 5.2×10^9 CFU g⁻¹, respectively (data not shown).

Within the time points assayed, molds could only be isolated on day 0 (9×10^3 to 4×10^5 CFU g⁻¹) and/ or day 3 (data not shown; Fig. 5A.1, 5B.1 - 5C.1), with no molds detected after the third day, except in sample NK2, where molds could still be detected until the third day of fermentation. However, this probably reflects that the initial amount of molds was 10 fold higher in NK2 than those in the other samples.

On the other hand, yeasts could be isolated since day zero at 3×10^5 - 3.3×10^6 CFU g⁻¹ and the amounts in all samples gradually increased over the first five days and then either remained constant or slightly increased further from the fifth to ninth day of the process reaching 4.3×10^7 - 5.2×10^9 CFU g⁻¹ on day nine (data not shown and Fig. 5).

Identification of molds and yeasts in the selected starters

Identification of molds

Identification of molds using morphological methods revealed 41 different mold isolates that belonged to two genera: *Mucor* sp. and *Rhizopus* sp. They could be divided into five probable species groups as follows: 12 isolates were *Mucor hiemalis*, 19 were *M. racemosus*, six were *M. indicus*, three were *Rhizopus microsporus* and one was *R. oryzae*. One mold from each species group was selected for further confirmation of the identification by DNA sequence and phylogenetic analysis based upon the ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA. The representative mold from each group was individually cultivated on Potato Dextrose Agar (PDA) and the mycelia harvested for DNA extraction. The purified PCR products were directly sequenced. Molecular phylogenetic analysis based upon neighbour joining distance analysis of these consensus sequences and their most similar sequences obtained from BLASTN searches of the NCBI data base are shown in Fig. 3. The molecular identifications of likely mold species, or at least their closest known relatives, were all in agreement with the identifications for the same samples made by the conventional morphological methods (data not shown).

Identification of yeasts

Because of the large numbers of yeast isolates attained causing logistic problems to attempt to fully identify them all, we first prescreened them for differences by analyzing the RFLP patterns of the PCR amplified ITS1-5.8S-ITS2 region of DNA to group all the isolates. The PCR-RFLP patterns attained revealed seven clear different patterns, and all isolates were thus grouped accordingly (Table 1).

One yeast isolate from each group, representative of that group, was identified to likely species level by a combination of both conventional biochemical methods (Barnett et al., 2000) (data not shown) and by DNA sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 region (Las Heras-Vazquez et al., 2003) (Table 1).

From DNA sequencing results and analysis of the percentage sequence similarity to known isolates in the NCBI database, the yeasts in groups 1 to 7 (except group 4) were identified as likely to be; *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Pichia anomala*, *Issatchenkia orientalis*, *Tolulaspota delbrueckii* and *Candida glabrata* (Table 1). However, in the case of group 4 no sequence with more than 99 % sequence similarity was found, but rather only 92 % as the closest sequence in the GenBank database (*P. anomala*) which then potentially challenges the current molecular species concept for yeast identification by ITS sequences (Sugita et al., 1999). To help resolve this we further PCR amplified and sequenced the D1-D2 region of the 5' region of the 26S rDNA gene fragment. The resulting sequence (EU789701) showed 99 % sequence similarity to *Pichia anomala*, which, using the established 99 % criteria for this gene fragment (Peterson and Kurtzman, 1991), makes the species group three and four likely to be the same species (i.e. both *P. anomala*) but to represent across strain polymorphisms. A neighbour-joining distance based phylogenetic tree is shown in Fig. 4. *Candida albicans* was chosen as an outgroup in figure 4 since it was not previously detected in any of the amyolytic starters reported. In addition, it is a kind of budding yeasts as same as all the yeasts we found in this study.

Diversity of molds and yeasts during sato production

The composition of molds and yeasts isolated from the Sato production process with the six selected loogpang samples are summarized in Table 2. Only yeasts in the class Hemiascomycetes were detected in the selected samples, namely; *Saccharomyces* sp., *Saccharomycopsis* sp., *Candida* sp., *Issatchenkia* sp., *Tolulaspota* sp. and *Pichia* sp.

S. cerevisiae and *P. anomala* were found in all samples except that in sample NN6 *P. anomala* from group 4 was found compared to *P. anomala* from group 3 in all the other samples (Tables 1 and 2). *Sm. fibuligera* was also found in all samples except in NN27. *C. glabrata*, *I. orientalis* and *T.*

delbrueckii were all found in only one of the six samples, that being NK2, NN25 and NK2, respectively (Table 2). The amount and number of yeast strains in the starter loogpang did not correlate with the final ethanol concentration in the Sato (Table 2; Figs. 2B & 5).

In the case of molds, only two genera in the Order Mucorales were found in the six selected loogpang samples; *Mucor* sp. and *Rhizopus* sp. *M. racemosus* was found in all samples except for NN27 (Table 2). The number of mold strains and amount of mold at the beginning of the fermentation were both not correlated to the observed liquefaction capacity (Table 2, Figs. 2A & 5). For example, comparison between NN27 and NK2 revealed that the former contained only one species of mold whilst the latter was comprised of three different strains. However, their abilities in liquefaction, as assayed here were rather similar.

From Table 2, we noticed that selected starters collected from the northern part of Thailand (NN6, NN25, NN27 and LA1) contain two species of mold and four species of yeast, whilst four species of mold and five yeast species were found in samples collected from the northeast. *Rhizopus* sp. was only detected in loogpang samples from the northeast region while whilst we found *Mucor* sp. in all selected starters (Table 2). The effects and importance of the lower and different diversity of molds and yeasts in the northern samples, compared to those collected from the northeastern part region, upon the taste diversity or quality of the sato remains unknown.

Population dynamics of molds and yeasts during sato production

Each of the six selected loogpang samples (NN6, NN25, NN27, LA1, NP1 and NK2) was used as a starter for sato production, and two hundred ml of each sample were taken at day 0, 3, 5, 7 and 9 of the fermentation process and plated onto Rose Bengal Agar and Yeast Malt Extract Agar (pH 4.5) plates as described for the enumeration of molds and yeasts, respectively, except that the isolated yeasts were further inoculated in L-lysine medium in order to distinguish the non-*Saccharomyces* from the *Saccharomyces* yeasts, since the latter can not utilize L-lysine. Molds and non-*Saccharomyces* yeasts were detected only in the early stage (first three days) of the process under aerobic fermentation, and thereafter *S. cerevisiae* became dominant and replaced the non-*Saccharomyces* yeasts in the later stages (from day three onwards), except in the case of the NN25 starter where *I. orientalis* was

detected on day five and persisted until day nine (Fig. 5B.2). The amount of glucose in the sample increased in the early aerobic stage (until the third day), and then dramatically decreased thereafter over the next six days (Fig. 5) which coincided with the anaerobic growth of the yeast *S. cerevisiae* (Fig. 5). This is consistent with the liquefaction of glutinous rice resulting from the amyolytic enzymes produced by molds and some non-*Saccharomyces* yeasts such as *Sm. fibuligera* (Tsuyoshi et al., 2005), and thereafter, that *S. cerevisiae* utilized the high concentration of glucose and produced ethanol under anaerobic conditions. The increase in *S. cerevisiae* numbers at each time period correlated well with the increase in ethanol content in sato with the time of fermentation.

