สปีชีส์ของยีสต์กับบทบาทในการผลิตสารให้กลีนในสาโท

นางสาวศศิกานต์ บ่อผล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5072479223

YEAST SPECIES AND THEIR ROLES IN AROMA COMPOUND PRODUCTION IN SATO

Miss Sasikan Borphol

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สปีชีส์ของยีสต์กับบทบาทในการผลิตสารให้กลิ่นในสาโท
โดย	นางสาวศศิกานต์ บ่อผล
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

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

……..อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์)

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

……กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. กาญจนา มหัทธนทวี)

ศศิกานต์ บ่อผล : สปีชีส์ของยีสต์กับบทบาทในการผลิตสารให้กลิ่นในสาโท (YEAST SPECIES AND THEIR ROLES IN AROMA COMPOUND PRODUCTION IN SATO) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ชุลี ยมภักดี, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ. ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์, 124 หน้า.

สาโทเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านของไทย ที่เกิดจากการหมักข้าวเหนียวด้วยลูกแป้งสุราซึ่งใช้เป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสมอันได้แก่ รา ยีสต์ และแบคทีเรีย การผลิตสาโทในระดับอุตสาหกรรมมีปัญหาด้านคุณภาพที่ไม่สม่ำเสมอในแต่ละชุดการผลิต คุณภาพของกล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสมจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว จุดมุ่งหมายของงานวิจัยคือศึกษาบทบาทของยีสต์เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีต่อการผลิตสารให้กลิ่นในสาโท ได้ทำการผลิตสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ของราสองสายพันธุ์คือ *Rhizopus microsporus* NN505 และ *Mucor hiemalis* NN609 ในทุกชุดการทดลองและแปรผันยีสต์ชนิด *Saccharomyces* sp. จำนวน 5 สายพันธุ์ได้แก่ N5D8, BMD8, TISTR5161, NP101D8 และ 493 EDV (สายพันธุ์ทางการค้า) เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี, สารให้กลิ่น และการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้ผลิตสาโท เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเอทานอลในปริมาณสูง อีกทั้งสามารถผลิตสารให้กลิ่นที่ดีในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์และเอสเทอร์หลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ฟีนิลแอลกอฮอล์ และ 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต เป็นผลให้การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นที่ได้มีค่าสูง จากนั้นศึกษาบทบาทของยีสต์ non – *Saccharomyces* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Issatchenkia orientalis* TISTR5259, *Pichia anomala* NP101 และ *Saccharomycopsis fibuligera* NP101 ที่มีต่อการผลิตสารให้กลิ่น โดยทำการผลิตสาโทจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมของรา 2 สายพันธุ์คือ *M. hiemalis* NN609 และ *R. microsporus* NN505 ในทุกชุดการทดลองและแปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์ แยกกันแต่ละชนิดในอัตราส่วนระหว่าง *S. cerevisiae* NP101D8 ต่อ non – *Saccharomyces* ดังนี้ 1 ต่อ 0.5 1 ต่อ 1 1 ต่อ 2 และ 1 ต่อ 4 ตามลำดับ เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี สารให้กลิ่น และการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าที่อัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 ได้รูปแบบของสารประกอบให้กลิ่นที่ดีทั้งด้านชนิดและปริมาณ และได้คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสสูง และการเติมยีสต์ non – *Saccharomyces* ในกล้าเชื้อบริสุทธิ์ผสมได้ปริมาณเอสเทอร์โดยรวมในสาโทและผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสสูงกว่าในชุดควบคุมที่มีการเติมเฉพาะยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 เพียงชนิดเดียว จากผลของ Principal Component Analysis (PCA) พบว่ายีสต์ *I. orientalis* TISTR5259 และ *P. anomala* NP101 มีความสัมพันธ์อย่างสูงกับการผลิต เอทิลแอซีเทต และไอโซบิวทานอล ส่วนยีสต์ *Sm. fibuligera* NP101 มีความสัมพันธ์อย่างสูงกับการผลิตไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เอทิลออกทาโนเอท เอทิลเดคาโนเอท และ 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต จากองค์ความรู้ที่ได้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดสู่การพัฒนาเพื่อยกระดับคุณภาพสาโทในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ภาควิชา จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ปีการศึกษา 2553	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5072479223 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : SATO / YEASTS / VOLATILE COMPOUNDS / SENSORY TEST

SASIKAN BORPHOL: YEAST SPECIES AND THEIR ROLES IN AROMA COMPOUND PRODUCTION IN SATO. THESIS ADVISOR: ASST.PROF. CHULEE YOMPAKDEE, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASST.PROF. NATCHANUN LEEPIPATPIBOON, Dr. rer. nat., 124 pp.

Sato, a Thai alcoholic beverage, produces from fermentation of steamed glutinous rice mixed with *Loogpang*, as a starter culture, which composes of several kinds of microorganisms included molds, yeasts and bacteria. Industrial *Sato* manufacturer faces a serious problem of inconsistency in its quality in each batch. Quality of mixed pure starter culture is one of important factors to solve the problem. This study focused on studying the role of yeast species on contributing volatile compounds in *Sato*. *Sato* was produced from mixed pure starter cultures composed of two mold isolates (*Rhizopus microsporus* NN505 and *Mucor hiemalis* NN609) and one each of the selected *Saccharomyces cerevisiae* strain: BMD8, N5D8, NP101D8, TISTR5161 or commercial strain 493 EDV (Danstil®, Canada). The samples were taken at the end of fermentation and determined for chemical parameters, volatile compounds and sensory test analysis. The strain NP101D8 was selected based on its characteristic of high productivity in ethanol and higher alcohols especially phenyl alcohol and 2 – phenylethyl acetate as well as high sensory test scores. Then, three non – *Saccharomyces* yeasts, *Issatchenkia orientalis* TISTR5259, *Pichia anomala* NP101 and *Saccharomycopsis fibuligera* NP101, were investigated on profile of volatile compounds produced. The *Sato* was produced using two molds strains with the selected *S. cerevisiae* NP101D8 and varying each of the 3 strains of non – *Saccharomyces* yeasts from 1:0.5, 1:1, 1:2 and 1:4, respectively. The ratio between *S. cerevisiae* and non – *Saccharomyces* at 1:0.5 showed high quality and quantity in volatile compounds profiles as well as high scores in sensory test results. Moreover, The addition of non – *Saccharomyces* yeast in the mixed pure starter culture obtained *Sato* with higher total ester content as well as sensory test scores than that of control group which contain only *S. cerevisiae* NP101D8 in the mixed pure starter culture. Principal Component Analysis (PCA) data indicated that *I. orientalis* TISTR5259 and *P. anomala* NP101 showed the ability to produce high level of ethyl acetate and isobutanol while *Sm. fibuligera* NP101 tends to contribute high amount of isoamyl alcohol, ethyl octanoate, ethyl decanoate and 2 – phenylethyl acetate. The results obtained could serve as platform for developing of mixed pure starter culture for production of high quality and consistency in quality of commercial *Sato*.

Department : Microbiology Student's Signature .....

Field of Study : Industrial Microbiology Advisor's Signature .....

Academic Year : 2010 Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และบริษัทบัณฑิตพัฒน์ - เทค จำกัด ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว. – อุตสาหกรรม สัญญาเลขที่ MRG-WI525S137

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอ กราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณคุณนิธิโรจน์ (วุฒิเลิศ) ทรัพย์ไพบูลย์สุข กรรมการผู้จัดการบริษัท บัณฑิตพัฒน์ - เทค จำกัด ผู้ผลิตและจัดจำหน่ายสาโทบางม้า ที่สนับสนุนทุนวิจัย อีกทั้งยังเอื้อเฟื้อตัวอย่างสาโทบางม้า ตัวอย่างลูกแป้งสุรา และสายพันธุ์ยีสต์ทางการค้า (493 EDV) และขอขอบพระคุณคุณลาวัลย์ ชตานนท์ และสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่เอื้อเฟื้อสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณ ดร. ศุมาพร เกษมสำราญ ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำในการวิเคราะห์ PCA และกราบขอบพระคุณอาจารย์ ประดิษฐ์ ครุวัณณา อาจารย์วัลลภ อิมะไชย์ และคณะผู้เชี่ยวชาญด้านการชิมไวน์และสาโทระดับประเทศทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆเกี่ยวกับการทดสอบทางประสาทสัมผัสแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ ดร. กาญจนา มหัทธนทวี ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำต่างๆ ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

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

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ บุคลากร ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำต่าง ตลอดจนอำนวยความสะดวกต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบคุณ พีๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งห้องปฏิบัติการ 452 402 และ 462 คุณอภิชญา เตชะวสัญญู คุณอำภา หลวงคล้ายโพธิ์ นางสาวมาติกา อ้นแก้ว นางสาววันกุศล ชนะสิทธิ์ สำหรับการแบ่งปันรอยยิ้ม กำลังใจ ความห่วงใย และความช่วยเหลือที่มีให้เสมอมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่สาว และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือ คำปลอบโยนเวลาท้อแท้และเหนื่อยล้า รวมทั้งให้กำลังใจและสนับสนุนในทุกๆ ด้านแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

    2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโท..... 5

    2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในลูกแป้งสุรา..... 11

    2.3 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก..... 12

    2.4 กระบวนการที่เกิดขึ้นในสาโท..... 14

    2.5 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีที่สำคัญในการผลิตสาโท..... 15

    2.6 สารประกอบให้กลิ่นรสในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์..... 20

3. วิธีดำเนินการวิจัย..... 30

    3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 30

    3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ..... 31

    3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง..... 33

        3.3.1 การจำแนกชนิดราและยีสต์ที่อยู่ในลูกแป้งสุราโดยใช้สัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล..... 34

        3.3.2 การคัดแยกตัวแทนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตสาโทที่มีกลิ่นรสที่ดี..... 37

        3.3.3 แปรผันอัตราส่วนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* กับยีสต์ในกลุ่ม non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์ เพื่อให้ได้สาโทที่มีคุณภาพด้านกลิ่นรสที่ดี..... 40

บทที่ หน้า

4. ผลการทดลอง..... 40
4.1 การจำแนกชนิดราและยีสต์ที่อยู่ในลูกแป้งโดยใช้สัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล..... 43
4.2 การคัดเลือกตัวแทนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* จำนวน 5 สายพันธุ์ ทีมีความสามารถในการผลิตสาโทที่มีกลิ่นรสที่ดี..... 57
4.3 แปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* กับยีสต์ non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์เพื่อให้ได้สาโทที่มีคุณภาพด้านกลิ่นรสที่ดี..... 67
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 88
5.1 การจำแนกชนิดราและยีสต์ที่อยู่ในลูกแป้งสุราโดยใช้สัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล..... 88
5.2 การคัดเลือกตัวแทนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* จำนวน 5 สายพันธุ์ ทีมีความสามารถในการผลิตสาโทที่ดี..... 89
5.3 แปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* กับยีสต์ non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์เพื่อให้ได้สาโทที่มีคุณภาพด้านกลิ่นรสที่ดี..... 92
รายการอ้างอิง..... 97
ภาคผนวก..... 104
ภาคผนวก ก..... 105
ภาคผนวก ข..... 106
ภาคผนวก ค..... 110
ภาคผนวก ง..... 113
ภาคผนวก จ..... 117
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 124

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	หัวเชื้อชนิดต่างๆ และชื่อไวน์ข้าวของแต่ละประเทศ.....	9
2.2	องค์ประกอบและปริมาณของสารประกอบเอสเทอร์และฟูเซลออยล์ที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ.....	21
2.3	กรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นและฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในไวน์องุ่น.....	23
4.1	แหล่งที่มาของยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยจำนวน 8 สายพันธุ์.....	42
4.2	ผลของการจำแนกราในลูกแป้งสุราโดยใช้สัณฐานวิทยา.....	46
4.3	ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้เป็นของเหลวของรา 3 ไอโซเลตที่แยกจากลูกแป้ง NN5 เทียบกับราสายพันธุ์ *M. hiemalis* NN609.....	47
4.4	ผลของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของตัวแทนยีสต์ 5 กลุ่ม.....	48
4.5	การจัดกลุ่มของยีสต์ที่แยกได้ตามรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS โดยวิธี PCR-RFLP.....	49
4.6	การจำแนกชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันในฐานข้อมูลใน GenBank.....	51
4.7	ผลของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์ 2 สายพันธุ์.....	53
4.8	การจำแนกชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันในฐานข้อมูลใน GenBank.....	54
4.9	ผลการจำแนกชนิดของยีสต์โดยใช้ลักษณะทางชีวเคมี.....	56
4.10	ผลของการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์.....	58
4.11	คะแนนของผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์.....	59
4.12	ปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์โดยรวมของตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากยีสต์ 5 สายพันธุ์.	63

ตารางที่		หน้า
4.13	องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากการแปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์.....	69
4.14	ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ในสาโทที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ ยีสต์ non - *Saccharomyces* แต่ละสายพันธุ์ในอัตราส่วนต่างๆ จำนวน 3 สายพันธุ์.....	76
4.15	ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์ในสาโทที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ ยีสต์ non - *Saccharomyces* แต่ละสายพันธุ์ในอัตราส่วนต่างๆ จำนวน 3 สายพันธุ์.....	77
4.16	ปริมาณโดยรวมของสารประกอบให้กลิ่นในสาโทที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* แต่ละสายพันธุ์ในอัตราส่วนต่างๆ จำนวน 3 สายพันธุ์.....	78
ง1	ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์.....	113
ง2	ค่าคะแนนรวมเฉลี่ยของผลการทดลองทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมแปรผันอัตราส่วนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* กับยีสต์ในกลุ่ม non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์.....	114
จ1	ตัวอย่างการวิเคราะห์ผลองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์ ด้วย SPSS เวอร์ชั่น 17.0.....	117

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลูกแป้งที่มีเส้นใยของราปกคลุมอยู่ด้านบน……..	8
2.2	แผนภูมิการผลิตลูกแป้งแบบภูมิปัญญาท้องถิน……....	10
2.3	การเจริญของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักสาโท.....	13
2.4	การเปลียนแป้งเป็นน้ำตาล.....	16
2.5	การเปลียนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยยีสต์.....	17
2.6	เมแทบอลิซึมของยีสต์ภายใต้ภาวะทีมีอากาศและไม่มีอากาศ……	18
2.7	ปฏิกิริยาการเปลียนกรดอะมิโนไปเป็นฟูเซลแอลกอฮอล์.....	22
2.8	วิถีการย่อยสลายกลูโคสเป็นกลีเซอรอล ซัคซิเนตและสารประกอบอืนๆ โดยยีสต์ ในภาวะทีไม่ใช้อากาศ……..	25
2.9	การเกิดเอสเทอริฟิเคชันระหว่างกรดและแอลกอฮอล์ โดยมีเอนไซม์เอสเทอเรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา……	27
2.10	การเกิดเอสเทอริฟิเคชันระหว่างการหมักโดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลกอฮอล์อะเซทิลทรานสเฟอเรส และ แอลกอฮอล์เอซิลทรานสเฟอเรส……..	27
4.1	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของรา 3 ไอโซเลตทีแยกจากลูกแป้ง NN5……....	43
4.2	ต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของตัวแทนของราทีแยกได้จากลูกแป้งสุรา NN5……	45
4.3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา NN505 ทีแยกได้จากลูกแป้ง NN5…….	46
4.4	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของตัวแทนยีสต์ 5 กลุ่ม.....	48
4.5	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของตัวแทนยีสต์ 5 กลุ่มทีถูกตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ *Hae*III, *Hin*fI, *Hha*I……..	50
4.6	ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของตัวแทนยีสต์ 5 กลุ่ม……	52
4.7	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์ 2 สายพันธุ์.....	53

ภาพที่		หน้า
4.8	ตัวอย่างการศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน ของ *P. fabianii*.....	55
4.9	ตัวอย่างการศึกษาความสามารถในการหมักของตัวแทนยีสต์ 5 กุล่ม โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	55
4.10	ปริมาณอะเซทัลดีไฮด์และสารกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากการเติมเชื้อบริสุทธิ์ผสม *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์.....	61
4.11	ประมาณสารกลุ่มเอสเทอร์ที่พบในตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากการเติมเชื้อบริสุทธิ์ผสม *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์.....	64
4.12	กราฟ biplot แสดงความสัมพันธ์ของยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ กับความสามารถในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในตัวอย่างสาโท.....	66
4.13	ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (Sensory test) ของสาโทที่แปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *I. orientalis* TISTR5259.....	71
4.14	ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (Sensory taste) ของสาโทที่แปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *P. anomala* NP101.....	72
4.15	ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (Sensory taste) ของสาโทที่แปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *Sm. fibuligela* NP101...	73
4.16	กราฟ biplot แสดงความสัมพันธ์ของการแปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S.cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *. orientalis* TISTR5259 ในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในตัวอย่างสาโท.....	83
4.17	กราฟ biplot แสดงความสัมพันธ์ของการแปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S.cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *P. anomala* NP101 ในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในตัวอย่างสาโท.....	84
4.18	กราฟ biplot แสดงความสัมพันธ์ของการแปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S.cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *Sm. fibuligela* NP101 ในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในตัวอย่างสาโท.....	85
4.19	กราฟ biplot แสดงความสัมพันธ์ของยีสต์ *S.cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* 3 สายพันธุ์ ในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในตัวอย่างสาโทที่แปรผันอัตราส่วนระหว่าง *S.cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* 3 สายพันธุ์ เท่ากับ 1 ต่อ 0.5.....	86

ภาพที่		หน้า
ข1	กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของกลูโคส……	108
ข2	ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของเอทานอลและสารประกอบให้กลิน.....	109
ง1	ตัวอย่างอะกาโรสเจลเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์และราจากสาโทที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์ ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ *Hae*III, *Hin*fI, *Hha*I……	115
ง2	ตัวอย่างอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียจากสาโทจากสาโทที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์……	116
จ1	ตัวอย่างโครมาโทรแกรมของสารประกอบให้กลินมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟพร้อมเครื่องตรวจวัดชนิดเฟลมไอโอไนเซชัน (GC - FID) โดยเก็บตัวอย่างให้กลินบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace).....	121
จ2	ตัวอย่างโครมาโทรแกรมของสารประกอบให้กลินของตัวอย่างสาโทที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟพร้อมเครื่องตรวจวัดชนิดเฟลมไอโอไนเซชัน (GC - FID) โดยเก็บตัวอย่างให้กลินบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace).....	122

บทที่ 1
บทนำ

สาโทเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านของไทยที่มีกรรมวิธีและขั้นตอนในการผลิตโดยภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทยที่มีการอนุรักษ์และถ่ายทอดสืบต่อจากรุ่นสู่รุ่น ในขบวนการผลิตสาโทจะใช้ข้าวเป็นวัตถุดิบหลักโดยจะหมักร่วมกับกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เรียกว่าลูกแป้งสุรา ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ รา ยีสต์ และแบคทีเรีย ทั้งชนิดที่จำเป็นและไม่จำเป็นต่อการหมัก ในระหว่างกระบวนการหมักราทำหน้าที่หลักในการเปลี่ยนข้าวซึ่งเป็นวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลและยีสต์ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ (กุณฑลี ไกรธรรมจิตกุล, 2547, นุชรี อ่อนพร้อม, 2547 และ อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) นอกจากนี้ยีสต์ยังมีบทบาทสำคัญในการสร้างสารประกอบให้กลิ่นเฉพาะตัวในสาโทอีกด้วย (นริสา ตรีเนตร, 2550 และ อำภา หลวงคล้ายโพธิ์, 2552)

ในอดีตการผลิตสาโทถือเป็นเรื่องผิดกฎหมายแต่ในปี พ.ศ. 2543 รัฐบาลไทยเปิดเสรีการผลิตและจำหน่ายสาโทมากขึ้น โดยผลักดันการผลิตสาโทเป็นผลิตภัณฑ์ในหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์หรือเป็นอุตสาหกรรมขนาดกลางและเล็กแต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ผู้ประกอบการหลายรายประสบกับปัญหาหลายประการโดยเฉพาะเรื่องคุณภาพที่ไม่คงที่ในแต่ละชุดการผลิตและรสชาติของสาโทไม่ดี อาทิ มีรสเปรี้ยวของน้ำส้มสายชู ซึ่งปัญหาดังกล่าวส่งผลกระทบโดยตรงต่อผู้ประกอบการผลิตสาโททั้งเชิงเศรษฐศาสตร์และผลกระทบเชิงสังคม เช่น ปัญหาการตัดราคา ปัญหาการส่งคืนสินค้า ขาดความไว้วางใจจากผู้บริโภค เป็นต้น ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ กลิ่นรสถือเป็นปัจจัยหนึ่งในการบ่งชี้ถึงคุณภาพของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดนั้นๆ สำหรับการผลิตสาโทก็เช่นกัน ปัจจัยที่ส่งผลต่อกลิ่นรสของสาโท ได้แก่ คุณภาพของน้ำ สายพันธุ์ข้าว เครื่องเทศหรือสมุนไพร ซึ่งปัจจัยผันแปรสำคัญประการหนึ่งต่อคุณภาพกลิ่นรสของสาโทก็คือ คุณภาพของลูกแป้งสุรา (กุณฑลี ไกรธรรมจิตกุล, 2547 และนุชรี อ่อนพร้อม, 2547, อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550, นริสา ตรีเนตร, 2550 และ อำภา หลวงคล้ายโพธิ์, 2552)

จุลินทรีย์ที่อยู่ในลูกแป้งสุรามีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการหมักและคุณภาพของสาโท ทั้งในด้านรสชาติ สี รวมไปถึงกลิ่นเฉพาะอีกด้วย ดังนั้นในกระบวนการผลิตสาโทที่ไม่สามารถควบคุมลูกแป้งสุราให้มีคุณภาพทางกายภาพ เคมีและชีวภาพให้คงที่ได้ ตลอดจนการจัดเก็บรักษาลูกแป้งสุราที่ไม่เหมาะสม จะเป็นการเพิ่มอัตราเสี่ยงต่อการปนเปื้อนและการสูญหายของจุลินทรีย์ชนิดที่จำเป็นต่อการผลิตสาโท จุลินทรีย์ที่อยู่ในลูกแป้งจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญยิ่งต่อคุณภาพของสาโท ทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณภาพตลอดจนประสิทธิภาพของการหมักหรือขยายกำลังการผลิตให้เพิ่มขึ้นจากเดิมได้ จุลินทรีย์หลักที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับคุณภาพกลิ่นและรสของสาโทคือราและยีสต์ ในส่วนของแบคทีเรียยังมีรายงานวิจัยถึงบทบาทของแบคทีเรียน้อย

อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่าแบคทีเรียกรด แลคติกมีบทบาทในการผลิตสารให้กลิ่นเฉพาะด้วย (เจริญ เจริญชัย, 2545 และนริสา ตรีเนตร, 2550)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทหลักในการผลิตสารให้กลิ่นในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์หลายชนิด เช่น ไวน์องุ่น (Rojas และคณะ, 2003, Romano และคณะ, 2003, Mateos และคณะ, 2006, Swiegers และคณะ, 2009) สปาร์กลิงไวน์ (Sparkling wine) (Torrens และคณะ, 2008) ไวน์ผลไม้ (Estévez และคณะ, 2004) เป็นต้น ดังนั้นจึงนำมาสู่จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้โดยต้องการศึกษาบทบาทของยีสต์แต่ละสปีชีส์ที่แยกได้จากลูกแป้งสุราที่เมื่อนำมาผลิตสาโทแล้วพบว่าสาโทที่ได้มีคุณภาพด้านกลิ่น รสดี โดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสและวิเคราะห์รูปแบบสารให้กลิ่น ซึ่งผลจากงานวิจัยนี้นอกจากจะได้องค์ความรู้พื้นฐานของกลิ่น รสในสาโทที่ผลิตโดยยีสต์แต่ละสปีชีส์แล้ว ยังสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยต่อไป เพื่อการปรับปรุงคุณภาพด้านกลิ่นรสของสาโทให้ดียิ่งขึ้น รวมถึงการพัฒนาคุณภาพด้านกลิ่นรสของสาโทให้มีความหลากหลายเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคมากขึ้นอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งหมายศึกษาความสามารถในการผลิตสารให้กลิ่นในสาโทโดยยีสต์แต่ละสปีชีส์ ผลของงานวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ เพื่อนำไปพัฒนาคุณภาพด้านกลิ่นของสาโทต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีและองค์ความรู้ด้านบทบาทของยีสต์แต่ละสปีชีส์ต่อการสร้างสารให้กลิ่นในสาโท เพื่อนำไปพัฒนาปรับปรุงให้สาโทมีคุณภาพด้านกลิ่นรสที่หลากหลายสามารถตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคได้ดียิ่งขึ้น ตลอดจนสามารถผลิตสาโทให้มีคุณภาพคงที่ในแต่ละชุดการผลิต เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาคุณภาพของสาโทเพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกียวข้อง

ในภูมิภาคต่างๆ ของโลกทั้งในแถบซีกโลกตะวันออกและตะวันตกมีผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มมาก มายหลายชนิดที่ได้จากกระบวนการหมักจากธัญพืช ผลิตภัณฑ์ที่สำคัญและเป็นที่นิยมอย่างมากคือ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ซึ่งจะแตกต่างกันตามชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเช่น ธัญญาหาร ผลไม้ เป็นต้น เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ได้รับความนิยมในวงกว้างคือ ไวน์

การทำไวน์นับเป็นศิลปะแขนงหนึ่งที่มีชื่อทางภาษาอังกฤษว่า Enology หรือ Oenology แปลว่า ความรู้ในการผลิตไวน์ ซึ่งเป็นการรวบรวมเอาหลักการทางวิทยาศาสตร์ 3 สาขามารวมกัน คือ สาขาชีวเคมี เพื่อการศึกษาการเปลียนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ และกระบวนการเปลียนแปลงสารประกอบอินทรีย์เป็นกลินและรสของไวน์ สาขาจุลชีววิทยา เพื่อศึกษาถึงยีสต์ และภาวะที่จะให้ยีสต์เปลียนน้ำตาลให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ต้องการ และสาขาพฤกษศาสตร์ เพื่อศึกษาชนิดและวิธีการเพาะปลูกพันธุ์พืช เช่น องุ่น พืชและผลไม้ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไวน์

ไวน์ (Wine) เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทสุราแช่ ไวน์ที่ผลิตในเชิงพาณิชย์ส่วนใหญ่ผลิตจากผลองุ่นแต่ไวน์ที่ผลิตเพื่อบริโภคในระดับครัวเรือนบางครั้งอาจใช้ผลไม้ชนิดอืนตามฤดูกาลมาผลิตไวน์ได้ ซึงจะให้กลิน และรสชาติที่แตกต่างกัน ไวน์ที่ผลิตจากผลไม้ชนิดอืนจะเรียกชือผลไม้ชนิดนั้นตามหลังคำว่าไวน์ เช่น ไวน์สับปะรด ไวน์กระเจียบ และไวน์ข้าว เป็นต้น

การทำไวน์ข้าวจะแยกออกจากการทำไวน์ผลไม้อย่างชัดเจน เนืองจากกรรมวิธีการผลิตและหลักการจะแตกต่างจากการทำไวน์ผลไม้ค่อนข้างมาก กระบวนการผลิตไวน์ข้าวของแต่ละประเทศจะมีความแตกต่างกันทั้งวัตถุดิบ อุณหภูมิ และระยะเวลา แต่โดยรวมแล้วเป็นการหมักแบบธรรมชาติโดยใช้ธัญพืชเป็นวัตถุดิบ การทำไวน์จากข้าวมีการผลิตกันมาตั้งแต่ดั้งเดิมและเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในหลายพื้นที เช่น สาเก (Sake) ในประเทศญีปุ่น ทาไปและคูลาโป (Tapuy and Kulapo) ในประเทศฟิลิปินส์ ฮวางจุ้ยและชูจุ้ย (Huangjiu and Choujiu) ในประเทศจีน (Aidoo และคณะ, 2006) สำหรับประเทศไทยมีการผลิตไวน์ข้าวที่ทำมาจากการหมักข้าวเหนียวกับหัวเชื้อที่เรียกว่าลูกแป้งที่ในโอ่งหรือภาชนะดินเผามาช้านาน ซึงแต่ละท้องถินจะมีขั้นตอนการผลิต ส่วนผสมและชือเรียกต่างกันไปตามแต่ละท้องที เช่น สาโท (เหล้าโท) อุ และน้ำขาว เป็นต้น

Yoshikawa (1985) ได้แบ่งไวน์ข้าวตามลักษณะความใส ออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1. Alcoholic beverage เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีลักษณะใส ได้แก่ สาเก (Sake) และเชาชิงจุ้ย (Shao – Shin - Chu) เป็นต้น
2. Miscellaneous alcohol drinks เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีลักษณะขุ่น อันเนืองมาจาก

จุลินทรีย์และของแข็งที่เหลือตกค้างอยู่ ได้แก่ ทาไป (Tapuy) ทาเป (Tapay) และสาโท (Sato)

สาโท หรือไวน์ข้าว จัดเป็นสุราแช่ตามความหมายในพระราชบัญญัติสุรา พ.ศ.2492 มาตรา 4 ซึ่งให้คำนิยามว่า “สุราแช่” หมายถึงสุราที่ไม่ได้กลั่นและให้ความหมายรวมถึงสุราแช่ที่ได้ผสมกับสุรากลั่นแล้ว แต่ยังมีความแรงของแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรีด้วย (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน สาโท, 2546) ลักษณะสาโทคือ มีน้ำขาวขุ่น รสชาติหวาน และมีกลิ่นเฉพาะตัว

ในทวีปเอเชียนิยมผลิตไวน์จากข้าวมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน โดยแต่ละแหล่งผลิตจะมีวิธีการผลิตก้อนแป้งหัวเชื้อ (Aidoo และคณะ, 2006) ที่ต่างกันทั้งวัตถุดิบ ส่วนผสม และเชื้อจุลินทรีย์ ไวน์ข้าวในแต่ละพื้นที่มีชื่อเรียกที่แตกต่างกันเช่น ญี่ปุ่นเรียกว่าโคจิ (koji) จีนเรียกว่าชู (chou) เกาหลีเรียกว่า นุรุก (nuruk) อินโดนีเซียเรียกว่ารากิ (ragi) (Haruta และคณะ, 2006) และไทย เรียกว่า ลูกแป้งสุรา (Loogpang)

ลูกแป้งสุราในแต่ละหมู่บ้านมีสูตรเฉพาะเป็นของตนเอง และส่วนใหญ่ถูกปกปิดเป็นความลับ ไม่เผยแพร่แก่ผู้อื่น โดยภูมิปัญญาท้องถิ่นยังเชื่อมโยงกับสภาวะแวดล้อม หรือความหลากหลายทางชีวภาพ เช่น สมุนไพร ที่นำไปทำเป็นหัวเชื้อ เป็นต้น สูตรการทำลูกแป้งสุราของแต่ละแหล่งมีความแตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์และสรรพคุณของสมุนไพร แต่โดยรวมจะคล้ายคลึงกัน ซึ่งประกอบด้วยสมุนไพรหลากหลายชนิด ได้แก่ กระเทียม ข่า ดีปลี พริกแดง ปิดปลิวแดง เป็นต้น นำมาบดรวมกัน ผสมกับแป้งข้าวเหนียว และลูกแป้งสุราเก่าที่มียีสต์และราซึ่งถือว่าลูกแป้งเป็นหัวใจของการหมักที่ทำให้เกิดความหลากหลายของกลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะในแต่ละท้องถิ่น

ลูกแป้งสุราจัดเป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่อยู่ในรูปของก้อนแป้งที่มีความชื้นต่ำ สามารถเก็บรักษาได้นาน ซึ่งผ่านการถ่ายทอดวิธีการทำจากรุ่นสู่รุ่นตามกรรมวิธีพื้นบ้านสมัยก่อน ลูกแป้งเป็นแหล่งของจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งชนิดที่จำเป็นซึ่งมีประโยชน์ต่อการหมักและชนิดที่ไม่จำเป็น ดังนั้นคุณภาพของสาโทจึงขึ้นกับคุณภาพของลูกแป้งเป็นสำคัญ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลต่อกลิ่นรสของสาโทด้วย

ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของสาโท ได้แก่

1. ลูกแป้ง กล่าวคือในลูกแป้งประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ทั้งที่จำเป็นและไม่จำเป็นต่อการหมัก ลูกแป้งที่ผลิตจากแหล่งผลิตที่ต่างกันจะมีชนิดของจุลินทรีย์ที่ต่างกัน ดังนั้นการคัดเลือกลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ ที่ให้กลิ่นและรสชาติที่ดีในสาโทก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ
2. สายพันธุ์ของข้าวที่ใช้ในการหมัก ข้าวแต่ละสายพันธุ์จะมีคุณสมบัติต่างกัน เช่น ความเหนียว

ของ ข้าว กลีนหอมของข้าว รวมถึงรสชาติของข้าวด้วย ดังนั้นปัจจัยเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดกลีนและรสชาติในสาโทแตกต่างกัน

3. ระยะเวลาในการหมัก
4. การเก็บรักษาหลังการหมัก หากเก็บในภาชนะที่ไม่ดีหรือเก็บในภาวะที่ไม่เหมาะสม ก็มีผลทำให้กลีนและรสชาติของสาโทเปลี่ยนไป
5. คุณภาพของน้ำ

2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโท

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโทก็เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อคุณภาพของสาโท แต่ยังไม่ค่อยมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับวัตถุดิบต่างๆที่มีผลต่อคุณภาพต่างๆของสาโท

2.1.1 ข้าว

เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตสาโท มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ คือ *Oryza sativa* โดยข้าวที่ปลูกในประเทศไทยจัดอยู่ใน Indica type มี 2 ชนิด คือ ข้าวเจ้า (Rice, Ordinary rice) และข้าวเหนียว (Glutinous rice, Sticky rice) มีลักษณะเมล็ดเรียวยาว มีความสมบูรณ์ทางโภชนาการสูง ประกอบด้วย

- คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) อยู่ระหว่างร้อยละ 70 – 80 ซึ่งเป็นแป้งเกือบทั้งหมด
- โปรตีน (Protein) เฉลี่ยร้อยละ 11
- ไขมัน (Lipid) ที่มีอยู่ร้อยละ 0 – 2 ในส่วนของจมูกข้าว

นอกจากนั้นยังมีสารที่ทำหน้าที่แอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant) ตามธรรมชาติ มีประสิทธิภาพ ช่วยลดปริมาณคลอเรสเตอรอลในเลือดและมีปริมาณเส้นใยอาหารเป็นทั้งแหล่งเกลือแร่และกลุ่มวิตามินที่สำคัญหลายชนิด ซึ่งในข้าวแต่ละชนิด เช่น ข้าวเหนียว และข้าวเจ้าจะมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน องค์ประกอบสำคัญที่พบในเมล็ดข้าว คือ แป้ง (Starch) และส่วนที่ไม่ใช่แป้ง (non - starch constituents) ซึ่งได้แก่ โปรตีน ไขมัน เส้นใย วิตามินและแร่ธาตุต่างๆ แป้ง (Starch) เป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุด ซึ่งอยู่ในรูปของเม็ดแป้ง (Starch granule) ซึ่งมีความสำคัญในการเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลและแอลกอฮอล์ เมื่อมีการหมักเกิดขึ้น แป้งมีสูตรทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)n$ มีค่า n ไม่น้อยกว่า 1,000 แป้งส่วนใหญ่เป็นสาร Heterogeneous ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของกลูโคส ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ อะไมโลส (Amylose) และ อะไมโลเพคติน (Amylopectin) เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีที่ต่างกัน ดังนี้

- อะไมโลส เป็นสายตรง ประกอบด้วย 70 - 2,100 หน่วยของน้ำตาลกลูโคส ต่อกันด้วยพันธะ α1 ,4 glycosidic linkage ในแป้งทั่วไปพบพันธะชนิดนี้ได้ถึงเกือบ 100%

- อะไมโลเพกทิน เป็นพอลิเมอร์ที่มีการแตกแขนง ส่วนที่เป็นแขนงต่อกันด้วยพันธะ α1, 6 glycosidic linkage แต่ส่วนกลูโคสหน่วยอื่นๆ ต่อด้วยพันธะ α 1, 4 glycosidic linkage

ปริมาณอะไมโลสในข้าวเหนียวขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวเช่น ข้าวเหนียวดำมีปริมาณอะไมโลสร้อยละ 5.7 ข้าวเหนียวสันป่าตองมีร้อยละ 2.8 เป็นต้น ซึ่งปริมาณอะไมโลสที่มากน้อยต่างกันจะ มีผลต่อคุณสมบัติของข้าวเมื่อนึ่งสุกแล้วกล่าวคือ ข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสสูงจะมีความเหนียวและมีความชื้นน้อยกว่าข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสต่ำ นอกจากนี้ยังมีผลต่อการแทงเส้นใยของเชื้อราเข้าสู่ภายในเมล็ดข้าวอีกด้วย (สุภมาศ ไข่คำ, 2544)

การทำสาโทนิยมใช้ข้าวเหนียวขาวหรือข้าวเหนียวดำเป็นวัตถุดิบมากกว่าข้าวเจ้า เนื่องจากข้าวเหนียวมีองค์ประกอบเป็นไขมันอยู่น้อยกว่าข้าวเจ้าซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้เมื่อนำข้าวเหนียวมาผลิตสาโททำให้ได้สาโทที่มีกลิ่นและรสชาติที่ดีกว่าการใช้ข้าวเจ้าเป็นวัตถุดิบ เนื่องจากองค์ประกอบที่เป็นไขมันจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ในระหว่างการหมักทำให้สาโทที่ได้มีกลิ่นเหม็นหืน นอกจากนี้จุลินทรีย์ในลูกแป้งสุราสามารถย่อยแป้งข้าวเหนียวได้ดีกว่าแป้งข้าวเจ้า (มนตรี เชาวน์สังเกต, 2521) ส่วนการขัดสีข้าวก็อาจมีผลต่อคุณภาพและการหมักสาโท หากใช้ข้าวที่ยังมีรำข้าวเหลืออยู่บ้างอาจช่วยให้มีการหมักดีขึ้น เนื่องจากมีสารอาหารให้จุลินทรีย์มากกว่าข้าวขัดขาว

กุณฑลี ไกรธรรมจิตกุล และ นุชรี อ่อนพร้อม (2547) ศึกษากลิ่นและรสที่ดีของสาโทที่ผลิตจากข้าวเหนียวดำและข้าวหอมนิลเปรียบเทียบกับที่ผลิตจากข้าวเหนียวขาว ซึ่งเป็นข้าวเหนียวที่ใช้กันทั่วไปสำหรับการผลิตสาโท จากการวิเคราะห์น้ำหมักสาโทด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมตรี พบว่ารูปแบบของสารให้กลิ่นรสในสาโททั้งสามชุดการทดลองให้ผลแตกต่างกัน โดยพบสารระเหยบางชนิดซึ่งส่วนใหญ่ให้กลิ่นที่ดี พบในสาโทที่ผลิตจากข้าวเหนียวดำและข้าวหอมนิลแต่ไม่พบในสาโทที่ผลิตจากข้าวเหนียวขาว สารระเหยเหล่านี้ได้แก่ เอทิลโพรพิโอเนต, เอทิลบิวทิเรต และ โทลูอีน ซึ่งให้กลิ่นคล้ายผลไม้ และการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่ากลิ่นรสของสาโทที่หมักจากการใช้ข้าวเหนียวดำเป็นวัตถุดิบ เป็นที่ยอมรับจากผู้ทดสอบมากกว่าสาโทที่ผลิตจากข้าวเหนียวขาว คณะผู้วิจัยจึงรายงานว่ากลิ่นรสที่ดีนี้นอกจากจะเกิดจากสายพันธุ์ข้าวที่ใช้แล้วน่าจะเกิดจากกระบวนการที่จุลินทรีย์ในลูกแป้งสุราเปลี่ยนแป้งที่เป็นองค์ประกอบในข้าวแต่ละสายพันธุ์ให้ได้สารให้กลิ่นที่แตกต่างกัน

พรพิมล คงสุวรรณ (2548) ศึกษาผลของพันธุ์และระดับการขัดสีข้าวต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีระหว่างการหมักไวน์ข้าว โดยใช้พันธุ์ข้าว 3 สายพันธุ์ในการผลิตไวน์ข้าว ได้แก่ ข้าวพันธุ์ลอย กข6 และ ขาวดอกมะลิ 105 ที่มีระดับการขัดสี 3 ระดับ ได้แก่ ระดับการขัดสีที่ 0 หรือไม่ผ่านการขัดสี (อัตราการขัดสี 100%) ระดับการขัดสีที่ 1 (อัตราการขัดสีระหว่าง 86 -

84%) และ ระดับการขัดสีที่ 2 (อัตราการขัดสีระหว่าง 82 - 80%) และจุลินทรีย์ที่ใช้ได้แก่ *Amylomyces rouxii* TISTR 3128 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049 จากนั้นวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของไวน์ข้าวในระหว่างการหมัก ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (total soluble solid) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ความเป็นกรด - เบส (pH) ปริมาณกรด (Total acidity) ปริมาณแอลกอฮอล์ สารประกอบเอสเทอร์ และฟูเซลออยล์ และประเมินคุณภาพของไวน์ข้าวโดยทดสอบความชอบทางด้านกลีนและการยอมรับ ผลการทดลองพบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าของของแข็งที่การละลายได้จะลดลงตามระยะเวลาในการหมัก และปริมาณแอลกอฮอล์สูงขึ้นตามระยะเวลาในการหมัก ส่วนปริมาณเอสเทอร์และฟูเซลออยล์ พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับการขัดสีข้าว ส่วนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลีนและการยอมรับของผู้บริโภคพบว่า ไวน์ข้าวที่หมักจากข้าวพันธุ์ กข6 ที่ระดับการขัดสีที่ 1 และ 2 ได้รับคะแนนความชอบสูงที่สุดทั้งในด้านกลีนและการยอมรับ

