



รายงานผลงานวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตสารให้กลิ่นรส
SCREENING OF FLAVOR PRODUCING YEAST

โดย

ฐปน ชื่นบาล สมคิด ดีจริง มยุรา ศรีกัลยานุกุล ศักดิ์ชัย เสถียรพิระกุล



รายงานผลงานวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตสารให้กลิ่นรส
SCREENING OF FLAVOR PRODUCING YEAST

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2543
จำนวน 197,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นายฐปน ชื่นบาล
ผู้ร่วมโครงการ นางสาวสมคิด ดีจริง
นางสาวมยุรา ศรีกัลยานุกุล
นายศักดิ์ชัย เสถียรพีระกุล

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
วันที่ 30 ตุลาคม 2544

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2543 จากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีจากความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในการอนุเคราะห์เชื้อยีสต์บางส่วน ที่ใช้ในการคัดเลือก และขอขอบพระคุณที่ปรึกษาโครงการวิจัย รศ.ดร.สาวิตรี ลิ้มทอง ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย รศ.ดร.เกรียงศักดิ์ ไชยโรจน์ และคุณพิสณฑ์ กิจสวัสดิ์ไพบุลย์ ที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลือ และให้คำแนะนำเป็นอย่างดี คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณ มา ณ โอกาสนี้

นายฐปน ชื่นบาล

นางสาวสมคิด ดีจริง

นางสาวมยุรา ศรีกัลยานุกุล

นายศักดิ์ชัย เสถียรพีระกุล

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	(ก)
สารบัญภาพ	(ข)
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	2
การตรวจเอกสาร	3
สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย	10
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	10
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	10
อุปกรณ์การวิจัย	11
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	13
สรุปผลการวิจัย	51
เอกสารอ้างอิง	52

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 จำนวนเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งต่าง	13
2 แสดงแหล่งตัวอย่างที่แยกเชื้อยีสต์และลักษณะของกลิ่นจากน้ำหมักจากยีสต์ ในอาหาร YM broth ทดสอบโดยการดม	14
3 แสดงคุณลักษณะความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของ เชื้อยีสต์สายพันธุ์ 7-18-1	21
4 แสดงคุณลักษณะความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของ เชื้อยีสต์สายพันธุ์ MD 1-2-1	22
5 แสดงคุณลักษณะความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของ เชื้อยีสต์สายพันธุ์ K44	23
6 แสดงคุณลักษณะความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของ เชื้อยีสต์สายพันธุ์ K404	24
7 แสดงผลโครมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟีที่วิเคราะห์จากองค์ประกอบ น้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ 7-18-1	25
8 แสดงผลโครมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟีที่วิเคราะห์จากองค์ประกอบ น้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ MD 1-2-1	30
9 แสดงผลโครมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟีที่วิเคราะห์จากองค์ประกอบ น้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ K44	34
10 แสดงผลโครมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟีที่วิเคราะห์จากองค์ประกอบ น้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ K404	42

(ข)

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะเซลล์ของยีสต์สายพันธุ์ ก) 7-18-1 ข) สายพันธุ์ MD1-2-1 ค) สายพันธุ์ K44 ง) สายพันธุ์ K404 กำลังขยาย 1000 เท่า	20
2 โครมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟี ของน้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ 7-18-1	25
3 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น 3-Methyl-1- butanol	26
4 แมสสเปกตรัมของ 3-Methyl-1- butanol	26
5 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น 2-Methyl-1- butanol	27
6 แมสสเปกตรัมของ 2-Methyl-1- butanol	27
7 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น Isoamyl acetate	28
8 แมสสเปกตรัมของ Isoamyl acetate	28
9 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น Ethyl acetate	29
10 แมสสเปกตรัมของ Ethyl acetate	29
11 โครมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟี ของน้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ MD 1-2-1	30
12 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น 3-Methyl-1- butanol	31
13 แมสสเปกตรัมของ 3-Methyl-1- butanol	31
14 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น 2-Methyl-1- butanol	32
15 แมสสเปกตรัมของ 2-Methyl-1- butanol	32
16 แมสสเปกตรัมของพีค unidentified	33