DISCUSSION

The diversity and population dynamics of molds and yeasts in six selected loogpang samples from a total of 114 samples from Thailand were studied. We could not detect much diversity in the principal molds (five species) and yeasts (seven species), at least at the species level, and this may be because of the following reasons. Firstly, the use of glutinous rice as a substrate may select the species of microorganisms. Secondly, the anti-microbial properties of the herbs used in loogpang can also select for some species of microorganisms. Thirdly, with respect to the later fermentation stages, anaerobic alcoholic fermentation eliminates most ethanol sensitive as well as obligatorily aerobic microorganisms (Querol and Fleet, 2006). The diversity within the species level, potentially of significant importance, is now the basis of future work using this study as the platform. However, at the species level the molds isolated from all six selected loogpang samples were all in the Order Mucorales, the same as those that are also encountered in other amyolytic rice fermentation starters such as Bhaati Jaanr, an Indian alcoholic beverage (Tamang and Thapa, 2006) and Banh men, an amyolytic starter from Vietnam (Lee and Fujio, 1999).

All analyzed yeast isolates were in the Class Hemiascomycetes, and have also been found in previous studies. For example, Tsuyoshi et al. (2005) found that the yeasts isolated from Marcha were identified as *S. bayanas*, *C. glabrata*, *P. anomala*, *Sm. fibuligera*, *Sm. capsularis* and *P. burtonii*. The yeasts, *S. cerevisiae*, *Sm. fibuligera*, *P. anomala* and *C. glabrata*, were isolated from Bhaati Jaanr (Tamang and Thapa, 2006), and Banh men contained *S. cerevisiae*, *Hyphopichia burtonii*, *Sm.*

fibuligera, *P. anomala* and *Candida* sp. (Lee and Fujio, 1999). Thus, in terms of general mold and yeast compositions at the species level, loogpang (for sato) is rather similar to starter inoculums for other ethanolic fermented Indo-Asian rice based drinks. However, as with isolate variants of the above principal species, the role of the minor yeasts and lactic acid bacteria, as well as their complex interactions, upon developing the taste and aroma will be essential to evaluate in order to facilitate reliable sato production as well as in developing subtle taste diversities.

In this study though, we found that *Pichia* sp. had higher polymorphism than the other yeasts as detected by the relatively insensitive PCR-RFLP method (Table 1). ITS sequences typically are under more relaxed structural constraints and evolve relatively fast, but also show different evolutionary rates between species. It may be of benefit to also protein coding sequence based data sets since such synonymous codon substitutions can account for a high degree of sequence divergence and thus often resolve better at the strain level (Daniel and Meyer, 2003).

The amount of molds and yeasts in the starter inoculums and beginning of the fermentation process were neither correlated to the liquefaction activity nor to the alcohol producing capacity, respectively (Table 2, Figs. 2 & 5). In the saccharification step, the microorganisms present and especially molds produce amyolytic enzymes to catabolise starch into glucose. Amyolytic enzymes are composed of four groups, the endo α -1, 4-glucanase, exo α -1, 4-glucanase, endo α -1, 6-glucanase and exo α -1, 6-glucanase, and all four are required for optimal starch catabolism and consequentially ethanolic fermentation. Although the use of amyolytic enzymes as fermentation supplements could efficiently turn corn, wheat and potatoes into glucose syrup (Nigam and Singh, 1995), such approaches are more expensive and so restrictive to the lower income populations, whilst they are viewed as unnatural and so potentially devalued by the wealthier markets. However, in the context of the molds found in loogpangs, it is relevant to note that *Rhizopus* sp. are known to produce some of the amyolytic enzymes such as glucoamylase (exo α -1, 4-glucanase) and pullulanase (endo α -1, 6-glucanase) (Nigam and Singh, 1995; Kolarova and Augustin, 2001), although this remains to be formally confirmed and characterized for the *R. oryzae* and *R. microsporus* isolates found in these samples.

The population dynamics of the molds and yeasts seen here showed simplistically the same broad trends as those previously reported in wine fermentation in that non-*Saccharomyces* yeasts dominate in the early stage of aerobic fermentation and are then replaced by *S. cerevisiae* at the later stages of the process as the alcohol concentration increases (Fleet and Heard, 1993; Perez-Nevaldo, et al., 2006; Torija, et al., 2001; Paraggio, 2004 and Tamang and Thapa, 2006). The molds and non-*Saccharomyces* yeasts could not be detected by the fifth day when the alcohol concentration was 3.4-10.9 % (v/v). While the increased ethanol concentration was found to correlate well with the increased levels of *S. cerevisiae* at from the third day onwards (Fig. 5), the initial amount of *S. cerevisiae* (day zero) did not correlate to the alcohol concentration at the ninth day in every sample. There was no apparent difference in alcohol tolerance capacity between the two strains of *P. anomala* (group 3 vs. 4) (Table 2) which could not be detected at the fifth day when the alcohol concentration was 3.4-3.8 % (v/v) (Fig. 5). However, in addition to a low ethanol tolerance, that the amount of non-*Saccharomyces* yeasts decreased until they could not be detected on the fifth day might also be the result of killer like toxins or fermentative metabolites, such as the potential toxin produced by *S. cerevisiae* (Paraggio, 2004). Five species of non-*Saccharomyces* yeasts found in this study have also been reported in wine fermentation where they are associated with the desired complexity of wine and may contribute to quality and flavor of the product (Romano et al., 1997).

During the fermentation period, at an ethanol concentration of 3-4 % (v/v), most of the non-*Saccharomyces* yeasts were non-viable except for *I. orientalis* (Fig. 5B.2). It could be noted that these non-*Saccharomyces* yeasts (except for *I. orientalis*) were absent in the fermentation process when the amount of the *S. cerevisiae* reached 10^7 CFU g⁻¹ (Figs. 5A.2, 5B.2 & 5C.2).

I. orientalis in sato produced from the NN25 starter could not be detected at the beginning, but only at mid to later fermentation stages (day's five to nine) along with the *S. cerevisiae*. The finding that *I. orientalis* shared the late fermentation stage with *S. cerevisiae* is consistent with the results of Clemente-Jimenez et al. (2004) and implies that *I. orientalis* is rather resistant to high alcohol concentrations. In addition, *I. orientalis* can produce volatile compounds such as 2-methyl-1-propanol and 3-methyl-1-butanol which are part of the desired aroma and flavor in such alcoholic beverages. The role of non-*Saccharomyces* yeasts on flavor and aroma production in wine, and some other

alcoholic beverages, has been reported but not for these Indo-Asian rice wines. Rojas et al. (2001) found that *P. anomala* 10590 produced 2-phenylethyl acetate at levels sufficient to induce a good aroma in wine. *C. glabrata* produced iso-butyl alcohol and iso-amyl alcohol which were associated with flavor in brem, a Balinese rice wine (Sujaya et al., 2004), whilst the flavor enhancing compounds, 2, 3 butanediol, acetoin and ethyl acetate, were produced by *T. delbrueckii* (Ciani and Maccarelli, 1998). *Sm. fibuligera* has been reported to play a role in the saccharification process as a result of its secretion of extracellular amylolytic enzymes such as α -amylase, glucoamylase and α -glucosidase (Hostinova, 2002).