2.1.2 น้ำ

น้ำเป็นวัตถุดิบที่สำคัญอย่างมากในการผลิตสาโท เนื่องจากเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในสาโทไม่ต่ำกว่า 80% คุณภาพของน้ำมีผลต่อคุณภาพของสาโทเป็นอย่างมาก การผลิตจะต้องคำนึงถึงคุณภาพของน้ำเป็นพิเศษ น้ำที่เหมาะสมควรเป็นน้ำที่มีคุณภาพใกล้เคียงกับมาตรฐานน้ำดื่ม คือ ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิน และไม่มีรสชาติ สะอาด ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค โดยเฉพาะอย่างยิง ควรเป็นน้ำอ่อน ไม่มีสนิมเหล็ก ไม่มีคลอรีน เพราะคลอรีนจะไประงับการเจริญของยีสต์ทำให้ปฏิกิริยาการหมักเกิดขึ้นช้า และจะทำให้สาโทมีกลิ่นที่ผิดปกติไป (กุณฑลี ไกรธรรมจิตกุล, 2547)

2.1.3 ลูกแป้งสุรา

ลูกแป้ง (มผช.๓/๒๕๔๖) ตามพระราชบัญญัติ พ.ศ.2493 มาตรา 4 จัดเป็นกล้าเชื้อสุราอย่างหนึ่งตามนิยาม ดังนี้ “ลูกแป้ง” หมายถึง เชื้อสุรา แป้งเชื้อสุรา แป้งข้าวหมัก หรือเชื้อใดๆ เมื่อหมักกับวัตถุหรือของเหลวอื่นๆ แล้วสามารถทำให้เกิดแอลกอฮอล์ที่ใช้ทำสุราได้ ลูกแป้งอาจผสมสมุนไพรหรือเครื่องเทศด้วยหรือไม่ก็ได้ ลูกแป้งมีหลายชนิดผลิตขึ้นตามวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้ เช่น ลูกแป้งน้ำส้มสายชู ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งสุรา เป็นต้น (มนตรี เชาวสังเกต, 2521)

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

ภาพที่ 2.1 ลูกแป้งทีมีเส้นใยของราปกคลุมอยู่ด้านบน

องค์ประกอบสำคัญของลูกแป้งสุรา ก็คือปลายข้าว ซึงใช้ได้ทั้งข้าวเหนียวและข้าวเจ้า นำมาผสมกับเครืองเทศหรือสมุนไพรต่างๆ คุณภาพของลูกแป้งสุราขึ้นอยู่กับคุณภาพของข้าวและเครืองเทศ ในเครืองเทศสมุนไพรจะมีสารส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดจำเป็น เช่น เป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน วิตะมิน เกลือแร่ ทีช่วยส่งเสริมการการเจริญเติบโตและกระบวนการหมักของราและยีสต์ เช่น รากหวาย มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังมีสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดไม่จำเป็นอีกด้วย เช่น essential oil และสารระเหย อาทิ กานพลู มีสารยับยั้งแบคทีเรียแลคติคและราหลายชนิดทีไม่ต้องการ (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2527) ได้รายงานปริมาณการใช้และผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในเครืองเทศสมุนไพรไทยไว้หลายชนิด เช่น กานพลู ปริมาณทีสามารถยับยั้งแบคทีเรียแลคติคและราหลายชนิดให้ได้ผลนั้นจะต้องใช้ถึงร้อยละ 30 เป็นต้นซึงในความเป็นจริงผู้ผลิตลูกแป้งจะไม่ใช้เครืองเทศสมุนไพรอย่างใดอย่างหนึงเพียงชนิดเดียวในปริมาณมากๆ แต่จะใช้หลายๆ ชนิดผสมกันเพือเสริมฤทธิ์ซึงกันและกัน (Synergistic effect) ดังนั้นการเก็บลูกแป้งไว้นานๆ อาจทำให้สารเหล่านี้สูญเสียคุณสมบัติไป ในการผลิตลูกแป้งเมือผสมข้าวกับเครืองเทศแล้วปั้นเป็นก้อน ผู้ผลิตมักนิยมต่อหัวเชื้อโดยโรยด้วยผงลูกแป้งเก่าแล้วนำไปบ่มในบรรยากาศทีควบคุมระดับความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิ เป็นเวลา 2 วัน จะสังเกตุเห็นการเจริญของเส้นใยราสีขาวปกคลุมทั่วลูกแป้ง (ดังภาพที 2.1) จากนั้นลดระดับความชื้นสัมพัทธ์โดยผู้ผลิตจะเปิดผ้าทีคลุมออกและตากลมต่ออีก 1 - 2 วัน จากนั้นนำออกตากแดด 1 - 2 วัน จนลูกแป้งแห้งและมีน้ำหนักเบา วัดค่าความชื้นสุดท้ายได้น้อยกว่าร้อยละ 20 หรือมีค่า a_w ไม่เกิน 0.85 (ยุพกนิษฐ์ พ่วงวีระกุล, 2545)

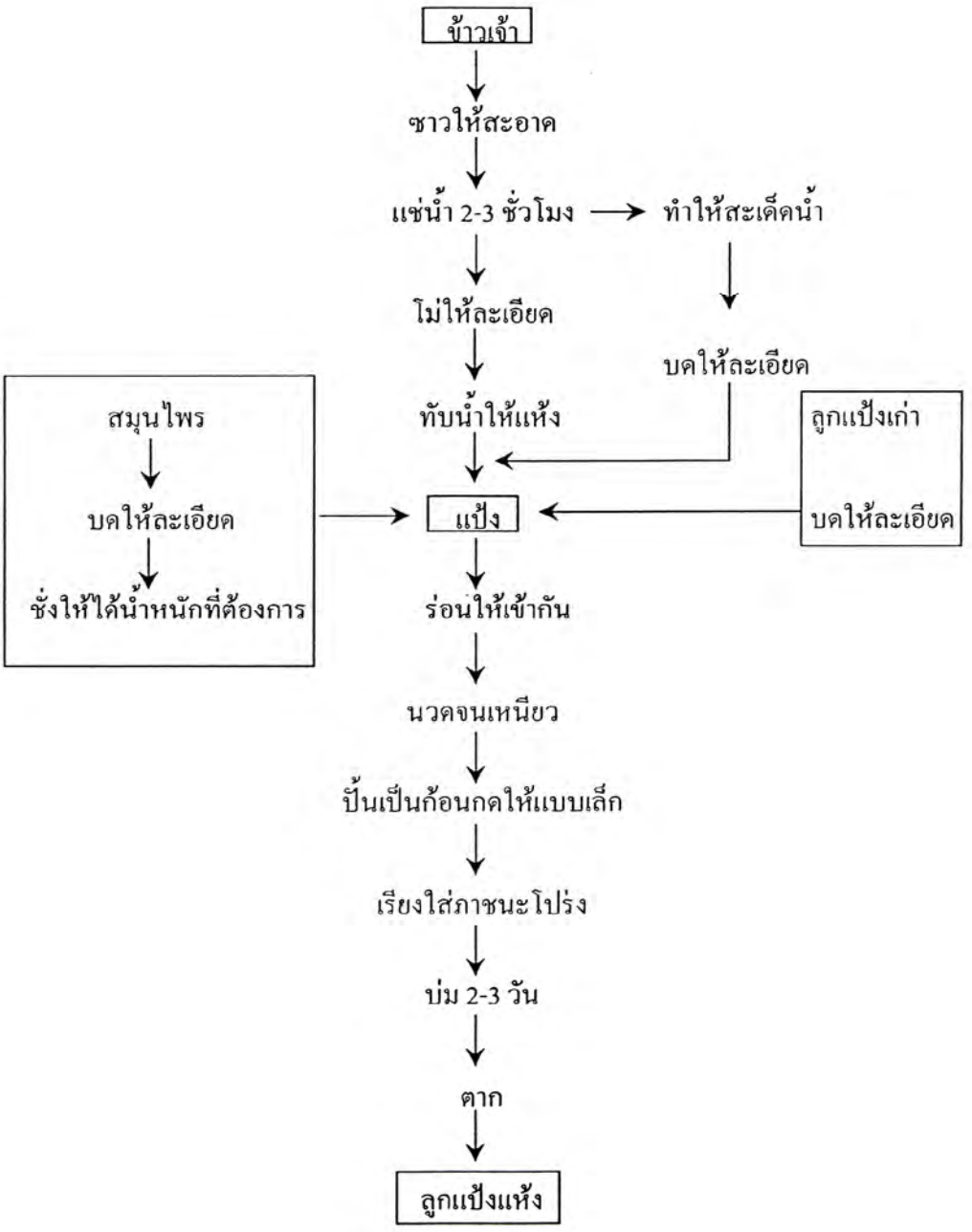
การผลิตลูกแป้งสุรามักทำกันเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือน โดยมีกรรมวิธีทีคล้ายคลึงกันและคล้ายคลึงกับการผลิตลูกแป้งสุราของชนชาติอืน ต่างกันแต่เพียงองค์ประกอบของวัตถุดิบ ขนาด รูปร่าง ตลอดจนชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์เท่านั้น (มนตรี เชาวสังเกต, 2521) ซึงในแต่ละท้องถินจะมีชือเรียกทีแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที 2.1

ตารางที่ 2.1 หัวเชื้อชนิดต่างๆ และชื่อไวน์ข้าวของแต่ละประเทศ

ประเทศ	ชื่อหัวเชื้อ	ส่วนผสมหลัก	รูปร่าง	เชื้อ	ชื่อไวน์ข้าว
จีน	*Chu*	Wheat, barley, millet, rice (whole grain, grits or flour)	ก้อน หรือ ก้อนเค้ก	*Rhizopus* *Amylomyces*	Shao-Shin - Chu
เกาหลี	*Nuruk*	Wheat, rice, barley (whole grain, grits or flour)	ก้อนเค้กขนาดใหญ่	*Aspergillus* *Rhizopus* *Yeasts*	Makkari
	Meju	Soybean (whole seed)	ก้อนขนาดใหญ่	*Aspergillus* *Bacillus*	
ญี่ปุ่น	*Koji*	Wheat, rice (whole grain, grits or flour)	ก้อนเล็ก - ผง	*Aspergillus*	Sake, Amazake
มาเลเซีย	*Ragi*	Rice (flour)	ก้อนเค้กขนาดเล็ก	*Amylonyces* *Endomycopsis*	Tapay
ฟิลิปปินส์	*Bubod*	Rice, glutinous rice (flour)	ก้อนเค้กขนาดเล็ก	*Mucor* *Rhizopus* *Saccharomyces*	Tapuy
ไทย	*Loogpang*	Rice bran	ก้อนเล็ก - ผง	*Amylonyces* *Aspergillus*	กระแช่, น้ำขาว, สาโท, อุ
อินเดีย	*Marchaa*	Rice	ก้อนเค้กชนิดแบน	*Hansenula anomala* *Mucor fragilis* *Rhizopus arrhizus*	Shonti, Murcha

ที่มา : Aidoo, K. E. และคณะ, 2006

ขั้นตอนการผลิตลูกแป้งแบบภูมิปัญญาท้องถิ่น แสดงดังภาพที่ 2.2 แสดงให้เห็นว่าทุกขั้นตอนในการผลิตมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่จำเป็นต่อการหมัก ตั้งแต่ตัวแป้ง สมุนไพร ลูกแป้งเก่า การนวด การปั้น การตาก การบ่ม ไม่มีการควบคุม ตลอดจนการเก็บซึ่งส่วนใหญ่จะห่อ



ภาพที่ 2.2 แผนภูมิการผลิตลูกแป้งแบบภูมิปัญญาท้องถิน

ที่มา: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547

ด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547) และปัจจุบันยังไม่มีสูตรและกระบวนการผลิตลูกแป้งที่แน่นอนซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อคุณภาพของสาโทที่ได้ไม่คงที่ เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการผลิตสาเกซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประจำชาติของญี่ปุ่น ในกระบวนการผลิตสาเกนั้นใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วในการหมัก โดยขั้นแรกสาเกมีการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยใช้ *Aspergillus oryzae* และจากนั้นน้ำตาล จะถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์โดย *Saccharomyces sake* ซึ่งการใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วนี้มีข้อดีคือ ช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อการหมัก ทำให้ได้คุณภาพของสาเกที่ค่อนข้างคงที่ จากแนวคิดนี้ทำให้ได้มีนักวิจัยหลายคนได้ศึกษาเกี่ยวกับการปรับปรุงการผลิตไวน์ข้าวโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสม ดังนี้

วรรัตน์ โชติวรรณพร (2539) ศึกษาการผลิตไวน์ข้าวเหนียวดำโดยการหมักโดยเชื้อบริสุทธิ์ โดยรวบรวมลูกแป้งจากทั่วประเทศและคัดแยกราและยีสต์ พบว่ารา LM 18 ซึ่งเป็นลูกแป้งสุราจากจังหวัดแพร่ ย่อยแป้งได้ดีที่สุด และยีสต์ LY 17 หมักน้ำตาลได้ดีและทนต่อแอลกอฮอล์สูง ข้อมูลเบื้องต้นนี้สามารถนำไปสู่การพัฒนาการผลิตสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ต่อไป

อำภา หลวงคล้ายโพธิ์ (2552) ศึกษารูปแบบของปริมาณกรดอินทรีย์ สารประกอบให้กลิ่นและการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากลูกแป้งสุรา NP101 เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่คัดแยกมาจากลูกแป้ง NP101 พบว่ารูปแบบสาโทที่ผลิตจากทั้ง 2 แหล่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกการวิเคราะห์ จากการวิจัยนี้สรุปได้ว่าสามารถนำเชื้อบริสุทธิ์ผสมมาเป็นหัวเชื้อในการผลิตสาโทแทนการใช้ลูกแป้งสุราเพื่อให้สาโทมีคุณภาพที่ดีในทุกๆ การผลิต

ซึ่งแนวทางการใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์นั้นจะทำให้สามารถควบคุมชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ได้ตลอดจนสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่จำเป็นต่อการหมัก ทำให้สามารถควบคุมคุณภาพของสาโทในระหว่างกระบวนหมักได้ นอกจากนี้ยังทำให้สาโทที่ได้มีความคงที่ทุกรุ่นการผลิตดีกว่าวิธีการใช้ลูกแป้งสุรา (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547 และ อำภา หลวงคล้ายโพธิ์, 2552)

2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในลูกแป้งสุรา

รา ซึ่งสามารถย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาล โดยใช้เอนไซม์กลุ่มอะไมเลส ประกอบด้วยอัลฟา อะไมเลส, เบต้าอะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส ย่อยโมเลกุลของแป้งให้เป็นน้ำตาลหลายโมเลกุล โมเลกุลคู่และโมเลกุลเดียว ชนิดและปริมาณของราที่พบมากน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของลูกแป้ง สายพันธุ์ที่พบมีหลายสายพันธุ์ได้แก่ รามีเส้นใยสีขาวฟู รามีเส้นใยสีเทาดำ รามีเส้นใย

สีเทาเหลือง รามีเส้นใยสีเหลืองเขียว และบางชนิดมีสี เช่น *Mucor hiemalis Mucor racemosus Rhizopus oligosporus* และ *Rhizopus* oryzae (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550)

ยีสต์ เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุดเพราะนอกจากจะมีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์แล้ว ยังมีบทบาทสำคัญในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ของสาโทอีกด้วย ยีสต์ที่พบในลูกแป้งสุรามีมากมายหลายชนิดเช่น กลุ่ม *Saccharomyces* ได้แก่ *S. cerevisiae* และ *S. bayanus* กลุ่ม non - *Saccharomyces* ได้แก่ *Saccharomycopsis fibuligera Torulaspora delbrueckii Issatchenkia orientalis Candida glabrata* และ *Pichia anomala* (นริสา ตรีเนตร, 2550 และ Limtong และคณะ, 2002) เป็นต้น

แบคทีเรีย มักพบในกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติก เช่น *Leuconostoc oenos*, *Pediococcos pentosaceus*, *P. parvulus*, *P. damnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. trichodes*, *L. hilgardii*, *L. fructivorans* แบคทีเรียที่ผลิตกรดอแอซีติกเช่น *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus* (นภา โล่ห์ทอง, 2535) นอกจากนี้อาจพบ *Bacillus* spp. ในลูกแป้งจากการปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ เช่น แป้ง และสมุนไพร แต่ถ้าส่วนผสมของสมุนไพรเหมาะสม สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์นี้ได้มาก (นภา โล่ทอง, 2535)

2.3 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก

2.3.1 รา

ในระหว่างการหมักสาโท ราเจริญได้ดีในช่วง 2 - 3 วันแรกของการหมัก ซึ่งเป็นภาวะการหมักที่ใช้อากาศ เนื่องจากการบรรจุข้าวในถังหมัก จะบรรจุเพียง 1 ใน 4 ของปริมาตร เพื่อให้ราได้รับออกซิเจนจากอากาศอย่างทั่วถึง จากนั้นเมื่อเกิดน้ำเชื่อมข้าว (น้ำต้อย) ขึ้น และยีสต์เริ่มการหมัก ทำให้มีปริมาณแอลกอฮอล์ และภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งเกิดจากการที่ยีสต์ปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาทำให้ราตายไป ดังภาพ 2.3 (อำภา หลวงคล้ายโพธิ์, 2552)

2.3.2 ยีสต์

แม้ว่าในช่วงแรกของการหมัก พบยีสต์ในลูกแป้งเป็นชนิด non - *Saccharomyces* เช่น *Sm. fibuligera P. anomala C. glabrata* (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) แต่ในระหว่างการหมักสาโท ยีสต์นี้จะเจริญเพียงช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้นแล้วจะตายไป และพบยีสต์ *S. cerevisiae* ทำหน้าที่ในการหมักแทน โดยยีสต์ *S. cerevisiae* มีความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ได้ดีกว่าและทนปริมาณแอลกอฮอล์ได้สูงกว่ายีสต์ชนิด non - *Saccharomyces*

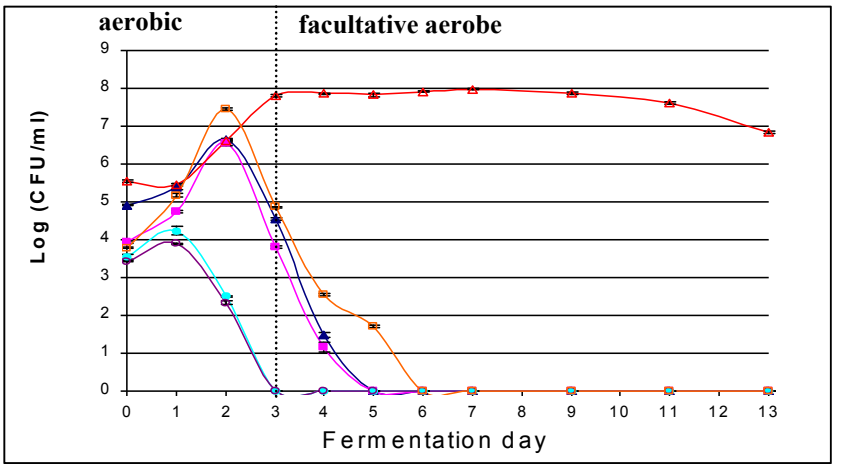
2.3.3 แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับสาโท

2.3.3.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก มีความสำคัญต่อการหมักสาโท เนื่องจากสาเหตุ 2 ประการ คือ แบคทีเรียเหล่านี้มีส่วนในการทำให้สาโทเสื่อมเสีย และทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะของผลิตภัณฑ์

2.3.3.2 แบคทีเรียกรดแอซีติก

แบคทีเรียกรดแอซีติก หรือที่เรียกว่า แบคทีเรียกรดน้ำส้มสายชู เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง สามารถออกซิไดส์เอทานอลให้เป็นกรดแอซีติก (กรดน้ำส้มสายชู) แบ่งเป็น 2 สายพันธุ์ คือ *Acetobacter* sp. และ *Gluconobacter* sp. ซึ่งทำให้เกิดการเสื่อมเสียของสาโท ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรสน้ำส้มสายชู นอกจากนั้นการเจริญของแบคทีเรียแอซีติกในระหว่างการหมักสาโทยังอาจมีผลต่อการเจริญของยีสต์ด้วย



ภาพที่ 2.3 การเจริญของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักสาโท (อำภา หลวงคล้ายโพธิ์, 2552)

อย่างไรก็ตาม ยังพบรา ยีสต์และแบคทีเรียปนเปื้อนอีกหลากหลายชนิดที่เป็นสาเหตุให้สาโทมีคุณภาพลดลง ปัญหาดังกล่าวทำให้เป็นข้อจำกัดในการผลิตสาโทในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ระยะเวลาในการเก็บลูกแป้งสุราก็ส่งผลถึงคุณภาพสาโทด้วย เนื่องจากลูกแป้งสุราที่เก็บเป็นระยะเวลานานมักพบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์หลักคือราและยีสต์ลดลง แต่อาจเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนเนื่องจากประสิทธิภาพในการยับยั้งจากน้ำมันหอมระเหย (volatile oil) และสารยับยั้งประเภทอื่น ได้แก่ แอลกอฮอล์ (alcohol) กรดอินทรีย์ (organic acid) ฟีนอล

(phenol) อัลคาลอยด์ (alkaloid) เอสเทอร์ (ester) เทอร์ปีน (terpene) จากส่วนประกอบที่เป็นสมุนไพรอาจสูญเสียขณะเก็บ (ยุพกนิษฐ์ พ่วงวีระกุล, 2545)

2.4 กระบวนการที่เกิดขึ้นในสาโท

2.4.1. กระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล มีกระบวนการดังนี้

1) Gelatinization เป็นขั้นตอนการทำให้แป้งสุก เม็ดแป้งในข้าวเมื่อสัมผัสความร้อนชื้นทำให้โครงสร้างของแป้งขยายตัวและเกิด Gelatinization ทำให้แป้งมีลักษณะนุ่มเหนียวเหมาะสมต่อการทำกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Tester และคณะ, 1990)

2) Liquefaction เป็นขั้นตอนเพื่อลดความหนืดของแป้งที่ gelatinize แล้ว โดยเอนไซม์จะย่อยโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม (random hydrolysis) เมื่อการไฮโดรไลซ์เกิดขึ้นจะทำให้พอลิเมอร์ของกลูโคส ถูกตัดเป็นสายสั้นๆ มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ทำให้มีความหนืดลดลง

3) Saccharification เป็นการไฮโดรไลซ์แป้งให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาล ดังนั้นหลังการย่อยแล้วจะได้ Monosaccharide หรือ Disaccharide หรือ น้ำตาลที่มีโมเลกุลสูงกว่าบ้างเล็กน้อย จะได้เป็นน้ำตาลกลูโคส มอลโทส หรือ มอลโทไทรโอส

2.4.2.กระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดยจุลินทรีย์

การหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาล แสดงได้เป็นสมการดังนี้

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

การหมักแอลกอฮอล์จากแป้งมีความจำเป็นที่ต้องใช้เชื้อราในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ปัจจุบันการผลิตแอลกอฮอล์นิยมใช้เอนไซม์ α - amylase และ glucoamylase จากรา การใช้ราย่อยแป้งเพื่อผลิตแอลกอฮอล์หรือที่เรียกว่า Amylo process นั้น ใช้เชื้อราในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล และเชื้อราเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้เล็กน้อย ดังนั้นการหมักแอลกอฮอล์จึงจำเป็นต้องเติมยีสต์ร่วมด้วย เพื่อจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์

เอนไซม์ที่เกียวข้องในการหมักสาโท

เอนไซม์ที่มีความสำคัญมากในการหมักสาโท คือ เอนไซม์อะไมเลส ซึ่งเป็น Extracellular enzyme มีความสามารถในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจากการสร้างของจุลินทรีย์หลายชนิด

เอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยแป้ง สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดตามตำแหน่งการย่อยแป้งดังนี้

1. Endoamylase เป็นเอนไซม์ที่ย่อย (hydrolyze) แป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง α - D - (1, 4) glycosidic linkage ถ้าการย่อยไม่สมบูรณ์จะมีกลูโคส มอลโตส และเด็กสตรินเกิดขึ้น ถ้าการย่อย

สมบูรณ์จะได้น้ำตาล มอลโตส และกลูโคสเท่านั้น เอนไซม์ประเภทนี้ ได้แก่ α - amylase หรือ amylo (1, 4) dextrinase พบได้ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์

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

- α - amylase ย่อยแป้งที่ตำแหน่ง β - D - (1, 4) glycosidic linkage เข้าไปทีละ 2 หน่วยของกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยพันธะที่ต่อแบบ β - D - (1, 6) glycosidic linkageได้ ผลที่ได้จากการย่อย คือ น้ำตาลมอลโทส และเด็กสตรินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เอนไซม์ชนิดนี้ พบได้ในพืชชั้นสูง เช่น ธัญพืช มันเทศ และแบคทีเรียบางชนิด
- Glucoamylase เป็นเอนไซม์ที่พบครั้งแรกในจุลินทรีย์ และพบว่ามีในเนื้อเยื่อของสัตว์ด้วย โดยสามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์จากปลายทางด้าน non - reducing ที่ตำแหน่ง β - D - (1, 4) glycosidic linkage เข้าไปทีละ 1 หน่วยกลูโคส แล้วยังสามารถย่อยที่ตำแหน่ง β - D - (1, 6) glycosidic linkage และ β - D - (1, 3) glycosidic linkage ได้ดีพอๆกับ β - D - (1, 4) glycosidic linkage อีกด้วย ดังนั้นผลการย่อยที่สมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคส (D - glucose) เพียงอย่างเดียว

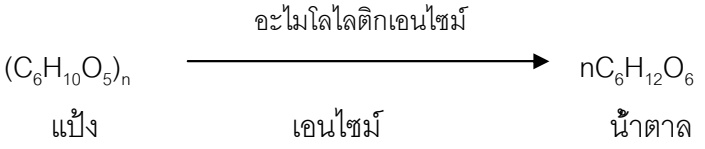
2.5 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีที่สำคัญในการผลิตสาโท

ในกระบวนการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์นั้น การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีถือได้ว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อคุณภาพและลักษณะเฉพาะของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แต่ละชนิด วัตถุดิบที่หลากหลายผสมผสานกับการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรสชาติ กลิ่น สี และเนื้อสัมผัส ที่เป็นเอกลักษณ์ที่ลงตัวของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์นั้นๆ ปฏิกิริยาในกระบวนการหมักสาโทจัดเป็น Multiparallel fermentation หมายถึงกระบวนการหมักที่มีหลายปฏิกิริยาและจะเกิดขึ้นพร้อมๆกัน ซึ่งแบ่งเป็นสองขั้นตอนหลักตามภาวะของการหมักและ ประเภทของจุลินทรีย์ ดังนี้

2.5.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยรา

การเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการหมักสาโทที่ใช้แป้งเป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิต เชื้อราจะสร้างเส้นใยจำนวนมากแผ่กระจายปกคลุมบนผิวเมล็ดข้าวและแทรกตัวเข้าไปในช่องว่างระหว่างเมล็ดข้าว บางส่วนแทงทะลุเข้าไปในเมล็ดข้าวทำให้แป้งในเมล็ดข้าวเปลี่ยนเป็นน้ำตาล (Saccharification) ในภาวะที่มีอากาศ โดยราจะสร้างเอนไซม์

กลุ่มอะไมเลส ประกอบด้วยแอลฟาอะไมเลส (α - amylase) และกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) หรืออะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ถูกส่งออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายแป้ง ซึ่งสามารถย่อยพันธะ แอลฟา 1,4 และพันธะแอลฟา 1,6 - ไกลโคซิดิก (α - 1,4 – และ α 1, 6 -glycosidic) ของสายพอลิเมอร์ของแป้ง ทั้งที่มีโครงสร้างเป็นอะไมโลส หรืออะไมโลเพกทินได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ดังภาพที 2.4 นอกจากราจะเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลแล้วยังพบสารอาหารและวิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของยีสต์อีกด้วย นอกจากนี้รายังผลิตสารประกอบที่ให้กลิ่นและรสชาติในสาโท และยังมีรายงานว่ายีสต์บางจีนัสที่มีเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่สามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลเฟอร์เมนต์ โดยยีสต์จีนัสสำคัญ คือ *Saccharomycopsis* sp. เช่น *Sm. fibuligera* (Tsuyoshi และคณะ, 2005)



ภาพที 2.4 การเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล

ตัวอย่างราที่มีบทบาทในการสร้างเอนไซม์ปริมาณมากได้แก่ ราใน Class Zygomycetes Order Mucorales Family Mucoraceae จีนัสที่สำคัญคือ *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. และ *Amylomyces* sp. และราใน Class Eurotiomycetes Order Eurotiales Family Trichocomaceae ได้แก่ *Aspergillus sp.* (ยุพกนิษฐ์ พ่วงวีระกุล, 2545)

2.5.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยยีสต์

ในขั้นตอนหลังจากการเติมน้ำในกระบวนการหมักสาโท ยีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งสองภาวะ (Facultative Anaerobe) ก็จะเปลี่ยนรูปแบบการสร้างพลังงานจากการหายใจที่ใช้ออกซิเจน (Aerobic Respiration) มาเป็นกระบวนการหมัก (Alcoholic Fermentation) ซึ่งขั้นตอนที่สองนี้เป็นกระบวนการ เปลี่ยนน้ำตาลรีดิวส์ให้เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ ยีสต์ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ ทนต่อแอลกอฮอล์ได้ดีและตกตะกอนแยกออกจากไวน์ได้ง่าย ซึ่งยีสต์หลักที่มีบทบาทเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ได้แก่ *Saccharomyces* sp. เช่น *S. cerevisiae, S. bayanus* ซึ่งกิจกรรมหลักของยีสต์ในกลุ่มนี้จะเปลี่ยนน้ำตาล 1 โมเลกุลให้เป็น เอทานอล 2 โมเลกุล คาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล และพลังงาน ดังภาพที 2.5 ซึ่งปฏิกิริยาที่แสดงนี้เป็นปฏิกิริยาพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลงในการผลิต

เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทุกชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีสต์ยังมีบทบาทสำคัญในการผลิตสารให้กลิ่นที่สำคัญอีกด้วย

$$\underset{\text{น้ำตาล}}{C_6H_{12}O_6} \xrightarrow{\text{ยีสต์}} \underset{\text{เอทานอล}}{2C_2H_5OH} + \underset{\text{คาร์บอนไดออกไซด์}}{2CO_2} + \underset{\text{พลังงาน}}{\text{Energy}}$$

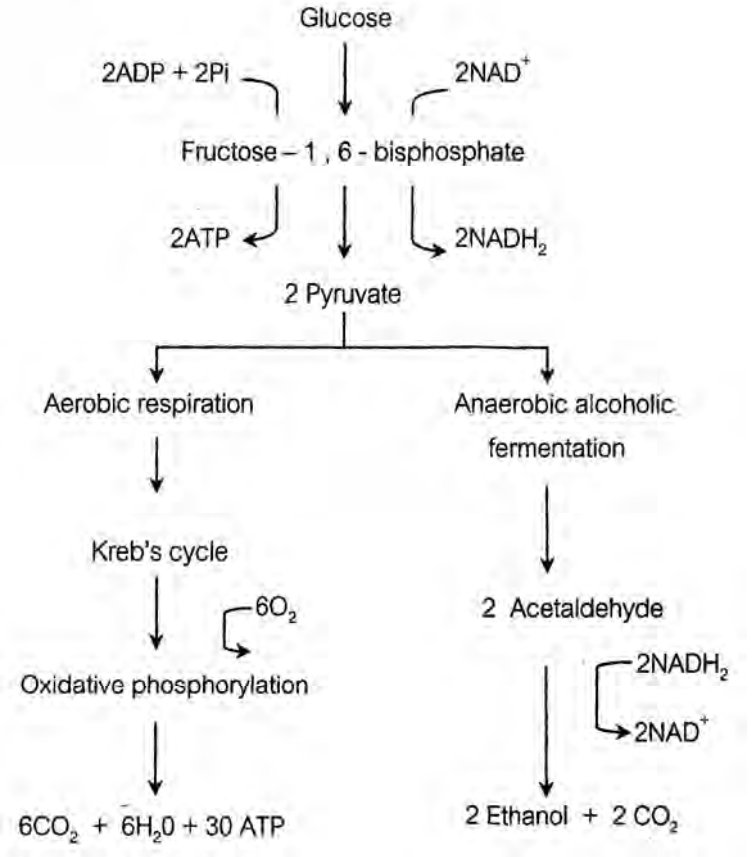
ภาพที่ 2.5 การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยยีสต์

Rajas และคณะ (2003) ศึกษาผลของการใช้ยีสต์ในกลุ่ม Non - *Saccharomyces* 2 ชนิด คือ *Hanseniaspora guilliermondii* 11104 และ *P. anomala* 10590 ผลิตไวน์ร่วมกับ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ทางการค้า ที่มีต่อปริมาณของแอซีเทตเอสเทอร์ ในไวน์ พบว่า ไวน์ที่ผลิตจากหัวเชื้อผสม (mixed culture) มีปริมาณแอซีเทตเอสเทอร์ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นจำเพาะสูงกว่าไวน์ที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ของ *S. cerevisiae*

Romano และคณะ (2003) ศึกษาบทบาทของยีสต์แต่ละชนิดที่มีต่อกลิ่นของไวน์ โดยใช้ยีสต์ 2 ชนิดคือ *S. cerevisiae* (52 สายพันธุ์) และ *Hanseniaspora uvarum* (59 สายพันธุ์) พบว่ายีสต์แต่ละชนิดผลิตสารให้กลิ่นต่างชนิดและปริมาณแตกต่างกันตามสายพันธุ์

ชีวเคมีของการเกิดเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ส่วนใหญ่จะเป็นการเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของยีสต์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนท้ังในภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงสรุปดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 เมแทบอลิซึมของยีสต์ภายใต้ภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ

ที่มา : Roehr, 2001

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

ขั้นตอนต่อมาไพรูเวตจะถูกเปลี่ยนต่อไปให้ผลผลิตสุดท้ายต่างกันตามชนิดของยีสต์และภาวะแวดล้อมในระหว่างกระบวนการหมัก โดยแบ่งการเปลี่ยนแปลงเป็น 2 ประเภท คือ

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

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

องค์ประกอบทางเคมีในสาโท

มนตรี เชาวน์สังเกต (2521) วิเคราะห์สาโทในขณะที่ยังมีปฏิกิริยาของการหมัก จากบางแหล่งในประเทศ 11 ตัวอย่าง พบว่ามีลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีดังนี้

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

และในการวิเคราะห์องค์ประกอบของสาโทที่หมักโดยลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ 5 ตัวอย่าง และปล่อยให้เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์ ปรากฏว่าได้สาโทที่มีลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีดังนี้

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

2.6 สารประกอบที่ให้กลิ่นรสในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

สารประกอบที่ให้กลิ่นรสในสาโทนั้นมีความคล้ายคลึงกับที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดอื่นๆ ซึ่งสารประกอบที่ให้กลิ่นรสนั้นเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by product) ที่เกิดขึ้นโดยยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ในการสร้างสารประกอบให้กลิ่นของยีสต์มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง เช่น การเปลี่ยนแปลงภาวะในการหมัก ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด - เบส และ การกวน เป็นต้น ดังนั้นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แต่ละประเภทมีชนิดและปริมาณที่แตกต่างกันไปแปรผันตามวัตถุดิบ สายพันธุ์จุลินทรีย์ และกระบวนการที่ใช้ในการผลิต ตารางที่ 2.2 แสดงสารประกอบที่ให้กลิ่นรสในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทต่างๆ ซึ่งจะพบว่ามีสารประกอบที่ให้กลิ่นรสในปริมาณที่แตกต่างกัน จากปัจจัยที่กล่าวมาแล้ว

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

ฟูเซลแอลกอฮอล์ (fusel alcohol)

ฟูเซลแอลกอฮอล์หรือเรียกอีกอย่างว่าไฮเออร์แอลกอฮอล์ (higher alcohol) เป็นกลุ่มแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอนอะตอมมากกว่า 2 อะตอม ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญมากเนื่องจากช่วยให้กลิ่นรสของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีความซับซ้อนขึ้น ส่วนใหญ่ที่พบในไวน์องุ่นเกิดจากผลิตภัณฑ์พลอยได้ของกระบวนการหมักของยีสต์ ซึ่งการเกิดฟูเซลแอลกอฮอล์ถูกสร้างไปควบคู่กับการสร้างเอทานอล ฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีจำนวนมากกว่า 40 ชนิด แต่มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่มีความสำคัญต่อกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ ฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบมากในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์คือ พวกแอลกอฮอล์สายตรง ได้แก่ โพรพานอล ไอโซบิวทานอล แอคทิฟเอมิลแอลกอฮอล์ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ แอโรมาติกแอลกอฮอล์ เฮกซานอล และ 2 - ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ เป็นต้น (Querol และคณะ, 2006) ความเข้มข้นของฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีความสำคัญกับกลิ่นรสของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยพบว่าที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 300 มก./ล. ช่วยทำให้เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดนั้นมีกลิ่นรสที่ซับซ้อน แต่ถ้ามากกว่า 300 มก./ล. ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี ฉุน และกลบกลิ่นรสที่ดีของสารตัวอื่น (พรพิมล ควรรณสุ, 2548) นอกจากนี้ฟูเซลแอลกอฮอล์ยังมีบทบาททางอ้อมในการพัฒนากลิ่นหอมของไวน์ โดยเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอินทรีย์ ทำให้เกิดเอสเทอร์ โดยในระหว่างกระบวนการหมักมีการสร้างเอสเทอร์อย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์จากยีสต์และมีการสร้างเอสเทอร์ต่อเนื่องไปในระหว่างการบ่มด้วย (Jackson, 2000)

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบและปริมาณของสารประกอบเอสเทอร์และฟูเซลออยล์ที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ

สารประกอบที่ให้กลิ่นรส	ชนิดของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์				
	สาโท[ก]	อุ[ข]	สาเก[ค]	ไวน์[ง]	เบียร์[จ]
สารประกอบเอสเทอร์ (มก./ล.)					
เอทิลแอซีเทต	15.00 - 567.43	19.86	20 - 30	33.5	8.2 - 47.6
ไอโซบิวทิลแอซีเทต	0.17	0.60	0.2 - 0.5	0.02	0.03 - 0.25
เอทิลบิวทิเรท	32.20 - 82.72	-	0.5	0.13	0.09
ไอโซเอมิลแอซีเทต	-	0.80	2	2.2	0.23
เอทิลคาโพรเอท	-	-	2	0.71	-
เอทิลคาพริเลท	-	-	5	1.0	0.08 - 0.1
เอทิลคาเพรท	-	-	10	0.24	-
เอทิลพีลาโกเนท	-	-	3	-	-
เอทิลลอเรท	0.40 - 1.45	-	2	-	-
เอทิลแลคเทต	-	2.45	2	4.0	0.1
ฟีนิลเอทิลแอซีเทต	0.31 – 3.47	-	8	3.5	0.1 - 0.17
แอลดีไฮด์ (มก. /ล.)					
อะซิทัลดีไฮด์	12.42 - 158.81	-	-	56.0	2.5 - 24.4
ฟูเซลออยล์ (มก. /ล.)					
โพรพานอล	-	3.35	120	18.5	7.7 - 16.2
ไอโซบิวทานอล	60 - 77.76	11.61	64	13.0	200
แอคทีฟเอมิลแอลกอฮอล์	-	-	-	29.0	7 - 23
ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	79.06 - 155.90	17.40	170	114	27 - 122
2 – ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์	23.08 - 31.14	-	75	-	5 - 7

ที่มา: [ก] Sirisantimethakom และคณะ (2008)

[ข] Chuenchomrat และคณะ (2008)

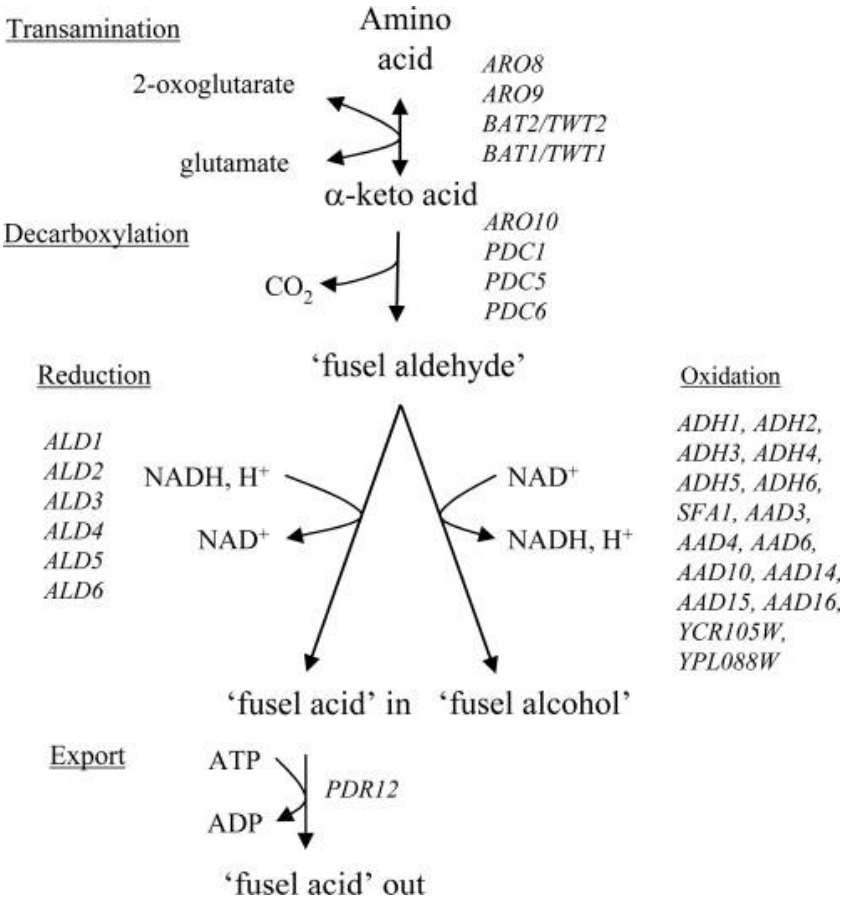
[ค] Kodama และคณะ (1977)

[ง] Delfini และ Formica, (2001)

[จ] Berry และคณะ (1987)

การสังเคราะห์ฟูเซลแอลกอฮอล์ระหว่างกระบวนการหมักเกิดโดยยีสต์จะเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ โดยปฏิกิริยาเอริค (Erlich reaction) เริ่มจากโมเลกุลของกรดอะมิโนถูกดึงเอาแอมโมเนียออกเรียกปฏิกิริยานี้ว่า ดีอะมิเนชัน (deamination) ได้เป็นกรดแอลฟาคีโตนิก (α - ketonic acid) จากนั้นเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decaboxylation) เอาคาร์บอนไดออกไซด์ออกได้เป็นแอลดีไฮด์ แล้วจึงเกิดปฏิกิริยารีดักชันของแอลดีไฮด์ได้เป็นแอลกอฮอล์ โดยปฏิกิริยาสุดท้ายมีการใช้ $NADH_2$ แล้วเปลี่ยนไปเป็น NAD^+ ดังแสดงในภาพที่ 2.7