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
17 โคโรมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟี ของน้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ K44	34
18 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น 3-Methyl-1- butanol	35
19 แมสสเปกตรัมของ 3-Methyl-1- butanol	35
20 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น 2-Methyl-1- butanol	36
21 แมสสเปกตรัมของ 2-Methyl-1- butanol	36
22 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น Isoamyl acetate	37
23 แมสสเปกตรัมของ Isoamyl acetate	37
24 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น Amyl propionate	38
25 แมสสเปกตรัมของ Amyl propionate	38
26 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น Phenylethyl alcohol	39
27 แมสสเปกตรัมของ Phenylethyl alcohol	39
28 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น Ethyl acetate	40
29 แมสสเปกตรัมของ Ethyl acetate	40
30 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น Phenylethyl propionate	41
31 แมสสเปกตรัมของ Phenylethyl propionate	41
32 โคโรมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟี ของน้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ K404	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
33 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น 3-Methyl-1- butanol	43
34 แมสสเปกตรัมของ 3-Methyl-1- butanol	43
35 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น Ethyl n-valerate	44
36 แมสสเปกตรัมของ Ethyl n-valerate	44
37 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น Isoamyl acetate	45
38 แมสสเปกตรัมของ Isoamyl acetate	45
39 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น 1-Butanol	46
40 แมสสเปกตรัมของ 1-Butanol	46
41 แมสสเปกตรัมของพีค unidentified	47
42 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรม ที่คาดว่าจะจะเป็น Phenylethyl alcohol	48
43 แมสสเปกตรัมของ Phenylethyl alcohol	48
44 แมสสเปกตรัมของพีค unidentified	49
45 แสดงการเกิด higher alcohol จากเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโนที่มีสายโซ่	50

การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตสารให้กลิ่นรส

SCREENING OF FLAVOR PRODUCING YEAST

ฐปน ชื่นบาล¹ สมคิด ดีจิง¹ มยุรา ศรีกัลยานุกุล¹ ศักดิ์ชัย เสถียรพีระกุล²

TAPANA CHEUNBARN¹ , SOMKID DEEJING¹

MAYARA SRIKANLAYANUKUL¹ , SAKCHAI SATEINPEERAKUL²

¹ภาควิชาชีววิทยา ²ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

บทคัดย่อ

จากการศึกษาโดยแยกเชื้อยีสต์จากแหล่งต่าง ๆ เช่น ดิน ใบไม้ ดอกไม้ ผลไม้ และอาหารหมัก บนอาหาร YM agar ได้เชื้อยีสต์ทั้งหมด 144 ไอโซเลท และเมื่อทำการคัดเลือกโดยการหมักในอาหาร YM broth แล้วทดสอบกลิ่นโดยการดม พบว่า เชื้อยีสต์ที่ให้กลิ่นเป็นที่น่าพอใจมีจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ 7-18-1, MD1-2-1, K44 และ K404 ซึ่งแยกได้จากดอกไม้ ผลไม้ มะเขือเทศ และดินจากโรงนม ตามลำดับ การจัดจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ 7-18-1, MD1-2-1, K44 และ K404 พบว่า เป็น *Candida pelliculosa*, *Candida norvegica*, *Candida valida* และ *Geotrichum* sp. ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารหอมระเหยโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี ที่สร้างโดยเชื้อยีสต์ 7-18-1 พบว่า ประกอบด้วย 3-Methyl-1-butanol, 2-Methyl-1-butanol, Isoamyl acetate และ Ethyl acetate เชื้อยีสต์ MD1-2-1 สร้าง 3-Methyl-1-butanol, 2-Methyl-1-butanol และสารที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ 1 ชนิด ส่วนเชื้อยีสต์ K44 สร้างสาร 3-Methyl-1-butanol, 2-Methyl-1-butanol, Phenylethyl alcohol, Isoamyl acetate, Amylpropionate, Ethyl acetate และ Phenylethyl propionate และเชื้อยีสต์ K404 สร้าง 3-Methyl-1-butanol, 1-Butanol, Phenylethyl alcohol, Ethyl isovalerate, Isoamyl acetate และสารที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้อีก 2 ชนิด