In this study, six loopang samples out of 114 samples from 42 provinces throughout central to northern and northeastern Thailand were selected based on their liquefaction capacity, ethanol producing activity and sensory test of sato, the final product. These represented four and two selected samples from the north and northeast regions of Thailand, respectively. The combination of both conventional and molecular identification methods were employed to identify the molds and yeasts to likely species level. Only two genera of molds in the Order Mucorales and only Hemiascomycetous yeasts were found in the selected starters. The initial aerobic conditions until the third day of sato production renders molds and some of non-*Saccharomyces* yeasts as the dominate species (Fig. 5), and the free glucose concentration rises sharply to peak at the end of this period (third day). Thereafter, the change to anaerobic conditions caused the molds to rapidly decline and is then followed by the decline in non-*Saccharomyces* yeasts, except for *I. orientalis*, once the ethanol levels reach 3-4 % (v/v), allowing *S. cerevisiae* to increase rapidly and dominate the culture. The rise in *S. cerevisiae* levels is associated with the rapid decrease in glucose and increase in ethanol levels (Figs. 5A.1, 5B.1 and 5C.1). It would be of interest to further investigate the roles of these non-*Saccharomyces* yeasts, along with those of other molds, yeasts and lactic acid bacteria, on the flavor in sato.

Acknowledgements

This work was financial supported by Annual Thailand government statement of expenditure 2005-2006 and Graduate grant thesis from Chulalongkorn University. We would like to thank Mr.

Suvit Chanhaworn for his kind cooperation on loogpang collection. The authors would like to thank Dr. Robert Butcher for his helpful discussion.

REFERENCES

- Aidoo, K.E., Nout, M.J. and Sarkar, P.K. (2006) Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermentation. *FEMS Yeast Res* **6**, 30-39.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, W., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. (2000) *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge University Press. UK.
- Burke, D., Dawson, D. and Stearns, T. (2000) *Methods in Yeast Genetics*. pp.111-112. A Cold Spring Harbor Laboratory Press, CA.
- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Marti'nez-Rodri'guez, S., Heras-Va'zquez, F.J.L. and Rodri'guez-Vico, F. (2004) Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol* **21**, 149-155.
- Ciani, M. and Maccarelli, F. (1998) Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol Biotechnol* **14**, 199-203.
- Daniel, H.-M. and Meyer, W. (2003) Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *Int J Food Microbiol* **86**, 61-78.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on physiogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Felsenstein, J. (1993) *PHYLIP, Version 3.5c*. University of Washington, Seattle.
<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
- Fleet, G.H. and Heard, G.M. (1993) Yeasts-growth during fermentation. In *Wine microbiology and biotechnology* ed. Fleet, G.H. pp.27-55. Harwood Chur, Switzerland.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit a userfriendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95-98.

- Hostinova, E. (2002) Amylolytic enzymes produced by the yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. *Biologia* **11**, 247-251.
- Kolarova, N. and Augustin, J. (2001) Production of Polysaccharide Hydrolases in the Genus *Rhizopus*. *Folia microbial* **46**, 223-226.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. (1997) Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol* **35**, 1216–1223.
- Las Heras-Vazquez, F.J., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jimenez, J.M. and Rodriguez-Vico, F. (2003) Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Res* **3**, 3-9.
- Lee, A.C. and Fujio, Y. (1999) Microflora of banh men, a fermentation starter from Vietnam. *World J Microbiol and Biotechnol* **15**, 51-55.
- Limtong, S., Sintara, S., Suwanarit, P. and Lotong, N. (2002) Yeast Diversity in Thai Traditional Fermentation Starter (Loog-pang). *Kasetsart J Nat Sci* **2**, 149-158.
- Nigam, P. and Singh, D. (1995) Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme microbiol tech* **17**, 770-778.
- Page, R.D.M. (1997) *TREEVIEW program version 1.5.1*. University of Glasgow, UK.
- Paraggio, M. (2004) Biodiversity of a natural population of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora uvarum* from Agloanico del vulture. *Food Technol Biotechnol* **42**, 165-168.
- Pérez-Neurado, F., Albergaria, H., Hogg, T. and Girio, F. (2006) Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Inter J Food Microbiol* **108**, 336-345.
- Querol, A. and Fleet, G. (2006) *Yeast in Food and Beverages*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany.
- Rojas, V., Gil, J. V., Pinaga, F. and Manzanares P. (2001) Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Inter J Food Microbiol* **70**, 283–289.
- Romano, P., Suzzi, G., Domizio, P. and Fatichenti, F. (1997) Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**, 239-242.

- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O. (2002) *Introduction to food-and airborne fungi*. Centraalbeau voor Schimmelculture, Utrecht, Netherland.
- Sipiczic, M., Romano, P., Lipani, G., Miklos, I. and Antunovics, Z. (2001) Analysis of yeast derived from natural fermentation in a Tokaj winery. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**, 97-105.
- 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 J Microbiol Biotechnol* **20**, 143-150.
- Tamang, J.P. and Thapa, S. (2006) Fermentation Dynamics During Production of Bhaati Jaanr, a Traditional Fermented Rice Beverage of the Eastern Himalayas. *Food Biotechnol* **20**, 251-261.
- Tamang, J.P., Dewan, S., tamang, B., Rai, A., Schillingerr, U. and Holzapfel, W.H. (2007) lactic acid bacteria in hamei and Marcha of North East India. *Indian J. Microbiol.*, **47**, 119-125.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitive of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Toriya, M.J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamon, J.M. and Mas, A. (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**, 345-352.
- Tsuyoshi, N., Fudou, R., Yamanaka, S., Kozaki, M., Tamang, N., Thapa, S. and Tamang J.P. (2005) Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amyolytic fermentation. *Inter J Food Microbiol* **99**, 135-146.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In. *A guide to methods and applications*. ed. Innis, M.A. Gelfand, D.H. Sninsky, J.J. and White, T.J. PCR protocols. pp.315-322. Academic Press, San Diego, CA.

Table 1 Grouping of the yeast isolates from the six selected loompangs

Group	No. of Isolate	Size of PCR product (bp)	DNA fragment (bp)			Species	% Similarity*
			<i>HinFI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>		
1	1074	880	360, 350, 180	320, 230, 180, 130	385, 365	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99
2	109	510	220, 140	380	300, 200, 170	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99
3	83	630	320, 270	630	630	<i>Pichia anomala</i>	100
4	9	650	350, 200	650	320, 310, 105	<i>Pichia anomala</i>	92
5	8	500	280, 220	390	190	<i>Issatchenkia orientalis</i>	99
6	2	780	395	780	290, 350	<i>Tolulasporea delbrueckii</i>	100
7	105	600	285	230	400, 155	<i>Candida glabrata</i>	99

* % Similarity compared to those in GenBank database (as June 16, 2008)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 2 Diversity of molds and yeasts during sato production from the six selected loogpangs

Sample location	Code	Loogpang sample	
		Molds	Yeasts
North	NN6	<i>Mucor racemosus</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>
		<i>Mucor hiemalis</i>	<i>Pichia anomala*</i>
			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	NN25	<i>Mucor racemosus</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>
		<i>Mucor indicus</i>	<i>Pichia anomala**</i>
			<i>Isatchenkia orientalis</i>
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
NN27	<i>Mucor indicus</i>	<i>Pichia anomala**</i>	
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
LA1	<i>Mucor racemosus</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	
		<i>Pichia anomala**</i>	
		<i>Sacchromyces cerevisiae</i>	
Northeast	NP1	<i>Mucor racemosus</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>
		<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Pichia anomala**</i>
			<i>Sacchromyces cerevisiae</i>
	NK2	<i>Mucor racemosus</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>
		<i>Mucor hiemalis</i>	<i>Pichia anomala**</i>
		<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
		<i>Candida glabrata</i>	
		<i>Sacchromyces cerevisiae</i>	

*Group 4 from Table 1

**Group 3 from Table 1

Figure legend

Fig. 1 Location of the 42 provinces in Thailand where the loogpang samples were collected from (○), composed of 10 in central Thailand and 16 each in the north and northeastern parts. Those provinces where samples were selected from for further analysis (●).