จากกระบวนการดังกล่าวข้างต้นทำให้ได้ชนิดและปริมาณของฟูเซลแอลกอฮอล์แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน ดังสรุปได้ในตารางที่ 2.3



ภาพที่ 2.7 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดอะมิโนไปเป็นฟูเซลแอลกอฮอล์

ที่มา : Hazelwood และคณะ, 2008

ตารางที่ 2.3 กรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นและฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในไวน์องุ่น

กรดอะมิโน	ฟูเซลแอลกอฮอล์
ลิวซีน	ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์
วาลีน	ไอโซบิวทานอล
ไอโซลิวซีน	แอคทิฟเอมิลแอลกอฮอล์
2 - ฟีนิลอลานีน	2 - ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์
ทรีโอนีน	โพรพานอล

ที่มา : Kodama และคณะ, 2001

กรด (Acids)

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

กรดอินทรีย์ในไวน์มีความสำคัญเท่าๆ กับแอลกอฮอล์ กรดไม่เพียงแต่ทำหน้าทีให้รสชาติทีสดชืน (refreshing taste) แต่กรดยังช่วยเพิมรสชาติในปากอีกด้วย บทบาทหลักของกรดคือช่วยคง pH ให้อยู่ในระดับตำ ซึงมีความสำคัญต่อความคงตัวของสีในไวน์แดง ในไวน์ทีมีค่า pH สูงๆ นัน ทำให้ง่ายต่อการเกิดออกซิเดชัน และทำให้สูญเสียกลินหอมและสีเปลียนได้ นอกจากนีทีค่า pH ตำยังมีประโยชน์ในการป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อืนด้วย เนืองจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ใน pH ตำ (Jackson, 2000)

กรดแอซีติก (Acetic acid)

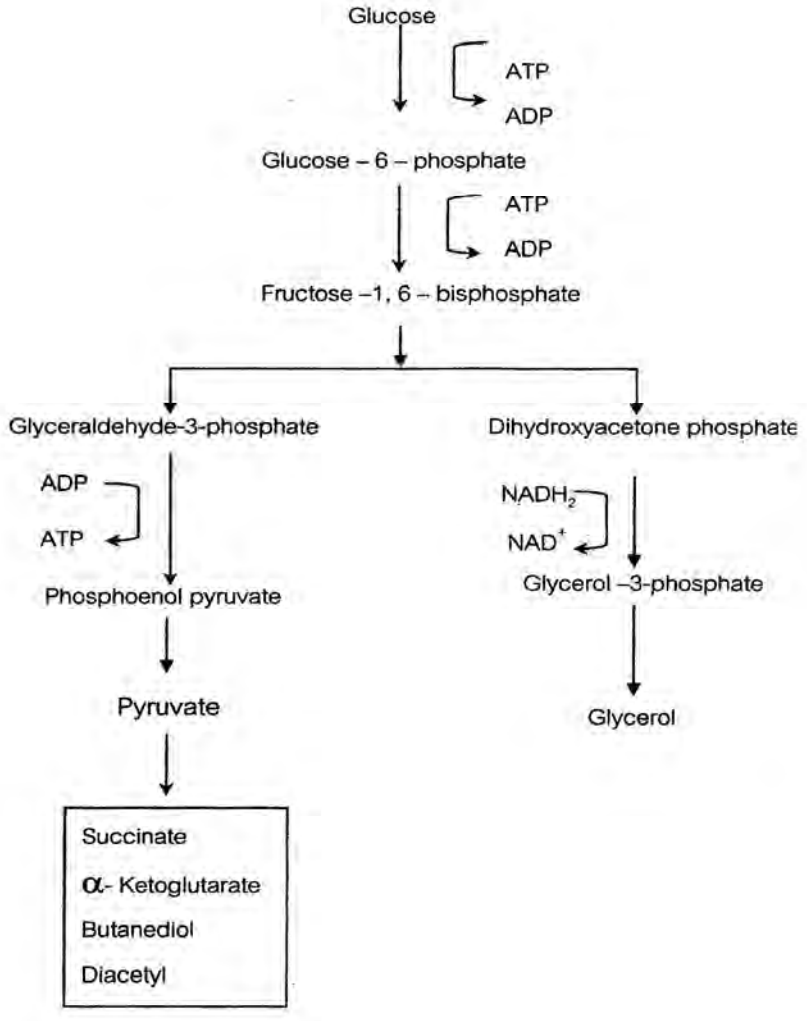
ในระหว่างกระบวนการหมักไวน์ ยีสต์ช่วยสร้างกรดแอซีติกได้ในปริมาณน้อย ระดับปกติทีพบในไวน์คือ น้อยกว่า 300 มก./ล. กรดแอซีติกสามารถช่วยเพิมความซับซ้อนให้กับกลินรสทีดีในไวน์ได้ มีความสำคัญในการสร้างสารในกลุ่มแอซีเทตเอสเทอร์ซึงให้กลินผลไม้ในไวน์ แต่ถ้ามีมากเกิน 300 มก./ล. จะให้รสเปรียวและกลินทีไม่ดีกับไวน์ ซึงถ้ามีปริมาณกรดแอซีติกมากแสดงว่าอาจเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียกรดแอซีติกหรือกรดแลคติกได้ (Jackson, 2000) กรดแอซีติกมีประโยชน์เมือมีอยู่ในผลิตภัณฑ์ในปริมาณน้อยๆ ถ้าปริมาณกรดคาร์บอกซิลิก เกินกว่าระดับ Threshold จะให้ผลในทางลบต่อกลินรสของไวน์ ในระหว่างกระบวนการหมักและบ่ม กรดมีผลต่อปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์ ซึงมีความสำคัญต่อกลินรสผลไม้ของไวน์ นอกจากนีอิทธิพลของความเป็นกรดยังมีผลในระหว่างการบ่ม ที pH ตำทำให้เกิดการย่อยสลายพวกไดแซ็กคาไรด์ เช่น ทรีฮาโลส และพอลิแซ็กคาไรด์อืนๆ ซึงเป็นการเพิมน้ำตาลในไวน์ในระหว่างการบ่มด้วย (Jackson, 2000)

เอสเทอร์ (Esters)

เอสเทอร์เป็นสารประกอบทีเกิดขึนในกระบวนการหมัก เกิดจากการรวมกันระหว่างกลุ่มคาร์บอกซิลิก ของกรดอินทรีย์และกลุ่มไฮดรอกซิลของแอลกอฮอล์หรือฟีนอล ตัวอย่างได้แก่ การเกิดเอทิลแอซีเทตซึงเกิดจากกรดแอซีติกและเอทานอล เป็นต้น เอสเทอร์เป็นกลุ่มของสารประกอบให้กลินทีมีความสำคัญในเครืองดืมแอลกอฮอล์โดยเฉพาะไวน์เพราะเป็นสารให้กลินทีดีเช่นกลินผลไม้ กลินดอกไม้ อาทิ เอทิลแอซีเทต ให้กลินผลไม้ เอทิลแคโพรเอตให้กลินแอปเปิ้ล ไอโซเอมิลแอซีเทตให้กลินกล้วยหอมและแอปเปิ้ล ไอโซบิวทิลแอซีเทตให้กลินผลไม้ และ 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทตให้กลินกุหลาบ น้ำผึง และ แอปเปิ้ล เป็นต้น ในไวน์สามารถพบเอสเทอร์ได้หลากหลายมีทังทีสามารถระบุได้ และมีทังทีมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถระบุได้ ซึงเอสเทอร์ทีมีปริมาณเท่ากับหรือมากกว่าระดับ threshold นันจะให้กลินผลไม้ ความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของระดับความเข้มข้นของสารนีมีอิทธิพลอย่างมากต่อคุณภาพของไวน์ทีได้ซึงแสดงให้เห็นว่าปริมาณของเอสเทอร์มีความสำคัญอย่างยิงต่อกลินรสของไวน์ (Saerens และคณะ, 2010)

เอสเทอร์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ อะลิฟาติกเอสเทอร์ และฟีโนลิกเอสเทอร์ แต่ในกลุ่มของฟีโนลิกเอสเทอร์ส่วนใหญ่สามารถตรวจพบได้ต่ำกว่าระดับ threshold เนื่องจากระเหยได้ยาก และมีปริมาณน้อย เอสเทอร์กลุ่มนี้จึงมีอิทธิพลต่อกลิ่นรสของไวน์น้อย ดังนั้นเอสเทอร์ในกลุ่มของอะลิฟาติก เอสเทอร์จึงเป็นเอสเทอร์หลักที่พบในไวน์ ซึ่งในกลุ่มนี้สามารถแยกย่อยได้อีกเป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่

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



ภาพที่ 2.8 วิถีการย่อยสลายกลูโคสเป็นกลีเซอรอล ซัคซิเนตและสารประกอบอื่นๆ โดยยีสต์ ในภาวะที่ไม่ใช้อากาศ

ที่มา : Zoecklein และคณะ, 1989

โดยใน 3 กลุ่มย่อยนี้ มีเฉพาะโมโนคาร์บอกซิลิกแอซิดเอสเทอร์ เท่านั้นที่ถูกเชื่อว่ามีความสำคัญทางด้านกลีนรส ซึ่งขึ้นอยู่กับ เอทานอลและกรดไขมันอิมตัว เช่น กรดเฮกซาโนอิก (แคโพรอิก) กรดออกทาโนอิก (แคพริริก) และ กรดเดคาโนอิก (แคพริก) และขึ้นกับกรดแอซีติก และ ฟูเซลล์แอลกอฮอล์ เช่น ไอโซเอมิล และ ไอโซบิวทิล แอลกอฮอล์ ซึ่งในกลุ่มนี้พบว่าให้กลีนรสในไวน์มาก เอสเทอร์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำเหล่านี้จะถูกเรียกว่า เอสเทอร์ผลไม้ (fruit ester) เนื่องจากส่วนใหญ่ให้กลีนผลไม้ เช่น ไอโซเอมิลแอซีเทต ให้กลีนกล้วย (banana like odor) และ เบนซิลแอซีเทต ให้กลีน แอปเปิ้ล (apple like odor) เป็นต้น เมื่อความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนเพิ่มขึ้นกลีนจะเปลี่ยนจากกลีนผลไม้ไปสู่กลีนสบู่ (soap like odor) และสุดท้ายเมื่อกรดไขมันมีคาร์บอน 16 ถึง 18 จะให้กลีนน้ำมันหมู (lard like odor) ส่วนในกลุ่มของไดหรือไตรคาร์บอกซิลิกแอซิดเอสเทอร์ นั้นปกติปริมาณที่จะมีเกิดขึ้นในไวน์จะประมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเฉพาะเอทิลแลคเทต ซึ่งเกิดจากกระบวนการหมักแบบมาโลแลคติก แต่สารในกลุ่มนี้มีกลีนอ่อนจึงไม่มีผลต่อกลีนรสของไวน์อย่างโดดเด่น แต่ในทางตรงข้ามการเกิดของ เมทาโนลิก และ เอทาโนลิก เอสเทอร์ ของกรดซัคซินิกให้กลีนในไวน์ Muscadine ตัวอย่างอื่นๆ คือ เอสเทอร์ที่ขึ้นกับ กรดมาลิก กรดทาร์ทาริก และกรดซิตริก ในกลุ่มของ ไฮดรอกซิลและออกโซแอซิดเอสเทอร์นั้น เกิดการระเหยได้ยากและพบว่ามีบทบาททางประสาทสัมผัสด้านการชิมเล็กน้อย เอสเทอร์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เกียวข้องกับกรดแลคติก ส่วนเอทิลและเมทิลเอสเทอร์ของกรดอะมิโนจะเกิดในระดับ มก./ล. และสมบัติทางประสาทสัมผัสด้านการชิมยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Jackson, 2000)

สารประกอบเอสเทอร์ที่มีความสำคัญในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ มี 2 กลุ่ม คือ เอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid ethyl ester) กับ แอซีเทตเอสเทอร์ (acetate ester) ซึ่งสารประกอบพวกนี้ให้กลีนดอกไม้หรือผลไม้ซึ่งเป็นกลีนที่ดีและเป็นที่ยอมรับ ตัวอย่าง เอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ได้แก่ เอทิลบิวทาโนเอต เอทิลเฮกซาโนเอต เอทิลออกทาโนเอต ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอลกอฮอล์และสารประกอบที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายหรือการสร้างกรดไขมันของเซลล์ยีสต์

ปริมาณสารเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นระหว่างขบวนการหมักขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น อุณหภูมิในระหว่างการหมัก ถ้าหมักที่อุณหภูมิต่ำ (ประมาณ 10 องศาเซลเซียส) จะสนับสนุนการสังเคราะห์ของเอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน เช่น เอทิลออกทาโนเอต เอทิลเดกแคโนเอตเป็นต้น แต่ถ้าหมักที่อุณหภูมิสูงจะสนับสนุนการเกิดของเอสเทอร์ที่มีมวลโมเลกุลสูงๆ เช่น พวกเอทิลออกทาโนเอต และ ฟีนิลเอทิลแอซีเทต เป็นต้น ระดับของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ระดับต่ำ และปริมาณออกซิเจนระหว่างกระบวนการหมักของยีสต์ ช่วยเพิ่มการเกิดเอสเทอร์ได้ และปัจจัยที่มีอิทธิผลต่อปริมาณ

เอสเทอร์อย่างมากคือ สายพันธุ์ยีสต์เพราะกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรส (Esterase) ในยีสต์ที่ต่างสายพันธุ์จะมีความแตกต่างกัน (Querol และคณะ, 2006 และ Killian และคณะ, 1979)

การเกิดสารประกอบเอสเทอร์ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เกิดได้จาก 2 กระบวนการ คือ

1. ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ในระหว่างการเก็บบ่มปฏิกิริยานี้เป็นการเกิดเอสเทอริฟิเคชันระหว่าง แอลกอฮอล์กับกรดอินทรีย์ ที่มีในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทำให้เกิดสารประกอบพวกเอสเทอร์ขึ้น กระบวนการนี้เกิดขึ้นอย่างช้าๆ ในระหว่างการหมักบ่มโดยมีเอนไซม์เอสเทอร์เรส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการแสดงในภาพที่ 2.9

$$\text{กรดแอซีติก} + \text{ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์} \xrightarrow{\text{เอสเทอเรส}} \text{ไอโซเอมิลแอซีเทต} + \text{น้ำ}$$

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

ภาพที่ 2.9 การเกิดเอสเทอริฟิเคชันระหว่างกรดและแอลกอฮอล์ โดยมีเอนไซม์เอสเทอเรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ที่มา : สุมัลลิกา โมรากุล, 2545

2. เอสเทอริฟิเคชันโดยเอนไซม์ระหว่างการหมัก เกิดช่วงหลังของการหมักโดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แอลกอฮอล์อะเซทิลทรานสเฟอเรส และ แอลกอฮอล์เอซิลทรานสเฟอเรส ทำให้เกิดเอสเทอร์ดังสมการที่แสดงในภาพที่ 2.10

$$\text{อะเซทัลโคเอ} + \text{ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์} \xrightarrow[\text{อะเซทิลทรานสเฟอเรส}]{\text{อะเซทิลโคเอแอลกอฮอล์}} \text{ไอโซเอมิลแอซีเทต} + \text{CoASH}$$

$$\text{แคพริลโคเอ} + \text{เอทานอล} \xrightarrow[\text{ซิลทรานสเฟอเรส}]{\text{เอซิลโคเอแอลกอฮอล์เอ}} \text{เอทิลแคโพรเอต} + \text{CoASH}$$

ภาพที่ 2.10 การเกิดเอสเทอริฟิเคชันระหว่างการหมักโดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลกอฮอล์อะเซทิลทรานสเฟอเรส และ แอลกอฮอล์เอซิลทรานสเฟอเรส

ที่มา : สุมัลลิกา โมรากุล, 2545

ยีสต์คือจุลินทรีย์ที่มีบทบาทหลักในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในระหว่างกระบวนการหมักของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แทบทุกชนิด ดังนั้นนักวิจัยทั่วโลกจึงให้ความสนใจศึกษาบทบาทของยีสต์ในการผลิตสารทุติยภูมิชนิดต่างๆ ที่ส่งผลต่อคุณภาพด้านกลิ่นรสของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ อาทิ เบียร์ เหล้ากลั่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไวน์

Jolly และคณะ (2003) ศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพของไวน์ที่ได้จากการผลิตโดยการใช้ยีสต์บริสุทธิ์ 5 สายพันธุ์ได้แก่ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ทางการค้าและยีสต์ในกลุ่ม non – *Saccharomyces* 4 สายพันธุ์ อีกทั้งยังมีการผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมระหว่าง *S. cerevisiae* กับ non – *Saccharomyces* จำนวน 4 สายพันธุ์แยกกันในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าผลทางประสาทสัมผัสของไวน์ที่ได้จากการผสมระหว่างยีสต์ 2 สายพันธุ์มีคุณภาพที่ดีกว่าไวน์ที่ผลิตจากเชื้อ *S. cerevisiae* เพียงอย่างเดียว

Patel และคณะ (2003) ศึกษาอิทธิพลของยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* จำนวน 20 สายพันธุ์ในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในไวน์ซิมโฟนี (Symphony wine) พบสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ 7 ชนิด เอสเทอร์ 7 ชนิด และกรด 7 ชนิด และพบว่ายีสต์ 18 สายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างสารประกอบให้กลิ่นชนิดเดียวแต่ต่างกันที่ปริมาณที่พบ ส่วนยีสต์อีกสองสายพันธุ์มีรูปแบบในการสร้างสารประกอบให้กลิ่นแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณอีกด้วย จะเห็นได้ว่ายีสต์ *S. cerevisiae* ต่างสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นแตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลทำให้กลิ่นรสของไวน์ที่ได้แตกต่างกัน

Viana และคณะ (2008) คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ non – *Saccharomyces* จำนวน 38 สายพันธุ์ โดยใช้เกณฑ์การคัดเลือกจากข้อมูลการสร้างสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์ในไวน์เป็นหลัก โดยขั้นตอนการคัดเลือกเบื้องต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ายีสต์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถสามารถในการผลิตเอสเทอร์ต่างกัน ทั้งนี้ยีสต์ในสกุล *Hanseniaspora* และ *Pichia* มีความสามารถในการผลิตสารกลุ่มแอซีเทตเอสเทอร์ดีที่สุด และเมื่อนำยีสต์ตัวแทนที่ผ่านการคัดเลือก 5 สายพันธุ์มาผลิตไวน์องุ่นพบว่ายีสต์ *H. osmophila* 1471 สามารถผลิตสาร 2 – ฟีนิลเอทิลแอซีเทต ได้ดีที่สุด ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์นี้จึงเหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้ผลิตไวน์ต่อไป

Callejon และคณะ (2010) เปรียบเทียบรูปแบบของสารประกอบให้กลิ่นและผลของการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของไวน์แดงที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* ที่แยกได้จากผลองุ่นหรือไวน์จำนวน 4 สายพันธุ์เทียบกับ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ทางการค้า 1 สายพันธุ์ พบว่าทั้งชนิดและปริมาณของสารประกอบให้กลิ่นพบแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ ส่วนผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าไวน์ที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ที่แยกจากองุ่นหรือไวน์มีคุณภาพดีกว่าไวน์ที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า

Comitini และคณะ (2010) ศึกษาคุณภาพของไวน์ที่ผลิตจากยีสต์บริสุทธิ์ผสมระหว่าง non - *Saccharomyces* กับ *S. cerevisiae* เปรียบเทียบกับไวน์ที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* โดยศึกษารูปแบบของสารประกอบให้กลิน พบว่าไวน์ที่ผลิตจากยีสต์บริสุทธิ์ผสมระหว่าง non - *Saccharomyces* กับ *S. cerevisiae* มีสารประกอบให้กลินในกลุ่มเอสเทอร์ในปริมาณมากกว่า อีกทั้งยังพบ volatile acidities ในปริมาณต่ำ ดังนั้น ไวน์ที่ได้จึงมีคุณภาพดีกว่าไวน์ที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* เพียงชนิดเดียว

ในปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีรายงานวิจัยที่เกียวข้องกับบทบาทของยีสต์ในการผลิตสารให้กลินรสในสาโทอย่างเป็นที่แน่ชัด งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาบทบาทในการสร้างสารให้กลินของยีสต์แต่ละสปีชีส์ที่อยู่ในลูกแป้งสุรา เพื่อเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่จะนำไปสู่แนวทางในการใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมในการผลิตสาโทซึ่งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพด้านกลินรสของสาโทให้ดียิ่งขึ้น เช่นมีความหลากหลายมากขึ้นสามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคในวงกว้าง ตลอดจนเป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือทีใช้ในการวิจัย

1. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
2. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
3. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
5. เครื่องวัดความเป็นกรด - เบส (pH meter) ของบริษัท Mettler -Toledo, Switzerland
6. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo - block) รุ่น MylabTH Thermo - Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea
7. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002 - S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
8. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น GenieII G - 560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
9. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท SANYO, Japan
10. เครื่องหมุนเหวียงชนิดตั้งโต๊ะ (bench - top centrifuge) รุ่น 2600 ของบริษัท Denvelle, Germany
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น NST 2000 ของบริษัท EYELA, Japan
12. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France
13. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 3 และ 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
14. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดความกว้างรู 0.22 ไมโครเมตร Restek,Thailand
15. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 ของบริษัท Bio - Rad, USA
16. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-ex, Japan
17. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA และ รุ่น MJ Mini^{TM} Personal Thermal Cycler บริษัท Biorad, USA
18. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ ขนาด 90 x 14 มิลลิเมตร ของบริษัท Millionant, France

19. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟพร้อมเครื่องตรวจวัดชนิดเฟลมไอโอไนเซชัน (Gac Chromatography – Flame ionization detector, GC-FID) รุ่น CP 3800 ของบริษัท Varian, USA

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

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

25. แอลกอฮอล์สัมบูรณ์ ของบริษัท Merck, Germany
26. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 37% ของบริษัท LAB - SCAN, Ireland
27. กรดแอซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) 99.8% ของบริษัท Merck, Germany
28. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) 95-97% ของบริษัท Merck, Germany
29. กรดซัคซินิก ของบริษัท May & Baker Ltd., England
30. กรดซิตริก ของบริษัท Merck, Germany
31. กรดไพรูวิก ของบริษัท Sigma, USA
32. กรดแลคติก ของบริษัท Sigma, USA
33. กรดมาลิค ของบริษัท Sigma, USA
34. อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป potato dextrose agar ของบริษัท Pronadisa, Spain
35. สารมาตรฐานสารประกอบให้กลีนรวม (Custom mix Standard) ของบริษัท SUPELCO, USA
36. เอทิลออกทาโนเอท 99% ของบริษัท Merck, Germany
37. เอทิลเดคาโนเอท 99% ของบริษัท Merck, Germany
38. 2 – ฟีนิลเอทิลแอซีเทต 99% ของบริษัท Merck, Germany
39. เอทิลบิวไทเรท 99% ของบริษัท Merck, Germany
40. ไอโซเอมิลแอซีเทต 99% ของบริษัท Sigma, USA
41. L - lysine ของบริษัท Sigma, USA
42. อะเซทัลดีไฮด์ 99% ของบริษัท Fluka, USA.
43. 1-โพรพานอล 99.5% ของบริษัท Merck, Germany
44. ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 98.5%ของบริษัท Sigma, USA
45. กลูโคส ของบริษัท Difco Laboratories, USA
46. กาแลคโตส ของบริษัท Difco Laboratories, USA
47. ไซโลส ของบริษัท Difco Laboratories, USA
48. แรมโนส ของบริษัท Difco Laboratories, USA
49. ซูโครส ของบริษัท Difco Laboratories, USA
50. มอลโทส ของบริษัท Difco Laboratories, USA
51. แมนนิทอล ของบริษัท Merck, Germany
52. อินโนสิทอล ของบริษัท Sigma, USA

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง

แหล่งลูกแป้งสุรา

นำลูกแป้งสุราจาก 8 แหล่งที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่า เมื่อนำไปผลิตสาโทแล้วได้รสชาติดีเป็นที่ยอมรับ จากส่วนวิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิตของนางสาว อภิชญา เตชะวสัญญู ที่ดำเนินการวิจัยใน พ.ศ. 2548 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และจากผู้ประกอบการผลิตสาโทบางม้า ดังนี้ ลูกแป้งสุราจากจังหวัดน่าน (NN5 NN27 NN25) ลูกแป้งสุราจากจังหวัดลำปาง (LA101) ลูกแป้งสุราจากจังหวัดนครพนม (NP101) ลูกแป้งสุราจากจังหวัดหนองคาย (NK102) ลูกแป้งสุราจากจังหวัดสระบุรี (SB102) และลูกแป้งสุราผลิตสาโทบางม้า (BM)

การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ของราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกแล้วและที่ได้รับจากแหล่งอื่น

การแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกแล้ว NN5

นำเชื้อบริสุทธิ์ของรา *M. hiemalis* NN609 ซึ่งแยกได้จากลูกแป้งสุรา NN6 ที่คัดมาจากทั่วประเทศแล้วว่าสามารถผลิตได้สาโทที่มีกลิ่นรสดี (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และได้คัดแยกเชื้อราเพิ่มเติมจากลูกแป้งสุรา NN 5 (ลูกแป้งสุราจากจังหวัดน่าน) ซึ่งเป็นลูกแป้งสุราที่มีแหล่งที่มาใกล้เคียงกับลูกแป้งสุรา NN6 (ลูกแป้งสุราจากจังหวัดน่าน) ซึ่งวิธีการแยกเชื้อราจากลูกแป้ง NN5 มีดังนี้

บดตัวอย่างลูกแป้งสุรา 2 กรัม ใส่ในข้าวเหนียวนึ่ง 100 กรัม ที่บรรจุขวดขนาด 500 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้เข้ากัน บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำหมักในวันที่ 0 และ 3 เจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร เจือจางในระดับต่างๆ หยดสารละลายที่ได้ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Rose Bengal agar เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 7 วัน แยกจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วเก็บในหลอดอาหาร PDA ที่ผิวหน้าเอียงในหลอดทดสอบ ที่ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมยีสต์บริสุทธิ์

ก. นำยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งสุราที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่าสามารถผลิตสาโทที่มีกลิ่นรสดี จำนวน 7 สายพันธุ์ (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM

ข. คัดแยกยีสต์เพิ่มจากลูกแป้งสุราที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่าสามารถผลิตสาโทที่มีกลิ่นรสดี 8 แหล่ง ดังนี้ NN5 NN27 NN25 LA101 NP101 NK102 SB102 และ BM เพื่อให้สามารถแยกยีสต์ได้ทุกชนิดทั้งที่มีจำนวนมากและน้อยในลูกแป้งสุราให้ได้มากชนิดที่สุด จึงต้องคัดแยกโดยใช้วิธี enrichment technique โดยบดตัวอย่างลูกแป้งสุรา 2 กรัม ใส่ในข้าวเหนียวนึ่ง

100 กรัม ทีบรรจุขวดขนาด 500 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้เข้ากัน โดยเติมน้ำในช่วงการหมักวันที่ 3 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างน้ำหมักในวันที่ 0 3 และ 9 เจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในระดับต่างๆ หยดสารละลายทีได้ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร และเกลียเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM และ L - lysine (สำหรับคัดแยกยีสต์ชนิด *Saccharomyces* และชนิด non - *Saccharomyces* โดยยีสต์ชนิด *Saccharomyces* ไม่สามารถเจริญบน L - lysine) เกลียให้ทั่วผิวหน้าอาหารและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 วัน แยกจนได้ยีสต์ทีบริสุทธิ์แล้วเก็บไว้ในอาหารแข็ง YM ทีมีผิวหน้าเอียงในหลอดทดสอบ ที่ 4 องศาเซลเซียส

ค. คัดแยกยีสต์จากยีสต์ผงสำเร็จรูป 493 EDV (Danstil®, Canada) ทีได้รับมาจากผู้ประกอบการ โดยเติมยีสต์ผง 5 กรัมในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในระดับต่างๆ หยดสาร ละลายทีได้ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร เกลียเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM บ่มทีอุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 วัน แยกจนได้เชื้อทีบริสุทธิ์แล้วเก็บไว้ในอาหารแข็ง YM ทีมีผิวหน้าเอียงในหลอดทดสอบ ที่ 4 องศาเซลเซียส

ง. นำยีสต์ทีได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ซึงคัดแยกมาจากลูกแป้งสุราและสาโท จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *S. cerevisiae* TISTR5161 และ *Candida krusei* TISTR5259 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เพื่อนำไปยืนยันผลการจำแนกต่อไป

3.3.1 การจำแนกชนิดราและยีสต์ทีอยู่ในลูกแป้งสุราโดยใช้สัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

3.3.1.1 การจำแนกรา

3.3.1.1.1 จำแนกราโดยใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุล

3.3.1.1.1.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยวิธี glass beads (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550)

เลี้ยงราบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที 30 องศาเซลเซียส 2 - 3 วัน ใช้คอร์กบอร์-เรอร์ เบอร์ 8 เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณทีเชื้อเจริญ นำสายใยทีได้ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยวิธี glass beads ซึงมีรายละเอียด ดังนี้ เติม 200ไมโครลิตร ของสารละลาย A (สารละลายA ประกอบด้วย 2 % Triton X - 100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0 และ 1 mM EDTA) 200 ไมโครลิตรของ Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25/24/1) และ 0.3 กรัมของเม็ดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.52 ϴ.45 ไมครอน หลังจากนั้น เขย่าผสมโดยใช้เครืองเขย่าผสมเป็นเวลา 3 นาที 30

วินาที แล้วจึงเติม 200 ไมโครลิตร TE บัฟเฟอร์ ปั่น 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาสกัดด้วย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25/24/1) ปั่น14 ,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาเติม 1 มิลลิลิตร ของเอทานอลบริสุทธ์ ปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอที14 ,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอทีได้ มาเติม 400 ไมโครลิตร TE บัฟเฟอร์ pH 8.0 และRNase A 30 ไมโครกรัม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเติม แอมโมเนียมอะซิเตต ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่ - 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอที 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอทีได้มาล้างด้วย 70% เอทานอล ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วจึงละลายตะกอนด้วย 50 ไมโครลิตร ของ TE บัฟเฟอร์

3.3.1.1.1.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในช่วง ITS rDNA ของรา ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

นำดีเอ็นเอมาเพิ่มจำนวนของบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอใช้ ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ซึ่งเป็น universal primers ของบริเวณ ITS โดยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 มีลำดับเบสดังนี้ 5’ – TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3’ และ 5’ – TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3’ ตามลำดับ โดยใช้ภาวะของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 15 นาที, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที, 35 รอบ, 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที -20 องศาเซลเซียส (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) นำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสมาวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS

3.3.1.1.1.3 การวิเคราะห์ผลทางชีววิทยาโมเลกุล

นำผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอเปิดในโปรแกรม Bioedit มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของราสปีชีส์ต่างๆ จากฐานข้อมูลใน Genbank แล้วจึงนำลำดับเบสดังกล่าวมาทำต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม ClustalX 1.81 และดูต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม nj plot

3.3.1.1.2 จำแนกราโดยใช้สัณฐานวิทยา

การจำแนกราโดยใช้สัณฐานวิทยา อ้างอิงตาม Introduction to food and airborne fungi (de Hoog และคณะ, 2000) ศึกษาสัณฐานวิทยาของราทั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์และดูด้วยตาเปล่า โดยศึกษาขนาดและลักษณะของสปอร์ ขนาดก้านชูสปอร์ การมีไรซอยด์ การมีคลามัยโด

สปอร์ ขนาดของคอลาเมลลา ขนาดของสปอร์แรงเจียม และลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

3.3.1.1.3 ศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งของราที่แยกได้

เพื่อคัดเลือกราที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดีเทียบเท่ากับราสายพันธุ์ *M. hiemalis* NN609 ดังนั้นจึงนำราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN5 จำนวน 3 ไอโซเลต มาศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งเป็นของเหลว (Liquefaction) โดยนำราบริสุทธิ์ที่แยกได้ 3 คอร์กบอร์เรอร์ ใส่ในข้าวเหนียวนึ่ง 100 กรัม ที่บรรจุขวดขนาด 500 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเปรียบเทียบหาความสามารถในการเปลี่ยนของแข็ง (ข้าวเหนียวนึ่ง) ให้กลายเป็นของเหลว (น้ำต้อย) แต่ละไอโซเลตทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ชุดการทดลอง ในการทดลองนี้ใช้ราสายพันธุ์ *M. hiemalis* NN609 เป็นตัวเปรียบเทียบ

3.3.1.2 การจำแนกยีสต์

ในการจำแนกยีสต์ที่แยกได้มาจากลูกแป้งสุราที่ผ่านการคัดเลือกแล้วทั้ง 8 แหล่ง นำเทคนิค Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) มาใช้เพื่อช่วยจัดกลุ่มของยีสต์ที่คัดแยกก่อน แล้วจึงคัดเลือกตัวแทนของยีสต์ในแต่ละกลุ่มไปทดสอบทางชีวเคมี และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

3.3.1.2.1 จำแนกยีสต์โดยใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุล

3.3.1.2.1.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยวิธี glass beads

เลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว YEPD ที่ 30 องศาเซลเซียส 2 - 3 วัน ปั่นแยกเซลล์ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วล้างเซลล์โดยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 500 ไมโครลิตร ปั่นแยกเซลล์ที่10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที อีกครั้ง นำเซลล์ที่ได้ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับราในข้อ 3.3.1.1.1.1

3.3.1.2.1.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในช่วง ITS rDNA ของยีสต์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

นำดีเอ็นเอมาเพิ่มจำนวนของบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์และวิธีการทำเช่นเดียวกับของราในข้อ 3.3.1.1.1.2

3.3.1.2.1.3 การจัดกลุ่มยีสต์โดยวิธี PCR - RFLP

นำผลิตภัณฑ์ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาตัดด้วย *Hin*FI, *Hha*I และ *Hae*III แล้วจึงจัดกลุ่มยีสต์ที่แยกได้ตามรูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรม Quantity one จากเครื่อง Gel doc (Bio - rad, USA) ในการวิเคราะห์ผล รูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ สุ่มตัวอย่างของยีสต์จากแต่ละกลุ่มมา

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ทำเช่นเดียวกับของราในข้อ 3.3.1.1.1.3

3.3.1.2.2 การจำแนกยีสต์โดยวิธีทางชีวเคมี

ก. การใช้แหล่งอาหารคาร์บอน ทำได้โดยการลงเชื้อ 5 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร 500 ไมโครลิตร ลงในอาหารยีสต์ไนโตรเจนเบสและเติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน 8 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลกโตส ไซโรส แรมโนส ซูโครส ซูโคส มอลโทส แมนนิทอล และอินโนสิทอล ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 โมลาร์

ข. การหมักแหล่งอาหารคาร์บอน ทำได้โดยการลงเชื้อ 5 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร 500 ไมโครลิตร ลงในอาหาร ยีสต์ไนโตรเจนเบสที่มีหลอดดักแก๊ส (Durham's tube) และเติมแหล่งคาร์บอนต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ กลูโคส และไซโครส ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 โมลาร์

3.3.2 การคัดเลือกตัวแทนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตสาโทที่มีกลิ่นรสที่ดี

3.3.2.1 ผลิตสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมของรา 2 สายพันธุ์และแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์

เติมราสองสายพันธุ์คือ *M. hiemalis* NN609 และ *R. microsporus* NN505 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ลงในข้าวเหนียวนึ่ง 300 กรัม จำนวนชนิดละ 9 คอร์กบอร์เรอร์ และแปรผันยีสต์จำนวน 5 สายพันธุ์ ดังนี้ *S. cerevisiae* NP101D8 (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550); N5D8 (คัดแยกจากลูกแป้งสุรา NN5 ที่ได้รับมาจากจังหวัดน่าน); 493 EDV (ยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า); BMD8 (คัดแยกจากลูกแป้งสุราที่ผลิตสาโทบางม้า) และ TISTR 5161 (ได้รับจาก วว.) แยกกันแต่ละชนิดลงไปจำนวน 5x10^3 cfu/ml หลังจากนั้นคลุกเคล้าให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เติมน้ำปริมาตร 300 มิลลิลิตรในช่วงการหมักวันที่ 3 แล้วบ่มต่ออีก 10 วัน หลังจากนั้นนำของเหลวส่วนใสใส่ขวดสีชาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อตกตะกอนให้สาโทใส แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างสาโทเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ได้แก่ ความเป็นกรด - เบส ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอลและสารประกอบให้กลิ่น และนำไปวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสโดยผู้เชี่ยวทางด้านการชิมไวน์และสาโทจำนวน 10 คน

3.3.2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของสาโทที่หมักได้

เก็บสาโทที่ได้จากข้อ 3.3.3.1 มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ดังนี้

3.3.2.2.1 ค่าความเป็นกรด – เบส

อ่านค่าความเป็นกรด - เบส ด้วยเครื่อง pH meter

3.3.2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโดยรวม (Total Titration Acidity)

นำตัวอย่างสาโท 5 มิลลิลิตร เติมน้ำร้อน 50 มิลลิลิตรแล้วหยด Phenopthalene 2 - 3 หยด นำไปไทเทรตกับ NaOH 0.1 นอร์แมล จนสารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู อ่านค่าปริมาตร NaOH ที่ได้ แล้วนำไปคำนวณ %TA

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

V = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นนอร์แมล

v = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

MW (lactic acid) = 90

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

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

3.3.2.3 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory test) ในสาโท

นำสาโทได้ในวันสุดท้าย จากข้อ 3.3.2.1 มาทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยผู้ทดสอบที่มีความเชียวชาญและคุ้นเคยกับการดื่มสาโท จำนวน 10 คน ทำการชิมและให้คะแนนในใบให้คะแนน (ภาคผนวก ค) และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ทางสถิติโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชั่น 17.0 (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA)

3.3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลและสารประกอบให้กลิน (Volatile compounds)

นำสาโทที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ใน vial ที่สะอาดปราศจากเชื้อขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิทด้วย Crimper 20 mm Seals จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี – เฟลมไอโอไนเซชัน (GC - FID) โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลินบริเวณที่ว่างเหนือสาร (Headspace) เพื่อฉีดวิเคราะห์และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบและคำนวณกับสารมาตรฐานที่ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์ :	CP - wax 52CB , Capillary Column
	(60.0 m x 0.25 mm id x 0.25 µm film thickness)
Injector :	Split (10:1)

อุณหภูมิของ Injector : 250 องศาเซลเซียส

ปริมาตรฉีด : 1 มิลลิลิตร

แก๊สตัวพา(carrier gas) ไนโตรเจน (อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที)

อุณหภูมิของ Oven : 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 นาที

35 องศาเซลเซียส ถึง 40 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 30 องศาเซลเซียส/นาที

40 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที

40 องศาเซลเซียส ถึง 117 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 40 องศาเซลเซียส/นาที

117 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

117 องศาเซลเซียส ถึง 240 องศาเซลเซียสอัตราเร็ว 30 องศาเซลเซียส/นาที

240 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที

Run Time : 14.69 นาที

ชนิดของ Detector : Flame - ionization detector (FID)

อุณหภูมิของ Detector : 250 องศาเซลเซียส

Vial equilibration time : 15 นาที

3.3.2.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 17.0 (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA) นอกจากนี้ยังวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ยีสต์กับการผลิตสารประกอบให้กลิ่นด้วยวิธี Principal Component Analysis (PCA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Unscrambler เวอร์ชั่น 9.7 (CAMO, Norway)

3.3.2.6 ตรวจสอบการปนเปื้อนของสาโทจากจุลินทรีย์อื่น

เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นของตัวอย่างสาโทจะนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR - RFLP) มาใช้เพื่อตรวจสอบดูรูปแบบการตัดจากเอนไซม์ตัดจำเพาะของดีเอ็นเอทีสกัดได้จากสาโท ดังนี้

นำน้ำหมักที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 มาใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วล้างเซลล์โดยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB (Arlorio และคณะ, 1999) ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้ ปั่นแยกเซลล์ที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที อีกครั้ง ทิ้งส่วนน้ำใส เติม 600 ไมโครลิตร ของ

สารละลาย Lysis buffer (สารละลาย Lysis buffer ประกอบด้วย 2% CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris pH 8.0 และ 25 mM EDTA) และ 10 ไมโครลิตร ของ Proteinase K (10 mg/ml) ลงในตะกอนเซลล์ เขย่าเบาๆและบ่มที 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชัวโมง จากนั้นปั่น 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ แล้วจึงเติม 600 ไมโครลิตร TE บัฟเฟอร์ และ 1,200 ไมโครลิตร Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25/24/1) เขย่าขึ้นลงเบาๆ 60 ครั้ง และ ปั่น 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ และเติม 600 ไมโครลิตร Phenol/Chloroform/ Isoamyl alcohol (25/24/1) อีกครั้ง เขย่าขึ้นลง 60 ครั้ง ปั่น 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ จากนั้นจึงเติม 1 มิลลิลิตร ของ Isopropanol เขย่าเบาๆ บ่มที อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอที 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอทีได้มาล้างด้วย 70% เอทานอล 500 ไมโครลิตร ปั่น 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วจึงละลายตะกอนด้วย 20 ไมโครลิตร ของ TE บัฟเฟอร์

เพิมจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในช่วง 16S rDNA ของแบคทีเรียและ 26S rDNA ของยีสต์และรา ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

ก. เพิมจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ไพรเมอร์ 27F (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') และ ไพรเมอร์ 1492R (5' - GGTTACCTTGTT ACGACTT - 3') โดยใช้ภาวะของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที; 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที, 30 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 6 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที -20 องศาเซลเซียส

ข. เพิมจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 26S rDNA ยีสต์และรา เช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1.1.2

นำผลิตภัณฑ์ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาตัดด้วย *Hin*FI, *Hha*I และ *Hae*III แล้วจึงวิเคราะห์ผลรูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรม Quantity one จากเครือง Gel doc (Bio - rad, USA)