Abstract

One hundred and forty four yeasts strains were isolated from soil, leaves, flowers, fruits and fermented foods on YM agar. Four selected strains that could produce pleasant aroma screening by smelling in YM broth were 7-18-1, MD1-2-1, K44 and K404. These selected strains were isolated from flowers, fruits, tomatoes and soil, respectively. They were identified as *Candida pelliculosa*, *Candida norvegica*, *Candida valida* and *Geotrichum* sp., respectively. The volatile compounds were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry and found that the strain 7-18-1 produced 3-Methyl-1-butanol, 2- Methyl-1-butanol, Isoamyl acetate, Ethyl acetate. The strain MD1-2-1 produced 3-Methyl-1-butanol, 2-Methyl-1-butanol and 1 unidentified compound. The strain K44 produced 3-Methyl-1-butanol, 2- Methyl-1-butanol, Phenylethyl alcohol, Isoamyl acetate, Amylpropionate, Ethyl acetate and Phenylethyl propionate. The strain K404 produced 3-Methyl-1-butanol, 1-Butanol, Phenylethyl alcohol, Ethyl isovalerate, Isoamyl acetate and 2 unidentified compounds.

คำนำ

เนื่องจากกลิ่นรสเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่สามารถดึงดูดความสนใจจากผู้บริโภคได้ ปัจจุบันความต้องการสารที่ให้กลิ่นรสจากธรรมชาติชนิดใหม่ ๆ มีมากขึ้น วิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพที่ผลิตสารประกอบที่ให้กลิ่นหอมต่าง ๆ จากจุลินทรีย์และเอนไซม์เป็นขบวนการที่น่าสนใจ เนื่องจากการผลิตสารให้กลิ่นรส (Flavor compounds) โดยวิธีการสกัดจากพืชนั้นมีข้อเสียคือ ต้องใช้วัตถุดิบจำนวนมาก การเพาะปลูกพืชเพื่อเป็นวัตถุดิบต้องใช้ระยะเวลาอันยาวนาน ต้องใช้พื้นที่ในการปลูกพืชจำนวนมาก และยังขึ้นอยู่กับสภาพดินฟ้าอากาศ อีกด้วย ทำให้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) ซึ่งสามารถใช้สารตั้งต้นจากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ และ ปิโตรเคมี เพื่อสังเคราะห์เป็นสารให้กลิ่นรสทดแทนมีแนวโน้มมากขึ้น แต่การสังเคราะห์ทางเคมี มีข้อเสีย คือ มีต้นทุนการผลิตสูง เนื่องจากต้องใช้ปฏิกิริยาเคมีหลายขั้นตอน เพื่อเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ประกอบกับผู้บริโภคมีแนวโน้มที่จะบริโภคสารที่ได้จากแหล่งธรรมชาติมากกว่าสารที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ดังนั้น การผลิตสารให้กลิ่นรส

โดยขบวนการทางชีวภาพโดยอาศัยจุลินทรีย์และเอนไซม์ เป็นกระบวนการที่น่าสนใจมากขึ้น เพราะมีข้อได้เปรียบคือ ไม่ต้องใช้พื้นที่จำนวนมาก สามารถควบคุมสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ที่ใช้ในกระบวนการผลิตได้ และมีแนวโน้มในการเพิ่มผลผลิตได้ แม้ว่าการผลิตสารให้กลิ่นรสบางชนิดจากจุลินทรีย์ยังมีผลผลิตต่ำก็ตาม ความพยายามที่จะพัฒนา และปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ตลอดจนการปรับปรุงกระบวนการผลิตจะสามารถทำให้ผลผลิตของสารให้กลิ่นรสจากจุลินทรีย์สูงขึ้น มีความคุ้มค่าในเชิงพาณิชย์มากขึ้น ซึ่งมีจุลินทรีย์มากมายหลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิตสารให้กลิ่นรสได้ ในปริมาณที่น่าสนใจ