Fig. 2 Performance of some sources of loogpang samples collected in Thailand. A) amount of namtoi (liquefaction) (□) and glucose in namtoi ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) (■); B) amount of glucose in sato ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) (■), and % (v/v) ethanol in sato (□).

Fig. 3 Molecular phylogenetic position of the representative mold strains of each group based on the ITS1 - 5.8S - ITS2 sequences. Bootstrap values at the node were calculated from 1000 samplings. Bar, 1 % estimated sequence divergence.

Fig. 4 Molecular phylogenetic position of the representative yeast strains of each group based on the ITS1 - 5.8S - ITS2 sequences. Bootstrap values at the node were calculated from 1000 samplings. Bar, 1 % estimated sequence divergence.

Fig. 5 Population dynamics of molds and yeasts during sato production by some of selected loogpang samples.

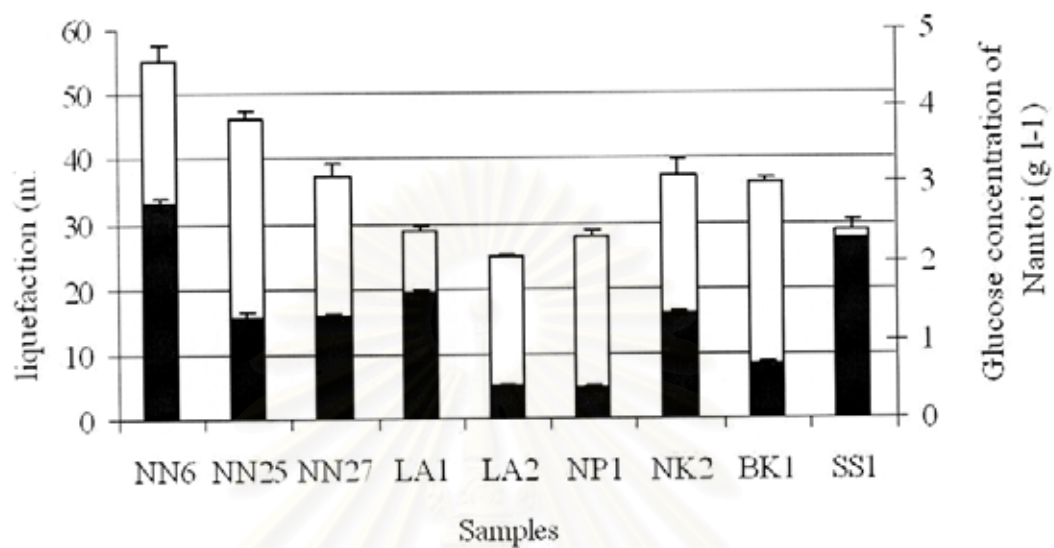
Data for three representatives of the six selected loogpang samples (A) NN6, B) NN25 and C) NK2) are shown. A.1, B.1 and C.1 represent the amount and number of mold strains whilst A.2, B.2 and C.2 represent the amount and number of yeast strains. *Saccharomyces cerevisiae* (■), *Saccharomycopsis fibuligera* (⊗), *Pichia anomala* (group 3) (⊕), *Pichia anomala* (group 4) (⊗), *Candida glabrata* (⊗), *Issatchenkia orientalis* (⊗), *Torulaspora delbrueckii* (■), *Mucor racemosus* (⊗), *Mucor hiemalis* (⊗), *Mucor indicus* (⊗), *Rhizopus oligosporus* (⊗), *Rhizopus oryzae* (⊗), % Ethanol (▲) and amount of glucose (□)



Fig. 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

a)



b)