3.3.3 แปรผันอัตราส่วนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* กับยีสต์ในกลุ่ม non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์ เพือให้ได้สาโททีมีคุณภาพด้านกลินรสทีดี

3.3.3.1 ผลิตสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมของรา 2 สายพันธุ์ ยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 และแปรผันอัตราส่วนยีสต์ในกลุ่ม non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์

เติมราสองสายพันธุ์คือ *M. hiemalis* NN609 และ *R. microsporus* NN505 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ลงในข้าวเหนียวนึง 300 กรัม จำนวนชนิดละ 9 คอร์กบอร์เรอร์ เติมยีสต์

S. cerevisiae NP101D8 จำนวน $5x10^3$ cfu/ml และแปรผันยีสต์ในกลุ่ม non – *Saccharomyces* 3 สายพันธุ์คือ *I. orientalis* TISTR5259 (ได้รับมาจาก วว.) *P. anomala* NP101 และ *Sm. fibuligera* NP101 (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) แยกกันแต่ละชนิดลงไปจำนวน $2.5x10^3$ $5x10^3$ $1x10^4$ $2x10^4$cfu/ml ตามลำดับ หลังจากนั้นคลุกเคล้าให้เข้ากัน และนำไปบ่มทีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เติมน้ำปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในวันที 3 ของการหมัก บ่มต่อไปอีก 10 วัน หลังจากนั้นจะตกตะกอนให้ใสโดยนำของเหลวส่วนใสใส่ขวดสีชาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วนำไปแช่ทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างสาโทเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ได้แก่ ความเป็นกรด - เบส ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสโดยผู้เชี่ยวทางด้านการชิมไวน์และสาโทจำนวน 10 คน และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล และสารประกอบให้กลิน

3.3.3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของสาโททีหมักได้

นำสาโททีได้จากข้อ 3.3.3.1 มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.2

3.3.3.3 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory test) ในสาโท

นำสาโททีได้จากข้อ 3.3.3.1 มาวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส เช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.3

3.3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลและสารประกอบให้กลิน (Volatile compounds)

นำสาโททีได้จากข้อ 3.3.3.1 มาวิเคราะห์องค์ประกอบปริมาณเอทานอลและสารประกอบให้ เช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.4

3.3.3.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ผลทางสถิติเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.5

3.3.3.6 ตรวจสอบการปนเปื้อนของสาโทจากจุลินทรีย์อืน

นำสาโททีได้มาตรวจสอบการปนเปื้อนเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.6

บทที 4

ผลการทดลอง

การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ของราและยีสต์ทีแยกได้จากลูกแป้งสุราทีคัดเลือกแล้วและทีได้รับจากแหล่งอืน

งานวิจัยนีมุ่งสนใจศึกษาความสามารถของยีสต์สปีชีส์ต่างๆ ยีสต์ที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ประกอบด้วยสายพันธุ์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์ ยีสต์ในกลุ่ม non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์ดังนี้ *I. orientalis* TISTR5259 *Sm. fibuligera* NP101 และ *P. anomala* NP101 ยีสต์ทั้ง 8 สายพันธุ์ มีแหล่งทีมาแสดงดังตารางที 4.1

ตารางที 4.1 แหล่งทีมาของยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยจำนวน 8 สายพันธุ์

ยีสต์	สายพันธุ์ยีสต์	แหล่งทีมา
S. cerevisiae	N5D8	คัดแยกจากลูกแป้งสุรา NN5 (ได้รับมาจากจังหวัดน่าน)
S. cerevisiae	NP101D8	อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550
S. cerevisiae	TISTR5161	ได้รับจาก วว.
S. cerevisiae	493 EDV	สายพันธุ์ทางการค้า
S. cerevisiae	BMD8	คัดแยกจากลูกแป้งสุราทีเป็นหัวเชื้อผลิตสาโทบางม้า
I. orientalis	TISTR5259	ได้รับจาก วว.
Sm. fibuligera	NP101	ได้รับจาก อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550
P. anomala	NP101	ได้รับจาก อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550

งานวิจัยนีคัดแยกยีสต์ส่วนหนึงจากลูกแป้งสุราที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่าเมือนำไปผลิตสาโทแล้วได้กลินรสดีจำนวน 7 ชนิด (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) และรวมถึงลูกแป้งสุราทีเป็นหัวเชื้อในการผลิตสาโทบางม้าอีก 1 ชนิด โดยนำลูกแป้งสุราจากทั้ง 8 แหล่งมาผลิตสาโทเพือแยกยีสต์ เก็บตัวอย่างในวันที 0 และ 8 พบว่ายีสต์ทีได้สามารถแยกเป็นกลุ่ม *S. cerevisiae* และกลุ่ม non - *Saccharomyces* โดยอาศัยผลการเจริญบนอาหารแข็ง L - lysine (ยีสต์ *S. cerevisiae* ไม่สามารถเจริญได้แต่ยีสต์กลุ่ม non - *Saccharomyces* สามารถเจริญได้) หลังจากนั้นสุ่มหาตัวแทนยีสต์ *S. cerevisiae* จำนวน 3 ไอโซเลต จากลูกแป้งสุราแต่ละแหล่งและทุกไอโซเลตของยีสต์กลุ่ม non - *Saccharomyces* ไปจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิคทางชีวเคมีควบคู่กับเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลต่อไป

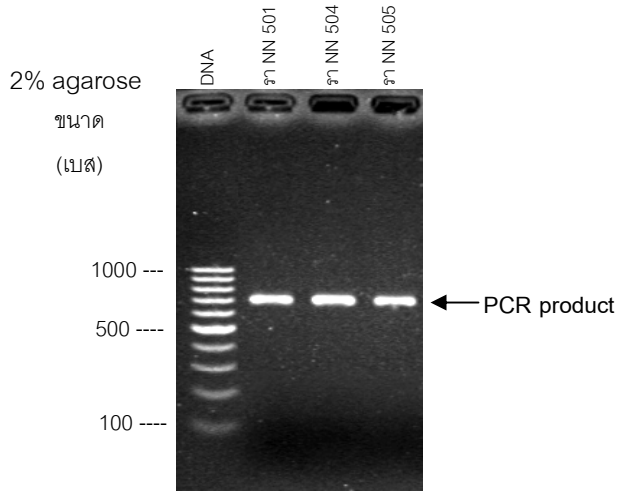
คัดแยกเชื้อราเพิ่มเติมจากลูกแป้ง NN5 (ลูกแป้งสุราจากจังหวัดน่าน) โดยนำลูกแป้ง NN5 มาผลิตสาโท เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 และ 3 ของการหมัก พบราที่แยกได้จำนวน 24 ไอโซเลตซึ่งมีลักษณะโคโลนีคล้ายกันดังนั้นจึงสุ่มหาตัวแทนรา 3 โคโลนี ได้แก่รหัส NN501 NN504 และ NN505 เพื่อนำไปจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลพร้อมทั้งทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของราที่แยกได้ต่อไป

4.1 การจำแนกชนิดราและยีสต์ที่อยู่ในลูกแป้งสุราโดยใช้สัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

4.1.1 การจำแนกรา

4.1.1.1 จำแนกราโดยใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุล

จากการคัดแยกราจากลูกแป้งสุรา NN5 แล้วสุ่มเลือกตัวแทนมา 3 ไอโซเลต หลังจากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในช่วง ITS rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (F) และ ITS4 (R) ขนาดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของราทั้ง 3 ไอโซเลตมีค่า 700 เบส แสดงดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของรา 3 ไอโซเลตที่แยกจากลูกแป้ง NN5

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสมาวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS มาเปรียบ เทียบกับลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์และราสปีชีส์ต่างๆ จากฐานข้อมูลใน Genbank และสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่า ราที่แยกได้จากลูกแป้ง NN5 ทั้ง 3 ไอโซเลต มีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS กับ ราสายพันธุ์ *Rhizopus oryzae*, *M. miehei*, *R. microsporus*, และ *M. rouxii*

เท่ากับร้อยละ 100 จากการวิเคราะห์ผลทางชีววิทยาโมเลกุลพบว่ายังไม่สามารถจำแนกชนิดของราที่แยกมาจากลูกแป้ง NN5 ได้อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องใช้ข้อมูลสัณฐานวิทยาเข้ามาประกอบด้วย

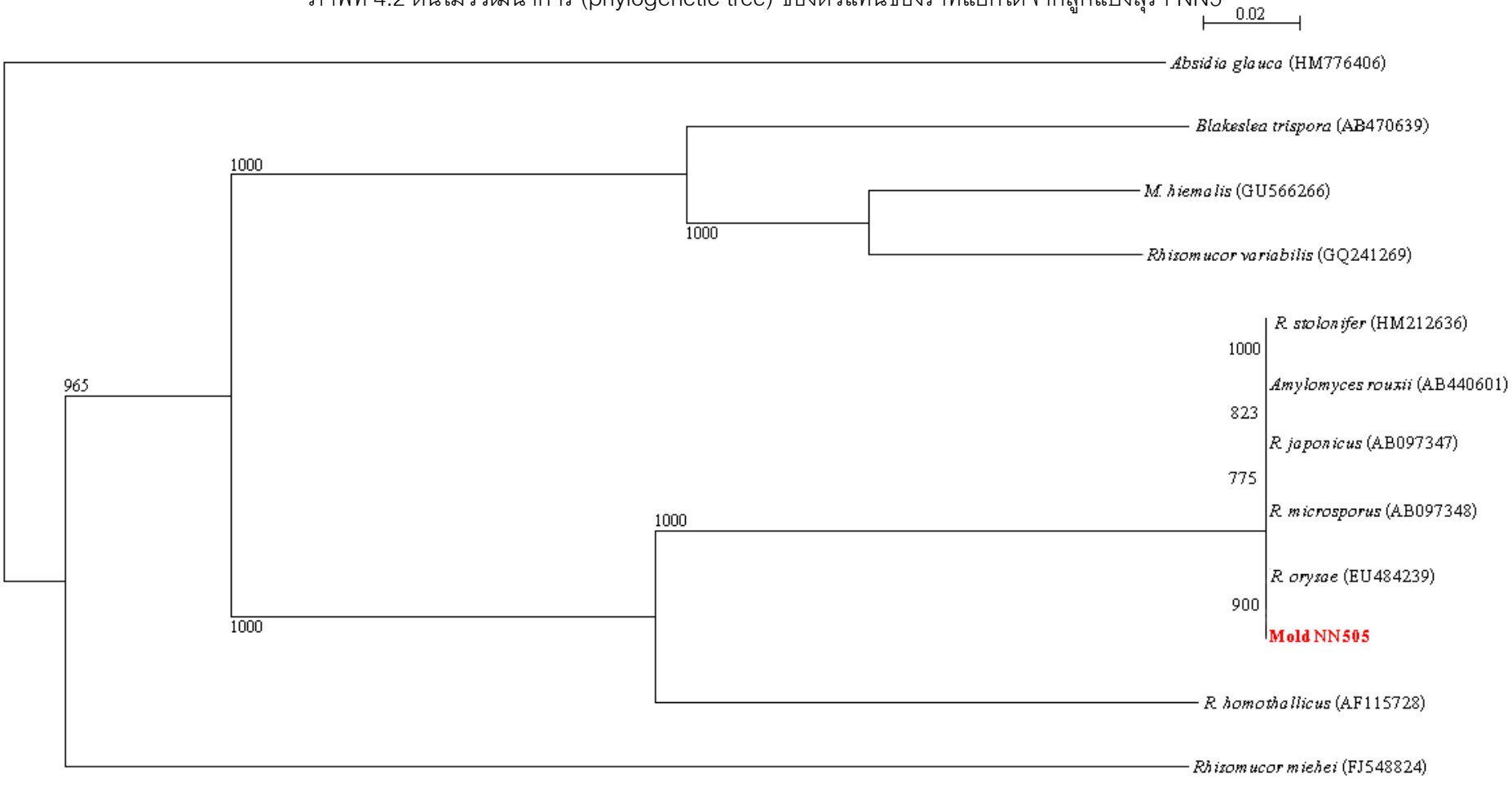
4.1.1.2 จำแนกราโดยใช้สัณฐานวิทยา

การจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์และดูด้วยตาเปล่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA รวมไปถึงการศึกษา ขนาดและลักษณะของสปอร์ ขนาดก้านสปอร์ การมีไรซอยด์ การมีคลามัยโดสปอร์ ขนาดของสปอร์แรงเจียม และการเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.3

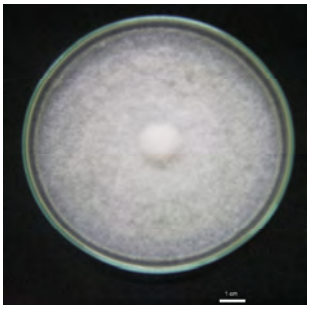
จากตารางที่ 4.2 พบว่า ราทั้ง 3 ไอโซเลตมีไรซอยด์อย่างเห็นได้ชัด แสดงว่าราที่คัดแยกจากลูกแป้งสุรา NN5 ทั้ง 3 ไอโซเลตเป็นราในกลุ่ม *Rhizopus* spp. ซึ่งคุณลักษณะการปรากฏของไรซอยด์นั้นจะสามารถใช้แยกระหว่างราในกลุ่ม *Mucor* spp. ออกจาก *Rhizopus* spp. โดยราในกลุ่ม *Mucor* spp. จะไม่มีไรซอยด์ ในทางตรงกันข้าม รากลุ่ม *Rhizopus* spp. มีไรซอยต์ ส่วนคุณสมบัติที่ใช้ในการแยกระหว่างราสายพันธุ์ *R. microsporus* กับราสายพันธุ์ *R. oryzae* คือความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส กล่าวคือราสายพันธุ์ *R. microsporus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิดังกล่าว ส่วนราสายพันธุ์ *R. oryzae* ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิดังกล่าวได้ ดังนั้นจากผลการจำแนกโดยใช้สัณฐานวิทยาพบว่าราที่คัดแยกมาจากลูกแป้ง NN5 คือราสายพันธุ์ *R. microsporus*

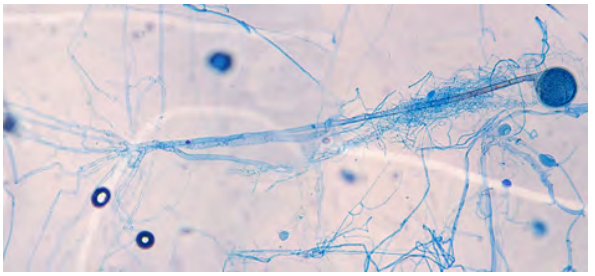
ผลการจำแนกรา NN501, NN504 และ NN505 จากลูกแป้ง NN5 โดยใช้วิธีสัณฐานวิทยาควบคู่กับวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลสามารถสรุปได้ว่าเป็นรา *R. microsporus*

ภาพที่ 4.2 ต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของตัวแทนของราที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา NN5



ก

ข 

ค 

ภาพที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา NN505 ที่แยกได้จากลูกแป้ง NN5

ก. ลักษณะของรา NN505 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 200 เท่า

ข. ลักษณะโคโลนีของรา NN505 ที่เจริญบนอาหาร PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน

ค. ลักษณะไรซอยด์ของรา NN505 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ตารางที่ 4.2 ผลของการจำแนกราในลูกแป้งสุราโดยใช้สัณฐานวิทยา (อ้างอิงตาม (De Hoog, 2000)

รหัสของรา	การมีไรซอยด์	การมีคลามัยโดสปอร์	ลักษณะก้านสปอร์	การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	ขนาดของก้านสปอร์ (ไมโครเมตร)	ลักษณะสปอแรงจิโอสปอร์			ชื่อสปีชีส์
						ลักษณะ	สี	ขนาด (ไมโครเมตร)	
NN501	+	+++	Un branch	+	58	irregular	Hyaline	10 x 11	*R. microsporus*
NN504	+	+++	Un branch	+	62	irregular	Hyaline	9 x 11	*R. microsporus*
NN505	+	+++	Un branch	+	74	irregular	Hyaline	14 x 14	*R. microsporus*

4.1.1.3 ศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งของราที่แยกได้

จากการศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งของรา 3 ไอโซเลตจากลูกแป้ง NN5 เทียบกับรา *M. hiemalis* NN609 ซึ่งพบว่าเป็นราที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดี (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำต้อย (ของเหลวที่ได้จากการเปลี่ยนจากแป้งเป็นน้ำเชื่อม) ที่วัดได้จาก 3 ชุดการทดลองของราทั้ง 3 ไอโซเลตมีค่าใกล้เคียงกับรา *M. hiemalis* NN609 แสดงผลได้ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้เป็นของเหลวของรา 3 ไอโซเลตที่แยกจากลูกแป้ง NN5 เทียบกับราสายพันธุ์ *M. hiemalis* NN609

รา	ปริมาณของเหลวที่วัดได้ (มิลลิลิตร)
NN501	51 ± 2.0
NN504	53 ± 2.1
NN505	57 ± 1.5
M. hiemalis NN609	55 ± 2.0

ในการศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งของรา พบว่าราที่แยกได้จากลูกแป้ง NN5 ทั้ง 3 ไอโซเลตมีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดีเทียบเท่ากับ *M. hiemalis* NN609 โดยรา NN505 มีความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้เป็นของเหลวได้ดีที่สุด ด้วยเหตุนี้รา *R. microsporus* NN505 จึงถูกคัดเลือกให้เป็นตัวแทนของราเพื่อนำไปใช้ในการทดลองถัดไป

4.1.2 การจำแนกยีสต์

4.1.2.1 จำแนกยีสต์โดยใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุล

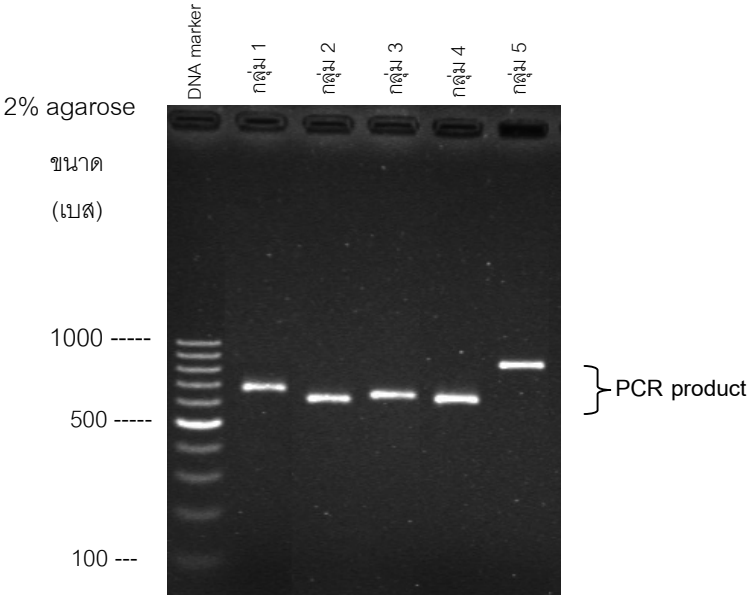
ก. การจำแนกยีสต์ที่มาจากการคัดแยกจากลูกแป้งสุรา 8 แหล่ง พบว่ายีสต์ที่สามารถแยกได้มีจำนวนมากถึง 447 ไอโซเลต จึงจำเป็นต้องจัดกลุ่มยีสต์ก่อนที่นำไปจำแนกต่อ ได้เลือกใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR - RFLP) มาช่วยจัดกลุ่มด้วยรูปแบบของชิ้นส่วนของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Hin*FI, *Hha*I และ *Hae*III โดยเริ่มต้นจากทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งสุรา หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอในช่วง ITS rDNA มาเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์

ITS1 และ ITS4 แสดงขนาดของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในตารางที่ 4.4 และตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของตัวแทนยีสต์ทั้ง 5 กลุ่มแสดงดังภาพที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของตัวแทนยีสต์ 5 กลุ่ม

กลุ่มที่	ขนาดของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (เบส) *
1	670
2	610
3	630
4	610
5	830

* ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้คำนวณจากโปรแกรม Quantity one จากเครื่อง Gel doc (Bio - rad, USA)



ภาพที่ 4.4 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของตัวแทนยีสต์ 5 กลุ่ม

จากผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณไรโบโซมอลของยีสต์ไอโซเลตต่างๆ พบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีขนาดอยู่ระหว่าง 610 - 830 เบส

เพื่อศึกษารูปแบบของชิ้นส่วนของไรโบโซมอลดีเอ็นเอจากยีสต์แต่ละไอโซเลต เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ (restriction enzyme) เพื่อใช้รูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าว เพื่อการแบ่งกลุ่มยีสต์ จึงได้นำเอาผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ 3 ชนิด คือ *Hin*FI, *Hha*I และ *Hae*III ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.5

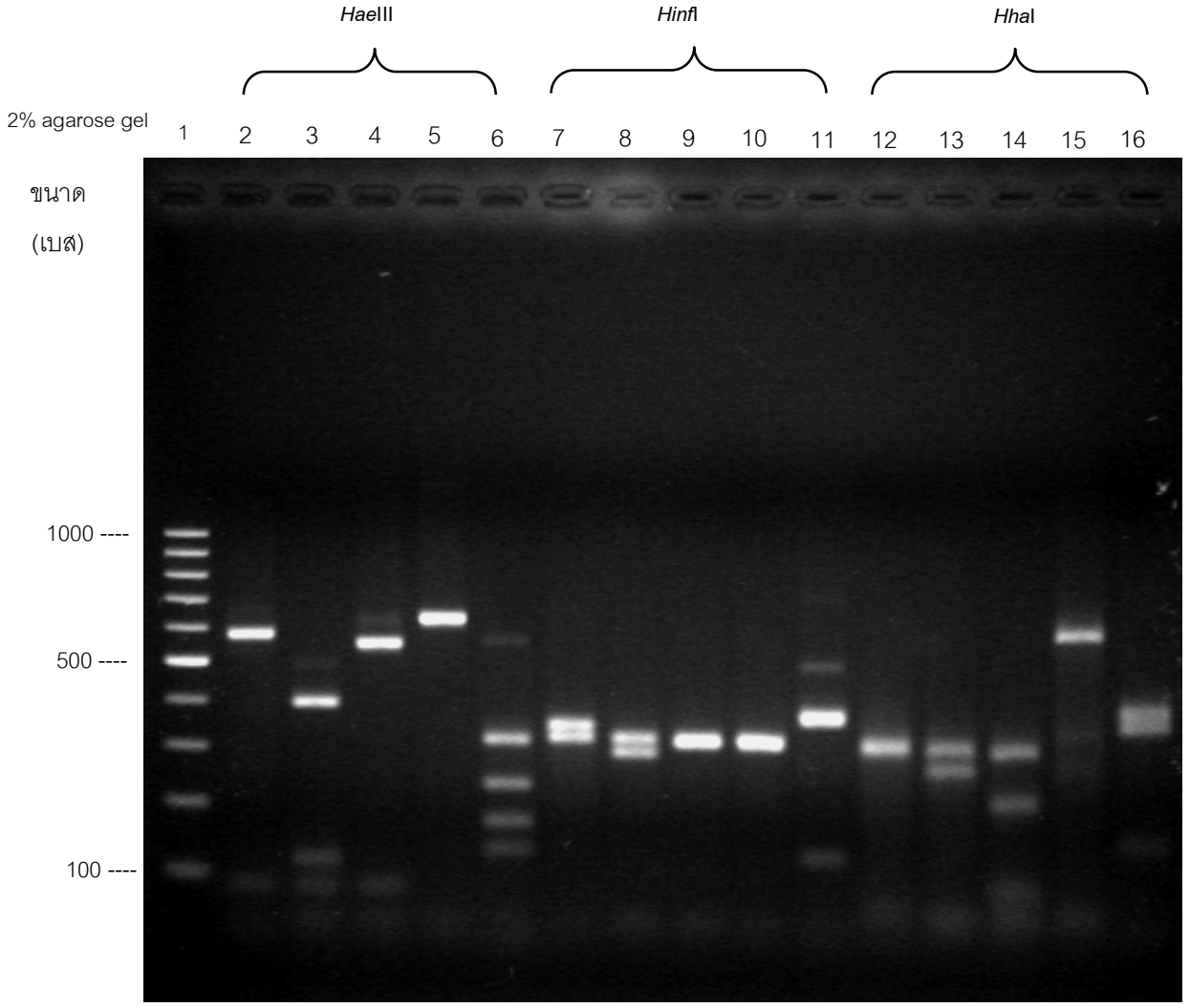
จากภาพที่ 4.5 พบว่า ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์ที่คัดแยกจากลูกแป้งที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 8 แหล่ง ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ 3 ชนิด คือ *Hae*III, *Hinf*I และ *Hha*I ได้รูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถจัดกลุ่มของยีสต์ได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม ขนาดดีเอ็นเอของยีสต์ทั้ง 5 กลุ่มที่ถูกตัดชิ้นส่วนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 การจัดกลุ่มของยีสต์ที่แยกได้ตามรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS โดยวิธี PCR – RFLP

กลุ่มที่	ขนาดของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (เบส)	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (เบส)*		
		*Hae*III	*Hinf*I	*Hha*I
1	670	60, 590	313, 340	270, 300
2	610	60, 110, 390	270, 290	255, 280
3	630	60, 550	287, 288	70, 200, 290
4	610	610	280, 290	580
5	830	110, 170, 210, 310	100, 350, 360	370, 390

* ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้คำนวณจากโปรแกรม Quantity one จากเครื่อง Gel doc (Bio - rad, USA)

เพื่อการจำแนกชนิดของยีสต์ต่อไปจึงได้เลือกตัวแทนกลุ่มแบบสุ่มไปยืนยันการจำแนกชนิดโดยวิธีทางชีวเคมีควบคู่กับนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์ตัวแทนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ไปเปรียบเทียบร้อยละความคล้าย (% Similarity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันของยีสต์ที่มีในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งผลการจำแนกชนิดของยีสต์แสดงดังตารางที่ 4.6 และสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ดังแสดงในภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.5 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของตัวแทนยีสต์ 5 กลุ่มที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ *Hae*III, *Hin*fI, *Hha*I

Lane ที่ 1 คือ DNA marker

Lane ที่ 2 – 6 คือผลิตภัณฑ์ PCR ของยีสต์ทั้ง 5 กลุ่มที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hae*III

Lane ที่ 7 –11 คือผลิตภัณฑ์ PCR ของยีสต์ทั้ง 5 กลุ่มที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hin*fI

Lane ที่ 12 – 16 คือผลิตภัณฑ์ PCR ของยีสต์ทั้ง 5 กลุ่มที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hha*I

ตารางที่ 4.6 การจำแนกชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันในฐานข้อมูลใน GenBank

กลุ่มยีสต์	ชนิดของยีสต์	%similarity*
1	*Sm. fibuligera*	100
2	*P. caribbica*	100
3	*P. fabianii*	99
4	*P. anomala*	99
5	*S. cerevisiae*	99

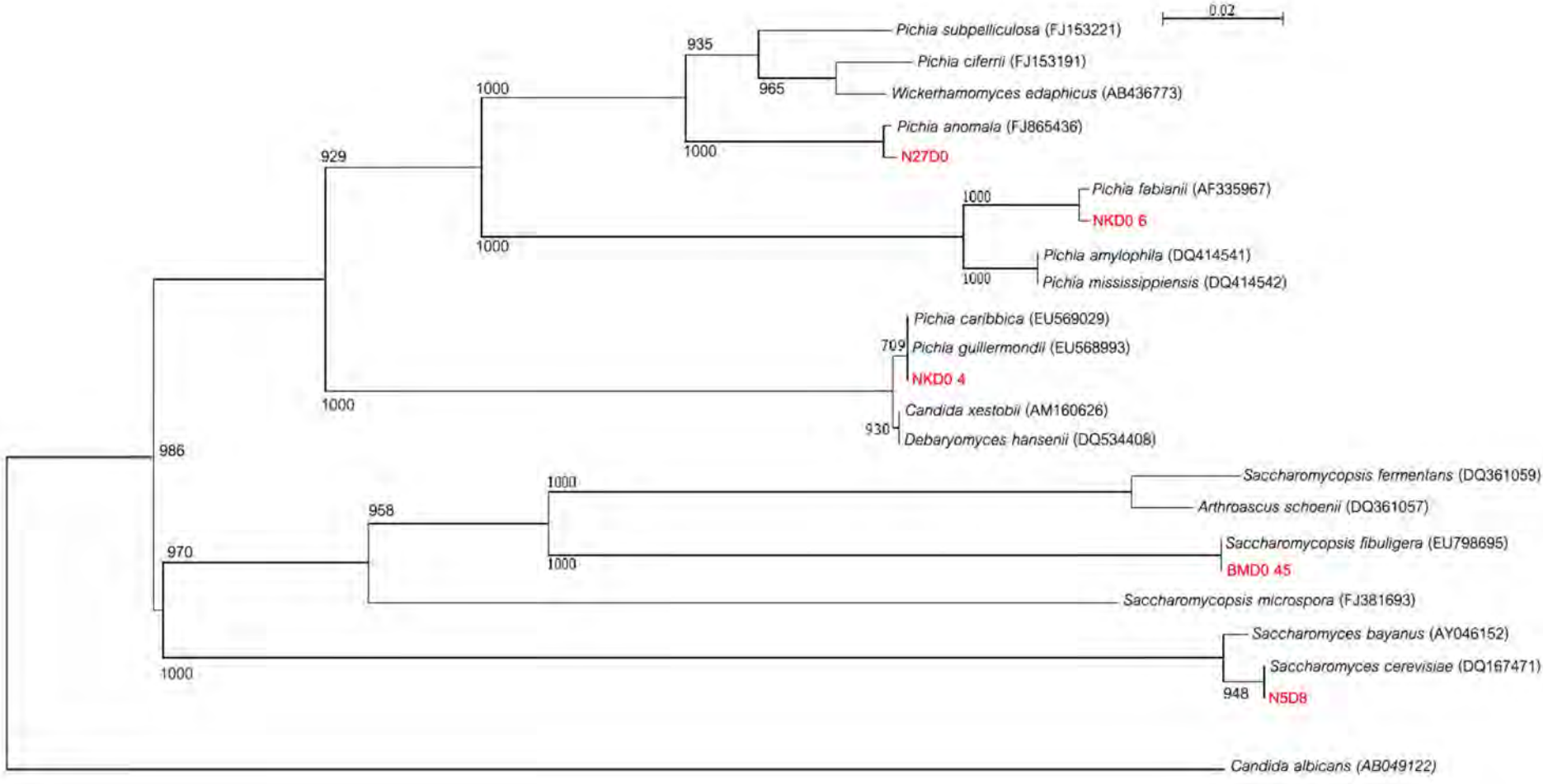
* %similarity= ร้อยละความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันในฐานข้อมูล

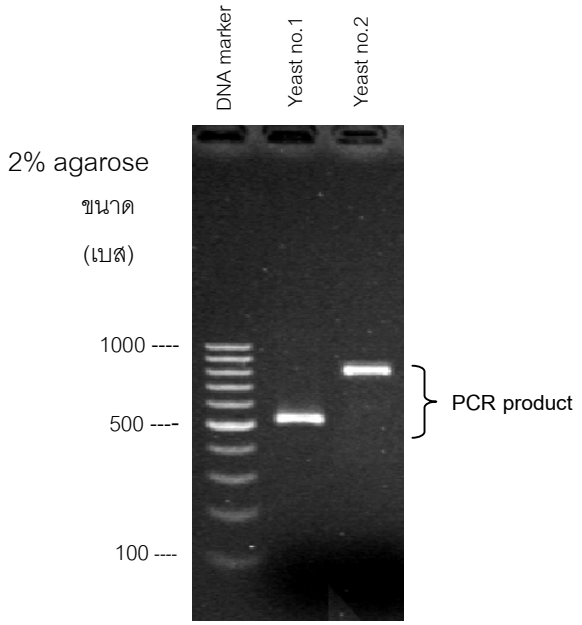
จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์ กลุ่มที่ 1 ถึงกลุ่มที่ 5 กับฐานข้อมูล Genbank พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Sm. fibuligera, P. caribbica, P. fabianii*, *P. anomala*, *S. cerevisiae* ตามลำดับ จากนั้นได้นำตัวแทนของยีสต์จากแต่ละกลุ่มไปทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยันผลการจำแนกต่อไป

ข. การยืนยันสายพันธุ์ยีสต์ที่ได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ซึ่งคัดแยกมาจากลูกแป้งสุราและสาโท จำนวน 2 สายพันธุ์

การยืนยันสายพันธุ์ยีสต์ 2 สายพันธุ์ที่ได้รับจาก วว. โดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล เริ่มจากขั้นตอนการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์ หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอในช่วง ITS rDNA มาเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอของยีสต์แสดงดังภาพที่ 4.7 และแสดงขนาดของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในตารางที่ 4.7

ภาพที่ 4.6 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของตัวแทนยีสต์ 5 กลุ่ม





ภาพที่ 4.7 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์ 2 สายพันธุ์ (Yeast no. 1 คือ *C. krusei* TISTR5259 และ Yeast no. 2 คือ *S. cerevisiae* TISTR5161)

ตารางที่ 4.7 ผลของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์ 2 สายพันธุ์

สายพันธุ์ยีสต์	ขนาดของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (เบส) *
C. krusei TISTR5259	540
S. cerevisiae TISTR5161	880

* ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้คำนวณจากโปรแกรม Quantity one จากเครื่อง Gel doc (Bio-rad, USA)

ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่ามีขนาด 540 และ 880 เบส เพื่อการจำแนกชนิดของยีสต์ต่อไปโดยวิธีทางชีวเคมีควบคู่กับนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำไปเปรียบเทียบร้อยละความคล้าย (% Similarity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันของยีสต์ที่มีในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งผลการจำแนกชนิดของยีสต์แสดงดังตารางที่ 4.8 พบว่า ยีสต์รหัส TISTR5259 มีร้อยละความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับสายพันธุ์ *I. orientalis* เท่ากับ 100 และยีสต์รหัส TISTR5161 มีร้อยละความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับสายพันธุ์ *S. cerevisiae* เท่ากับ 100

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์ ได้นำยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ไปทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยันผลการจำแนกต่อไป

ตารางที่ 4.8 การจำแนกชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันในฐานข้อมูลใน GenBank

ชนิดของยีสต์	%similarity*
I. orientalis	100
S. cerevisiae	100

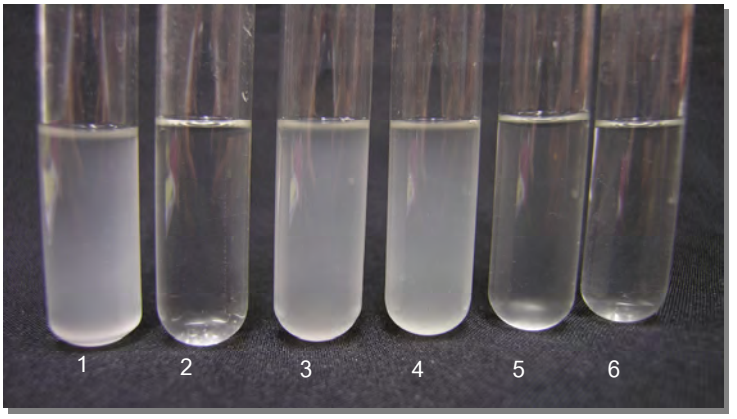
* %similarity = ร้อยละความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันในฐานข้อมูล

4.1.2.2 การจำแนกยีสต์โดยวิธีทางชีวเคมี

การจำแนกชนิดของยีสต์ตัวแทนกลุ่มยีสต์ 5 กลุ่ม (ตารางที่ 4.5) และ ยีสต์ที่ได้รับจาก วว. ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยใช้ลักษณะทางชีวเคมีเป็นการศึกษารูปแบบการใช้แหล่งอาหารคาร์บอน (Carbon assimilation) และรูปแบบการหมัก แหล่งคาร์บอนที่ใช้ศึกษาจำนวน 8 ชนิด ดังนี้ กลูโคส กาแลกโตส ไซโรส แรมโนส ซูโครส ซูโคส มอลโทส แมนนิทอล และอินโนสิทอล การศึกษารูปแบบการหมัก (Fermentation) โดยใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดคือ กลูโคส และ ไซโรส ทั้งนี้การทดสอบต่างๆ จะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิด ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.9 และภาพที่ 4.8 และ 4.9

จากตารางที่ 4.8 พบว่า ตัวแทนยีสต์ในกลุ่มที่ 1 2 3 4 5 ยีสต์ที่ได้รับจาก วว. รหัสที่ 1 และ 2 มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน และการหมัก เหมือนกับยีสต์สายพันธุ์ *Sm. fibuligera P. caribbica P. fabianii P. anomala S. cerevisiae I. orientalis* และ *S. cerevisiae* ตามลำดับ

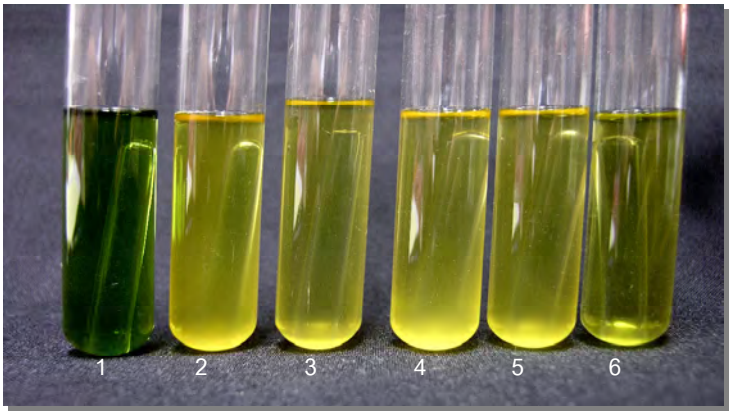
จากตารางที่ 4.5 4.7 และ 4.8 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของตัวแทนยีสต์ทั้ง 5 กลุ่ม ไปเสนอใน G enbank เพื่อให้ได้ ascession mumber ทำให้สามารถระบุชื่อของตัวแทนยีสต์ทั้ง 5 กลุ่มและยีสต์ที่ได้รับจาก วว. รหัสที่ 1 และ 2 ได้ว่าเป็น *Sm. fibuligera* BMD0 (HQ677911) *P. caribbica* NKD04 (HQ677912) *P. fabianii* BMD06 (HQ677913) *P. anomala* N27D0 (HQ677914) *S. Cerevisiae* N5D8 (HQ677915) *I. orientalis* TISTR5259 และ *S. cerevisiae* TISTR5161 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.8 ตัวอย่างการศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน ของ *P. fabianii*

1 = กลูโคส 2 = กาแลคโตส 3 = ไซโรส

4 = ซูโครส 5 = มอลโตส 6 = อินโนซิทอล



ภาพที่ 4.9 ตัวอย่างการศึกษาความสามารถในการหมักของตัวแทนยีสต์ 5 กุล่ม โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

1 = ไม่มีการเติมยีสต์ 2 = ยีสต์กลุ่ม 1 3 = ยีสต์กลุ่ม 2

4 = ยีสต์กลุ่ม 3 5 = ยีสต์กลุ่ม 4 6 = ยีสต์กลุ่ม 5

ตารางที่ 4.9 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์โดยใช้ลักษณะทางชีวเคมี (อ้างอิงตาม Barnett และคณะ, 1999)

รหัส	การใช้แหล่งคาร์บอน								การหมัก	
	กลูโคส	กาแลคโทส	ไซโลส	แรมโนส	ซูโครส	มอลโทส	แมนนิทอล	อินโนสิทอล	กลูโคส	ไซโลส
กลุ่ม 1	+	+	-	-	N	+	N	N	+	N
*Sm. fibuligera**	+	-	-	-	v	+	v	v	v	N
กลุ่ม 2	+	+	N	N	+	N	+	N	+	+
*P. caribbica**	+	+	N	v	+	v	+	N	v	+
กลุ่ม 3	+	-	+	-	+	+	+	-	+	N
*P. fabianii**	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
กลุ่ม 4	+	N	N	-	+	N	+	-	+	N
*P. anomala**	+	v	v	-	+	v	+	-	+	-
กลุ่ม 5	+	N	-	-	N	N	N	-	+	N
*S. cerevisiae**	+	v	-	-	v	v	v	-	+	-
ยีสต์วว. 1	+	-	N	-	-	+	-	-	+	-
*C. krusei**	+	+	v	-	+	+	+	-	+	N
*I. orientalis**	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
ยีสต์วว. 2	+	N	-	-	N	N	N	-	+	N
*S. cerevisiae**	+	v	-	-	v	v	v	-	+	-

* แสดงเฉพาะลักษณะทางชีวเคมีที่สามารถแยกความแตกต่างของสปีชีส์

N ไม่มีข้อมูล, D ติดตามผลนานเกิน 7 วัน, - ไม่สามารถเจริญได้, + สามารถเจริญได้ และ v สามารถเจริญหรือไม่สามารถเจริญได้

ยีสต์วว.1 คือ ยีสต์รหัส TISTR5259 ยีสต์วว. 2 คือ ยีสต์รหัส TISTR5161

4.2 การคัดเลือกตัวแทนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* จำนวน 5 สายพันธุ์ ทีมีความสามารถในการผลิตสาโทที่มีกลีนรสทีดี

เนืองจากในการทดลองนีต้องการคัดเลือกตัวแทนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* จำนวน 5 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตสาโทที่มีกลีนรสดี ด้วยเหตุนีจึงผลิตสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมระหว่างรา 2 สายพันธุ์คือ *M. hiemalis* NN609 (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) และ *R. microsporus* NN505 ในทุกชุดการทดลอง และแปรผันชนิดของยีสต์แต่ละชนิดในแต่ละชุดการทดลองในปริมาณที่เท่ากัน หมักตามวิธีที 3.3.2.1 หลังจากนันเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์องค์ประกอบด้านต่างๆ ดังนี

4.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของสาโทที่หมักได้

การวิเคราะห์ ความเป็นกรด – เบส ปริมาณกรดโดยรวม ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ ร้อยละเอทานอล ซึงได้ผลดังแสดงในตารางที 4.10