จากที่กล่าวมาข้างต้น การคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารให้กลิ่นรส จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจเพื่อเป็นแนวทางในการนำจุลินทรีย์มาใช้ในการผลิตสารให้กลิ่นรส และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

การตรวจเอกสาร

สารให้กลิ่นรส (flavor compounds) ไม่ว่าจะเป็นสารให้กลิ่นรสที่ระเหยไม่ได้ (non volatile compounds) เช่น กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ หรือสารที่ระเหยได้ (volatile compounds) มีแนวโน้มที่ได้รับความนิยมมากขึ้นเพราะเหตุผลต่อไปนี้คือ

1. เนื่องจากอาหารที่ผลิตด้วยขบวนการให้ความร้อน ซึ่งใช้สารที่ให้กลิ่นรสที่ระเหยได้ (volatile flavor) นั้น มีส่วนในตลาดเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งแนวโน้มของผู้บริโภคที่มีความชื่นชอบผลิตภัณฑ์ที่ปรุงแต่งกลิ่นรสมีเพิ่มขึ้นจึงทำให้มีความต้องการสารให้กลิ่นรสในอุตสาหกรรมอาหารเพิ่มขึ้น

2. แหล่งของสารให้กลิ่นรสตามธรรมชาติที่จัดหาได้นั้นลดลง เนื่องจากปัญหาด้านเกษตรกรรมและเศรษฐกิจของประเทศผู้ผลิต

3. ขาดกระบวนการสังเคราะห์สารให้กลิ่นรสทางเคมีที่เชื่อถือได้ คุณสมบัติของสารเคมีที่ให้กลิ่นรสนั้น ขึ้นอยู่กับตำแหน่งทางโครงสร้างที่จำเพาะเจาะจงทั้งในด้าน regiospecificity และ stereospecificity ซึ่งอาจได้มาจากการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่จำเพาะกับสารตั้งต้นและปฏิกิริยาและการสังเคราะห์ทางเคมีต้องใช้หลายขั้นตอน

4. ในหลายประเทศมีกฎหมายควบคุมที่แยกความแตกต่างของกลิ่นรสตามธรรมชาติออกจากสารอื่น ๆ และผลผลิตที่ได้จากกระบวนการทางชีวภาพนั้นถูกจัดว่าเป็นสารธรรมชาติจึงทำให้มีคุณค่าในทางการค้าสูงขึ้น

5. ผู้บริโภคจำนวนมากมีแนวโน้มที่จะไม่ยอมรับอาหารซึ่งเติมสารที่ไม่ได้มาจากธรรมชาติ (Piggott และ Peterson, 1994) สารให้กลิ่นรสที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อเติมแต่งกลิ่นและรสในอาหารมีหลายกลุ่ม เช่น กรด แอลกอฮอล์ แลคโตน เอสเทอร์ อัลดีไฮด์ คีโตน ฯลฯ และมีรายงาน พบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิตสารให้กลิ่นรสในปริมาณสูง ซึ่งมีทั้งรา ยีสต์ และแบคทีเรีย

ตัวอย่างของสารที่ให้กลิ่นรสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ ได้แก่

1. ไพราซีน (pyrazines) ใช้เสริมแต่งกลิ่นรส (flavor enhancer) ในประเภทถั่ว (roasted foods) ที่ให้กลิ่นรสของพวกมัน ข้าวโพด (popcorn-like) กาแฟ (coffee like) สับปะรด (pineapple-like) และช็อคโกแลต (chocolate) ซึ่งสารพวกไพราซีนสามารถผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* เชื้อผ่าเหล่าของ *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas perolens* และ soil streptomycetes