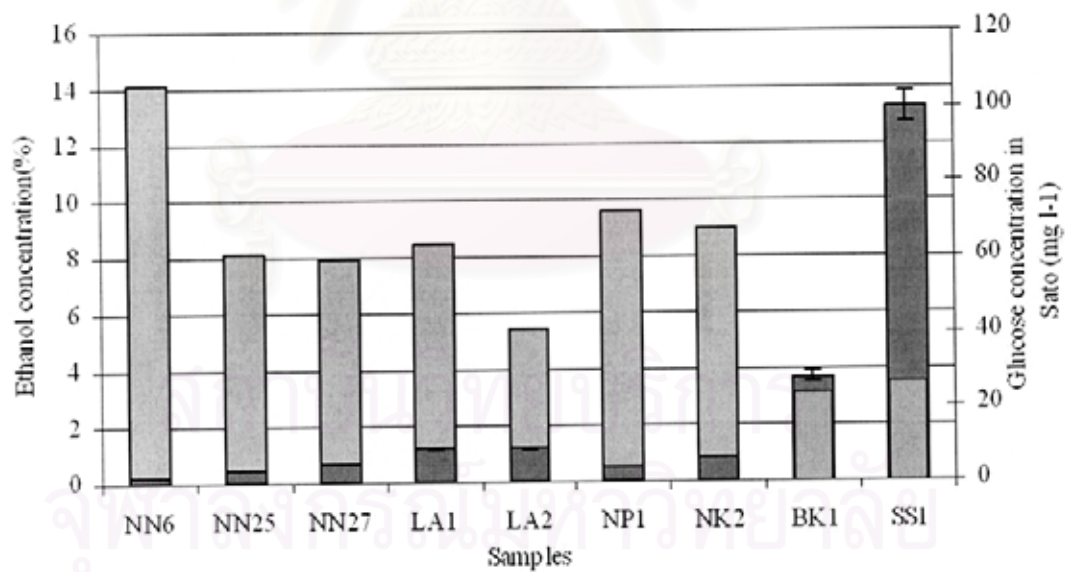


Fig. 2

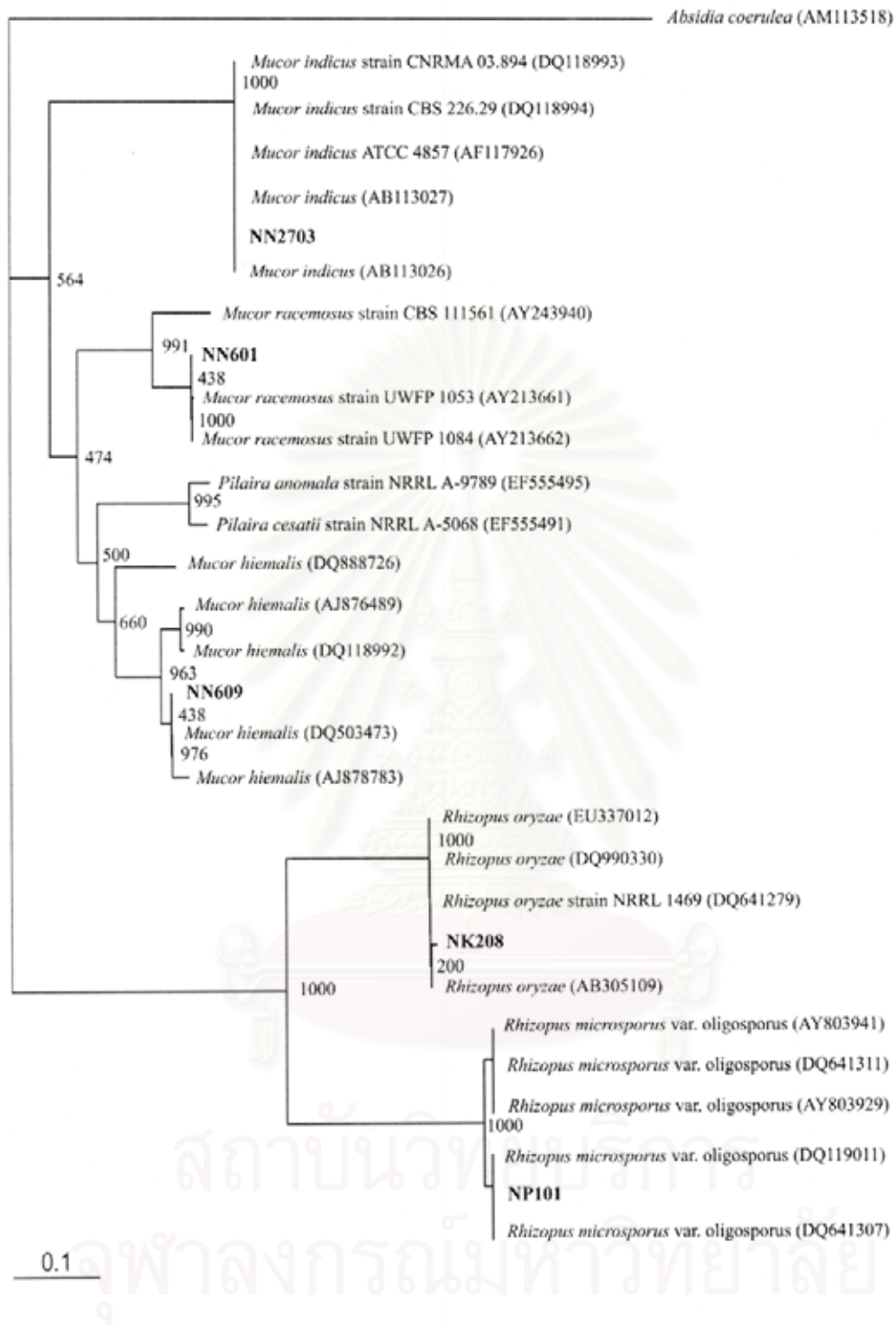


Fig. 3

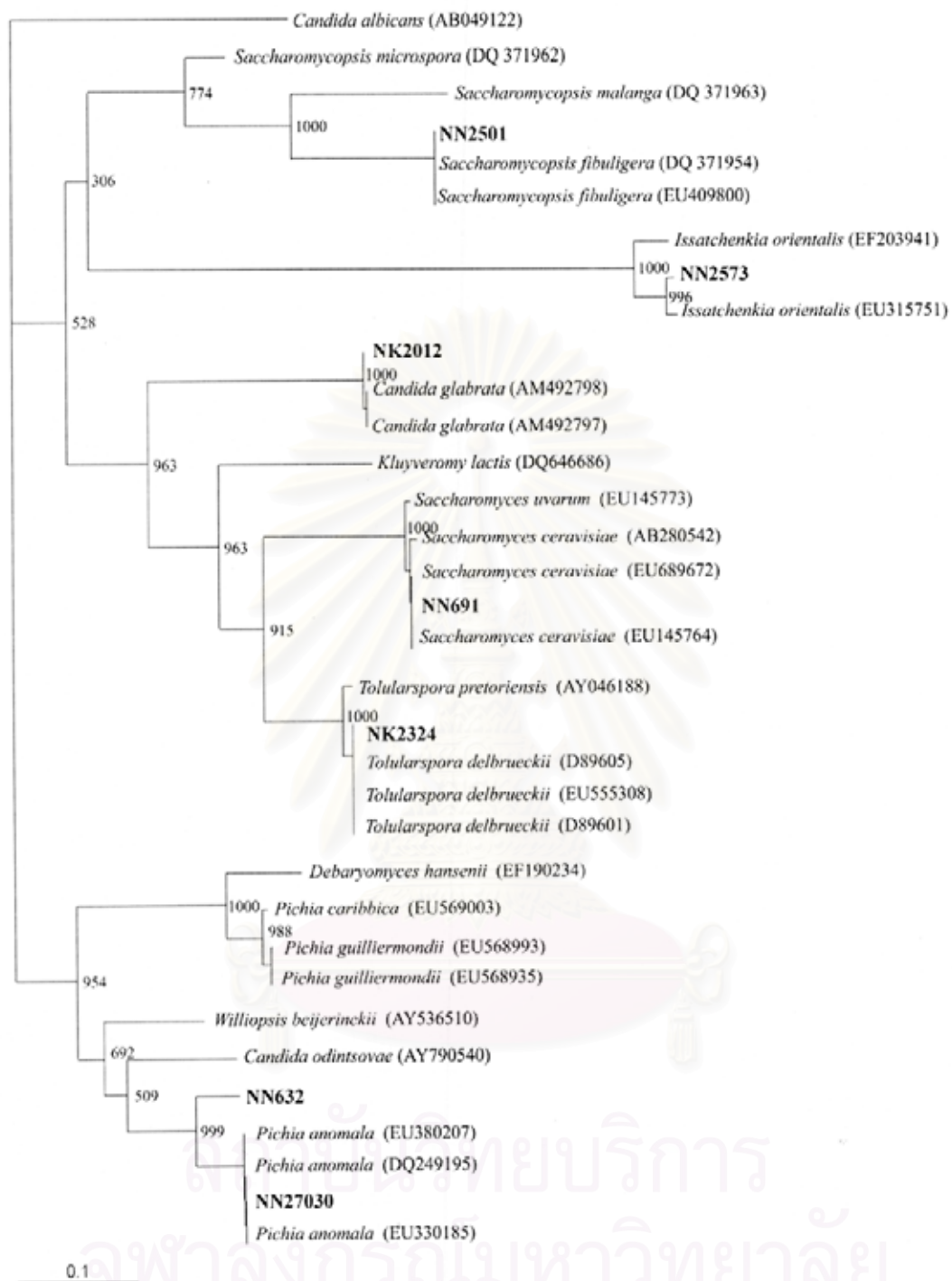


Fig. 4

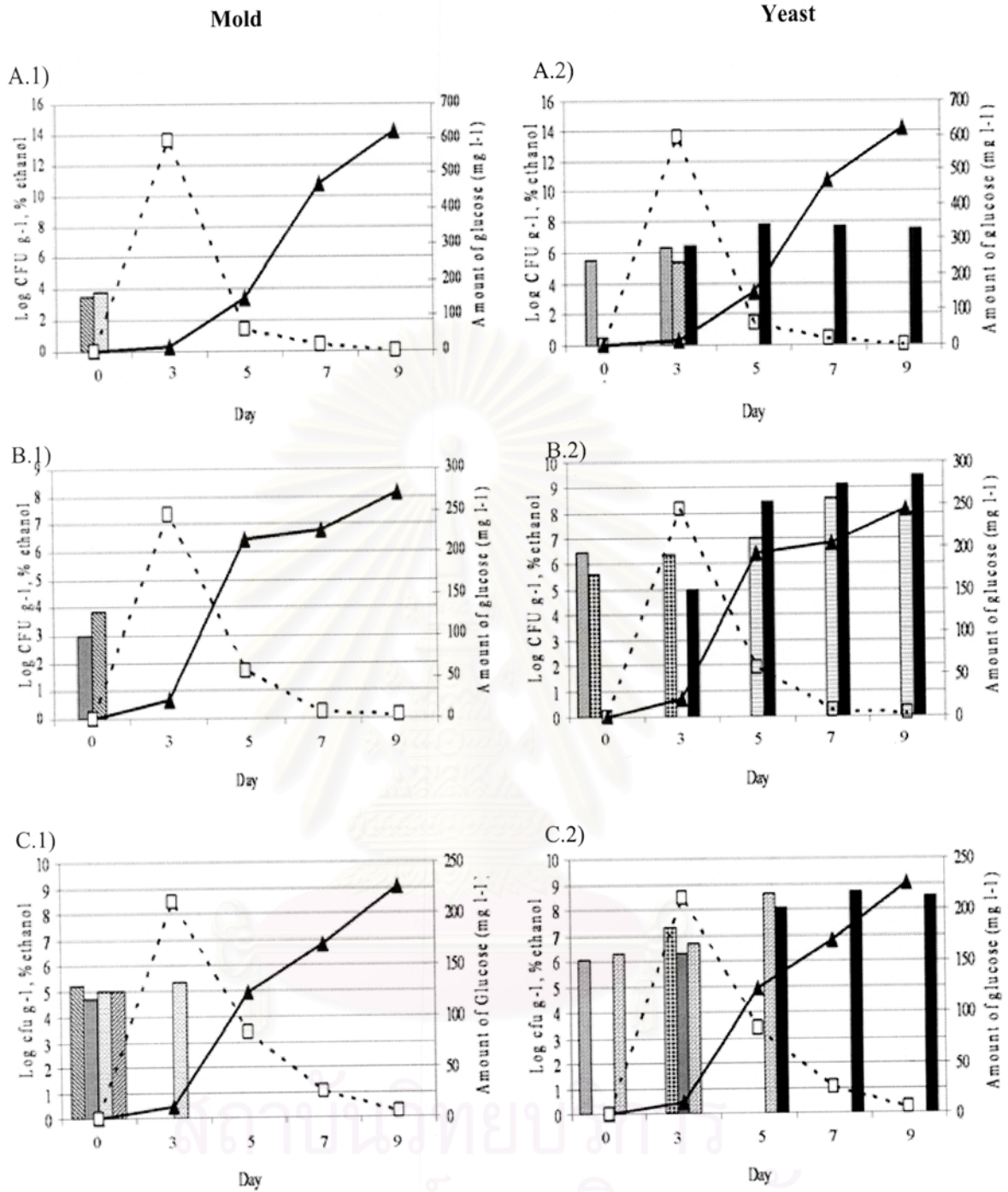
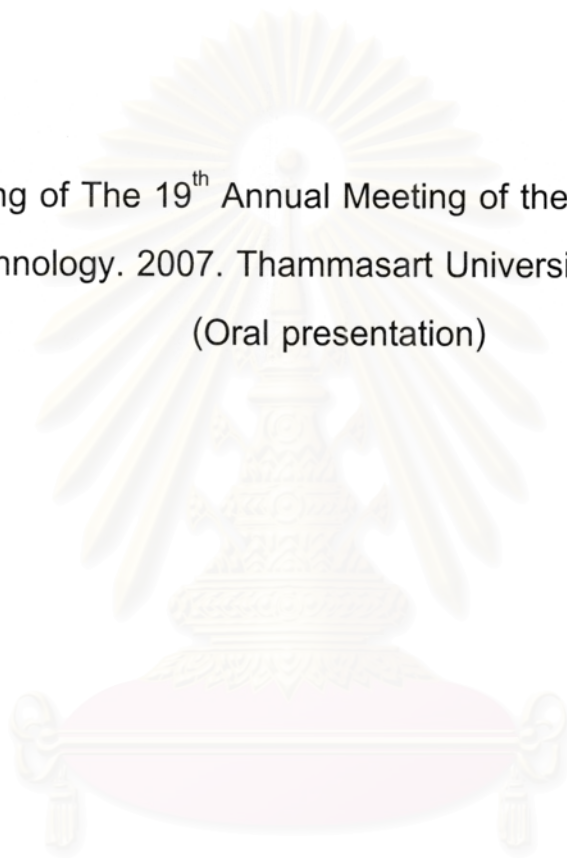


Fig. 5

Proceeding of The 19th Annual Meeting of the Thai Society for
Biotechnology. 2007. Thammasart University. Pg. 55-59.

(Oral presentation)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Diversity and population dynamics of molds and yeasts during production of Sato, a traditional Thai rice wine from Nan province

Apichava Taechavasonyoo, Jiraporn Thaneeyavarn and Chulee Yompakdee

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

Abstract

Traditional Thai rice wine, Sato, is usually produced in Northern and North Eastern part of Thailand. Nan is a forest enriched province, thus making the area high in diversity of living organisms. Production of Sato used an amylolytic starter, loogpang, as a source of microorganisms to ferment glutinous rice to rice wine. Molds and yeasts in the starter play major roles in production process. Commercial Sato production was not successful because of the quality inconsistency. This study aims on studying diversity and fermentation dynamics of molds and yeasts for further improvement in the consistency and/or quality of the product. Three of 41 Loogpang samples from Nan province were selected for the activities of the yeasts and molds and the flavor of the produced Sato. Samples were taken from each Sato at day 0, 3, 5, 7 and 9 for mold and yeast isolations followed by identifications using morphological, biochemical and molecular methods, respectively. Not so high in diversity of molds and yeasts in selected loogpangs were observed. During Sato fermentation, molds and non-*Saccharomyces* yeasts were dominated only in the early stage (day 0-3), then were replaced by the yeast *S. cerevisiae* at the later fermentation process.

Keyword Loogpang Yeasts Molds Diversity Sato Population Dynamics Nan province