ค่าความเป็นกรด – เบส ในสาโทมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (มนตรี เชาว์สังเกต, 2521) ค่าความเป็นกรด - เบสและค่าปริมาณกรดรวมของสาโทที่เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์มีค่าอยู่ระหว่าง 3.40 - 4.70 และ 0.29 – 0.93 ตามลำดับ (มนตรี เชาว์สังเกต, 2521) จากผลการวิเคราะห์ความเป็นกรด - เบส และปริมาณกรดรวม พบว่า ผลของความเป็นกรดเบส และปริมาณกรดโดยรวมของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมันร้อยละ 95 (p<0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (น้ำหมักที่ไม่มีการเติมยีสต์ลงไป) โดยค่าความเป็นกรด - เบส มีค่าอยู่ในช่วง 3.3 – 3.7 และค่าปริมาณกรดโดยรวมมีค่าระหว่าง 0.34 - 0.59 โดยพบว่าสาโทที่มีค่า pH ตำ จะมีปริมาณกรดโดยรวมสูง

หลังจากการเติมน้ำในวันที่สามของการหมักได้เกิดกระบวนการเปลียนน้ำตาลรีดิวซ์ไปเป็นแอลกอฮอล์ ซึงเกิดจากการทำงานของยีสต์ เมื่อระยะเวลาในการหมักเพิมขึน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลง ในทางกลับกันปริมาณแอลกอฮอล์จะเพิมขึนตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่า สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมันร้อยละ 95 (p<0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ส่วนผลของร้อยละเอทานอล พบว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมยีสต์ทุกสายพันธุ์ยกเว้นสายพันธุ์ BMD8 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม พบว่า สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการเติมยีสต์สายพันธุ์ BMD8 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คือ 182.60 มก./มล. แต่ปริมาณเอทานอลที่พบมีค่าตำสุด คือ ร้อยละ 3.73 ส่วนสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR5161 มีปริมาณ

น้ำตาลรีดิวซ์ต่ำที่สุด เท่ากับ 1.22 มก./มล. กลับพบว่ามีปริมาณเอทานอลสูงสุดคือ ร้อยละ 8.46 เห็นได้ว่า ยีสต์สายพันธุ์ BMD8 มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลได้น้อยที่สุด ในขณะที่ ยีสต์สายพันธุ์ TISTR5161 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลและเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4.10 ผลของการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างสาโท ที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์

เชื้อบริสุทธิ์ผสม		**ความเป็นกรด - เบส**	**ปริมาณกรดโดยรวม**	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.)**	**ร้อยละเอทานอล** (v/v)
รา	**ยีสต์**				
รา1+รา2[a]	N5D8	3.7 ± 0.0*	0.38 ± 0.02*	3.91 ± 0.36*	7.29 ± 0.50*
รา1+รา2[a]	NP101D8	3.7 ± 0.0*	0.34 ± 0.02*	1.56 ± 0.02*	8.20 ± 0.60*
รา1+รา2[a]	TISTR5161	3.7 ± 0.0*	0.37 ± 0.03*	1.22 ± 0.04*	8.46 ± 0.63*
รา1+รา2[a]	BMD8	3.6 ± 0.1*	0.52 ± 0.02*	182.60 ± 1.29*	3.73 ± 0.55
รา1+รา2[a]	493 EDV	3.6 ± 0.0*	0.49 ± 0.02*	78.49 ± 1.79*	4.84 ± 0.01*
รา1+รา2[a, b]	-[C]	3.3 ± 0.0	0.59 ± 0.04	109.62 ± 4.82	3.29 ± 0.36

* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

[a] หมายถึง รา 2 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง รา1 คือ *M. hiemalis* NN609 และ รา 2 คือ *R. microsporus* NN505

[b] คือ ชุดควบคุม

[C] คือ ไม่มีการเติมยีสต์

4.2.2 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory test) ในสาโท

นำสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมชุดต่างๆ ไปทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิมโดยผู้ทดสอบที่มีความคุ้นเคยและเชี่ยวชาญทางด้านการชิมไวน์และสาโทระดับชาติ จำนวน 10 คน ให้คะแนนในใบคะแนนและวิธีการให้คะแนน (ภาคผนวก ค) ซึ่งแบ่งเกณฑ์การให้คะแนนออกเป็นสี่ด้านคือ สี กลิน รส และการยอมรับ คะแนนที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชั่น 17.0 ในการทดสอบนี้ ผู้วิจัยใช้สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมยีสต์ *S. cerevisiae* 493 EDV ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์การค้าเป็นชุดควบคุมแทนการใช้ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมยีสต์ เนื่องจากในชุดควบคุมที่เติมเฉพาะราบริสุทธิ์เพียงแค่ 2 สายพันธุ์โดยไม่มีการเติมยีสต์จะขาดคุณลักษณะของความเป็นสาโท ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะนำมาทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 คะแนนของผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์

เชื้อบริสุทธิ์ผสม		**คะแนน**				**คะแนนรวม (100)**
รา	**ยีสต์**	**สี** (10)	**กลิน** (30)	**รส** (40)	**การยอมรับ** (20)	
ร1+ร2[a]	N5D8	7.9 ± 0.7	22.0 ± 2.5	30.1 ± 5.8	15.3 ± 2.5	75.3 ± 10.5
ร1+ร2[a]	NP101D8	8.0 ± 0.6	22.2 ± 2.4	27.9 ± 4.9	14.3 ± 3.1	72.3 ± 9.5
ร1+ร2[a]	TISTR 5161	7.9 ± 0.6	20.4 ± 2.5	28.1 ± 5.0	14.5 ± 3.0	70.9 ± 9.3
ร1+ร2[a]	BMD8	7.0 ± 1.5*	20.6± 3.8	31.1 ± 3.1	15.4 ± 2.0	74.1 ± 7.3
ร1+ร2 [a, b]	493 EDV	7.9 ± 0.7	22.7 ± 1.6	28.7 ± 4.6	15.4 ± 2.5	74.7 ± 7.1

* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

[a] หมายถึง รา 2 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง ร1 คือ *M. hiemalis* NN609 และ รา 2 คือ *R. Microsporus* NN505

[b] คือ ชุดควบคุม

จากตารางที่ 4.11 พบว่า คะแนนของการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านกลิน รส การยอมรับ และคะแนนโดยรวมของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p>0.05) เมื่อเทียบกับสาโทชุดควบคุม สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการเติมยีสต์สายพันธุ์ N5D8 มีคะแนนเฉลี่ยโดยรวมมากที่สุดคือ 75.3 คะแนน ซึ่งมีค่ามากกว่าชุดควบคุม รองลงมาคือ สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมยีสต์สายพันธุ์ BMD8 และ NP101D8 ด้วยคะแนน 74.1 และ 72.3 ตามลำดับ ซึ่งคะแนนที่ได้มีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (74.7 คะแนน) คุณภาพสาโทที่ได้จัดอยู่ในเกณฑ์ที่ดี เมื่อพิจารณาคะแนนในด้านกลิน พบว่าสาโทที่ผลิตโดยการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 4 สายพันธุ์มีคะแนนด้านกลินน้อยกว่าในชุดควบคุม (28.7 คะแนน) สาโทที่เติมยีสต์สายพันธุ์ NP101D8 และ N5D8 มีคะแนนสูงสุด มีค่า 22.2 และ 22.1 ตามลำดับ จัดเป็นสาโทที่มีกลินผลไม้หรือวัตถุดิบในสาโทแรง เป็นที่ยอมรับของผู้เชียวชาญ ด้านรสชาติพบว่าสาโทที่ผลิตจากการเติมยีสต์สายพันธุ์ BMD8 ได้รับคะแนนมากที่สุด รองลงมาคือสาโทที่ผลิตโดยเติมยีสต์สายพันธุ์ N5D8 มีค่า 31.1 และ 30.0 คะแนน ตามลำดับ จัดเป็นสาโทที่มีรสชาติดี เป็นที่ชื่นชอบของผู้เชี่ยวชาญ

4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิน (Volatile compounds) ในสาโท

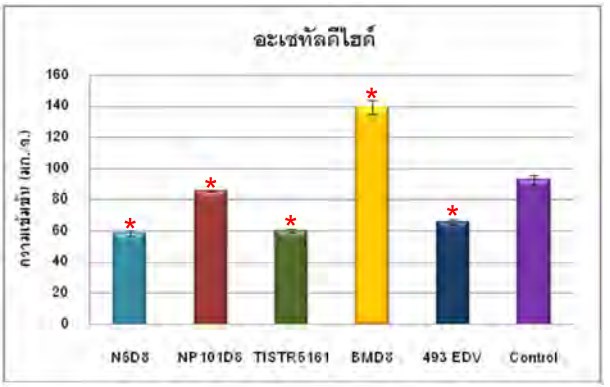
สารประกอบให้กลินที่มีบทบาทสำคัญในไวน์องุ่นได้แก่ สารในกลุ่มฟุเซลแอลกอฮอล์และ

เอสเทอร์ ซึ่งถูกสร้างโดยยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมัก ปริมาณและชนิดของสารที่พบจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ภาวะในการหมัก สายพันธุ์ยีสต์ วัตถุดิบ เป็นต้น (Valero และคณะ, 2002)

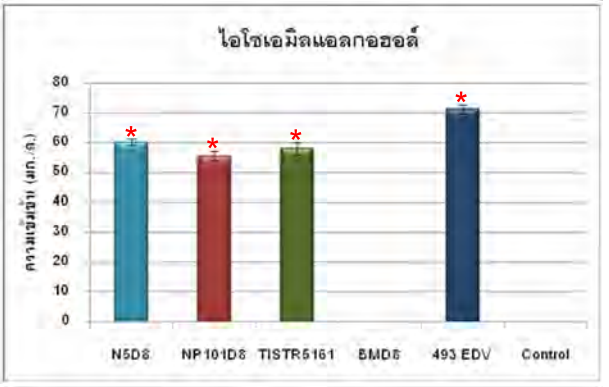
จากการทดลองเมื่อวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบให้กลินโดยใช้วิธีเก็บตัวอย่างบริเวณช่องว่างเหนือสาร (headspace) แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC - FID พบว่า ปริมาณสารประกอบให้กลินที่ตรวจพบจากตัวอย่างสาโทมีความแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณสารที่พบซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของยีสต์ที่ใช้ผลิต สารประกอบให้กลินหลักที่พบในการทดลองนี้มีอย่างน้อย 10 ชนิด เช่น อะซิทัลดีไฮด์ สารในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ ได้แก่ ไอโซบิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอออล์ 1 - โพรพานอล ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ และสารในกลุ่มเอสเทอร์ได้แก่ เอทิลแอซีเทต เอทิลออกทาโนเอท เอทิลเดคาโนเอท 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต เป็นต้น ในชุดควบคุม (น้ำหมักที่ไม่มีการเติมยีสต์ลงไปมีเพียงรา 2 สายพันธุ์เท่านั้น) พบสารประกอบให้กลิน 5 ชนิดคือ อะเซทัลทัลดีไฮด์ เอทิลแอซีเทต กรดอะซิติก เอทิลเดคาโนเอต และ 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต ส่วนสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* แต่ละสายพันธุ์ลงไป พบว่าสารประกอบให้กลินในสาโทส่วนใหญ่มีจำนวนชนิดมากกว่าที่พบในชุดควบคุม ยกเว้นสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* BMD8 พบสารประกอบให้กลินเพียง 4 ชนิดเท่านั้น ปริมาณของอะเซทัลดีไฮด์สารในกลุ่มฟูเซลแอลกอออล์และเอสเทอร์แสดงดังภาพที่ 4.10 และ 4.11

อะเซทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) คือผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการย่อยน้ำตาลในระหว่างกระบวนการไกลโคไลซีส (Mateos และคณะ, 2006) สารนี้เป็นสารประกอบให้กลินที่สำคัญในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์หลายชนิดเช่น เบียร์ ไวน์แดง ไวน์ขาว บรันดี และ สาเก เป็นต้น ซึ่งปริมาณที่พบจะแตกต่างกัน เช่นในไวน์แดง พบปริมาณ 4 - 212 มก./ล. สาเก พบในปริมาณ 15 - 60 มก./ล. (Liu และคณะ, 2000) มีรายงานถึงอิทธิพลของปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ต่อเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ว่าถ้าความเข้มข้นของอะเซทัลดีไฮด์ต่ำจะให้กลินดีในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เช่น กลินผลไม้ แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าความเข้มข้นสูงเกิน 100 – 120 มก./ล. จะส่งผลทำให้เกิดกลินที่ไม่ดี เช่น กลินเหม็นเขียว หรือกลินเหม็นหืน ในเบียร์ และไวน์ เป็นต้น (Liu และคณะ, 2000) จากการทดลองนี้พบว่า (ภาพที่ 4.10 ก) สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 5 สายพันธุ์มีปริมาณอะเซทัลดีไฮด์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาโทในชุดควบคุม ($p<0.05$) สาโทที่ผลิตจากเชื้อ *S. cerevisiae* BMD8 มีปริมาณอะเซทัลดีไฮด์สูงกว่าในชุดควบคุม โดยมีค่าเท่ากับ 139.58 มก./ล. อะเซทัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นในระดับดังกล่าวทำให้เกิดกลินที่ไม่ดีแก่สาโท

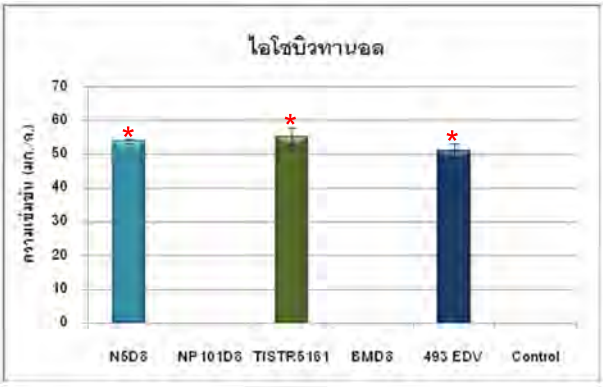
ก)



ข)



ค)



ง)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมโดยไม่มีการเติมยีสต์ (p<0.05)

ภาพที่ 4.10 ปริมาณอะเซทัลดีไอด์และสารกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากการแปรผัน *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์ ก) ปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ ข) ปริมาณ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ค) ปริมาณไอโซบิวทานอล ง) ปริมาณฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์

ปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์

ฟูเซลแอลกอฮอล์เป็นสารประกอบให้กลิ่นที่สำคัญในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ซึ่งระดับความเข้มข้นของสารกลุ่มนี้จะส่งผลต่อกลิ่นรสในเครื่องดื่มแอลกอออล์ โดยพบว่าผลรวมของสารฟูเซลแอลกอออล์ที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่า 300 มก./ล. จะส่งผลทำให้เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดนั้นมีกลิ่นที่ดี ซับซ้อน แต่ถ้าปริมาณมากกว่า 400 มก./ล. จะทำให้เกิดกลิ่นไม่ดีและกลบกลิ่นที่ดีของสารให้กลิ่นชนิดอื่น (Swiegers และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าฟูเซลแอลกอฮอล์ยังมีบทบาททางอ้อมในการพัฒนากลิ่นหอมของไวน์ โดยจะเกิดปฏิกิริยากับกรดอินทรีย์ทำให้เกิดสารกลุ่มเอสเทอร์ขึ้นในระหว่างขบวนการหมักโดยยีสต์ (Jackson, 2000) ในการทดลองนี้พบสารประกอบในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ที่สำคัญดังนี้ ไอโซเอมิลแอลกอออล์ ไอโซบิวทานอล และฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์

ไอโซเอมิลแอลกอออล์ (Isoamyl alcohol) เป็นฟูเซลแอลกอออล์ที่ให้กลิ่นผลไม้ (Sirisantimethakom และคณะ, 2008) จากการทดลองพบว่าปริมาณที่พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* N5D8 NP101D8 493 EDV และ TISTR5161 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาโทในชุดควบคุม (ไม่มีการเติมยีสต์) (p<0.05) ความเข้มข้นที่พบคือ 55.55 – 71.42 มก./ล. (ภาพที่ 4.10 ข) แต่ไม่พบสารนี้ในตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* BMD8

ไอโซบิวทานอล (Isobutanol) เป็นฟูเซลแอลกอออล์ที่ให้กลิ่นตัวทำละลายหรือน้ำยาทาเล็บ (Peinado และคณะ, 2004) จากการทดลองพบว่าปริมาณที่พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* N5D8 493 EDV และ TISTR5161 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาโทในชุดควบคุม (p<0.05) ความเข้มข้นที่พบคือ 53.84 51.10 และ 55.27 มก./ล. ตามลำดับ (ภาพที 4.10 ค)

ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ (Phenylethyl alcohol) เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ที่ให้กลิ่นดอกไม้และน้ำผึ้ง (Torrens และคณะ, 2008) จากผลการทดลองพบสารประกอบนี้ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 เท่านั้น ที่ระดับความเข้มข้น 137.04 มก./ล. (ภาพที 4.10 ง)

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์ในสาโทมีหลายปัจจัย เช่น กระบวนการหมัก สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่อยู่ในลูกแป้งสุรา และวัตถุดิบที่ใช้ เป็นต้น (นริสา ตรีเนตร, 2550 อำภา หลวงคล้ายโพธิ์, 2552 และกุณฑลี ไกรธรรมจิตกุล, 2547) จากผลการทดลองนี้พบว่าสายพันธุ์ของยีสต์มีผลต่อการผลิตสารในกลุ่มฟูเซลแอลกอออล์ในปริมาณที่ต่างกัน ปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์โดยรวมในทุกชุดการทดลองมีปริมาณอยู่ในช่วง 113.38 – 192.59 มก./ล. (ตารางที 4.12)

ปริมาณดังกล่าวอยู่ในระดับต่ำกว่าที่กำหนด ดังนั้นระดับฟูเซลแอลกอออล์ที่เกิดขึ้นจึงส่งผลให้เกิดกลีนทีดีในสาโท

ตารางที่ 4.12 ปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์และเอสเทอร์โดยรวมของตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์

เชื้อบริสุทธิ์ผสม		**ปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์โดยรวม (มก./ล.)**	**ปริมาณเอสเทอร์โดยรวม (มก./ล.)**
รา	**ยีสต์**		
รา1+รา2[a]	N5D8	114.02	223.29
รา1+รา2[a]	NP101D8	192.59	243.12
รา1+รา2[a]	TISTR 5161	113.38	180.18
รา1+รา2[a]	493 EDV	122.52	182.87
รา1+รา2[a]	BMD8	ND	82.17
รา1+รา2[a,b]	-	ND	101.51

[a] หมายถึง รา 2 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง รา1 คือ *M. hiemalis* NN609 และ รา 2 คือ *R. microsporus* NN505

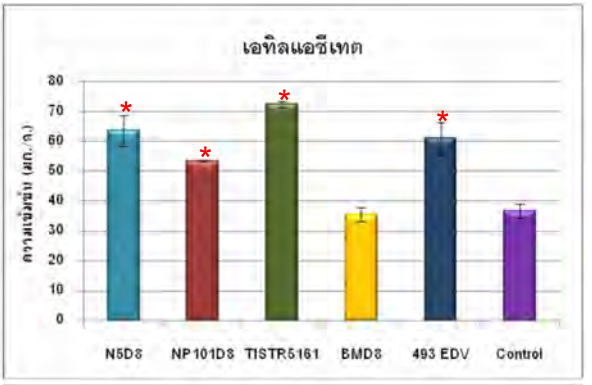
[b] คือ ชุดควบคุม

ND คือ ไม่พบ

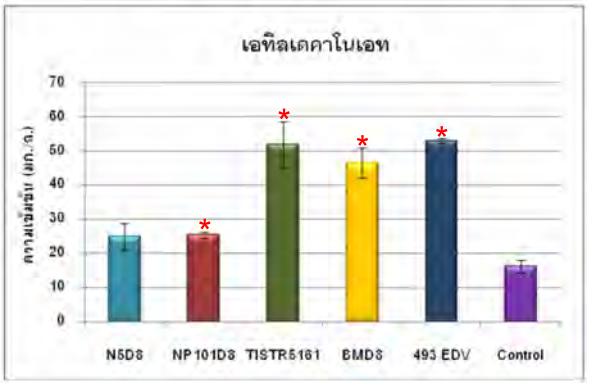
ปริมาณเอสเทอร์

เอสเทอร์ เป็นสารที่มีความสำคัญในการให้กลีนรสที่ดีในไวน์ เช่น กลีนผลไม้ กลีนดอกไม้ สารกลุ่มนี้ถูกสร้างโดยยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ (Romano และคณะ, 2003) ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเอสเทอร์ ได้แก่ วัตถุดิบที่ใช้และสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการหมัก (Rojas และคณะ, 2003) เอสเทอร์ที่ถูกตรวจพบในไวน์มีทั้งที่สามารถระบุชนิดได้และมีทั้งที่มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถระบุได้ ซึ่งเอสเทอร์ที่มีปริมาณเท่ากับหรือมากกว่าระดับ threshold นั้นจะให้กลีนผลไม้ซึ่งมีความสำคัญยิ่งต่อกลีนรสของไวน์ ในการทดลองนี้พบสารประกอบในกลุ่มเอสเทอร์ที่สำคัญได้แก่ เอทิลแอซีเทต เอทิลเดคาโนเอท เอทิลออกทาโนเอท และ 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต ซึ่งแสดงในภาพที่ 4.11

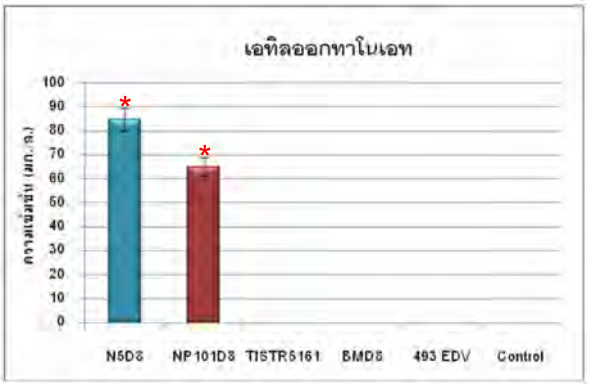
ก)



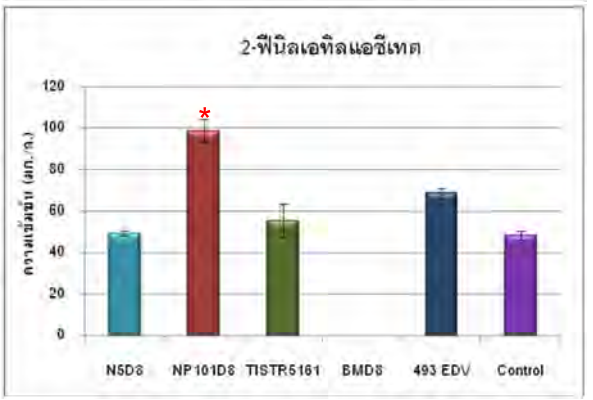
ข)



ค)



ง)



* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสาโทที่ผลิตโดยไม่เติมเชื้อบริสุทธิ์ผสม ($p<0.05$)

ภาพที่ 4.11 ประมาณสารกลุ่มเอสเทอร์ที่พบในตัวอย่างสาโทที่ผลิตโดยการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์ ก) ปริมาณเอทิลแอซีเทต ข) ปริมาณเอทิลเดคาโนเอท ค) ปริมาณเอทิลออกทาโนเอท ง) ปริมาณ 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต

เอทิลแอซีเทต (Ethyl acetate) เป็นเอสเทอร์ที่พบมากและให้กลิ่นที่สำคัญในไวน์ โดยให้กลิ่นผลไม้ กลิ่นสับปะรด (Peinado และคณะ 2004) สารกลุ่มนี้เกิดจากเอนไซม์จากยีสต์หรือแบคทีเรีย ได้แก่ เอนไซม์เอสเทอเรส ในไวน์ที่เพิ่งหมักเสร็จจะเกิดปฏิกิริยา เอสเทอริฟิเคชั้น และทรานเอสเทอริฟิเคชั้น โดยมีกรดแอซีติกและเอทานอลเป็นสารตั้งต้น ถ้ามีในปริมาณที่ต่ำกว่า 80 มก./ล. จะให้กลิ่นที่น่าพอใจ แต่ถ้าปริมาณสูงเกิน 150 มก./ล.จะให้กลิ่นน้ำส้มสายชูซึ่งเป็นกลิ่นที่ไม่ดี (Mateos และคณะ, 2006) จากการทดลองพบว่าปริมาณ เอทิลแอซีเทต ที่พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 N5D8 493 EDV และ TISTR5161 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาโทในชุดควบคุม (p<0.05) ที่ปริมาณ 53.53 – 72.55 มก./ล. (ภาพที่ 4.11 ก)

เอทิลเดคาโนเอท หรือ เอทิลแคเพรท (Ethyl decanoate หรือ Ethyl caprate) เป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้ องุ่น และบรั่นดีในไวน์ (Peinado และคณะ, 2004) จากการทดลองพบสารนี้ในทุกชุดการทดลอง ซึ่งปริมาณที่พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการแปรผันยีสต์ *S . cerevisiae* NP101D8 N5D8 493 EDV และ TISTR5161 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาโทในชุดควบคุม (p<0.05) ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* 493 EDV พบว่ามีปริมาณเอทิลเดคาโนเอทสูงที่สุด ในปริมาณ 53.08 มก./ล.(ภาพที่ 4.11 ข)

เอทิลออกทาโนเอท หรือ เอทิลแคไพเรท (Ethyl octanoate หรือ Ethyl capyrate) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันขนาดกลาง (C_6 - C_{10}) ให้กลิ่นคล้ายแอปเปิ้ล (Lilly และคณะ, 2000) จากการทดลองพบว่า สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 และ N5D8 เท่านั้นที่พบสารนี้ในระดับความเข้มข้น 65.17 และ 84.95 มก./ล. ตามลำดับ (ภาพที่ 4.11 ค)

2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต (2 - Phenylethyl acetate) เป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้หรือกลิ่นหอมของดอกไม้ (Lilly และคณะ, 2000) จากการทดลองพบว่าปริมาณ 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต ที่พบในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 N5D8 493 EDV และ TISTR5161 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาโทในชุดควบคุม (p<0.05) โดยพบในปริมาณ 98.97 – 49.68 มก./ล. (ภาพที่ 4.11 ง)

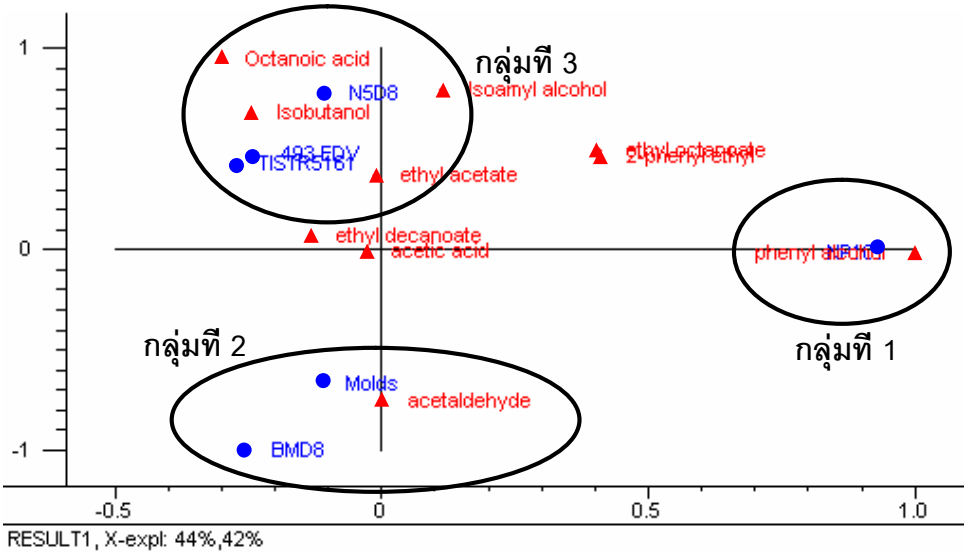
จากผลการทดลองพบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มของฟูเซลแอลกอออล์และเอสเทอร์แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.12) จากผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ศึกษาอิทธิพลของ *S. cerevisiae* ในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์และเอสเทอร์ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เช่น ไวน์ (Iranzo

และคณะ, 2000 และ Mateos และคณะ, 2006) และสุรากลั่นของประเทศบลาซิล (Cachaca) (Gomes และคณะ, 2007 และ Oliveira และคณะ, 2005) เป็นต้น

4.2.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เพื่อศึกษาบทบาทของยีสต์ *S. cerevisiae* จำนวน 5 สายพันธุ์ในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในสาโทและหาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของยีสต์กับความสามารถในการผลิตสารประกอบให้กลิ่น จึงได้นำข้อมูลของสารประกอบให้กลิ่นที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC - FID มาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Principal Component Analysis (PCA) ซึ่งสามารถแสดง ดังภาพที่ 4.12

ภาพที่ 4.12 กราฟ biplot แสดงความสัมพันธ์ของยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ กับความสามารถในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในตัวอย่างสาโท



หมายเหตุ : Molds: ตัวอย่างนำหมักที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมระหว่างรา 2 ชนิดเท่านั้น ไม่มีการเติมยีสต์ลงไป (ชุดควบคุม)

จากภาพที่ 4.12 พบว่ามี 2 องค์ประกอบ และสามารถอธิบายความแปรปรวนรวมได้ 86% ซึ่งองค์ประกอบที่ 1 (PC1) และ องค์ประกอบที่ 2 (PC2) สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 44% และ 42 % ตามลำดับ จากองค์ประกอบทั้งสองสามารถแบ่งกลุ่มตามความสัมพันธ์ได้เป็น 3 กลุ่มอย่างชัดเจนดังนี้

กลุ่มที 1: NP101D8 มีความสัมพันธ์อย่างสูงต่อการผลิตสารฟีนิลแอลกอฮอล์

กลุ่มที 2: BMD8 และ molds มีความสัมพันธ์อย่างสูงต่อการผลิตสารอะเซทัลดีไฮด์

กลุ่มที 3: TISTR5161 493 EDV และ N5D8 มีความสัมพันธ์อย่างสูงต่อการผลิตกรดออกทาโนอิค ไอโซบิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และเอทิลแอซีเทต ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์ทางด้านองค์ประกอบทางเคมี สารประกอบให้กลิน รวมถึงการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* BMD8 เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลในระดับต่ำ ทำให้สาโทที่ได้มีรสหวานกว่าตัวอย่างสาโทอื่นๆ ส่งผลให้สาโทที่ผลิตจากการเติมสายพันธุ์นี้ได้รับคะแนนทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติสูงที่สุด แต่พบว่าคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลินต่ำเนื่องจากสาโทที่ผลิตจากการเติมยีสต์ BMD8 มีปริมาณของอะเซทัลดีไฮด์ในระดับสูงทำให้เกิดกลินฉุนที่ไม่ดี อีกทั้งระดับสารประกอบให้กลินในกลุ่มเอสเทอร์และกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบมีระดับต่ำ ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์ BMD8 จึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการผลิตสาโท ส่วนยีสต์ 2 สายพันธุ์คือ N5D8 และ NP101D8 เป็นยีสต์ที่มีลักษณะที่ดีเหมาะสำหรับการนำไปใช้ผลิตสาโท เนื่องจากยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้คะแนนการทดสอบด้านประสาทสัมผัสทั้งด้านกลิน รสและการยอมรับสูง (จากตารางที่ 4.11) อีกทั้งยังมีร้อยละของเอทานอลสูง (จากตารางที่ 4.10) รวมทั้งมีความสามารถในการผลิตสารประกอบให้กลินโดยเฉพาะอย่างยิงในกลุ่มเอสเทอร์ และกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ ซึงเป็นสารประกอบให้กลินที่มีอิทธิพลต่อกลินรสของสาโทได้เป็นจำนวนมากกว่าสายพันธุ์ทางการค้า 493 EDV (จากตารางที่ 4.12) โดยเฉพาะอย่างยิงยีสต์สายพันธุ์ NP101D8 มีบทบาทเด่นในการผลิตสารประกอบให้กลินที่เป็นเอกลักษณ์แตกต่างจากยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า กล่าวคือสามารถผลิตฟีนิลแอลกอฮอล์ และ 2 – ฟีนิลเอทิลแอซีเทตในระดับสูง ซึงสารทั้งสองชนิดนี้มีความสำคัญมากในไวน์เนื่องจากเป็นสารที่ให้กลินดี ซึงระดับที่พบส่งผลให้สาโทที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ NP101D8 ได้รับคะแนนการทดสอบด้านประสาทสัมผัสทั้งด้านกลินสูงที่สุด ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* NP101D8 จึงถูกคัดเลือกให้เป็นตัวแทนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* สำหรับใช้ในการผลิตสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมต่อไป

4.2.5 ตรวจสอบการปนเปื้อนของสาโทจากจุลินทรีย์อืน

ไม่พบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อืนที่ไม่ต้องการ (แสดงในภาคผนวก ง)

4.3 แปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์เพือให้ได้สาโทที่มีคุณภาพด้านกลินรสที่ดี

กระบวนการหมักสาโทจัดเป็น Multiparallel fermentation คือมีหลายปฏิกิริยาเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีซึงถือได้ว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อคุณภาพของสาโท ทำให้สาโทที่ได้มีรสชาติ กลิน สี และเนื้อสัมผัส ที่เป็นเอกลักษณ์ ยีสต์ชนิด non – *Saccharomyces* จัดว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีในระหว่างกระบวนการหมักสาโทโดยตรง ซึงยีสต์ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการผลิตสารให้กลิน ทำสาโทมีกลินรสที่ซับซ้อนยิงขึ้น ซึงถือเป็นข้อแตกต่างระหว่างสาโทกับสาเก เนื่องจากสาเกเป็นไวน์

ข้าวที่ใช้ยีสต์ในกระบวนการหมักเพียงชนิดเดียวคือสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ระหว่างกระการผลิตสาเกนั้นมีการควบคุมคุณภาพด้านกลีนรส โดยทำการหมักที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานาน แต่ในกระบวนการผลิตสาโทไม่นิยมหมักที่อุณหภูมิต่ำเนื่องจากสิ้นเปลืองต้นทุนในการผลิต ดังนั้นการพัฒนาคุณภาพสาโทจึงเน้นไปทางด้านการนำเอายีสต์ชนิด non – *Saccharomyces* มาช่วยพัฒนาด้านกลีนรสของสาโทให้ดียิงขึ้น การทดลองนี้จึงทำการศึกษาบทบาทของยีสต์ non - *Saccharomyces* รวมทั้งการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างยีสต์ทั้งสองกลุ่ม การทดลองนี้ทำการผลิตสาโทโดยเชื้อบริสุทธิ์ผสมของรา 2 สายพันธุ์คือ *M. hiemalis* NN609 (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) และ *R. microsporus* NN505 (ที่แยกและคัดเลือกได้จากการศึกษานี้) ในทุกชุดการทดลองและแปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์คือ *Sm. fibuligera* NP101 *P. anomala* NP101 และ *I. orientalis* TISTR5259 สาเหตุที่เลือกยีสต์ 3 สายพันธุ์นี้เป็นตัวแทนยีสต์ในกลุ่ม non – *Saccharomyces* เพื่อใช้ในการศึกษาบทบาทของการผลิตสารให้กลีนในสาโท เนื่องจากยีสต์สายพันธุ์ *Sm. fibuligera* NP101 และ *P. anomala* NP101 เป็นสายพันธุ์ที่พบมากในลูกแป้งสุราเกือบทุกชนิด (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550) อีกทั้งยังเคยมีรายงานบทบาทของการสร้างกลีนในไวน์ชนิดอื่นอีกด้วย (Rojas และคณะ, 2003) ส่วนยีสต์สายพันธุ์ *I. orientalis* เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการทนแอลกอฮอล์ในระดับสูงได้จึงสามารถเจริญอยู่ในระหว่างกระบวนการหมักสาโทได้นานกว่า non – *Saccharomyces* สายพันธุ์อื่นๆ (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550 และ อำภา หลวงคล้ายโพธิ์, 2552) ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์นี้จึงน่าจะมีบทบาทในการผลิตสารให้กลีนในสาโทได้เป็นจำนวนมาก ในการทดลองนี้เติมยีสต์ 3 สายพันธุ์แยกกันแต่ละชนิดลงไปจำนวน $2.5x10^3$ $5x10^3$ $1x10^4$ และ$2x10^4$cfu/ml ตามลำดับแล้วหมักตามวิธีที่ 3.3.4.1 หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์องค์ประกอบด้านต่างๆ ดังนี้

4.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของสาโทที่หมักได้

นำสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีได้แก่ ความเป็นกรด – เบส ปริมาณกรดโดยรวม ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และร้อยละเอทานอล ได้ผลแสดงในตารางที่ 4.13

ค่ากรด - เบสมีบทบาทสำคัญมากต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จากการทดลองนี้พบว่าความความเป็นกรด-เบสของทุกตัวอย่างสาโทไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (สาโทที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่ไม่เติมยีสต์ non - *Saccharomyces*) โดยค่าความเป็นกรด -เบส อยู่ในช่วง 3.7 - 3.8 ปริมาณกรดโดยรวมของสาโท

ที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *I. orientalis* TISTR5259 และ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *P. anomala* NP101 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และ1 ต่อ 2 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เมื่อพิจารณาพบว่าสาโทที่มีค่ากรด - เบสต่ำจะมีปริมาณกรดโดยรวมสูง

ตารางที่ 4.13 องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากการแปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์

เชื้อบริสุทธิ์ผสม		**อัตราส่วนปริมาณ NP101D8 ต่อ Non - *Saccharomyces***	**ความเป็นกรด - เบส**	**ปริมาณกรดโดยรวม**	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.)**	**ร้อยละเอทานอล (โดยปริมาณ)**
รา	**ยีสต์**					
รา1+รา2[a]	NP101D8 แปรผันกับ *I. orientalis*	1 ต่อ 0.5	3.7 ± 0.1	0.38 ± 0.02	2.87 ± 0.19*	6.51 ± 1.29
		1 ต่อ 1	3.7 ± 0.0	0.40 ± 0.02*	3.44 ± 0.26*	5.66 ± 0.51*
		1 ต่อ 2	3.7 ± 0.0	0.42 ± 0.02*	3.83 ± 0.12*	5.47 ± 0.71*
		1 ต่อ 4	3.7 ± 0.0	0.35 ± 0.02	4.20 ± 0.07*	4.85 ± 0.15*
รา1+รา2 [a]	NP101D8 แปรผันกับ *P. anomala*	1 ต่อ 0.5	3.8 ± 0.0	0.31± 0.03	2.55 ± 0.10*	6.64 ± 1.33
		1 ต่อ 1	3.8 ± 0.0	0.26 ± 0.01*	2.58 ± 0.10*	5.93 ± 0.48*
		1 ต่อ 2	3.8 ± 0.0	0.25 ± 0.03*	3.66 ± 0.14*	5.21 ± 0.34*
		1 ต่อ 4	3.8 ± 0.0	0.31 ± 0.02	4.41 ± 0.18*	4.71 ± 0.99*
รา1+รา2 [a]	NP101D8 แปรผันกับ *Sm. fibuligera*	1 ต่อ 0.5	3.7 ± 0.0	0.36 ± 0.01	2.91 ± 0.07*	6.46 ± 0.06
		1 ต่อ 1	3.8 ± 0.0	0.33 ± 0.03	3.36 ± 0.23*	5.91 ± 0.64*
		1 ต่อ 2	3.8 ± 0.0	0.34 ± 0.03	3.72 ± 0.10*	5.25 ± 0.15*
		1 ต่อ 4	3.8 ± 0.0	0.30± 0.02	4.56 ± 0.07*	4.55 ± 0.21*
รา1+รา2 [a, b]	NP101D8	1 ต่อ 0	3.7 ± 0.0	0.34 ± 0.02	1.49 ± 0.12	8.20 ± 0.60

* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

[a] หมายถึง รา 2 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง รา1 คือ *M. hiemalis* NN609 และ รา 2 คือ *R. microsporus* NN505

[b] คือ ชุดควบคุม

เมื่อพิจารณาผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ในทุกอัตราส่วนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05) เมื่อเทียบกับสาโทในชุดควบคุม นอกจากนี้ในการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* กับยีสต์ non – *Saccharomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ จะพบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 และต่ำสุดที่อัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 ส่วนผลของร้อยละเอทานอล พบว่าในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 1 ต่อ 2 และ 1 ต่อ 4 ในทุกชุด

การแปรผัน มีค่าร้อยละเอทานอลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เป็นที่น่าสังเกตว่าสาโทที่มีการเติมยีสต์ในกลุ่ม non - *Saccharomyces* จะพบปริมาณเอทานอลต่ำกว่าสาโทที่มีการเติมเฉพาะยีสต์ *S. cerevisiae* เท่านั้น และเมื่อจำนวน non - *Saccharomyces* เพิ่มมากขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้น ในทางกลับกันปริมาณเอทานอลจะลดลงตามลำดับ อัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 เป็นค่าที่ยีสต์มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลได้ดีที่สุด

4.3.2 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory test) ในสาโท

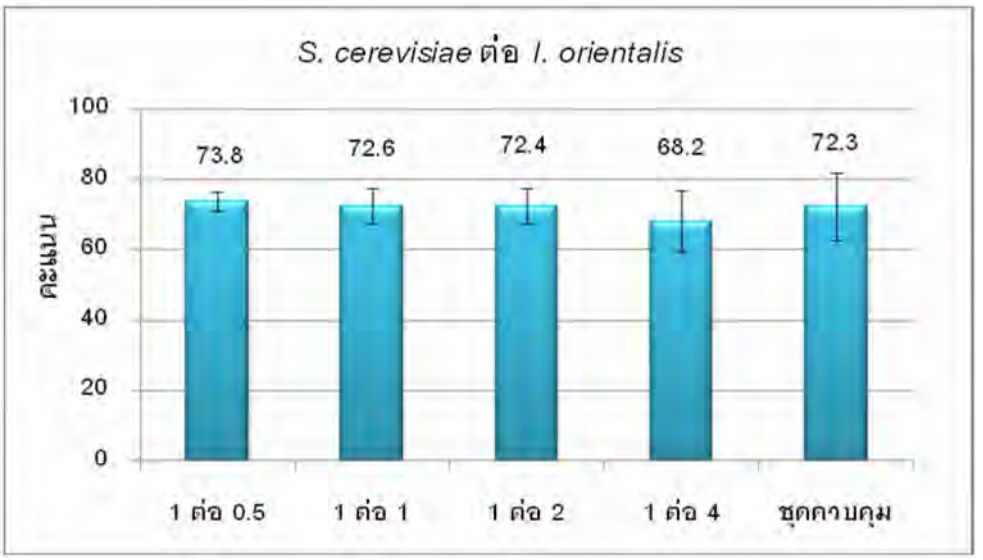
นำสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการแปรผันยีสต์ระหว่าง *S. cerevisiae* กับยีสต์ non – *Saccharomyces* 3 สายพันธุ์ในทุกอัตราส่วน ไปทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิมโดยผู้ทดสอบที่มีความคุ้นเคยและเชี่ยวชาญทางด้านการชิมไวน์และสาโทระดับชาติ จำนวน 10 คน ในการทดสอบนี้ ผู้วิจัยใช้สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 เท่านั้นเป็นชุดควบคุม ซึ่งได้ผลดังภาพที่ 4.13 4.14 และ 4.15