2. โมโนเทอร์ปีน (monoterpenes) เป็นสารที่ให้กลิ่นรสที่สำคัญในน้ำมันหอมระเหย (essential oils) ซึ่งพบในกลุ่มของ *Ceratocystis* sp. เช่น *C. moniliformis*, *C. variispora* นอกจากนี้เชื้อ *Trametes odorata* และ เชื้อ *Phellinus* sp. เช่น *P. igniarius*, *P. tremulae* และ *P. laevigatus* เป็นต้น สำหรับในเชื้อยีสต์นั้น พบว่า *Kluyveromyces lactis* สามารถผลิตได้

3. ไดอะเซทิล (Diacetyl) เป็นส่วนประกอบสำคัญที่ให้กลิ่นรสของเนยในผลิตภัณฑ์นมหลายชนิดสามารถผลิตไดอะเซทิลได้ ได้แก่ *Leuconostoc dextranicum*, *L. citrovorum* และ *Streptococcus lactis* subsp. diacetyl lactis โดยใช้ซิเตรทเป็นสารตั้งต้น

4. แลคโตน (lactone) มักพบทั่วไปในอาหารให้กลิ่นรสหลายแบบ เช่น กลิ่นรสท็อกลิ่นคล้ายมะพร้าว กลิ่นเนย กลิ่นคล้ายมัน กลิ่นหอมหวาน สังเคราะห์ทางเคมีจาก keto acid แต่ปัจจุบันการผลิตจากจุลินทรีย์ให้ผลคุ้มค่าในเชิงพาณิชย์มากกว่า และมีข้อได้เปรียบ คือ เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากธรรมชาติ และมีความบริสุทธิ์สูงกว่าการสังเคราะห์ทางเคมี และยัง สามารถลดจำนวนขั้นตอนของการสังเคราะห์ทางเคมีได้ จุลินทรีย์ที่นำมาผลิตแลคโตน มีทั้งยีสต์ *Candida*, *Saccharomyces* และยีสต์ *Sporobolomyces odoratus* สามารถผลิตสารให้กลิ่นของผลไม้ (fruity odor) ได้ เช่น สาร gamma decalactone จะเป็นตัวทำให้เกิดกลิ่นของพีช (peachy aroma) เช่น รา *Penicillium notatum* และ แบคทีเรีย *Sarcina lutea*

5. สารเสริมกลิ่นรส (flavor enhancers หรือ flavor potentiators) เป็นสารเสริมกลิ่นรสช่วยเพิ่มรสชาติในอาหารโดยตัวมันเอง อาจไม่มีรสชาติ ตัวอย่างที่เราคุ้นกันดีคือผงชูรส หรือ monosodium glutamate (MSG) ซึ่งเป็นเกลือโซเดียมของกรดอะมิโนกลูตามิกในรูปแบบ L-form ซึ่ง

สามารถผลิตจากวัตถุดิบแป้งมันสำปะหลัง หรือกากน้ำตาลจากอ้อยโดยการหมักด้วยเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* หรือ *Brevibacterium latofermentum*

6. สารให้ความหวาน (sweeteners) สารให้ความหวานหลายชนิดที่ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น แอสปาร์เทม (aspartame) ซึ่งเป็น methyl ester ของอะมิโน 2 ชนิด คือ กรดแอสปาร์ติก (aspartic acid) และฟีนิลอลานิน (phenylalanine) สามารถผลิตโดยใช้จุลินทรีย์โดยการตรึงเซลล์ (immobilized cells) ของ *Escherichia coli* ส่วนฟีนิลอลานิน สามารถผลิตจากสารตั้งต้นฟีนิลไพรูเวท (phenyl pyruvate) กรดฟอรั่มิก และแอมโมเนียโดยใช้ *Corynebacterium*

7. เอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการปรับปรุงกลิ่นรส เช่น อะไมเลส (amylase) และ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ที่ได้จาก *Aspergillus* และ *Rhizopus* ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่มหลายชนิด lactase หรือ β -galactosidase ที่ได้จาก *Aspergillus niger* หรือ ยีสต์ *Kluyveromyces* เอนไซม์ที่ย่อยนิวคลีโอไทด์ (Nucleotic enzyme) ผลิตจาก *Penicillium citrinum* หรือ *Streptomyces aureus* เอนไซม์ที่ย่อยไขมัน (lipase) และเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteinase) ในการผลิตเนยแข็งบางชนิดเพื่อให้กลิ่นรสมีเฉพาะตัว เอนไซม์ที่กำจัดกลิ่นรสไม่ดี นำผลไม้บางชนิดมีรสขม เช่น น้ำมะนาว สามารถกำจัดได้โดยใช้เอนไซม์ Nariginase จาก *Aspergillus niger* เอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดสารให้กลิ่นรส เพคตินเนส (pectinase) เซลลูเลส (cellulase) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) จาก *Aspergillus*, *Rhizopus* และ *Trichoderma* สามารถนำมาเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการสกัดสารให้กลิ่นรสจากผลไม้ ผัก ธัญพืช และกระบวนการผลิตน้ำผลไม้ กระบวนการผลิตไวน์

จะเห็นได้ว่าการนำจุลินทรีย์มาใช้ในการผลิตสารให้กลิ่นรส มีประโยชน์ต่อวงการอุตสาหกรรมอาหารมาก เนื่องจากกลิ่นรสเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งที่สามารถจะดึงดูดความสนใจจากผู้บริโภคได้และผู้บริโภค ปัจจุบันมักนิยมสารที่ได้จากแหล่งธรรมชาติมากกว่าได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แม้ว่าในปัจจุบันการผลิตสารให้กลิ่นรสบางชนิดจากจุลินทรีย์ยังมีผลผลิตต่ำก็ตาม ความพยายามที่จะพัฒนา และปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ตลอดจนการปรับปรุงกระบวนการผลิตจะสามารถทำให้ผลผลิตของสารให้กลิ่นรสจากจุลินทรีย์สูงขึ้นจนมีความคุ้มค่าในเชิงพาณิชย์ในอนาคตอันใกล้

1. การศึกษาการสร้างสารหอมระเหยในยีสต์

Akita และ คณะ (1990) ศึกษาการผลิต β -phenethyl alcohol และ β -phenethyl acetate จากเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่กลายพันธุ์แล้ว พบว่า เชื้อยีสต์ สามารถสร้าง β -phenethyl alcohol และ phenethyl acetate ได้ปริมาณมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ 12 เท่า และ 3 เท่า ตามลำดับ

Zironi และ คณะ (1993) รายงานการสร้างสารหอมระเหยโดยผสมเชื้อยีสต์ *Hanseniaspora guilliermondii* หรือ *Kloeckera apiculata* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในไวน์ พบว่า เมื่อเติมยีสต์ *S. cerevisiae* ลงไปในน้ำหมักที่ผ่านการหมักโดย apiculate yeast แล้ว พบว่ามีการสังเคราะห์ n-propanol และ acetoin ในปริมาณมาก และในปี 1994 Albertazzi และ คณะ รายงานว่า เชื้อยีสต์ *Hansenura anomala* CBS 110 และ *Kloeckera saturnus* CBS 5761 สามารถสร้าง 2-phenyl ethanol และ 2-phenylethyl acetate ได้ในอาหารเลี้ยงที่มี phenylalanine 2 กรัมต่อลิตร และยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ยังสามารถผลิตแอลกอฮอล์และสารประกอบพวกเอสเทอร์อื่น ๆ อีกด้วย

Pastore และคณะ (1994) รายงานการผลิตกลิ่นผลไม้จากเชื้อ *Geotrichum* sp. ที่แยกได้จากมะละกอ พบว่า มีสารหอมระเหยจำนวน 22 ชนิด ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้จำนวน 7 ชนิด คือ ethyl butyrate, ethyl isovalerate, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol และ ethyl hexanoate, ethyl butyrate, ethyl propionate และพบว่า ethyl isovalerate และ ethyl hexanoate เป็นสารที่ให้กลิ่นผลไม้มาก ขณะที่ ethyl propionate และ ethyl butyrate ให้กลิ่นผลไม้อ่อน ๆ