Introduction

Microbial starter, in form of dry powders or hard balls made from starchy cereals, are used to prepare food and alcoholic beverages. These starter preparations have a variety of names such as loogpang in Thailand, murcha or marcha in Nepal and India, ragi in Indonesia, bubod in Philippine, Chinese yeast cake in Taiwan [1]. Despite nomenclature differences, starter from these countries have similar microflora which include mold species of *Rhizopus*, *Mucor* and *Amylomyces* as well as yeast species of *Pichia*, *Saccharomycopsis*, *Hyphopichia*, *Saccharomyces* and *Candida*.

Loogpang is a mixed culture starters for production of Sato, alcoholic beverage in Thailand. It is a dry, round to flattened, creamy white to dusty white, size from 2.0 to 3.5 cm in diameter.

The microflora of loogpang consists of both important microflora and the contaminants. It has been reported on the isolation of the filamentous mold such as *Rhizopus*, *Mucor* and *Amylomyces* as well as yeast species of *Pichia*, *Saccharomycopsis*, *Issatchenkia*, *Sacharomyces* and *Candida* [2].

Nan province locates at the northern part of Thailand. The two third of the area consists of forest which made up great diversity of living organisms. Production of Sato used to be one of the famous local products from Nan. However, commercial scale of Sato production faces problem on the inconsistency of the quality of Sato produced from each batches. Clearly, the use of good mixed pure culture of molds and yeasts is an alternative choice as a starter for the consistency in quality of Sato.

This study aimed at studying the diversity and population dynamics of molds and yeasts in

the selected sources of loogpang from Nan province during Sato production process.

Materials and Methods

1. Sample Collections

Forty one samples of loogpang were collected from small scale factories and village of 11 districts of the Nan province (Fig. 1). The starters were stored at 4 °C prior to screening for their properties.