แปรผันระหว่าง *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *I. orientalis* TISTR5259

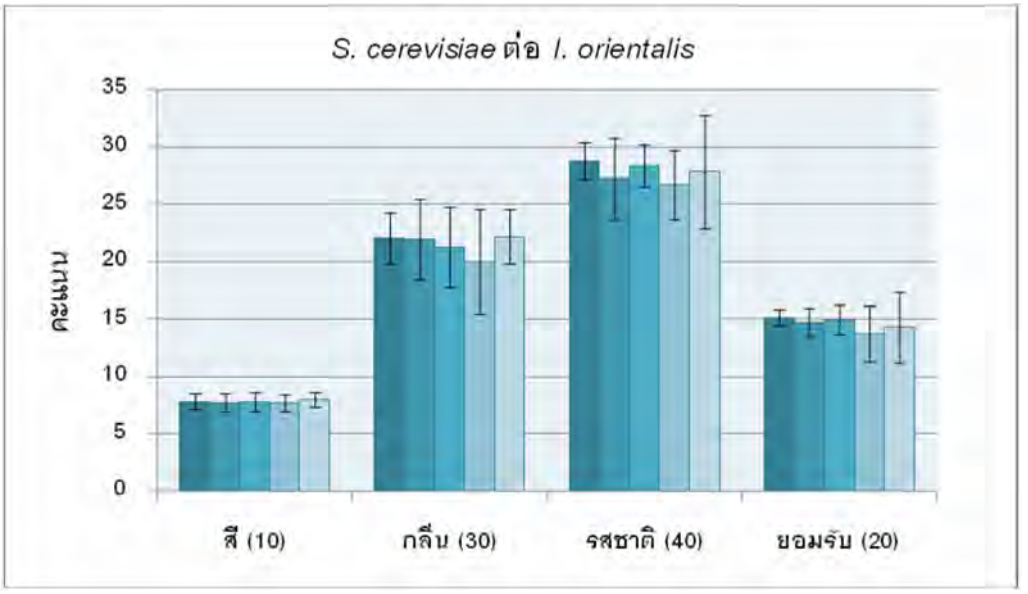
จากภาพที่ 4.13 ก พบว่าคะแนนรวมของสาโทที่ผลิตโดยแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *I. orientalis* TISTR5259 ในทุกอัตราส่วนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p>0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่สาโทที่ผลิตโดยแปรผันยีสต์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 มีคะแนนรวมสูงที่สุด รองลงมาคือ อัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีคะแนน 73.8 และ 72.6 คะแนน ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าคะแนนของชุดควบคุม สาโทที่ผลิตโดยแปรผันยีสต์ระหว่าง *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *I. orientalis* TISTR5259 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 และ 1 ต่อ 1 จัดเป็นสาโทที่มีคุณภาพที่ดีกว่าสาโทที่เติมยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 เพียงชนิดเดียว

จากภาพที่ 4.13 ข พบว่าคะแนนของการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านสี กลิน รส และการยอมรับของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *I. orientalis* TISTR5259 ในทุกอัตราส่วน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p>0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม อัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 มีคะแนนด้านกลินและรสมากที่สุดคือ 22.0 และ 28.8 คะแนน ตามลำดับ จากผลที่ได้แสดงว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสาโทจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *I. orientalis* TISTR5259 คืออัตราส่วน 1 ต่อ 0.5

ภาพที่ 4.13 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (Sensory test)
ของสาโทที่แปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *I. orientalis* TISTR5259



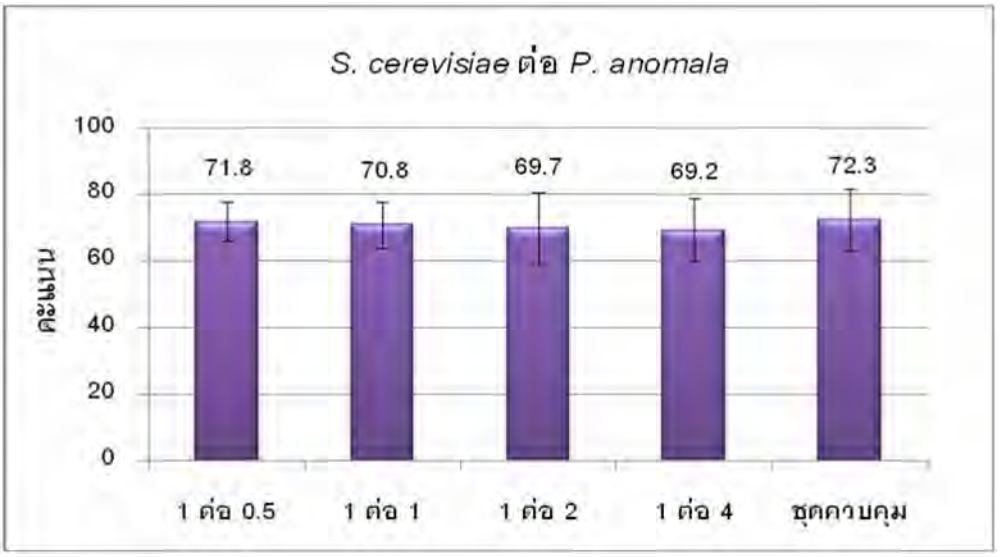
ก) คะแนนรวมจากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม



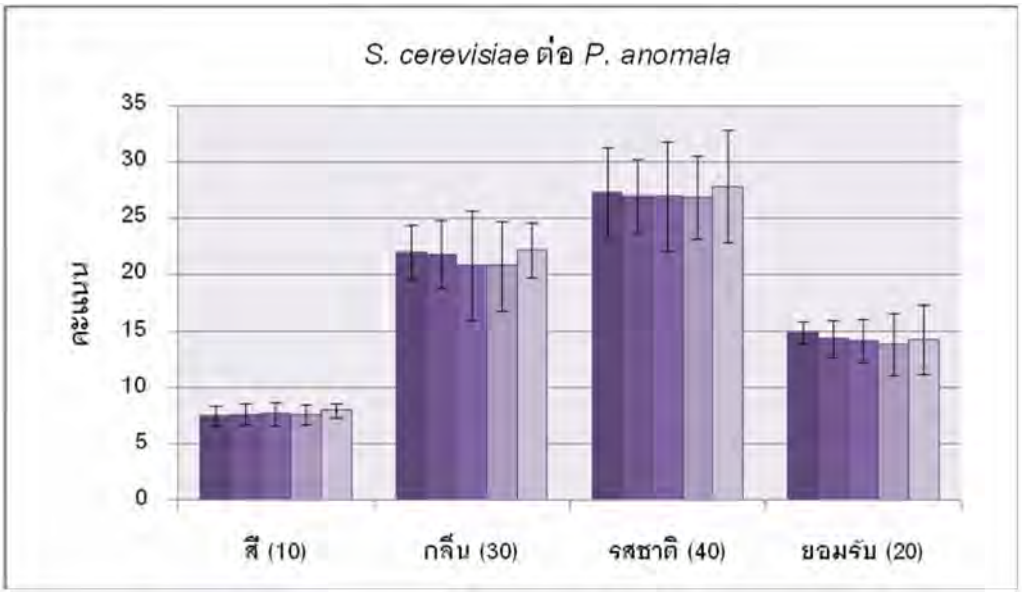
ข) ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิมในแต่ละด้านของสาโทที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *I. orientalis* TISTR5259 ในอัตราส่วนต่างๆ

(1 ต่อ 0.5 1 ต่อ 1 1 ต่อ 2 1 ต่อ 4 ชุดควบคุม)

ภาพที่ 4.14 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (Sensory test)
ของสาโทที่แปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *P. anomala* NP101



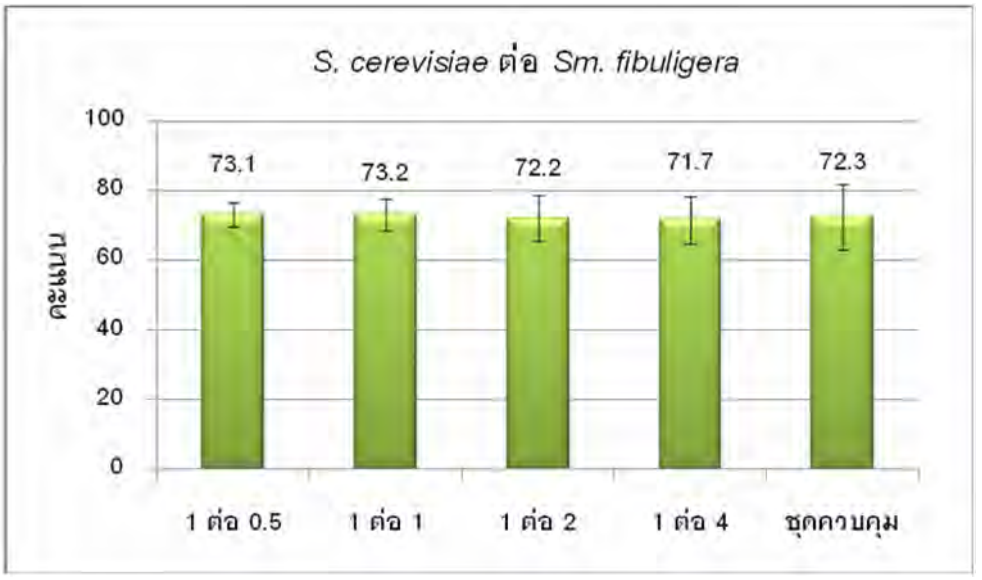
ก) คะแนนรวมจากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม



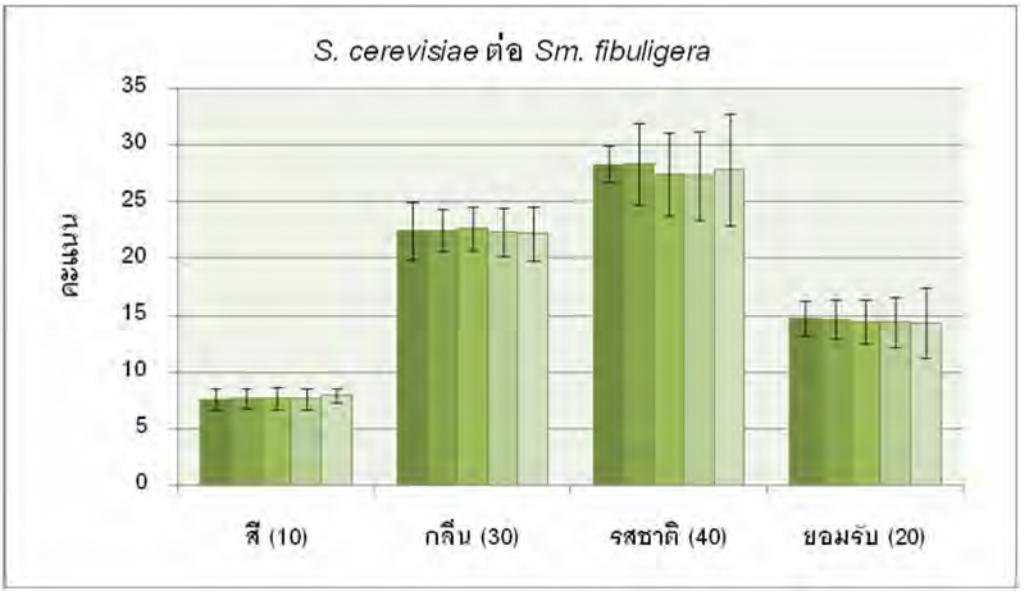
ข) ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิมในแต่ละด้านของสาโทที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *P. anomala* NP101 ในอัตราส่วนต่างๆ

(1 ต่อ 0.5 1 ต่อ 1 1 ต่อ 2 1 ต่อ 4 ชุดควบคุม)

ภาพที่ 4.15 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (Sensory test)
ของสาโทที่แปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *Sm. fibuligera* NP101



ก) คะแนนรวมจากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม



ข) ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิมในแต่ละด้านของสาโทที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *Sm. fibuligera* NP101 ในอัตราส่วนต่างๆ

(1 ต่อ 0.5 1 ต่อ 1 1 ต่อ 2 1 ต่อ 4 ชุดควบคุม)

แปรผันระหว่าง *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *P. anomala* NP101

จากภาพที่ 4.14 ก พบว่าคะแนนรวมของสาโทที่ผลิตโดยแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *P. anomala* NP101 ในทุกอัตราส่วนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p>0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม สาโทที่ผลิตโดยแปรผันยีสต์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 มีคะแนนรวมสูงที่สุด รองลงมาคือ อัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีคะแนน 71.8 และ 70.8 คะแนน ตามลำดับ จัดเป็นสาโทที่มีคุณภาพดี ถึงอย่างไรก็ตามคะแนนรวมของสาโทที่ผลิตโดยแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *P. anomala* NP101 ในทุกอัตราส่วนมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม

จากภาพที่ 4.14 ข พบว่า พบว่าคะแนนของการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านสี กลิน รส และการยอมรับของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *P. anomala* NP101 ในทุกอัตราส่วน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p>0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม อัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 มีคะแนนในด้านกลินและรสมากที่สุดคือ 22.0 และ 27.3 คะแนน ตามลำดับ จากผลที่ได้แสดงว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสาโทจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *P. anomala* NP101 คืออัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 เช่นเดียวกับการแปรผันระหว่าง *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *I. orientalis* TISTR5259

แปรผันระหว่าง *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *Sm. fibuligera* NP101

จากภาพที่ 4.15 ก พบว่าคะแนนเรวมของสาโทที่ผลิตโดยแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *Sm. fibuligera* NP101 ในทุกอัตราส่วนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p>0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม สาโทที่ผลิตโดยแปรผันยีสต์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 มีคะแนนรวมสูงที่สุด รองลงมาคือ อัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีคะแนน 73.3 และ 73.2 คะแนน ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าในชุดควบคุม ดังนั้นสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *Sm. fibuligera* NP101 ในอัตราส่วนดังกล่าว มีคุณภาพดีกว่าและเป็นที่ยอมรับจากผู้เชี่ยวชาญมากกว่าสาโทชุดควบคุม

จากภาพที่ 4.15 ข พบว่า คะแนนของการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านสี กลิน รส และการยอมรับของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *Sm. fibuligera* NP101 ในทุกอัตราส่วน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p>0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม อัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 และ 1 ต่อ 1 มีคะแนนในด้านกลินมากที่สุดคือ 22.7 คะแนน ส่วนคะแนนสูงสุดทางด้านรสชาติพบในอัตราส่วน 1

ต่อ 1 รองลงมาคือ 1 ต่อ 0.5 มีค่า 28.4 และ 28.3 คะแนน ตามลำดับจากผลที่ได้แสดงว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสาโทจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *Sm. fibuligera* NP101 คืออัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 เช่นเดียวกับการแปรผันยีสต์สองคู่แรก

จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิม (Sensory test) ของสาโทที่แปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non - *Saccharomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 มีค่าคะแนนรวมสูงที่สุด ซึ่งคุณภาพสาโทจัดอยู่ในเกณฑ์ดี เป็นที่ยอมรับของผู้เชี่ยวชาญ ดังนั้น อัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการผลิตสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* กับ ยีสต์ในกลุ่ม non - *Saccharomyces* ต่อไป

4.3.3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบให้กลิน (Volatile compounds) ในสาโทที่ได้

จากการทดลองเมื่อทำการวิเคราะห์สาโทโดยวิธี GC - FID โดยเก็บตัวอย่างสารให้กลินบริเวณที่ว่างเหนือสารพบว่า สาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ ยีสต์ non - *Saccharomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ในทุกอัตราส่วน รวมถึงสาโทที่ใช้เป็นชุดควบคุม (ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติม *S. cerevisiae* NP101D8) พบสารประกอบให้กลินชนิด อะเซทัลดีไฮด์ สารในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ได้แก่ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ไอโซบิวทานอล และ ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ และสารในกลุ่มเอสเทอร์ได้แก่ เอทิลแอซีเทต เอทิลเดคาโนเอท 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต และเอทิลออกทาโนเอท ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.14 และ 4.15

ตารางที่ 4.14 ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ในสาโทที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ ยีสต์ non - *Saccharomyces* แต่ละสายพันธุ์ในอัตราส่วนต่าง ๆ จำนวน 3 สายพันธุ์

เชื้อบริสุทธิ์ผสม		**อัตราส่วนระหว่าง NP101D8 ต่อ non-*Saccharomyces***	**สารประกอบให้กลิ่น (มก./ล.)**			
รา	**ยีสต์**		**อะเซทัลดีไฮด์**	**ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์**	**ไอโซบิวทานอล**	**ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์**
รา1+รา2[a]	NP101D8 แปรผันกับ *I. orientalis*	1 ต่อ 0.5	66.44 ± 0.84*	60.03 ± 0.60*	51.45 ± 0.26*	ND
		1 ต่อ 1	77.86 ± 2.36*	57.38 ± 0.52	52.61 ± 0.08*	ND
		1 ต่อ 2	76.87 ± 1.24*	55.59 ± 0.38	53.79 ± 0.44*	ND
		1 ต่อ 4	69.94 ± 2.27*	54.62 ± 0.54	55.39 ± 0.71*	ND
รา1+รา2[a]	NP101D8 แปรผันกับ *P. anomala*	1 ต่อ 0.5	68.46 ± 6.54*	58.80 ± 0.39*	55.86 ± 2.54*	ND
		1 ต่อ 1	99.99 ± 6.78	57.21 ± 0.36	ND	ND
		1 ต่อ 2	106.30 ± 1.78*	54.95 ± 0.36	0ND	ND
		1 ต่อ 4	122.89 ± 0.89*	ND	ND	ND
รา1+รา2[a]	NP101D8 แปรผันกับ *Sm. fibuligera*	1 ต่อ 0.5	60.86 ± 1.54	64.01 ± 0.06*	56.19 ± 0.04*	58.40 ± 0.66*
		1 ต่อ 1	84.71 ± 7.14	81.40 ± 2.18*	76.92 ± 2.71*	50.64 ± 0.72*
		1 ต่อ 2	105.51 ± 7.33	64.45 ± 0.68*	52.17 ± 1.01*	49.90 ± 0.53*
		1 ต่อ 4	94.09 ± 8.35	61.24 ± 0.82*	54.61 ± 2.31*	49.32 ± 0.49*
รา1+รา2[a,b]	NP101D8	1 ต่อ 0	85.64 ± 0.51	55.55 ± 1.63	ND	137.04 ± 2.76

* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

[a] หมายถึง รา 2 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง รา1 คือ *M. hiemalis* NN609 และ รา 2 คือ *R. microsporus* NN505

[b] คือ ชุดควบคุม ND คือ ไม่พบในตัวอย่างสาโท

ตารางที่ 4.15 ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์ในสาโทที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ ยีสต์ non - *Saccharomyces* แต่ละสายพันธุ์ในอัตราส่วนต่าง ๆ จำนวน 3 สายพันธุ์

เชื้อบริสุทธิ์ผสม		**อัตราส่วนระหว่าง NP101D8 ต่อ non - *Saccharomyces***	**สารประกอบให้กลิ่น (มก./ล.)**			
รา	**ยีสต์**		**เอทิลแอซีเทต**	**เอทิลเดคาโนเอท**	**2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต**	**เอทิลออกทาโนเอท**
รา1+รา2[a]	NP101D8 แปรผันกับ *I. orientalis*	1 ต่อ 0.5	120.01 ± 4.17*	35.33 ± 2.72*	58.65 ± 2.18*	49.51 ± 0.62*
		1 ต่อ 1	101.67 ± 0.38*	26.38 ± 3.67	ND	ND
		1 ต่อ 2	85.90 ± 2.46*	18.75 ± 1.07*	ND	ND
		1 ต่อ 4	72.93 ± 3.68*	ND	ND	ND
รา1+รา2[a]	NP101D8 แปรผันกับ *P. anomala*	1 ต่อ 0.5	63.45 ± 0.40*	21.10 ± 1.46	49.34 ± 2.80*	73.42 ± 1.42*
		1 ต่อ 1	61.76 ± 1.68*	47.36 ± 6.58*	67.16 ± 2.53*	ND
		1 ต่อ 2	51.03 ± 4.39	16.62 ± 0.12*	ND	ND
		1 ต่อ 4	42.87 ± 0.22*	ND	ND	ND
รา1+รา2[a]	NP101D8 แปรผันกับ *Sm. fibuligera*	1 ต่อ 0.5	58.47 ± 0.35	57.54 ± 7.87*	85.34 ± 4.51*	50.35 ± 0.10*
		1 ต่อ 1	60.70 ± 2.71*	25.70 ± 6.05	57.83 ± 3.57*	ND
		1 ต่อ 2	64.20 ± 4.37*	46.11 ± 2.44*	48.47 ± 0.71*	ND
		1 ต่อ 4	61.33 ± 2.56*	39.65 ± 4.99*	46.77 ± 0.73*	ND
รา1+รา2[a,b]	NP101D8	1 ต่อ 0	53.53 ± 0.27	25.45 ± 0.85	98.97 ± 5.62	65.17 ± 3.89

* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

[a] หมายถึง รา 2 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง รา1 คือ *M. hiemalis* NN609 และ รา 2 คือ *R. microsporus* NN505

[b] คือ ชุดควบคุม

ND คือ ไม่พบในตัวอย่างสาโท

ตารางที่ 4.16 ปริมาณโดยรวมของสารประกอบให้กลีนในสาโทที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ ยีสต์ non - *Saccharomyces* แต่ละสายพันธุ์ในอัตราส่วนต่าง ๆ จำนวน 3 สายพันธุ์

เชื้อบริสุทธิ์ผสม		**อัตราส่วนระหว่าง NP101D8 ต่อ non - *Saccharomyces***	**ปริมาณสารประกอบให้กลีน (มก./ล.)**	
รา	**ยีสต์**		**ฟูเซลแอลกอฮอล์โดยรวม**	**เอสเทอร์โดยรวม**
รา1+รา2[a]	NP101D8 แปรผันกับ *I. orientalis*	1 ต่อ 0.5	111.48	263.50
		1 ต่อ 1	109.99	128.05
		1 ต่อ 2	109.38	104.65
		1 ต่อ 4	110.01	72.93
รา1+รา2[a]	NP101D8 แปรผันกับ *P. anomala*	1 ต่อ 0.5	114.66	207.31
		1 ต่อ 1	57.21	176.28
		1 ต่อ 2	54.95	67.65
		1 ต่อ 4	ND	42.87
รา1+รา2[a]	NP101D8 แปรผันกับ *Sm. fibuligera*	1 ต่อ 0.5	178.60	251.70
		1 ต่อ 1	208.96	144.23
		1 ต่อ 2	166.52	158.78
		1 ต่อ 4	165.17	147.75
รา1+รา2[a,b]	NP101D8	1 ต่อ 0	192.59	243.12

[a] หมายถึง รา 2 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง รา1 คือ *M. hiemalis* NN609 และ รา 2 คือ *R. microsporus* NN505

[b] คือ ชุดควบคุม

ND คือ ไม่พบในตัวอย่างสาโท

แปรผันระหว่าง *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *I. orientalis* TISTR5259

จากสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *I. orientalis* TISTR5259 ที่แปรผันอัตราส่วนต่างๆ พบสารประกอบให้กลีนหลัก 7 ชนิด ประกอบด้วยอะเซทัลดีไฮด์ สารประกอบให้กลีนในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ได้แก่ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และไอโซบิวทานอล ส่วนสารประกอบให้กลีนในกลุ่มเอสเทอร์ได้แก่ เอทิลแอซีเทต เอทิลเดคาโนเอท 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต และเอทิลออกทาโนเอท

ปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ที่พบจากตัวอย่างสาโทในทุกอัตราส่วนมีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสาโทชุดควบคุม (p<0.05) คือ 66.84 - 77.86 มก./ล. อะเซทัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นในระดับดังกล่าวส่งผลทำให้เกิดกลิ่นดีในสาโท

<u>สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์</u>

จากตารางที่ 4.16 พบว่าตัวอย่างสาโทในทุกอัตราส่วนมีปริมาณผลรวมของฟูเซลแอลกอฮอล์ไม่แตกต่างกัน ซึ่งปริมาณที่พบอยู่ในระดับต่ำกว่า 300 มก./ล. ปริมาณดังกล่าวจะส่งผลทำให้สาโทมีกลิ่นที่ดีและซับซ้อน ฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบคือ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และไอโซบิวทานอล

ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เป็นฟูเซลแอลกอออล์ที่มีความสำคัญโดยให้กลิ่นผลไม้ จากตาราง 4.14 พบว่าในสาโทที่แปรผันยีสต์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 มีปริมาณของสารนี้สูงที่สุด คือ 60.03 มก./ล. ซึ่งเป็นค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสาโทในชุดควบคุม (p<0.05)

ไอโซบิวทานอลเป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ตัวทำละลายหรือน้ำยาทาเล็บ ซึ่งพบในตัวอย่างสาโทที่มีการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *I. orientalis* TISTR5259 ในทุกอัตราส่วน ในปริมาณ 51.45 - 55.39 มก./ล. แต่ไม่พบในชุดควบคุม (ที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8) ผลที่ได้แสดงว่า ยีสต์สายพันธุ์ *I. orientalis* TISTR5259 มีความสามารถในการผลิตสารไอโซบิวทานอลในสาโท

<u>สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์</u>

จากตารางที่ 4.16 พบว่าปริมาณเอสเทอร์โดยรวมมากที่สุด ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 มีค่า 263.50 มก./ล. ซึ่งปริมาณที่พบมีค่ามากกว่าสาโทที่ผลิตจากการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 เพียงชนิดเดียว และพบปริมาณน้อยสุดในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 มีค่า 72.93 มก./ล. เอสเทอร์ที่พบได้แก่ เอทิลแอซีเทต เอทิลเดคาโนเอท เอทิลออกทาโนเอท และ 2 – ฟีนิลเอทิลแอซีเทต

เอทิลแอซีเทต เป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้ กลิ่นสับปะรด (Peinado และคณะ 2004) ซึ่งถ้ามีในปริมาณที่ต่ำกว่า 80 มก./ล. จะให้กลิ่นที่น่าพอใจ แต่ถ้าปริมาณสูงเกิน 150 - 200 มก./ล. จะให้กลิ่นน้ำส้มสายชูซึ่งเป็นกลิ่นที่ไม่ดี (Mateos และคณะ, 2006) จากผลในตารางที่ 4.15 พบว่าปริมาณเอทิลแอซีเทต ที่พบในสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *I. orientalis* TISTR5259 ในทุกอัตราส่วนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสาโทในชุดควบคุม (p<0.05) ปริมาณที่พบในสาโทที่ผลิตจากการแปรผันอัตราส่วนระหว่างยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *I. orientalis* TISTR5259 ในอัตราส่วน

1 ต่อ 0.5 1 ต่อ 1 และ 1 ต่อ 2 มีค่า 120.01 101.67 และ 85.90 มก./ล. ตามลำดับ ซึ่งปริมาณดังกล่าวอาจส่งผลทำให้เกิดกลิ่นที่ไม่ดีต่อสาโท

เอทิลเดคาโนเอท เอทิลออกทาโนเอท และ 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต เป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้ และดอกไม้ (Peinado และคณะ, 2004) จากการทดลอง (ตารางที่ 4.15) พบว่าสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *I. orientalis* TISTR5259 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 พบชนิดและปริมาณเอสเทอร์ทั้ง 3 ชนิดมากที่สุด ซึ่งส่งผลให้สาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ในอัตราส่วนดังกล่าวมีกลิ่นที่ดีและซับซ้อนที่สุด

แปรผันระหว่าง *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *P. anomala* NP101

จากสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *P. anomala* NP101 ในอัตราส่วนต่างๆ พบสารประกอบให้กลิ่นหลัก 7 ชนิดประกอบด้วย อะเซทัลดีไฮด์ สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ได้แก่ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และไอโซบิวทานอล ส่วนสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์ได้แก่ เอทิลแอซีเทต เอทิลเดคาโนเอท 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต และเอทิลออกทาโนเอท

ปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ที่พบจากตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 1 ต่อ 2 และ 1 ต่อ 4 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสาโทในชุดควบคุม (p<0.05) ซึ่งมีค่า 68.46 106.30 และ 122.89 มก./ล. ตามลำดับ ระดับอะเซทัลดีไฮด์ที่พบในสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 และ 1 ต่อ 4 อาจทำให้เกิดกลิ่นไม่ดีในสาโท

<u>สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์</u>

จากการทดลอง (ตารางที่ 4.16) พบว่าตัวอย่างสาโทในทุกอัตราส่วนมีปริมาณผลรวมของฟูเซลแอลกอออล์อยู่ในระดับต่ำกว่า 300 มก./ล. สาโทผลิตจากการแปรผันยีสต์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 มีปริมาณผลรวมของฟูเซลแอลกอออล์มากที่สุดคือ 114.66 มก./ล. ซึ่งปริมาณดังกล่าวจะส่งผลทำให้สาโทนั้นมีกลิ่นที่ดี ซับซ้อน ฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบคือ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และไอโซบิวทานอล

ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เป็นฟูเซลแอลกอออล์ที่มีความสำคัญให้กลิ่นผลไม้ จากการทดลองนี้พบว่าในสาโทที่แปรผันยีสต์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 มีปริมาณของสารนี้สูงที่สุด คือ 58.80 มก./ล. ซึ่งเป็นค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสาโทในชุดควบคุม (p<0.05)

ไอโซบิวทานอลเป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ตัวทำละลายหรือน้ำยาทาเล็บ ซึ่งพบในตัวอย่างสาโทที่มีการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *P. anomala* NP101 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 เท่านั้น ในปริมาณ 58.86 มก./ล. แต่ไม่พบในชุดควบคุม (ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8) ผลที่ได้แสดงว่า ยีสต์ *P. anomala* NP101 มีความสามารถในการผลิตไอโซบิวทานอล

สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์

จากตารางที่ 4.16 พบว่าปริมาณเอสเทอร์โดยรวมมากที่สุด ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 มีค่า 207.31 มก./ล. และพบปริมาณน้อยสุดในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 มีค่า 42.87 มก./ล. เอสเทอร์ที่พบได้แก่ เอทิลแอซีเทตเอทิลเดคาโนเอท เอทิลออกทาโนเอท และ 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต

จากการทดลอง (ตารางที่ 4.15) พบว่าปริมาณเอทิลแอซีเทตที่พบในสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *P. anomala* NP101 ในทุกอัตราส่วนมีปริมาณเอทิลแอซีเทตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสาโทในชุดควบคุม ($p<0.05$) ยกเว้นในทุกอัตราส่วน 1 ต่อ 2 ปริมาณเอทิลแอซีเทตที่พบในทุกอัตราส่วนต่ำกว่าระดับ 80 มก./ล. ซึ่งส่งผลทำให้เกิดกลิ่นที่ดีต่อสาโท

เอทิลเดคาโนเอท เอทิลออกทาโนเอท และ 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต เป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้ และดอกไม้ (Peinado และคณะ, 2004) จากการทดลองพบว่าสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *P. anomala* NP101 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 พบทั้งชนิดและปริมาณของเอสเทอร์ทั้ง 3 ชนิดมากที่สุด ซึ่งส่งผลให้สาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ในอัตราส่วนดังกล่าวมีกลิ่นดีและซับซ้อนที่สุด เช่นเดียวกับผลที่ได้จากสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *P. anomala* NP101

แปรผันระหว่าง *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *Sm. fibuligera* NP101

จากสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *Sm. fibuligera* NP101 ในอัตราส่วนต่างๆ พบสารประกอบให้กลิ่นหลัก 8 ชนิด ประกอบด้วย อะเซทัลดีไฮด์ สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ได้แก่ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ไอโซบิวทานอล และฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ ส่วนสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์ได้แก่ เอทิลแอซีเทต เอทิลเดคาโนเอท 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต และเอทิลออกทาโนเอท

จากการทดลองนี้พบว่า สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *Sm. fibuligera* NP101 ในทุกอัตราส่วนมีปริมาณอะเซทัลดี

ไฮดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเทียบกับสาโทในชุดควบคุม (p>0.05) ปริมาณที่พบจากตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 มีค่ามากที่สุดคือ 105.51 มก./ล. ปริมาณดังกล่าวอาจจะส่งผลทำให้เกิดกลิ่นไม่ดีในสาโท

สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์

จากตารางที่ 4.16 พบว่าตัวอย่างสาโทในทุกอัตราส่วนมีปริมาณผลรวมของฟูเซลแอลกอฮอล์อยู่ในระดับต่ำกว่า 300 มก./ล. พบมากสุดในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีค่า 208.96 มก./ล. ปริมาณดังกล่าวจะส่งผลทำให้สาโทนั้นมีกลิ่นที่ดี ซับซ้อน ฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบคือ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ไอโซบิวทานอล และฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์

ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เป็นฟูเซลแอลกอออล์ที่มีความสำคัญคือให้กลิ่นผลไม้ จากการทดลองนี้พบว่าปริมาณที่พบในสาโทที่แปรผันยีสต์ในทุกอัตราส่วนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสาโทในชุดควบคุม (p<0.05) มีค่าระหว่าง 61.24 - 81.40 มก./ล.

ไอโซบิวทานอลเป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ตัวทำละลายหรือน้ำยาทาเล็บ จากการทดลองนี้พบว่าปริมาณที่พบในสาโทที่แปรผันยีสต์ในทุกอัตราส่วน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสาโทในชุดควบคุม (p<0.05) ซึ่งพบในปริมาณระหว่าง 52.17 - 76.92 มก./ล. ซึ่งสารนี้ไม่พบในชุดควบคุม (ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8) ผลที่ได้แสดงว่า ยีสต์ *Sm. fibuligera* NP101 มีความสามารถในการผลิตไอโซบิวทานอล

ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์เป็นฟูเซลแอลกอฮอล์ที่ให้กลิ่นดอกไม้และน้ำผึ้ง (Torrens และคณะ, 2008) จากผลการทดลองพบสารประกอบนี้ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ในทุกอัตราส่วนซึ่งปริมาณที่พบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสาโทในชุดควบคุม (p<0.05) มีค่าระหว่าง 49.32 - 58.40 มก./ล.

สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์

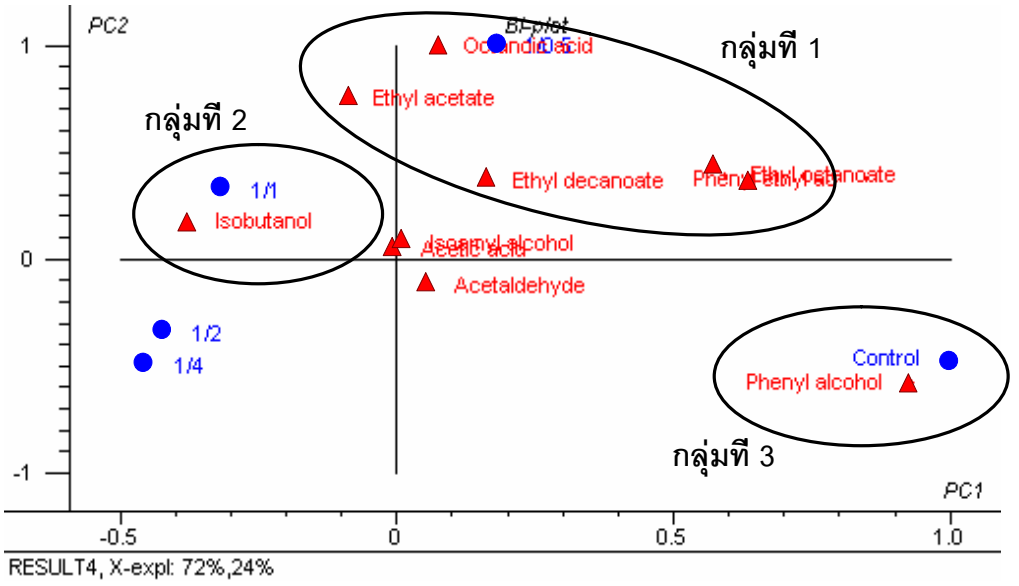
จากการทดลองพบว่าปริมาณเอทิลแอซีเทตที่พบในสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *Sm. fibuligera* NP101 ในทุกอัตราส่วน ยกเว้นอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสาโทในชุดควบคุม (p<0.05) ปริมาณที่พบในสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *Sm. fibuligera* NP101 ในทุกอัตราส่วนพบปริมาณเอทิลแอซีเทตต่ำกว่าระดับ 80 มก./ล. ซึ่งส่งผลทำให้เกิดกลิ่นที่ดีต่อสาโท

เอทิลเดคาโนเอท เอทิลออกทาโนเอท และ 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต เป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้ และดอกไม้ (Peinado และคณะ, 2004) จากการทดลองพบว่าสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *Sm. fibuligera* NP101 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 พบชนิดและปริมาณเอสเทอร์ทั้ง 3 ชนิดมากที่สุด ซึ่งส่งผลให้สาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ในอัตราส่วนดังกล่าวมีกลิ่นที่ดีและซับซ้อนที่สุด เช่นเดียวกับผลที่ได้จากสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *I. orientalis* TISTR5259 และ *P. anomala* NP101

จากผลของการวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ เอสเทอร์ พบว่าปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์โดยรวมในสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* กับ non - *Saccharomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในทุกอัตราส่วน (ยกเว้นอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ของการแปรผัน *S. cerevisiae* กับ *Sm. fibuligera*) มีปริมาณต่ำกว่าในชุดควบคุม แต่ปริมาณเอสเทอร์โดยรวมในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 ของการแปรผันยีสต์ทั้ง 3 คู่ มีปริมาณสูงกว่าชุดควบคุม

4.3.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เพื่อศึกษาอิทธิพลของการแปรผันยีสต์ *S.cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non - *Saccharomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในสาโท เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้ผลิตสาโท จึงได้นำข้อมูลของสารประกอบให้กลิ่นที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC - FID มาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Principal Component Analysis (PCA) ซึ่งสามารถแสดงดังภาพที่ 4.16 4.17 และ 4.18



ภาพที่ 4.16 กราฟ biplot แสดงความสัมพันธ์ของการแปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S.cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *I. orientalis* TISTR5259 ในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในตัวอย่างสาโท

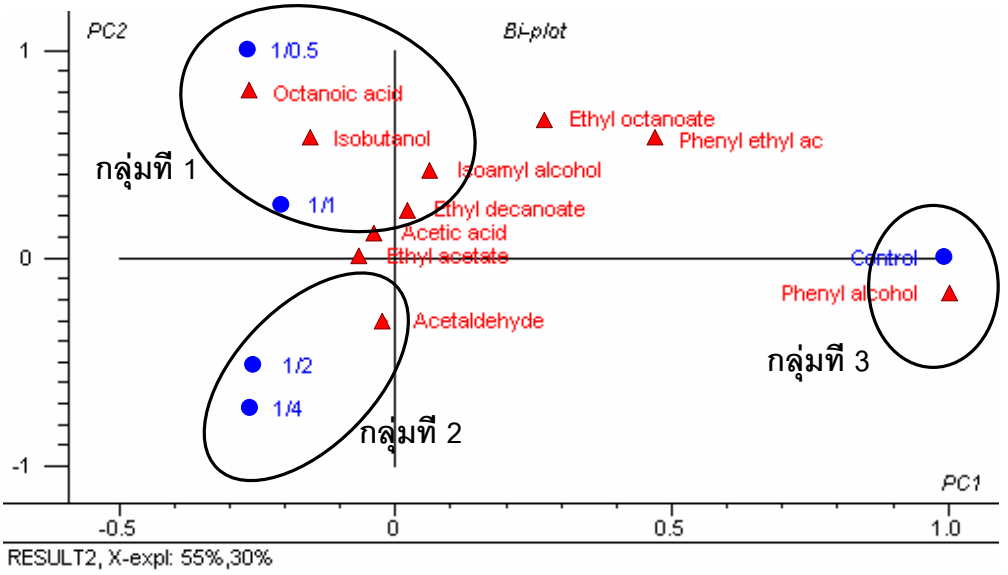
จากภาพที่ 4.16 สามารถอธิบายความแปรปรวนรวมได้ 96% ซึ่งองค์ประกอบที่ 1 (PC1) และองค์ประกอบที่ 2 (PC2) สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 72% และ 24% ตามลำดับ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตามความสัมพันธ์ได้เป็น 3 กลุ่ม อย่างชัดเจนดังนี้

กลุ่มที่ 1 : อัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 มีความสัมพันธ์อย่างสูงต่อการผลิตกรดออกทาโนอิค 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต เอทิลดีคาโนเอท เอทิลแอซีเทต และเอทิลออกทาโนเอท

กลุ่มที่ 2 : อัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีความสัมพันธ์ต่อการผลิตไอโซบิวทานอล

กลุ่มที่ 3 : ชุดควบคุม (สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติม *S. cerevisiae* NP101D8) มีความสัมพันธ์ต่อการผลิตฟีนิลเอทิลแอลกอออล์

การแปรผันยีสต์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 และ 1 ต่อ 4 พบว่าไม่มีความสัมพันธ์อย่างชัดเจนในการผลิตสารประกอบให้กลิ่น