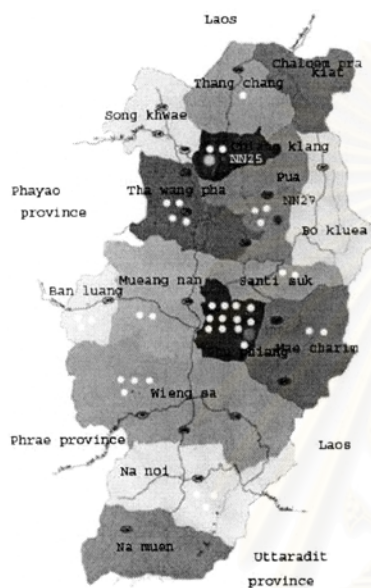


Fig. 1 Distribution of Loogpang samples (○) collected in Nan province

(modified by http://www.nan.go.th/webnan/g1/map_nan.html)
NN6 (● from Phu phiang subdistrict), NN25 (○ from Chiang klang district) and NN27 (● from Pua district)

2. Fermentation test

Traditional process for making rice wine was adapted to perform in the laboratory scale, as follows: fifty grams of glutinous rice were soaked in 60 ml of distilled water for 4 h at room temperature followed by steaming in an autoclave for 15min. at 121°C. The gelatinized rice paste was cooled to 35–40°C prior to being mixed with 2 g of the tested starter. After solid-state aerobic fungal fermentation for 3 days at 30°C (namtoi), 200 ml of sterile water was added to the molded mass to allow for submerged alcoholic fermentation for 7 days at 30°C in the same bottle (Sato). All of the fermented rice mass was homogenized using a Stomacher Labblender (Seward 400, Emergo, England).

3. Analytical methods

The pH of Sato was measured by digital pH meter (seven easy, METTLER TOLEDO). Glucose in namtoi and sato was analyzed by Glucose oxydase-peroxydase kit (Biotech, Thailand). Ethanol in Sato was analyzed by GC (3800, Varian). Flavor was assessed subjectively by a small expert panel.

4. Microbiological analysis

Samples were taken in Day 0, 3, 5, 7 and 9 of fermentation broth produced from each source of loogpang. Then, were transferred to a stomacher bag and homogenized with 200 ml sterilized water in a Stomacher Lab-blender 400 for 15 min at high speed. Appropriated serial dilutions were made before spreading onto Rose Bengal agar, Yeast Malt Extract Agar (pH4.5) for enumeration of molds and yeasts, respectively. The plates were incubated at 30 °C for 2–4 days. The colonies that appeared after incubation were counted and calculated as colony forming units (CFU) per gram of culture.

5. Identification of molds and yeasts

5.1 Mold isolates were identified based on microscopic morphological examination and cultural properties according to established taxonomic keys and descriptions [3].

5.2 Yeasts were first grouped according to the patterns of DNA fragment at internal transcribed spacer (ITS) region by PCR-RFLP [4]. The representative of each group was randomly selected for further identification by biochemical method [5] and DNA sequencing.

6. DNA isolation (modified from [6])

Pure cultures of each isolates were grown in 5 ml of YPD at 30°C for 2-3 Days. The cells were then collected by centrifugation at 10,000 rpm for 5 min at room temperature. The cells were resuspended in 500 µl of distilled water followed by centrifugation as described above. Collected cells were resuspended in 200 µl of extraction buffer (2% Triton X-100, 1% sodium dodecyl sulfate, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA), 200 µl of Phenol/Chloroform/ Isoamyl alcohol (25/24/1), and 0.3 g of glass bead (0.45-0.52 µm in diameter) were added and then vortexing for 3 min. After 200 µl of TE buffer (pH8.0) was added, and centrifuged at 14,000 rpm for 10 min. followed by DNA precipitation.

7. PCR amplification

The amplification reactions of the ITS1-5.8srDNA-ITS2 region were carried out under

the following conditions: each 50 µl reaction mixture containing 5-25 ng template DNA; 10x PCR buffer; 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP; 0.5 µM of each primer; and 1 U Deep vent polymerase (New England Biolab.). The primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-CTCCGCTTATTGATATGC-3') as described by [7] were used to amplify this region. Amplification was performed by a Perkin Elmer Thermocycler 2400 programmed as follows: initial denaturation at 94°C for 5 min; 30 s 94°C for denaturing, 30 s at 56°C for annealing, 1 min at 72°C for synthesis, repeated for 35 cycles; and a final extension step of 5 min at 72°C. Amplified samples were kept at -20°C until further use.

8. Restriction analysis

Aliquots (7 µl) of PCR products were digested without further purification with 1 U of restriction enzyme in 20 µl reaction volume, using the manufacturer's instructions and conditions. The restriction enzymes used were *CfoI*, *HaeIII* and *HinI*. RFLP products were analyzed by horizontal electrophoresis in 2% (w/v) agarose gels. The size of DNA fragment was calculated using Quantity One Program (BIO-RAD).

9. Ethanol production

Ethanol concentration in culture broth was determined by gas-chromatography (GC) (3800 Varian) using absolute ethanol as standard.

Results and Discussion

1. Collection of samples and screening for good sources of loogpang

Samples of Loogpang were collected from 11 districts in Nan province except for 2 districts that has no Sato production activity. Forty one sources of loogpang were obtained. The samples were, then, screened for the activity of mold and yeast for Sato production as well as for the good flavor of Sato obtained. Each source of loogpang was used as a starter for production of each Sato. On comparison of the activities of molds, level of liquefaction of steamed glutinous rice from each samples were scored at the first three day of the process. Then, at the end of the process, the activities of yeasts in loogpang were examined by comparison of the final concentration of glucose and ethanol in Sato. In addition, flavor of each Sato was determined subjectively by a small expert panel.

Three sources of loogpang were selected for further studies: NN6, NN25 and NN27 (Table 1, Fig.1). The selected sources of loogpang showed high activity of liquefaction of steamed rice (+++ → +++) which reflect their good ability to transform steamed glutinous rice into high glucose concentration in namtoi (1,309.35 – 2,757.55 mg/l). In addition, Sato produced from the three samples showed low in glucose concentration (1.55 – 5.27 mg/l) and reasonable high in ethanol production (7.90 – 14.19%) which reflect the fermentation activity of the microorganisms especially yeasts in the starters.

Table 1 Performance of some sources of loogpang collected in Nan province

Code of loogpang	Liquefaction of steamed rice ^a in the first three days	Glucose concentration (mg/l)		Ethanol concentration (%) in Sato
		Namtoi	Sato	
NN6	++++	2757.55	1.55	14.19
NN11	+	1223.02	59.43	2.69
NN25	++++	1309.35	3.42	8.14
NN26	+++	3271.94	54.33	6.94
NN27	+++	1335.25	5.27	7.90

^a Levels of liquefaction ranging from + (little) to +++++ (very much); Sample in bolds are selected for further study.

2. Isolation of molds and yeasts from selected sources of loogpang

Each selected loogpang was used as a starter to produce Sato and the samples were taken at day 0, 3, 5, 7 and 9 during fermentation process. Molds and yeasts were isolated from each samples of the three selected loogpangs. We found that molds could only be isolated on day 0 in 9×10^3 , 8×10^3 and 3×10^4 cfu/g from NN6, NN25 and NN27, respectively

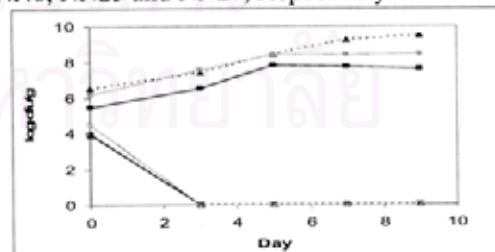


Figure2 Growth kinetics during Sato production of the three selected loogpangs: yeast (■) and mold (□) in NN6, yeast (▲) and mold (△) in NN25 and yeast (◆) and mold (◇) in NN27

We could not detect any molds on day 3 of the process. On the other hand, yeasts could be isolated since day 0 at 10^6 cfu/g and reached 10^9 cfu/g on day 9 (Fig. 2).