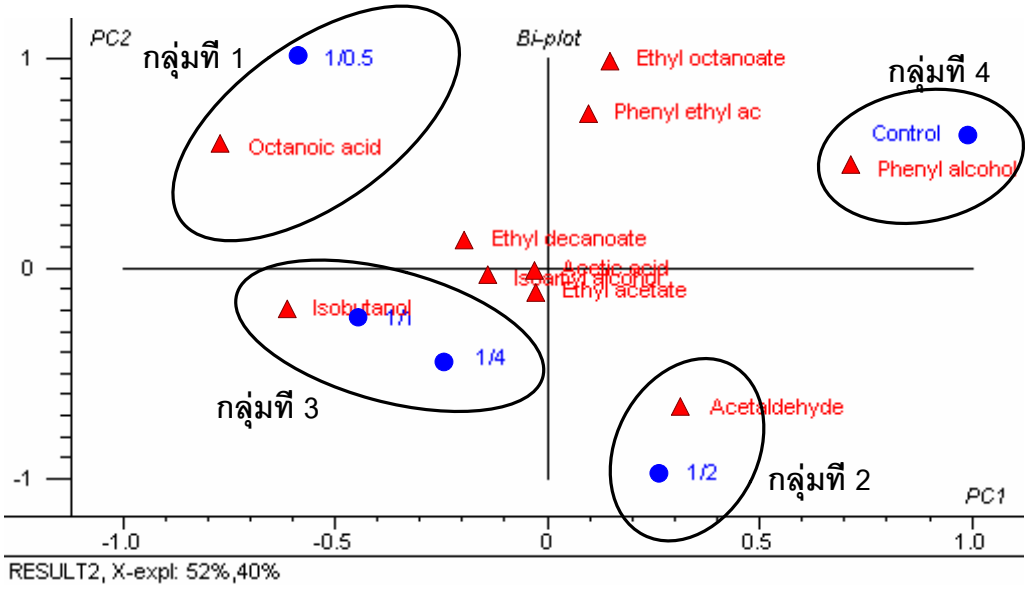
ภาพที่ 4.17 กราฟ biplot แสดงความสัมพันธ์ของการแปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S.cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *P.anomala* NP101 ในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในตัวอย่างสาโท

จากภาพที่ 4.17 สามารถอธิบายความแปรปรวนรวมได้ 85 % ซึ่งองค์ประกอบที่ 1 (PC1) และองค์ประกอบที่ 2 (PC2) สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 55% และ 30% ตามลำดับ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตามความสัมพันธ์ได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 : อัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 และ 1 ต่อ 1 มีความสัมพันธ์อย่างสูงต่อการผลิตกรดออกทาโนอิค ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ไอโซบิวทานอล และเอทิลแดคาโนเอท

กลุ่มที่ 2 : อัตราส่วน 1 ต่อ 2 และ 1 ต่อ 4 มีความสัมพันธ์ต่อการผลิตอะเซทัลดีไฮด์

กลุ่มที่ 3 : ชุดควบคุม (สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติม *S. cerevisiae* NP101D8) มีความสัมพันธ์ต่อการผลิตฟีนิลเอทิลแอลกอออล์



ภาพที่ 4.18 กราฟ biplot แสดงความสัมพันธ์ของการแปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S.cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *Sm. fibuligera* NP101 ในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในตัวอย่างสาโท

จากภาพที่ 4.18 สามารถอธิบายความแปรปรวนรวมได้ 92% ซึ่งองค์ประกอบที่ 1 (PC1) และองค์ประกอบที่ 2 (PC2) สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 52% และ 40% ตามลำดับ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตามความสัมพันธ์ได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

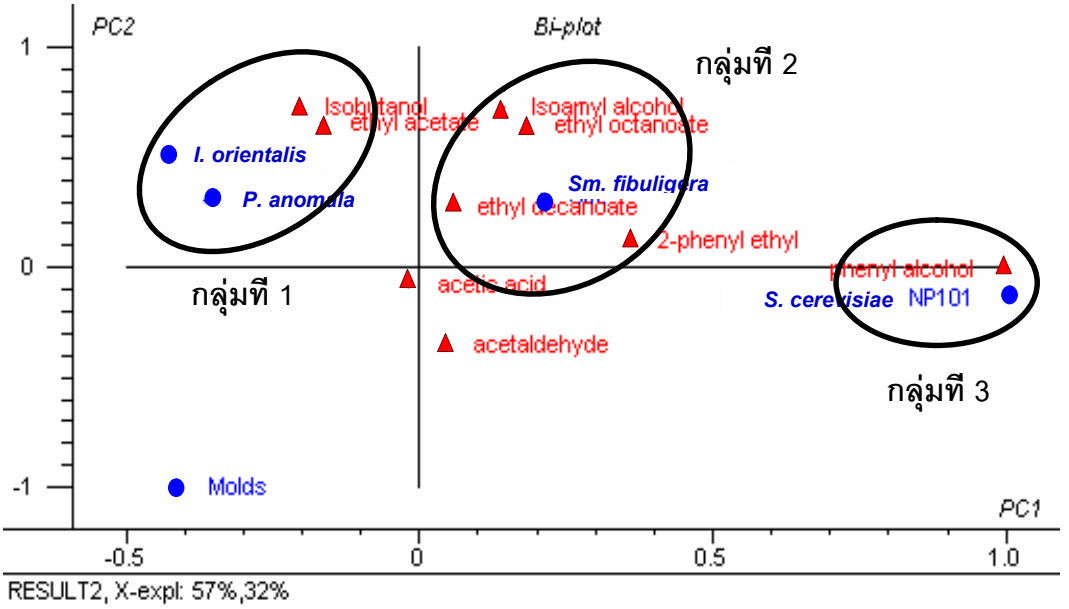
กลุ่มที่ 1 : อัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 มีความสัมพันธ์อย่างสูงต่อการผลิตกรดออกทาโนอิค

กลุ่มที่ 2 : อัตราส่วน 1 ต่อ 2 มีความสัมพันธ์อย่างสูงต่อการผลิตอะเซทัลดีไฮด์

กลุ่มที่ 3 : อัตราส่วน 1 ต่อ 1 และ 1 ต่อ 4 มีความสัมพันธ์ต่อการผลิตไอโซบิวทานอล

กลุ่มที่ 4 : ชุดควบคุม (สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติม *S. cerevisiae* NP101D8) มีความสัมพันธ์ต่อการผลิตฟีนิลเอทิลแอลกอออล์

เพื่อศึกษาอิทธิพลของยีสต์ non - *Saccharomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ในการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในสาโทและหาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของยีสต์กับความสามารถในการผลิตสาร ประกอบให้กลิ่น จึงได้นำข้อมูลของสารประกอบให้กลิ่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด คือ 1 ต่อ 0.5 ของการแปรผันยีสต์ทั้ง 3 คู่ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC - FID มาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Principal Component Analysis (PCA) ซึ่งสามารถแสดง ดังภาพที่ 4.19



ภาพที่ 4.19 กราฟ biplot แสดงความสัมพันธ์ของยีสต์ *S.cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* 3 สายพันธุ์ ในการผลิตสารประกอบให้กลีนในตัวอย่างสาโทที่แปรผันอัตราส่วนระหว่าง *S.cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* 3 สายพันธุ์ เท่ากับ 1 ต่อ 0.5

จากภาพที่ 4.19 สามารถอธิบายความแปรปรวนรวมได้ 89% ซึ่งองค์ประกอบที่ 1 (PC1) และองค์ประกอบที่ 2 (PC2) สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 57% และ 32% ตามลำดับ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตามความสัมพันธ์ได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 : ยีสต์ *I. orientalis* TISTR5259 และ *P. anomala* NP101 มีความสัมพันธ์อย่างสูงต่อการผลิตไอโซบิวทานอล และเอทิลแอซีเทต

กลุ่มที่ 2 : ยีสต์ *Sm. fibuligera* NP101 มีความสัมพันธ์อย่างสูงต่อการผลิตไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เอทิลออกทาโนเอท เอทิลเดคาโนเอท และ 2- ฟีนิลเอทิลแอซีเทต

กลุ่มที่ 3 : ชุดควบคุม (สาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติม *S. cerevisiae* NP101D8) มีความสัมพันธ์ต่อการผลิตฟีนิลเอทิลแอลกอออล์

จากผลทั้งด้านการวิเคราะห์สารประกอบให้กลีนโดยใช้เทคนิค GC - FID รวมถึงการทดสอบ ทางประสาทสัมผัสโดยผู้เชี่ยวชาญ 10 คน เมื่อนำมาประกอบในการตัดสินใจเพื่อคัดเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสาโทให้ได้คุณภาพที่ดี โดยแปรผันระหว่างยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non - *Saccharomyces* 3 สายพันธุ์ซึ่งประกอบด้วย *I. orientalis* TISTR5259 *P. anomala* NP101 และ *Sm. fibuligera* NP101 พบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดคือ 1 ต่อ 0.5 เนื่องจาก สาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ทั้ง 3 คู่ จากอัตราส่วน

ดังกล่าว พบมากทั้งชนิดและปริมาณของสารประกอบให้กลิ่นโดยเฉพาะสารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์และฟูเซลแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นสารประกอบให้กลิ่นที่มีอิทธิพลต่อกลิ่นรสของสาโท (จากตารางที่ 4.14 4.15 และ 4.16 และจากภาพที่ 4.16 4.17 และ 4.18) และได้คะแนนของการทดสอบด้านประสาทสัมผัสสูงที่สุด เป็นที่ยอมรับของผู้เชี่ยวชาญว่าเป็นสาโทที่มีคุณภาพดี (จากภาพที่ 4.13 4.14 และ 4.15) ดังนั้นอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 ของการแปรผันยีสต์ระหว่างกลุ่ม *S. cerevisiae* กับยีสต์ non - *Saccharomyces* จึงถูกคัดเลือกว่าเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับนำไปใช้ในการผลิตสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมต่อไป

นอกจากนี้ยังพบว่า ยีสต์ในกลุ่ม non – *Saccahromyces* มีบทบาทสำคัญในการผลิตสารให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์ เนื่องจากสาโทที่มีการเติมยีสต์ non – *Saccahromyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ในปริมาณที่เหมาะสมพบว่ามีปริมาณเอสเทอร์โดยรวมสูงกว่าสาโทที่เติมเฉพาะยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 เพียงชนิดเดียว โดยยีสต์สายพันธุ์ *I. orientalis* TISTR5259 และ *P. anomala* NP101 มีความสัมพันธ์อย่างสูงกับการผลิต เอทิลแอซีเทต และไอโซบิวทานอล ส่วนยีสต์สายพันธุ์ *Sm. fibuligera* NP101 มีความสัมพันธ์อย่างสูงกับการผลิตไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เอทิลออกทาโนเอท เอทิลเดคาโนเอท และ 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้หรือกลิ่นดอกไม้ (จากภาพที่ 4.19)

4.3.5 ตรวจสอบการปนเปื้อนของสาโทจากจุลินทรีย์อื่น

ไม่พบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การจำแนกชนิดราและยีสต์ที่อยู่ในลูกแป้งสุราโดยใช้สัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

5.1.1 การคัดแยกและจำแนกชนิดรา

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกราในวันที่ 0 และ 3 (ก่อนผ่าน้ำ) ของการหมัก เนื่องจากภายหลังการผ่าน้ำในวันที่ 3 จะเป็นการเปลี่ยนจากภาวะมีออกซิเจนเป็นขาดออกซิเจน ภาวะดังกล่าวไม่เหมาะสมต่อการเจริญของรา ลักษณะโคโลนีราที่พบทั้ง 24 ไอโซเลต มีลักษณะคล้ายกันคือเป็นเส้นสีขาว ฟูเหมือนปุยฝ้าย มีการสร้างสปอร์สีดำ เมื่อส่องดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบ ลักษณะสายใย ก้านชูสปอร์ อับสปอร์ และสปอร์ที่เหมือนกัน จึงสุ่มตัวแทนราจำนวน 3 ไอโซเลตมาจำแนกโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล และพบว่าไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากบริเวณ ITS เป็นบริเวณที่มีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง ซึ่งอาจเป็นผลจากอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม (Sujaya และคณะ, 2004) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของราบางสายพันธุ์คล้ายคลึงกัน ฉะนั้นจำเป็นต้องอาศัยวิธีทางสัณฐานวิทยามายืนยันผลการจำแนกอีกครั้ง โดยนำตัวแทนราทั้ง 3 ไอโซเลตมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยศึกษาขนาดและลักษณะของสปอร์ ขนาดก้านชูสปอร์ การมีไรซอยด์ การมีคลามัยโดสปอร์ ขนาดของคอลาเมลลา ขนาดของสปอร์แรงเจียม และลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) พบว่าราที่จำแนกได้เป็น *R. microsporus*

5.1.2 ความสามารถในการย่อยแป้งของราที่แยกได้

ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้เป็นของเหลว (liquefaction) เป็นเกณฑ์ชี้วัดประสิทธิภาพของราในการผลิตเอนไซม์มาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550, Kolarova และคณะ, 2001และHofrichter และคณะ, 2010) ซึ่งถูกนำมาใช้ประกอบการคัดเลือกตัวแทนราในการทดลองนี้ จากผลการทดลองพบว่า รา *R. microsporus* NN505 มีความสามารถในการย่อยข้าวเหนียวนึ่งให้มีลักษณะเหลว (Saccharification) ได้ดีที่สุด แสดงว่าราสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่นำมาใช้ในการย่อยโครงสร้างแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ดีที่สุด ดังนั้นราสายพันธุ์นี้จึงถูกคัดเลือกเพื่อนำไปใช้ในการผลิตสาโทจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมต่อไป

5.1.3 การคัดแยกและจำแนกชนิดยีสต์

การคัดแยกยีสต์จากลูกแป้งสุรา 8 แหล่งที่ผ่านการคัดเลือกว่าสามารถนำไปผลิตสาโทที่มีกลิ่นรสดี โดยใช้วิธี PCR - RFLP ในการจัดกลุ่มยีสต์ที่แยกได้ ซึ่งสามารถจัดได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม จากนั้นคัดเลือกตัวแทนยีสต์ทั้ง 5 กลุ่มมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

ควบคู่กับการจำแนกโดยวิธีทางชีวเคมี พบว่าเป็น *Sm. fibuligera, P. caribbica, P. fabianii , P. anomala* และ *S. cerevisiae* ตามลำดับ สายพันธุ์ที่พบในการทดลองนี้ได้เคยมีรายงานว่าพบเช่นกันในการทดลองของอภิชญา เตชะวสัญญู (2550) และ Limtong และคณะ (2002)

5.2 การคัดเลือกตัวแทนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* จำนวน 5 สายพันธุ์ ทีมีความสามารถในการผลิตสาโททีดี

จากการทดลองเมื่อนำสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมทีมีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์ (N5D8, NP101D8, BMD8, TISTR5161 และสายพันธุ์ทางการค้า 493 EDV) มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี, ทดสอบประสาทสัมผัสและสารประกอบให้กลิน ได้ผลดังนี้

5.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ก) ค่าความเป็นกรด - เบส (pH) และปริมาณกรดโดยรวม (Total acidity)

จากการทดลองพบว่าสาโททีผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมทีมีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 5 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์แบบผกผันระหว่างค่าความเป็นกรด - เบสกับปริมาณกรดโดยรวม กล่าวคือ ในระหว่างกระบวนการหมักยีสต์จะเปลียนน้ำตาลให้กลายเป็นเอทานอลและผลิตภัณฑ์อืนๆ รวมถึงกรดอินทรีย์เช่นกรดแอซีติก เนืองจากระดับความเข้มข้นของกรดเพิมขึนจะส่งผลทำให้ค่ากรด - เบสลดลง ผลการทดลองทีได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ กุณฑลี ไกรธรรมจิตกุล (2547) นริสา ตรีเนตร (2550) อำภา หลวงคล้ายโพธิ์ (2552) และ Sreeramulu และคณะ (2000)

ข) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณร้อยละเอทานอล

จากการทดลองนีพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณร้อยละเอทานอลในสาโททีผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมทีมีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์ แปรผันผกผันกัน กล่าวคือ เมือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาก ปริมาณร้อยละเอทานอลทีพบมีค่าตำ ซึงผลทีได้สอดคล้องกับการทดลองของ กุณฑลี ไกรธรรมจิตกุล (2547) นริสา ตรีเนตร (2550) และ อำภา หลวงคล้ายโพธิ์ (2552) ผลของการทดลองนีพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสาโททีผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมทีมีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 5 สายพันธุ์มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุมทีไม่มีการเติมยีสต์ลงไป ($p<0.05$) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ายีสต์ต่างสายพันธุ์มีความสามารถในการเปลียนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลต่างกัน ซึงผลทีได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Torrens และคณะ (2008)

5.2.2 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory test) ในสาโท

จากผลการทดลองทางประสาทสัมผัสด้วยการชิมโดยผู้เชียวชาญทางด้านไวน์และสาโทจำนวน 10 คน เมือนำคะแนนทีได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS พบว่า คะแนนรวมเฉลียของสาโททีผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมจากการเติมยีสต์สายพันธุ์

N5D8 มีคะแนนมากที่สุด เท่ากับ 75.27 รองลงมาคือสาโทที่ผลิตโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ 493 EDV (สายพันธุ์ทางการค้า) และ สายพันธุ์ BMD8 ด้วยคะแนน 74.72 และ 74.07 คะแนน ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าสาโทที่ผลิตโดยใช้ยีสต์ที่คัดแยกจากลูกแป้งหรือสาโทในที่นี้คือสายพันธุ์ N5D8 และ NP101D8 มีคุณภาพด้านกลิ่นรสดีกว่าหรือเทียบเท่าสาโทที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ทางการค้าซึ่งในที่นี้คือสายพันธุ์ 493 EDV ผลที่ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Callejon และคณะ (2010) พบว่าในการทดสอบทางประสาทสัมผัสของไวน์ที่ผลิตจากยีสต์ที่คัดแยกได้จากผิวองุ่น (ยีสต์ท้องถิ่น) มีคุณภาพด้านกลิ่นรสดีกว่าไวน์ที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า

5.2.3 การวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่น (Volatile compounds) ในสาโทที่ได้

จากการวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์เทียบกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่ไม่มีการเติมยีสต์ (ชุดควบคุม) พบว่า สารกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ถูกตรวจพบได้ในสาโทที่มีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* เท่านั้น ยกเว้นสาโทที่ผลิตจากการเติมยีสต์สายพันธุ์ BMD8 ซึ่งไม่พบสารกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์เช่นเดียวกับชุดควบคุม ชนิดและปริมาณของฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบแตกต่างกันตามสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ ซึ่งยีสต์แต่ละสายพันธุ์จะมีบทบาทในการผลิตสารต่างๆ ในกระบวนการหมักต่างกัน (Romano, 2003) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของหลายๆ งานวิจัยเช่น Iranzo และคณะ (2000) Meteo และคณะ (2006) Estevez และคณะ (2004) และ Torrens และคณะ (2008) ความเข้มข้นของฟูเซลแอลกอฮอล์โดยรวมของสาโททั้งหมดในการทดลองนี้มีค่าต่ำกว่า 300 มก./ล. (Swieger และคณะ, 2009) ปริมาณที่พบส่งผลทำให้สาโทมีกลิ่นรสดี ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลทดสอบทางประสาทสัมผัส กล่าวคือ สาโทที่มีการเติมยีสต์สายพันธุ์ N5D8 และ 493 EDV ซึ่งเป็นสาโทที่ได้คะแนนเฉลี่ยรวมสูง ต่างก็มีความเข้มข้นของสารกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์โดยรวมในระดับสูง ยกเว้นสาโทที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ BMD8 ที่ไม่พบสารกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ ซึ่งส่งผลทำให้สาโทที่ได้มีคะแนนทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นต่ำ แต่กลับได้รับคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติและการยอมรับสูง เนื่องจากสาโทที่ได้มีรสชาติที่หวาน กลมกล่อมกว่าสาโทอื่นๆ ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้ไม่ได้มีการปรุงแต่งรสชาติตัวอย่างสาโทเหมือนกับสาโททางการค้า ดังนั้นรสชาติของสาโทที่ได้จึงไม่มีรสหวาน ไม่กลมกล่อม ส่งผลให้สาโทที่เติมยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ (ยกเว้นยีสต์สายพันธุ์ BMD8) ได้คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติต่ำ

สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์ที่พบในสาโท ได้แก่ เอทิลแอซีเทต เอทิลเดคาโนเอท เอทิลออกทาโนเอท และ 2 - ฟีนิลเอทิลแอซีเทต ซึ่งเป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้ เอทิลแอซีเทตเป็นเอสเทอร์ที่พบมากและมีความสำคัญในไวน์ จากการทดลองนี้พบปริมาณเอทิลแอซีเทตต่ำกว่า 80

มก./ล. ในทุกชุดการทดลอง ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลของ Meteo และคณะ (2006) ที่รายงานว่ายีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* มีความสามารถในการผลิตเอทิลแอซีเทตในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับยีสต์ในกลุ่ม non - *Saccharomyces* นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของเอทิลแอซีเทตที่พบแปรผกผันกับปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์โดยรวม ผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Meteo และคณะ (2006)

อะเซทัลดีไฮด์เป็นสารประกอบให้กลิ่นที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง มีรายงานว่าถึงอิทธิพลของปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ต่อเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ว่า ถ้าความเข้มข้นของอะเซทัลดีไฮด์ต่ำจะให้กลิ่นดีในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เช่น กลิ่นผลไม้ แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าความเข้มข้นสูงเกิน 100 – 120 มก./ล. จะส่งผลทำให้เกิดกลิ่นที่ไม่ดี เช่น กลิ่นเหม็นเขียว หรือกลิ่นเหม็นหืน ใน เบียร์ และไวน์ เป็นต้น (Liu และคณะ, 2000) จากการทดลองนี้พบว่าระดับความเข้มข้นของอะเซทัลดีไฮด์ที่ต่างกันในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมยีสต์ต่างสายพันธุ์ ผลที่ได้สอดคล้องกับ Meteo และ คณะ (2006) และ Callejon และคณะ (2010) ระดับความเข้มข้นที่พบในสาโทที่ผลิตจากการเติมยีสต์สายพันธุ์ BMD8 มีค่าสูงเกิน 120 มก./ล. ส่งผลทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดีในสาโท ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลของการทดสอบด้านประสาทสัมผัส กล่าวคือ ทำให้สาโทที่ผลิตจากการเติมยีสต์สายพันธุ์ BMD8 มีคะแนนเฉลี่ยโดยรวมต่ำ Perez-coello (1999) รายงานว่าความสามารถในการผลิตอะเซทัลดีไฮด์ของยีสต์แต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเปลี่ยนอะเซทัลดีไฮด์ให้เป็นเอทานอล ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์ BMD8 น่าจะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวไม่ดี จึงทำให้เกิดการสะสมของอะเซทัลดีไฮด์ในปริมาณสูง อีกทั้งยังทำให้ระดับเอทานอลที่เกิดขึ้นมีค่าต่ำมากอีกด้วย

เมื่อนำข้อมูลของสารประกอบให้กลิ่นที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค PCA เพื่อหาความสัมพันธ์ของยีสต์แต่ะสายพันธุ์ในการผลิตสารให้กลิ่นที่เกิดขึ้น ผลที่ได้พบว่าสามารถแบ่งยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ออกเป็น 3 กลุ่มได้อย่างชัดเจน กลุ่มแรกประกอบด้วยสายพันธุ์ N5D8 TISTR5161 และสายพันธุ์ทางการค้า 493 EDV กลุ่มที่สองมีเพียง 1 สายพันธุ์คือ NP101D8 และกลุ่มที่สาม ประกอบด้วยสายพันธุ์ BMD8 ซึ่งมีรูปแบบความสัมพันธ์ในการผลิตสารใกล้เคียงกับชุดควบคุม (น้ำหมักที่ไม่ได้เติมยีสต์)

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมี ปริมาณสารให้กลิ่น และผลของการทดสอบด้านประสาทสัมผัส พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้เป็นหนึ่งในเชื้อบริสุทธิ์ผสมเพื่อการผลิตสาโท เนื่องจากยีสต์สายพันธุ์ NP101D8 มีบทบาทเด่นที่แตกต่างจากยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า 493 EDV ในการผลิตฟีนิลแอลกอฮอล์ และ 2 – ฟีนิลเอทิล

แอซีเทต ในระดับสูง ซึ่งระดับทีพบส่งผลให้สาโททีผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ NP101D8 ได้รับคะแนนการทดสอบด้านประสาทสัมผัสทั้งด้านกลีนสูงทีสุด อีกทั้งยังมีความสามารถในการผลิตเอทานอลในปริมาณสูงอีกด้วย ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* NP101D8 จึงถูกคัดเลือกให้เป็นตัวแทนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* สำหรับใช้ในการผลิตสาโทโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมต่อไป

5.3 แปรผันอัตราส่วนยีสต์ *S. cerevisiae* กับยีสต์ non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์เพือให้ได้สาโททีมีคุณภาพด้านกลีนรสทีดี

เพือทำการศึกษาบทบาทของยีสต์ non – Saccharomyces ในการผลิตสารให้กลีนในสาโทรวมถึงการศึกษาหาอัตราส่วนทีเหมาะสมระหว่างยีสต์ non – *Saccharomyces* กับยีสต์ *Saccharomyces* sp. มุ่งหมายเพือนำไปใช้ผลิตสาโทจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมให้ได้สาโททีมีกลีนและรสดีและมีความซับซ้อนยิงขึ้น โดยผลิตสาโทจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมทีแปรผันอัตราส่วนระหว่างยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 (ตัวแทนยีสต์ในกลุ่ม *Saccharomyces* sp.) กับยีสต์ non – *Saccharomyces* ทีแยกได้จากลูกแป้งสุราหรือสาโทจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ คือ *Sm. fibuligera* NP101 *P. anomala* NP101 และ *I. orientalis* TISTR5259 นำตัวอย่างสาโททีได้มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ปริมาณกรดอินทรีย์ ปริมาณสารประกอบให้กลีน รวมถึงการทดสอบทางประสาทสัมผัส

5.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ก) ค่าความเป็นกรด – เบส และปริมาณกรดโดยรวม

จากผลการทดลองพบว่าสาโททีผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมทีแปรผันอัตราส่วนระหว่างยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์ ในทุกอัตราส่วนมีความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด – เบส กับปริมาณกรดโดยรวมไปในทิศทางผกผันกัน กล่าวคือ เมือความเป็นกรด – เบส มีค่าตำ จะพบปริมาณกรดโดยรวมมีค่าสูง นอกจากนียังพบว่าปริมาณของยีสต์ non – *Saccharomyces* ไม่มีผลต่อความเป็นกรด – เบส และปริมาณกรดโดยรวมในสาโท ผลทีได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Comitini และคณะ (2010) พบว่าปริมาณของยีสต์ non – *Saccharomyces* ในไวน์องุ่นทีผลิตโดยมีการแปรผันเชื้อบริสุทธิ์ผสมระหว่าง *S. cerevisiae* และ non – *Saccharomyces* ไม่ส่งผลต่อความเป็นกรด – เบส และปริมาณกรดโดยรวมทีพบ

ข) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณร้อยละเอทานอล

จากผลการทดลองพบว่าสาโททีผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมทีแปรผันอัตราส่วนระหว่างยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์ ในทุกอัตราส่วนมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทีระดับความเชือมันร้อยละ 95 (p<0.05)

เมื่อเทียบกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมเฉพาะยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 (ชุดควบคุม) รูปแบบของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ทั้งสามคู่เหมือนกัน กล่าวคือพบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่อัตราส่วนระหว่าง *S. cerevisiae* ต่อ non - *Saccharomyces* เป็น 1 ต่อ 4 ซึ่งส่งผลให้ร้อยละเอทานอลที่พบมีค่าต่ำสุด ในทางตรงกันข้าม ที่อัตราส่วน *S. cerevisiae* ต่อ non – *Saccharomyces* เป็น 1 ต่อ 0.5 พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุด และมีร้อยละเอทานอลสูงสุด แสดงถึงการแย่งอาหารเพื่อการเจริญจากยีสต์ non – *Saccharomyces* ที่มีต่อยีสต์ *S. cerevisiae* อย่างไรก็ตาม ระดับเอทานอลที่เกิดขึ้นในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* ทั้งสามคู่มีค่าต่ำกว่าสาโทชุดควบคุม ผลที่ได้สอดคล้องกับผลของ Comitini และคณะ (2010) และ Moreira และคณะ (2005) ที่พบว่าปริมาณเอทานอลที่พบในไวน์องุ่นที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมระหว่างยีสต์ *S. cerevisiae* และ non – *Saccharomyces* มีค่าต่ำกว่าไวน์องุ่นที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* เพียงชนิดเดียว

5.3.2 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory test)

จากผลการทดลองด้านประสาทสัมผัสด้วยการชิมโดยผู้เชี่ยวชาญทางด้านไวน์และสาโทจำนวน 10 คน พบว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในทุกอัตราส่วนมีคะแนนเฉลียโดยรวมและคะแนนในแต่ละด้านไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p>0.05) เมื่อเทียบกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมเฉพาะยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 (ชุดควบคุม) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณของยีสต์ non – *Saccharomyces* ที่ใช้ในการทดลองนี้อาจมีน้อยเกินไป ทำให้สารประกอบให้กลิ่นที่ยีสต์สร้างในระหว่างการหมักมีปริมาณน้อยจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้โดยทางประสาทสัมผัส ผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Comitini และคณะ (2010) ซึ่งได้ศึกษาอิทธิพลของการแปรผันยีสต์ non – *Saccharomyces* กับ *S. cerevisiae* ในการผลิตสารให้กลิ่นในไวน์ พบว่ารูปแบบของการสร้างสารประกอบให้กลิ่นแตกต่างอย่างชัดเจนในเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนที่มียีสต์ non – *Saccharomyces* เป็นจำนวนมาก เช่น ในอัตราส่วนระหว่าง non – *Saccharomyces* ต่อ *S. cerevisiae* เท่ากับ 100 ต่อ 1 หรือ 10,000 ต่อ 1 เป็นต้น

5.3.3 การวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่น (Volatile compounds) ในสาโทที่ได้

จากการวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอัตราส่วนต่าง

ๆ เปรียบเทียบกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 (ชุดควบคุม) เพียงชนิดเดียว พบว่า

ปริมาณอะเซทัลดีไฮด์ที่พบในสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *I. orientalis* TISTR5259 และสาโทที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *P. anomala* NP101 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05) เมื่อเทียบกับสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมเฉพาะยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 เพียงชนิดเดียว (ชุดควบคุม) แต่ไม่พบความแตกต่างในสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *Sm. fibuligera* NP101

สารในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในการทดลองนี้ ได้แก่ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ไอโซบิวทานอล และฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ จากรายงานของ Swieger และคณะ (2009) พบว่าความเข้มข้นของฟูเซลแอลกอฮอล์ที่พบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีความสำคัญ โดยพบว่าฟูเซลแอลกอฮอล์โดยรวมไม่ควรเกิน 300 มก./ล. ถ้าเกินระดับดังกล่าวจะส่งผลทำให้เกิดกลิ่นไม่ดี มีลักษณะฉุน และอาจส่งผลไปกลบกลิ่นที่ดีของสารชนิดอื่นได้ จากผลการทดลองนี้พบว่า สาโทในทุกชุดการทดลองมีปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์โดยรวมต่ำกว่า 300 มก./ล. ในสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณฟูเซลแอลกอฮอล์น้อยกว่าในชุดควบคุม อัตราส่วนที่พบฟูเซลแอลกอฮอล์โดยรวมมากที่สุดในสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *I. orientalis* TISTR5259 และ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *P. anomala* NP101 ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 ส่วนสาโทที่ผลิตจากการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *Sm. fibuligera* NP101 พบในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

สารประกอบให้กลิ่นในกลุ่มเอสเทอร์ที่พบได้แก่ เอทิลแอซีเทต เอทิลเดคาโนเอท 2 – ฟีนิลเอทิลแอซีเทต และเอทิลออกทาโนเอท ซึ่งเป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้ จากการทดลองนี้พบว่าปริมาณเอสเทอร์โดยรวมที่พบในสาโทที่มีการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีปริมาณมากสุดที่อัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 ซึ่งปริมาณที่พบในอัตราส่วนนี้มีค่ามากกว่าในชุดควบคุม

เมื่อนำข้อมูลของสารประกอบให้กลิ่นที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค PCA เพื่อหาความสัมพันธ์ของอัตราส่วนของยีสต์ในแต่ละคู่ที่มีต่อการสร้างสารให้กลิ่นในสาโท พบว่าอัตราส่วนของยีสต์ในแต่ละคู่มีความสัมพันธ์ต่อการผลิตสารให้กลิ่นแยกกันอย่างชัดเจน ซึ่งจากผลที่ได้สรุปได้ว่า การแปรผันระหว่างยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *I. orientalis* TISTR5259 และ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ *P. anomala* NP101 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 มี

ความสัมพันธ์อย่างสูงต่อการผลิตสารประกอบให้กลิ่นที่ดีได้จำนวนมากชนิดที่สุด ส่วนคู่ของ *S. cerevisiae* NP101D8 กับ *Sm. fibuligara* NP101 ผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค PCA ไม่สามารถระบุอัตราส่วนที่เหมาะสมได้อย่างชัดเจน จึงจำเป็นต้องใช้ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสมาช่วยประกอบในการตัดสินใจ เมื่อพิจารณาผลขององค์ประกอบทางเคมีปริมาณสารประกอบให้กลิ่น รวมถึงผลของการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสาโทที่มีการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ non – *Saccharomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดต่อการนำไปใช้ผลิตสาโทจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมระหว่างยีสต์ *Saccharomyces* sp. กับ non – *Saccharomyces* คือ อัตราส่วน 1 ต่อ 0.5

อย่างไรก็ตามเมื่อนำผลการทดลองของน้ำหมักที่เติมเฉพาะราสองสายพันธุ์โดยไม่มีการเติมยีสต์ พบว่า ปริมาณของสารประกอบให้กลิ่นทั้งในกลุ่มฟูเซลแอลกอฮอล์ เอสเทอร์ ต่างมีระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าในสาโทที่มีการเติมยีสต์ในทุกชุดการทดลอง

กล่าวโดยสรุปพบว่ายีสต์แต่ละสปีชีส์มีความสามารถผลิตสารประกอบให้กลิ่นในสาโทแตกต่างกัน ทั้งนี้รูปแบบการสร้างสารให้กลิ่นจะมีความแตกต่างกันมากหรือน้อย ขึ้นกับสปีชีส์ของยีสต์ที่ใช้ (Fleet, 2003) จากการทดลองนี้พบว่าสาโทที่มีการเติมยีสต์ non – *Saccharomyces* ลงไปในอัตราส่วนที่เหมาะสมทำให้สาโทมีคุณภาพดีขึ้น มีความซับซ้อนของกลิ่นรสมากขึ้น เนื่องจากยีสต์ non – *Saccharomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์มีความสัมพันธ์กับการผลิตสารประกอบให้กลิ่นในสาโทโดยเฉพาะสารในกลุ่มเอสเทอร์ โดยยีสต์สายพันธุ์ *I. orientalis* TISTR5259 และ *Sm. fibuligera* NP101 เป็นสายพันธุ์ที่ดี เมื่อนำไปใช้ในการผลิตสาโทด้วยเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนที่เหมาะสมแล้วจะได้สาโทที่มีคุณภาพด้านกลิ่นรสดีและซับซ้อนกว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมยีสต์ *S. cerevisiae* เพียงชนิดเดียว ยีสต์สายพันธุ์ *I. orientalis* TISTR5259 และ *P. anomala* NP101 มีความสัมพันธ์อย่างสูงกับการผลิตเอทิลแอซีเทต และไอโซบิวทานอล ส่วนยีสต์สายพันธุ์ *Sm. fibuligera* NP101 มีความสัมพันธ์อย่างสูงกับการผลิตไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เอทิลออกทาโนเอท เอทิลเดคาโนเอท และ 2- ฟีนิลเอทิลแอซีเทต ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นผลไม้หรือกลิ่นดอกไม้ สาเหตุที่ยีสต์สายพันธุ์ *I. orientalis* สามารถสร้างสารประกอบให้กลิ่นในปริมาณสูงอาจเป็นเพราะยีสต์สายพันธุ์นี้มีความสามารถในการทนต่อภาวะที่มีปริมาณเอทานอลสูงได้ดีกว่ายีสต์ non – *Saccharomyces* ตัวอื่น ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์นี้จึงสามารถอยู่รอดในกระบวนการหมักได้นานกว่ายีสต์ non – *Saccharomyces* ตัวอื่น (Mingorance-Cazorla และคณะ, 2003) ในทางตรงกันข้ามยีสต์สายพันธุ์ *P. anomala* NP101 เป็นสายพันธุ์ที่เมื่อนำไปใช้ในการผลิตสาโทด้วยเชื้อบริสุทธิ์ผสมในอัตราส่วนระหว่างยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 ต่อยีสต์ชนิด non – *Saccharomyces* ที่ 1 ต่อ 0.5 ถึง 1 ต่อ 4 ได้สาโทที่มี

คุณภาพต่ำกว่าสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8 เพียงชนิดเดียว

จากผลการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงบทบาทของยีสต์แต่ละสปีชีส์ที่แยกได้จากลูกแป้งสุราที่เมื่อนำมาผลิตสาโทแล้วพบว่าสาโทที่ได้มีคุณภาพด้านกลีนและรสดี โดยพบว่ายีสต์แต่ละสปีชีส์ทั้งในกลุ่ม *Saccharomyces* sp. และ ในกลุ่ม non – *Saccharomyces* ต่างมีความสามารถในผลิตสารประกอบให้กลีนต่างกันออกไป ซึ่งผลจากงานวิจัยนี้นอกจากจะได้องค์ความรู้พื้นฐานของกลีนรสในสาโทที่ผลิตโดยยีสต์แต่ละสปีชีส์แล้ว ยังสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยต่อไปเพื่อนำไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรม การพัฒนากระบวนการผลิตสาโท เช่น การปรับปรุงสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมโดยการเพิ่มลดอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักให้เหมาะสมเนื่องจากมีรายงานจาก Lucia และคณะ (2009) ว่า การหมักไวน์ที่อุณหภูมิต่ำจะส่งผลให้ไวน์ที่ได้มีกลีนรสดีขึ้น เนื่องจากในภาวะที่อุณหภูมิต่ำ ยีสต์กลุ่ม non – *Saccharomyces* สามารถเจริญได้ดี ส่งผลให้สามารถผลิตสารประกอบให้กลีนเพิ่มมากขึ้นอีกด้วย นอกจากนี้ยังรวมถึงการพัฒนาคุณภาพด้านกลีนรสของสาโทให้มีความหลากหลายเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคมากขึ้นอีกด้วย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กุณฑลี ไกรธรรมจิตกุล. 2547. การศึกษาปัจจัยของสายพันธุ์ข้าวที่มีผลต่อกลิ่นและรสที่ดีของสาโทซึ่งผลิตจากข้าวเหนียวดำ เปรียบเทียบกับที่ผลิตจากข้าวเหนียวขาว โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

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

นภา โล่ห์ทอง. 2535. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต กรุงเทพฯ: พันนี พัลลิชชิง

นุชรี อ่อนพร้อม. 2547. ปัจจัยของสายพันธุ์ข้าวที่มีผลต่อกลิ่นและรสที่ดีของสาโท ซึ่งผลิตจากข้าวหอมนิลเปรียบเทียบกับการผลิตจากข้าวเหนียวขาว โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นริสา ตรีเนตร. 2550. ผลของยีสต์และราบางชนิดต่อสารให้กลิ่นในสาโท วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

พรพิมล ควรรณสุ. 2548. ผลของพันธุ์และระดับการขัดสีข้าวต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีระหว่างการหมักไวน์ข้าว วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

มนตรี เชาวน์สังเกต. 2521. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และราเพื่อใช้ผลิตไวน์ข้าว วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

วรรัตน์ โชติวรรณพร. 2539. การผลิตไวน์ข้าวเหนียวดำโดยการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุมัลลิกา โมรากุล. 2545. การพัฒนากรรมวิธีการผลิตไวน์ข้าว วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุภมาส ไข่คำ. 2544. การศึกษาคุณภาพของสุรากลั่นพื้นบ้านที่ผลิตในเขตภาคเหนือตอนบน วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สุหัทยา นำชัยสีวัฒนา. 2549. ผลของสมุนไพรและเครื่องเทศต่อสารให้กลิ่นในไวน์ข้าว วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

อำภา หลวงคล้ายโพธิ์. 2552. ประชากรจุลินทรีย์และคุณภาพของสาโท การเปรียบเทียบระหว่างการใช้หัวเชื้อลูกแป้งและเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แยกได้จากลูกแป้ง วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

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

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

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

Barnett, J. A., Payne, R. W. ,and Yarrow, D. 2000. Yeasts: Characteristics and identification. UK: Cambridge University Press.

Callejon, R. M., et al. 2010. Volatile and sensory profile of organic red wines produced

by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. Analytica Chimica Acta. 660: 68-75.

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

Comitini, F., et al. 2010. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology. In Press, Corrected Proof.

de Hoog, G. S., Guarro, J. , Gene J. ,and Figueras M.J. 2000. Atlas of clinical Fungi 2nd Ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures Universitat Rovira i Virgili Netherlands.

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

Estévez, P., Gil, M. L. ,and Falqué, E. 2004. Effects of seven yeast strains on the volatile composition of Palomino wines. International Journal of Food Science & Technology. 39: 61-69.

Eustace, R. ,and Thornton, R. J. 1987. Selective hybridization of wine yeasts for higher yields of glycerol. Canadian journal of Microbiology. 33: 112-117.

Fan, W. ,and Qian, M. C. 2005. Headspace Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography Olfactometry Dilution Analysis of Young and Aged Chinese Yanghe Daqu Liquors. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 7931-7938.

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

Gomes, F. C. O., Silva, C. L. C., Marini, M. M., Oliveira, E. S. ,and Rosa, C. A. 2007. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. Journal of Applied Microbiology. 103: 2438-2447.

Haruta, S., et al. 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a

traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. International Journal of Food Microbiology. 109: 79-87.

Hazelwood, L. A., Daran, J.-M., van Maris, A. J. A., Pronk, J. T. ,and Dickinson, J. R. 2008. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. Applied and Environmental Microbiology. 74: 2259-2266.

Hofrichter, M., Nout, M.J.R., and Aidoo, K.E. 2010. Asian Fungal Fermented Food. Industrial Applications. 10: 29-58.

Iranzo, J. U. F., Magana, F. G. ,and Vinas, A. M. G. 2000. Evaluation of the formation of volatiles and sensory characteristics in the industrial production of white wines using different commercial strains of the genus Saccharomyces. Food Control. 11: 143-147.

Jackson, R. S. 2000. Wine Science : pronciple practice, perception 2nd ed. USA: Academic press.

Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H. ,and Pretorius, I. S. 2003. The Effect of Non-*Saccharomyces* Yeasts on Fermentation and Wine Quality. South African Journal of Enology and Viticulture. 24: 55-62.

Kodama, Y., Omura, F., Miyajima, K. ,and Ashikari, T. 2001. Control of higher alcohol production by manipulation of the BAP2 gene in brewing yeast. Journal of the American society of Brewing Chemists. 59: 157-162.

Kolarova, N., and Augustín, J. 2001. Production of polysaccharide hydrolases in the genus Rhizopus. Folia Microbiologica. 46: 223-226.

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

Lamikanra, O. 1997. Changes in Organic Acid Composition during Fermentation and Aging of Noble Muscadine Wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 935-937.

Li, H., Tao, Y.-S., Wang, H. ,and Zhang, L. 2008. Impact odorants of Chardonnay dry

white wine from Changli County (China). European Food Research and Technology. 227: 287-292.

Lilly, M., Lambrechts, M. G. ,and Pretorius, I. S. 2000. Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase Activity on Flavor Profiles of Wine and Distillates. Applied and Environmental Microbiology. 66: 744-753.

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

Liu, S.-Q. ,and Pilone, G. J. 2000. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. International Journal of Food Science & Technology. 35: 49-61.

Mateos, J. R. A., Prez-Nevado, F. ,and Fernandez, R. M. 2006. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. Enzyme and Microbial Technology. 40: 151-157.

Mattick, L. R. and Rice, A. C. 1970. Survey of the Glycerol Content of New York State Wines. American Journal of Enology and Viticulture. 21: 213-215.

Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry. 31: 426-428.

Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jiménez, J. M., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J. ,and Rodríguez-Vico, F. 2003. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 19: 297-304.

Noble, A. C. and Bursick, G. F. 1984. The Contribution of Glycerol to Perceived Viscosity and Sweetness in White Wine. American Journal of Enology and Viticulture. 35: 110-112.

Oliveira, E. S., Cardello, H. M. A. B., Jeronimo, E. M., Souza, E. L. R. ,and Serra, G. E. 2005. The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21: 707-715.

Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E., Moreno, J. A. ,and Mauricio, J. C. 2004.

Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. Food Chemistry. 84: 585-590.

Querol, A. ,and Fleet, G. 2006. Yeast in food and beverages 2nd ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Roehr, M. 2001. The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications. Weinheim, Germany: Wiley-Vch Publishing.

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

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. ,and Capece, A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. International Journal of Food Microbiology. 86: 169-180.

Saerens, S. M. G., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J. ,and Thevelein, J. M. 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbial Biotechnology. 3: 165-177.

Sirisantimethakom, L., Laopaiboon, L., Danvirutai, P. ,and Laopaiboon, P. 2008. Volatile Compounds of a Traditional Thai Rice Wine. Biotechnology. 7: 505-513.

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

Sujaya, I. N., et al. 2004. Identification and characterization of yeasts in brem, a traditional Balinese rice wine. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 20: 143-150.

Swiegers, J. H., et al. 2009. The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. Food Microbiology. 26: 204-211.

Tester, R. F. ,and Morrison, W. R. 1990. Swelling and gelatinization of cereal starches. II. Waxy rice starches. Cereal Chemistry. 67: 558-563.

Torrens, J., Urp, P., Riu-Aumatell, M., Vichi, S., Lopez-Tamames, E. and Buxaderas, S. 2008. Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. International Journal of Food Microbiology. 124: 48-57.

Tsuyoshi, N., et al. 2005. Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a

microbial starter for amylolytic fermentation. International Journal of Food Microbiology. 99: 135-146.

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

Viana, F., Gil, J. V., Genovs, S., Valls, S. ,and Manzanares, P. 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. Food Microbiology. 25: 778-785.

Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H. ,and F.S.Nury 1989. Production Wine Analysis. New York: Chapman & Hall.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato dextrose agar (PDA)

Potato starch	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม

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

Yeast malt extract agar (YM)

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

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

Rose bengal agar

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

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

L-lysine medium

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

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

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสาโท

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

การเตรียมสารละลาย Phenopthalene

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

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

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

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

V = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรากไซด์เป็นนอร์แมล (N)

v = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

MW (กรดแลคติก) = 90

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

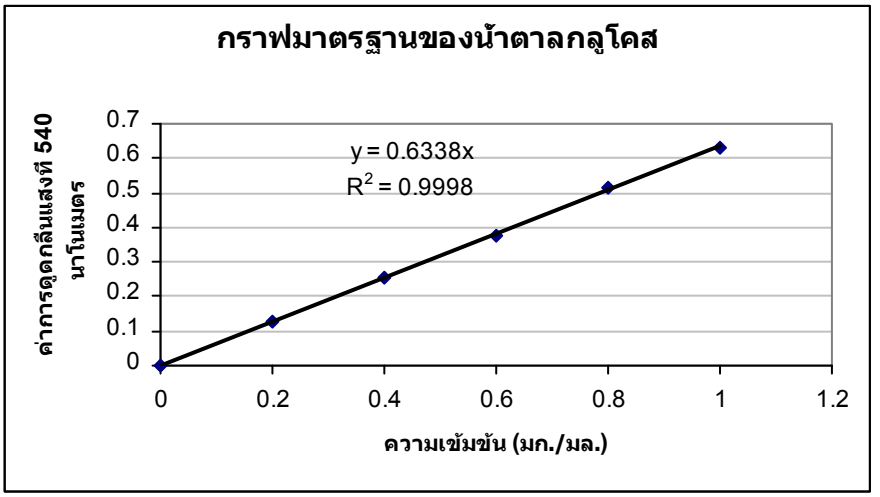
การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก (Dinitrosalicylic acid, DNSA)

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

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

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

ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 และ 1.2 มก./มล. และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ (blank) แล้วเขียนกราฟระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร



ภาพที ข1 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของกลูโคส

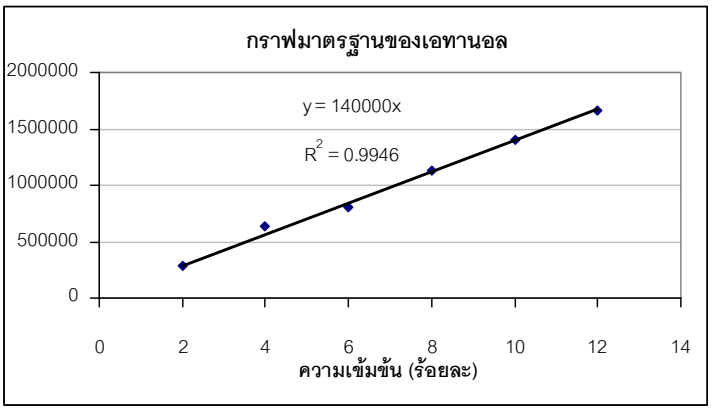
วิธีวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลและสารประกอบให้กลินโดยวิธี GC-FID

<u>การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลและสารประกอบให้กลิน</u>

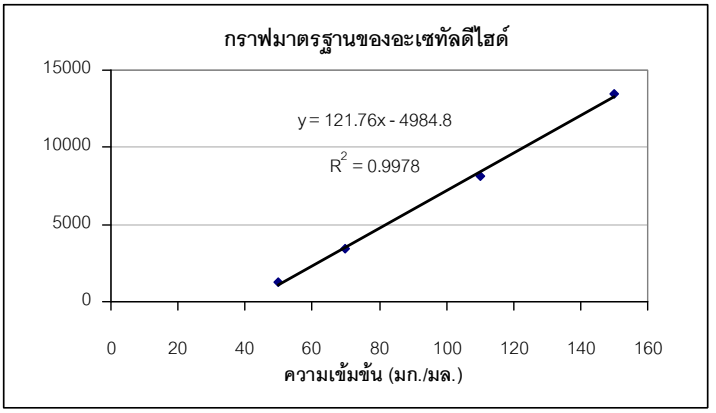
เตรียมสารละลายมาตรฐานของ อะเซทัลดีไฮด์ อะซีโตน เอทิลแอซีเทต เมทานอล 2 – โพรพานอล เอทิลบิวทาเรท 1 – โพรพานอล ไอโซบิวทานอล ไอโซเอมิลแอซีเทต 1 – บิวทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เอมิลแอลกอฮอล์ เอทิลออกทาโนเอท กรดแอซีติก เอทิลเดคาโนเอท 2 – ฟีนิลเอทิลแอซีเทต ฟีนิลแอลกอฮอล์ และ กรดออกทาโนอิค ความเข้มข้น 10000 มก./มล. ตัวอย่างละ 3 มิลลิลิตร ส่วนเอทานอลเตรียมให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 20 จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานรวมของสารประกอบให้กลินและเอทานอลโดยปิเปตสารมาตรฐานที่เตรียมไว้ผสมรวมกันที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 20 50 70 90 110 150 และ 200 มก./มล.

นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี GC – FID มาทำกราฟมาตรฐานของเอทานอลและสารประกอบให้กลินแต่ละชนิด โดยเขียนกราฟระหว่างค่าพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด

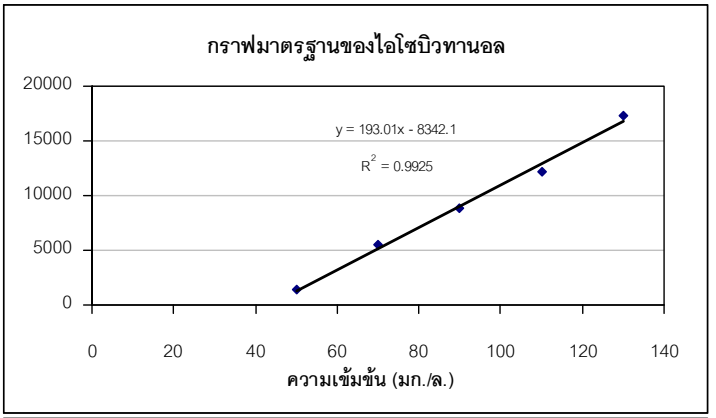
ก)



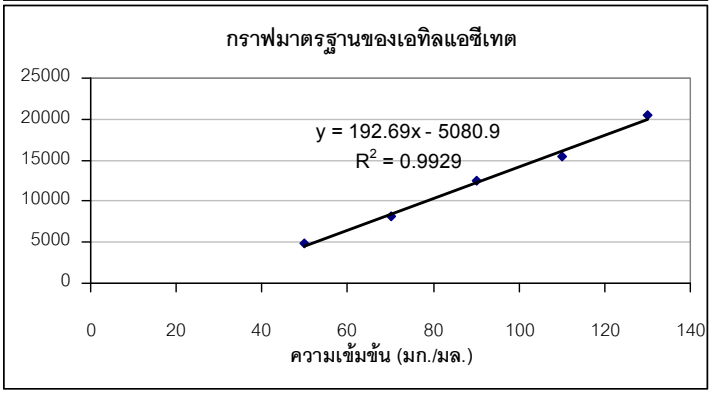
ข)



ค)



ง)



ภาพที่ ข2 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของเอทานอลและสารประกอบให้กลิ่น
ก) เอทานอล ข) อะเซทัลดีไฮด์ ค) ไอโซบิวทานอล ง) เอทิลแอซีเทต

ภาคผนวก ค
ใบให้คะแนนการชิมสาโท

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

หมายเหตุ

คะแนนที่บ่งชั้นคุณภาพไวน์:	ยอดเยียมมาก	91 – 100 คะแนน
	ยอดเยียม	81 – 90 คะแนน
	ดี	71 – 80 คะแนน
	พอใช้	61 – 70 คะแนน
	ระดับจำหน่ายได้	51 – 60 คะแนน
	มีปัญหาในคุณภาพ	ตำกว่า 50 คะแนน

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

วิธีการให้คะแนน

สี **คะแนนเต็ม 10 คะแนน**

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

กลิ่น **คะแนนเต็ม 30 คะแนน**

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

รส **คะแนนเต็ม 40 คะแนน**

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

การยอมรับ **คะแนนเต็ม 20 คะแนน** (ความประทับใจในคุณภาพ)

ยอมรับมาก	18 – 20	คะแนน
ยอมรับ	14 -17	คะแนน
พอใช้	10 – 13	คะแนน
ไม่ชอบ	6 – 9	คะแนน
ไม่ชอบมาก	ต่ำกว่า 6	คะแนน

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

ภาคผนวก ง

ตารางที่ ง1 ปริมาณสารประกอบให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมที่แปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์

เชื้อบริสุทธิ์ผสม		อะเซทัลดีไฮด์	เอทิลแอซีเทต	ไอโซบิวทานอล	ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	เอทิลออกทาโอเอท	กรดแอซิติก	เอทิลเดคาโนเอท	2-ฟีนิลเอทิลแอซิเตท	กรดออกทาโนอิค	ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์
รา	ยีสต์										
รา1+รา2[a]	N5D8	58.96±1.66*	63.73± 5.14*	53.84±0.77*	60.18±1.03*	84.95±4.73*	3.09±0.78*	24.93±3.97	49.68±0.96	86.16±1.54*	ND
รา1+รา2[a]	NP101D8	85.64±0.51*	53.53±0.27*	ND	55.55±1.63*	65.17±3.89*	ND	25.45±0.85*	98.97±5.62*	ND	137.04±2.76*
รา1+รา2[a]	TISTR5161	60.57±0.87*	72.55±0.99*	55.27±2.63*	58.11±1.94*	ND	5.54±0.06	52.00±6.76*	55.63±7.77	60.83±13.05*	ND
รา1+รา2[a]	BMD8	139.58±4.44*	35.57±2.40	ND	ND	ND	2.50±0.16*	46.60±4.44*	ND	ND	ND
รา1+รา2[a]	493 EDV	66.31±1.61*	61.04±5.46*	51.10±2.05*	71.42±1.53*	ND	3.82±0.21*	53.08±0.81*	68.75±2.43	64.31±0.45*	ND
รา1+รา2[a, b]	-	92.37±2.92	36.75±2.33	ND	ND	ND	ND	16.22±1.78	48.54±2.12	ND	ND

หน่วยของปริมาณสารที่พบเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร

ND คือ not detected

* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

[a] หมายถึง รา 2 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง รา1 คือ *M. hiemalis* NN609 และ รา 2 คือ *R. microsporus* NN505

[b] คือ ชุดควบคุม

ตารางที่ ง2 ค่าคะแนนรวมเฉลี่ยของผลการทดลองทางประสาทสัมผัสของสาโทที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ผสมแปรผันอัตราส่วนยีสต์ในกลุ่ม *S. cerevisiae* NP101D8 กับยีสต์ในกลุ่ม non – *Saccharomyces* จำนวน 3 สายพันธุ์

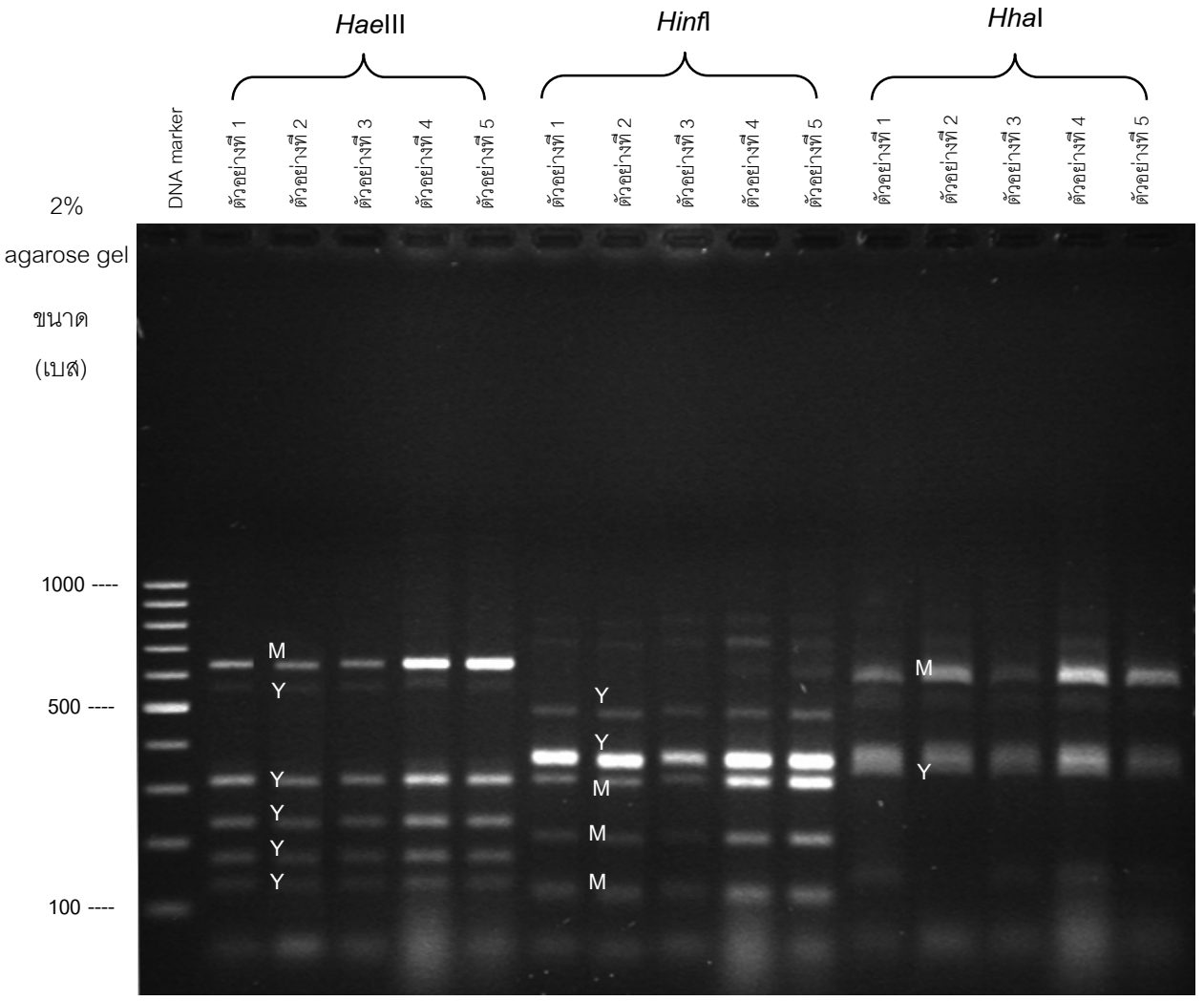
เชื้อบริสุทธิ์ผสม		**อัตราส่วนยีสต์ NP101D8 ต่อ Non - *Saccharomyces***	**คะแนน**				**คะแนนรวม** (100)
รา	**ยีสต์**		**สี** (10)	**กลิ่น** (30)	**รส** (40)	**ยอมรับ** (20)	
รา1+รา2[a]	NP101D8 แปรผันกับ *I. orientalis*	1 ต่อ 0.5	7.9±0.7	22.1±2.2	28.8±1.6	15.2±0.7	73.8±2.6
		1 ต่อ 1	7.8±0.8	21.9±3.5	27.3±3.6	14.8±1.2	72.6±5.1
		1 ต่อ 2	7.8±0.8	21.3±3.5	28.4±1.8	15.0±1.3	72.4±5.1
		1 ต่อ 4	7.7±0.7	20.0±4.5	26.7±3.1	13.8±2.4	68.2±8.6
รา1+รา2[a]	NP101D8 แปรผันกับ *P. anomala*	1 ต่อ 0.5	7.6±0.9	22.0±2.4	27.3±4.0	14.9±1.0	71.8±5.8
		1 ต่อ1	7.7±0.9	21.8±3.0	27.0±3.3	14.4±1.7	70.8±7.0
		1 ต่อ2	7.7±1.1	20.9±4.9	27.0±4.8	14.2±1.9	69.7±10.9
		1 ต่อ 4	7.7±0.9	20.8±4.0	26.9±3.7	13.9±2.7	69.2±9.5
รา1+รา2[a]	NP101D8 แปรผันกับ *Sm. fibuligera*	1 ต่อ 0.5	7.6±0.9	22.7±2.1	28.3±1.6	14.7±1.5	73.3±3.5
		1 ต่อ 1	7.7±0.9	22.5±1.9	28.4±3.6	14.7±1.7	73.2±4.7
		1 ต่อ 2	7.7±1.0	22.7±1.9	27.4±3.7	14.5±1.9	72.2±6.6
		1 ต่อ 4	7.7±0.9	22.4±2.1	27.3±3.9	14.4±2.2	71.7±6.8
รา1+รา2[a, b]	NP101D8	1 ต่อ 0	8.0±0.6	22.2±2.4	27.9±4.9	14.3±3.1	72.3±9.5

* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

[a] หมายถึง รา 2 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง รา1 คือ *M. hiemalis* NN609 และ รา 2 คือ *R. microsporus* NN505

[b] คือ ชุดควบคุม

ภาพที่ ง1 ตัวอย่างอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์และราจากสาโทที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์ ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ *Hae*III, *Hin*fI, *Hha*I



ตัวอย่างที่ 1 คือ สาโทที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมยีสต์ *S. cerevisiae* N5D8

ตัวอย่างที่ 2 คือ สาโทที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมยีสต์ *S. cerevisiae* NP101D8

ตัวอย่างที่ 3 คือ สาโทที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR5161

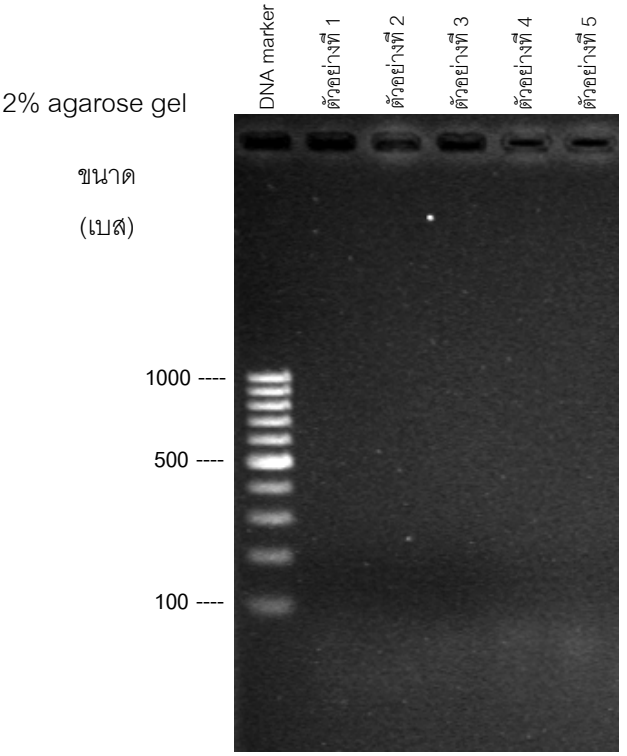
ตัวอย่างที่ 4 คือ สาโทที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมยีสต์ *S. cerevisiae* BMD8

ตัวอย่างที่ 5 คือ สาโทที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่เติมยีสต์ *S. cerevisiae* 493 EDV

M คือ แถบดีเอ็นเอของรา

Y คือ แถบดีเอ็นเอของยีสต์

ภาพที่ ง2 ตัวอย่างอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียจากสาโทจากสาโทที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมที่มีการแปรผันยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์



ภาคผนวก จ

ตารางที่ จ1 ตัวอย่างการวิเคราะห์ผลองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างสาโทที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์ ด้วย SPSS เวอร์ชั่น 17.0

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
pH	7.194	5	12	.003
TTA	.988	5	12	.464
RG	3.040	5	12	.053
Alcohol	2.122	5	12	.133

หมายเหตุ; pH คือ ค่ากรด – เบส, TTA คือ ปริมาณกรดโดยรวม,
RG คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, Alcohol คือ % เอทานอล

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
pH	Between Groups	.462	5	.092	34.438	.000
	Within Groups	.032	12	.003		
	Total	.494	17			
TTA	Between Groups	.145	5	.029	50.450	.000
	Within Groups	.007	12	.001		
	Total	.152	17			
RG	Between Groups	83421.015	5	16684.203	4464.711	.000
	Within Groups	44.843	12	3.737		
	Total	83465.858	17			
Alcohol	Between Groups	79.943	5	15.989	83.445	.000
	Within Groups	2.299	12	.192		
	Total	82.242	17			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Strain	(J) Strain	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
H	1	2	-.04667	.04230	.871	-.1887	.0954
		3	.15667*	.04230	.028	.0146	.2987
		4	.10667	.04230	.192	-.0354	.2487
		5	.03000	.04230	.977	-.1121	.1721
		6	.44000*	.04230	.000	.2979	.5821
	2	1	.04667	.04230	.871	-.0954	.1887
		3	.20333*	.04230	.004	.0613	.3454
		4	.15333*	.04230	.032	.0113	.2954
		5	.07667	.04230	.493	-.0654	.2187
		6	.48667*	.04230	.000	.3446	.6287
	3	1	-.15667*	.04230	.028	-.2987	-.0146
		2	-.20333*	.04230	.004	-.3454	-.0613
		4	-.05000	.04230	.837	-.1921	.0921
		5	-.12667	.04230	.091	-.2687	.0154
		6	.28333*	.04230	.000	.1413	.4254
	4	1	-.10667	.04230	.192	-.2487	.0354
		2	-.15333*	.04230	.032	-.2954	-.0113
		3	.05000	.04230	.837	-.0921	.1921
		5	-.07667	.04230	.493	-.2187	.0654
		6	.33333*	.04230	.000	.1913	.4754
	5	1	-.03000	.04230	.977	-.1721	.1121
		2	-.07667	.04230	.493	-.2187	.0654
		3	.12667	.04230	.091	-.0154	.2687
		4	.07667	.04230	.493	-.0654	.2187
		6	.41000*	.04230	.000	.2679	.5521
	6	1	-.44000*	.04230	.000	-.5821	-.2979
		2	-.48667*	.04230	.000	-.6287	-.3446
		3	-.28333*	.04230	.000	-.4254	-.1413

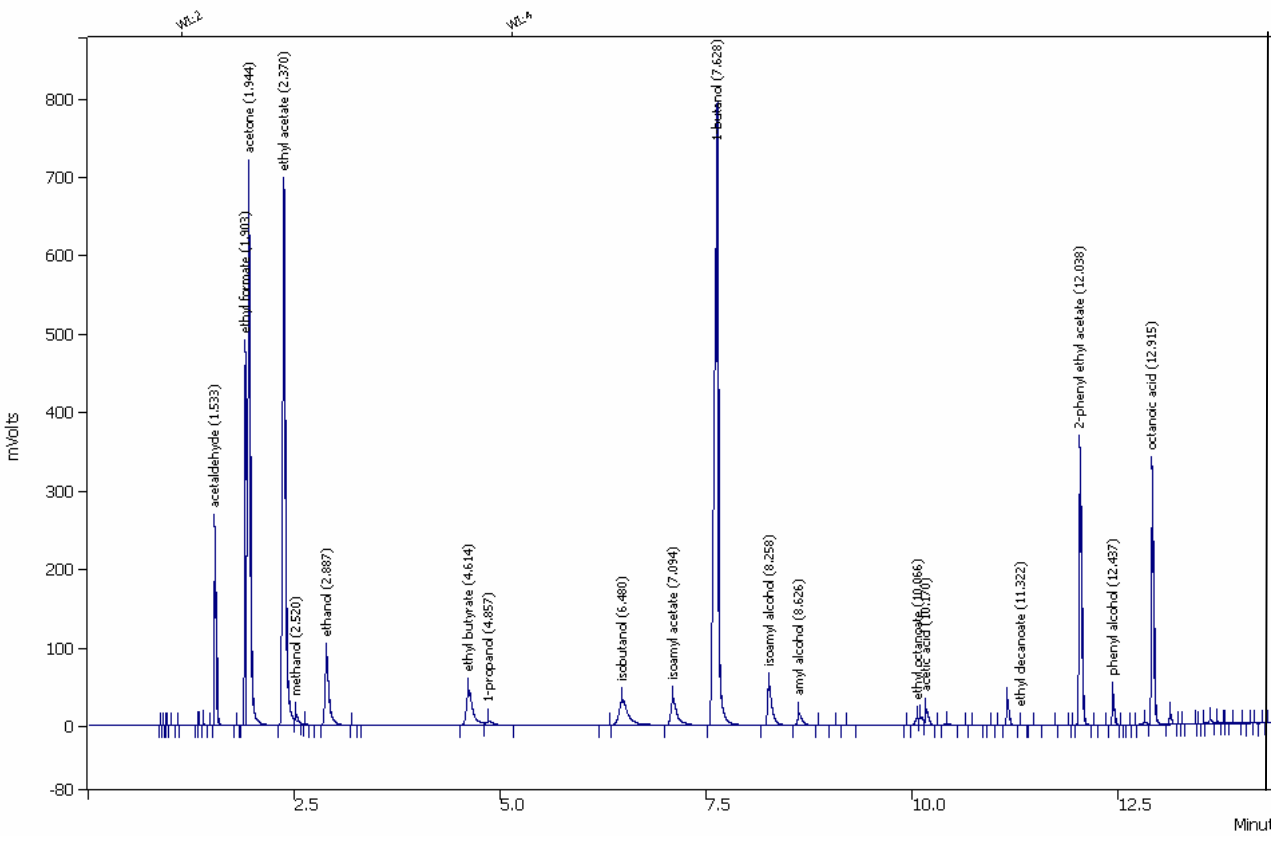
		4	-.33333*	.04230	.000	-.4754	-.1913
		5	-.41000*	.04230	.000	-.5521	-.2679
TTA	1	2	.030000	.019596	.653	-.03582	.09582
		3	-.150000*	.019596	.000	-.21582	-.08418
		4	-.114000*	.019596	.001	-.17982	-.04818
		5	-.006000	.019596	1.000	-.07182	.05982
		6	-.216000*	.019596	.000	-.28182	-.15018
	2	1	-.030000	.019596	.653	-.09582	.03582
		3	-.180000*	.019596	.000	-.24582	-.11418
		4	-.144000*	.019596	.000	-.20982	-.07818
		5	-.036000	.019596	.480	-.10182	.02982
		6	-.246000*	.019596	.000	-.31182	-.18018
	3	1	.150000*	.019596	.000	.08418	.21582
		2	.180000*	.019596	.000	.11418	.24582
		4	.036000	.019596	.480	-.02982	.10182
		5	.144000*	.019596	.000	.07818	.20982
		6	-.066000*	.019596	.049	-.13182	-.00018
	4	1	.114000*	.019596	.001	.04818	.17982
		2	.144000*	.019596	.000	.07818	.20982
		3	-.036000	.019596	.480	-.10182	.02982
		5	.108000*	.019596	.001	.04218	.17382
		6	-.102000*	.019596	.002	-.16782	-.03618
	5	1	.006000	.019596	1.000	-.05982	.07182
		2	.036000	.019596	.480	-.02982	.10182
		3	-.144000*	.019596	.000	-.20982	-.07818
		4	-.108000*	.019596	.001	-.17382	-.04218
		6	-.210000*	.019596	.000	-.27582	-.14418
	6	1	.216000*	.019596	.000	.15018	.28182
		2	.246000*	.019596	.000	.18018	.31182
		3	.066000*	.019596	.049	.00018	.13182
		4	.102000*	.019596	.002	.03618	.16782
		5	.210000*	.019596	.000	.14418	.27582

RG	1	2	-.27667	1.57838	1.000	-5.5783	5.0250
		3	-181.37667*	1.57838	.000	-186.6783	-176.0750
		4	-77.27000*	1.57838	.000	-82.5716	-71.9684
		5	-2.69333	1.57838	.553	-7.9950	2.6083
		6	-108.39667*	1.57838	.000	-113.6983	-103.0950
	2	1	.27667	1.57838	1.000	-5.0250	5.5783
		3	-181.10000*	1.57838	.000	-186.4016	-175.7984
		4	-76.99333*	1.57838	.000	-82.2950	-71.6917
		5	-2.41667	1.57838	.653	-7.7183	2.8850
		6	-108.12000*	1.57838	.000	-113.4216	-102.8184
	3	1	181.37667*	1.57838	.000	176.0750	186.6783
		2	181.10000*	1.57838	.000	175.7984	186.4016
		4	104.10667*	1.57838	.000	98.8050	109.4083
		5	178.68333*	1.57838	.000	173.3817	183.9850
		6	72.98000*	1.57838	.000	67.6784	78.2816
	4	1	77.27000*	1.57838	.000	71.9684	82.5716
		2	76.99333*	1.57838	.000	71.6917	82.2950
		3	-104.10667*	1.57838	.000	-109.4083	-98.8050
		5	74.57667*	1.57838	.000	69.2750	79.8783
		6	-31.12667*	1.57838	.000	-36.4283	-25.8250
	5	1	2.69333	1.57838	.553	-2.6083	7.9950
		2	2.41667	1.57838	.653	-2.8850	7.7183
		3	-178.68333*	1.57838	.000	-183.9850	-173.3817
		4	-74.57667*	1.57838	.000	-79.8783	-69.2750
		6	-105.70333*	1.57838	.000	-111.0050	-100.4017
	6	1	108.39667*	1.57838	.000	103.0950	113.6983
		2	108.12000*	1.57838	.000	102.8184	113.4216
		3	-72.98000*	1.57838	.000	-78.2816	-67.6784
		4	31.12667*	1.57838	.000	25.8250	36.4283
		5	105.70333*	1.57838	.000	100.4017	111.0050
Alcohol	1	2	.31000	.35740	.947	-.8905	1.5105
		3	4.77667*	.35740	.000	3.5762	5.9772
		4	3.66667*	.35740	.000	2.4662	4.8672

	5	1.21667*	.35740	.046	.0162	2.4172
	6	5.22333*	.35740	.000	4.0228	6.4238
2	1	-.31000	.35740	.947	-1.5105	.8905
	3	4.46667*	.35740	.000	3.2662	5.6672
	4	3.35667*	.35740	.000	2.1562	4.5572
	5	.90667	.35740	.188	-.2938	2.1072
	6	4.91333*	.35740	.000	3.7128	6.1138
3	1	-4.77667*	.35740	.000	-5.9772	-3.5762
	2	-4.46667*	.35740	.000	-5.6672	-3.2662
	4	-1.11000	.35740	.076	-2.3105	.0905
	5	-3.56000*	.35740	.000	-4.7605	-2.3595
	6	.44667	.35740	.805	-.7538	1.6472
4	1	-3.66667*	.35740	.000	-4.8672	-2.4662
	2	-3.35667*	.35740	.000	-4.5572	-2.1562
	3	1.11000	.35740	.076	-.0905	2.3105
	5	-2.45000*	.35740	.000	-3.6505	-1.2495
	6	1.55667*	.35740	.009	.3562	2.7572
5	1	-1.21667*	.35740	.046	-2.4172	-.0162
	2	-.90667	.35740	.188	-2.1072	.2938
	3	3.56000*	.35740	.000	2.3595	4.7605
	4	2.45000*	.35740	.000	1.2495	3.6505
	6	4.00667*	.35740	.000	2.8062	5.2072
6	1	-5.22333*	.35740	.000	-6.4238	-4.0228
	2	-4.91333*	.35740	.000	-6.1138	-3.7128
	3	-.44667	.35740	.805	-1.6472	.7538
	4	-1.55667*	.35740	.009	-2.7572	-.3562
	5	-4.00667*	.35740	.000	-5.2072	-2.8062

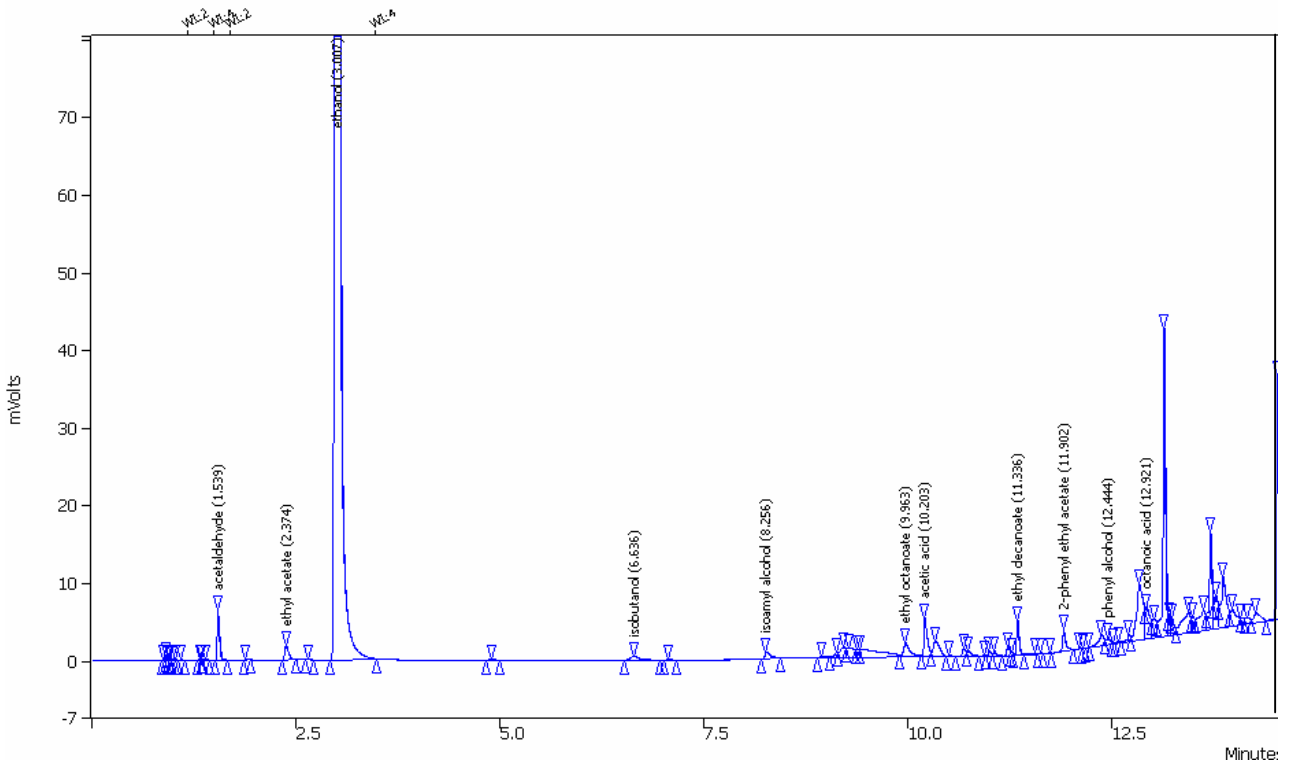
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ภาพที่ จ1 ตัวอย่างโครมาโทรแกรมของสารประกอบให้กลิ่นมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดแก๊สโครมาโทกราฟพร้อมเครื่องตรวจวัดชนิดเฟลมไอโอไนเซชัน (GC - FID) โดยเก็บตัวอย่างให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace)



Peak No.	Peak Name	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	acetaldehyde	1.533	-0.002	345427	VB	1.3	
2	ethyl format	1.903	-0.007	769918	BV	1.7	
3	acetone	1.944	-0.007	1377279	VP	1.6	
4	ethyl acetat	2.370	-0.006	1691762	PB	2.0	
5	methanol	2.520	-0.019	13763	TS	0.0	
6	ethanol	2.887	-0.018	306387	BB	2.7	
7	ethyl butyra	4.614	-0.023	251414	BV	4.4	
8	1-propanol	4.857	-0.031	36655	VB	7.1	
9	isobutanol	6.480	-0.010	274715	VV	6.1	
10	isoamyl acet	7.094	-0.036	194589	VV	4.2	
11	1-butanol	7.628	0.027	2568460	VP	2.8	
12	isoamyl alco	8.258	-0.010	197201	TF	0.0	
13	amyl alcohol	8.626	-0.019	58574	TF	0.0	
14	ethyl octano	10.066	0.111	30647	VV	4.4	
15	acetic acid	10.170	-0.068	59392	VV	2.5	
16	ethyl decano	11.322	0.077	2005	TS	0.0	
17	2-phenyl eth	12.038	-0.041	761235	PV	2.0	
18	phenyl alcoh	12.437	-0.027	69747	VP	1.6	
19	octanoic aci	12.915	-0.021	646514	VP	1.7	
	Totals:		-0.130	9655684			

ภาพที่ จ2 ตัวอย่างโครมาโทรแกรมของสารประกอบให้กลิ่นของตัวอย่างสาโทที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดแก๊สโครมาโทกราฟพร้อมเครื่องตรวจวัดชนิดเฟลมไอโอไนเซชัน (GC - FID) โดยเก็บตัวอย่างให้กลิ่นบริเวณที่ว่างเหนือสาร (headspace)



Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	acetaldehyde	0.9817	1.539	0.003	11822	BB	1.7	
2	ethyl acetat	0.0536	2.374	-0.016	6519	BB	2.9	
3	ethanol	4.9225	3.007	0.102	1018506	BB	3.2	C
4	isobutanol	0.0676	6.636	0.151	4105	BB	6.2	
5	isoamyl alco	0.4414	8.256	-0.024	4101	BB	4.6	
6	ethyl octano	0.0000	9.963	-0.103	10305	VV	4.5	
7	acetic acid	3.9551	10.203	-0.060	14325	VV	2.5	C
8	ethyl decano	4.4477	11.336	0.053	9319	VV	1.9	C
9	2-phenyl eth	1.0267	11.902	-0.201	7983	PP	2.5	
10	phenyl alcoh	0.0000	12.444	-0.035	3102	VV	0.0	
11	octanoic aci	2.6456	12.921	-0.030	14613	VV	0.0	C
	Totals:	18.5419		-0.160	1104700			

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศศิกานต์ บ่อผล เกิดเมื่อวันที่ 5 เมษายน พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2549 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิตสาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 ที่อยู่ปัจจุบัน 5/1020 หมู่บ้านประชาชื่น ตำบลบางตลาด อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี 11120

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้

1. งานการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 28th International Specialised Symposium on Yeast (ISSY28) ระหว่างวันที่ 15 - 18 กันยายน 2553 ณ โรงแรมมณเฑียร ริเวอร์ไซด์ กรุงเทพมหานคร ในหัวข้อ “ Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains based on the major volatile compounds and sensory quality of Sato ” (เสนอผลงานแบบโปสเตอร์)
2. งานการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ TSB2010: Biotechnology for Healthy Living ระหว่างวันที่ 20 – 22 ตุลาคม 2553 ณ จังหวัดตรัง ในหัวข้อ “Influence of the selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains on the production of volatile compounds in *Sato*” (เสนอผลงานด้วยวาจา)
3. งานประชุมวิชาการ โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 5 ระหว่างวันที่ 30 มีนาคม – 1 เมษายน 2554 ณ โรงแรมจอมเทียน ปาล์ม บีช เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี ในหัวข้อ “สปีชีส์ของยีสต์และบทบาทในการผลิตสารให้กลิ่นในสาโท” (เสนอผลงานด้วยวาจา)