3. Identification of selected molds and yeasts

3.1 Identification of molds

Morphological methods were used for identification of the isolated molds. Based on the macroscopic and microscopic morphology, size and structure of spores, sporangiophore, rhizoid, chlamydospore and sporangium. Among 20 isolates, 6 were identified as *Mucor hiemalis*, 10 were *Mucor racemosus* and 4 were *Mucor circinellodes* (data not shown).

3.2 Identification of yeasts

Because of the large number of isolated yeasts, PCR-RFLP patterns of ITS1-5.8srDNA-ITS2 DNA fragment digested with either *Hin*FI, *Hae*III or *Hha*I were used to divide the isolated yeasts into 5 groups (Table 2).

Table 2 Five different groups of the isolated yeasts based on their PCR-RFLP patterns

Group	No. of isolate	Size of PCR product (bp)	DNA fragment (bp)		
			<i>Hin</i> FI	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I
1	531	880	360,350,180	320,230,180,130	385,365
2	93	510	220,140	380	300,200,170
3	40	650	320,270	630	630
4	9	750	350,200,180	750	320,310,105
5	8	500	280,220	390	190

To identified the isolated yeasts, the representative isolate of each group was randomly chosen for identification by biochemical method [4] and DNA sequencing of the ITS1-5.8srDNA-ITS2 region.

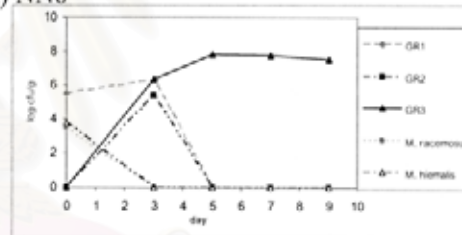
Table 3 Composition of molds and yeasts in the 3 selected sources of looppang

Code	In each source of looppang	
	Molds	Yeasts
NN6	<i>Mucor racemosus</i> <i>Mucor hiemalis</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> (GR.2)
		NN6-42 (similarity 92% to (GR.4)
		<i>Pichia anomala</i>
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (GR.1)
NN25	<i>Mucor racemosus</i> <i>Mucor circinellodes</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> (GR.2)
		<i>Pichia anomala</i> (GR.3)
		<i>Isatchenkia orientalis</i> (GR.5)
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (GR.1)
NN27	<i>Mucor circinellodes</i>	<i>Pichia anomala</i> (GR.3)
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (GR.1)

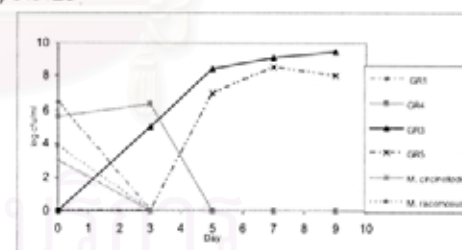
4. Population dynamics of molds and yeasts during Sato production

Each Looppang of NN6, NN25 or NN27 was used as a starter for Sato production. The samples were taken at day 0, 3, 5, 7 and 9 of the fermentation process. The homogenized samples were spreaded onto Rose Bengal agar and Yeast Malt Extract Agar (pH4.5) for enumeration of molds and yeasts, respectively. The isolated yeasts were further inoculated in L-lysine medium to distinguish the non-*Saccharomyces* yeasts from the *Saccharomyces* yeasts. The results showed that molds and the non-*Saccharomyces* yeasts could be detected only in the early stage of the process (day 0-3) under aerobic fermentation while the *Saccharomyces cerevisiae* became dominated and replaced the non-*Saccharomyces* yeasts at beginning of the later stage of the fermentation (day3-9). Interestingly, *Isatchenkia orientalis*, a non-*Saccharomyces* yeast, could also be detected throughout the second stage of fermentation (Fig. 3)

A) NN6



B) NN25



C) NN27

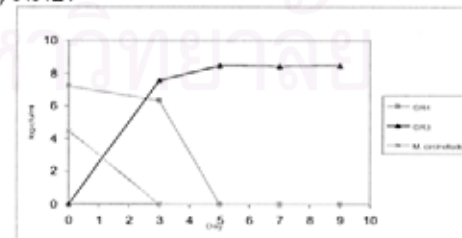


Fig 3. Population dynamics of molds and yeasts during Sato production from the three selected looppang: A) NN6, B) NN25 and C) NN27

Conclusion

The diversity and population dynamics of molds and yeasts in selected loogpang from Nan province were studied. Since the selected sources of loogpang were from areas that not so far away from one another (about 80 km at the most), we could not detect much diversity in molds and yeasts. In stead, some of the molds and yeasts composition in each of the three loogpangs were found redundant. *i.e.* the mold, *Mucor racemosus* and the yeast, *Saccharomycopsis fibuligera* were found in both NN6 and NN27. *S. cerevisiae* is the only yeast that could be found in all three sources. Population dynamics of the molds and yeasts showed the same results as those previously reported in wine fermentation that Non-*Saccharomyces* yeasts will be dominated in the early stage aerobic fermentation and was then replaced by *S. cerevisiae* at later stage of the fermentation as the alcohol concentration increased [8]. Interestingly, we found a non-*Saccharomyces* yeast *Isatchenkia orientalis* in Sato produced from NN25 which could be detected only in day3-9 along with *S. cerevisiae*. It is interesting to further study the roles of the *Isatchenkia orientalis*, besides its alcohol tolerance, along with those of molds and yeasts on the production and the quality of Sato.

References

- [1] Aidoo, K.E. Rob Nout, M.J. and Sarkar, P.K., Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermentation, FEMS Yeast Res., Vol. 6 pp.30-39, 2006.
- [2] Limtong, S. Sintara, S. Suwanarit, P. and Lotong, N., Yeast Diversity in Thai Traditional Fermentation Starter (Loog-pang), The Kasetsart Journal natural sciences, Vol. 2, pp.149-158, 2002.
- [3] Samson, R.A. Hoekstra, E.S. Frisvad, J.C. and Filtenborg, O., Introduction to food-and airborne fungi, Centraalbeau voor Schimmelculture, Utrecht, Netherland, 2002.
- [4] Las Heras-Vazquez, F.J. Mingorance-Cazorla, L. Clemente-Jimenez, J. M. and Rodriguez-Vico F., Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers, FEMS Yeast Research, Vol.3 pp. 3-9, 2003.
- [5] Barnett, J.A. Payne, R.W. and Yarrow, D., YEASTS: Characteristics and identification. Cambridge University Press, United Kingdom, 2000.
- [6] Burke, D. Dawson, D. and Stearns, T., Methods in Yeast Genetics. A Cold Spring Harbor Laboratory Press, California. pp.111-112, 2000.
- [7] White, T.J. Bruns, T. Lee, S. and Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A. Gelfand, D.H. Sninsky, J.J. and White, T.J., PCR protocols. A guide to methods and applications, Academic Press, San Diego, pp. 315-322, 1990.
- [8] Fleet, G.H. and Heard G.M., Yeasts-growth during fermentation, In: Fleet G.H.(ed) Wine microbiology and biotechnology, Harwood, Chur, Switzerland, pp.27-55, 1993.