Jiang (1995) ศึกษาการผลิตสารหอมระเหยจากยีสต์ *Kluyveromyces lactis* พบว่า สามารถสร้างสารหอมระเหยได้จำนวน 50 ชนิด โดยมีสารหลักคือ benzenoid hydrocarbons, alcohols, carboxylic acids, esters, carbonyl และ heterocyclic compound และสารที่พบในปริมาณมากคือ isoamyl alcohol, isobutanol, 2-phenylethanol, isobutyric acid, isovaleric acid, 2-phenylethyl acetate, 2-phenylethyl isobutyrate และ 3-hydroxy-2-butanone

Haffner and Tressl (1996) ศึกษาการผลิตสาร gamma-decanolactone จากยีสต์ *Sporobolomyces odoratus* และพบว่าเมื่อเติม oleic acid ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เชื้อยีสต์ สามารถสร้าง (R)-gamma-decanolactone และ (Z)-6-gammadecanolactone และมีหลักฐานว่า oleic acid เป็นตั้งต้นสำคัญในการผลิตสารหอมระเหย (R)-gammadecanolactone

Romano และคณะ (1998) ศึกษาการสร้าง 2,3- butanediol ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ให้กลิ่นในไวน์ ของยีสต์ 4 สายพันธุ์ คือ *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii*, *Zygosaccharomyces balii* พบว่า *S. cerevisiae* และ *Z. balii* สร้าง 2,3-butanediol แต่ *K. apiculata* และ *Sc. ludwigii* สร้างในปริมาณเล็กน้อย

Sluis (1999) ศึกษาผลของ threonine, cystathionine และ branch chain amino acid ต่อขบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์ *Zygosaccharomyces rouxii* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีบทบาทในการสร้างสารให้กลิ่นในชีอิ้ว พบว่า การเติม threonine จะมีผลยับยั้งการเจริญของ *Z. rouxii* ซึ่งเป็นการทำให้มีการสะสมกลีเซอรอล และสร้าง higher alcohol ปริมาณเล็กน้อย แต่เมื่อเติม branch chain amino acid จะมีผลทำให้การสร้าง isobutyl alcohol และ isoamyl alcohol มากขึ้น

2. การศึกษาการสร้างสารหอมระเหยในเชื้อรา

ในปี 1991 Christen และคณะ ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างกลิ่นคล้ายกล้วยหอมของเชื้อรา *Ceratocystis fimbriata* โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร, ยูเรีย 1.9 กรัมต่อลิตร, แอมโมเนียมซัลเฟต 4.5 กรัมต่อลิตร, โพตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 กรัมต่อลิตร, แคลเซียมไนเตรท ($\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 1 กรัมต่อลิตร, แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.75 กรัมต่อลิตร, trace element solution 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไทอะมีน (thiamine) 150 ไมโครกรัมต่อลิตร, ไบโอติน (biotin) 10 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่า กลูโคส, ยูเรีย และแอมโมเนียมซัลเฟต จำเป็นต่อการสร้างกลิ่น และองค์ประกอบอื่นๆ มีผลต่อการเจริญของเชื้อราด้วย

Christen และ คณะ (1994) ศึกษาการผลิตจากเชื้อรา *Ceratocystis fimbriata* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ พบว่า เชื้อราสามารถสร้างกลิ่นกลิ่นผลไม้จากสับสเตรทชนิดต่าง ๆ เช่น fish hydrolysate, potato broth และ synthesis compound ซึ่งพบว่า ในอาหารที่มี glucose/urea และ glucose/ammonium sulfate และให้กลิ่นมีลักษณะคล้ายกล้วย และพบว่าเมื่อใช้ potato broth และ fish hydrolysate มีผลให้เซลล์เพิ่มขึ้น และทำให้สร้างกลิ่นได้ และเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่มี amberlite, bagasse, wheat bran, wheat bran เติมยูเรีย พบว่า บน wheat bran, wheat bran เติมยูเรีย สร้างกลิ่นเล็กน้อย ส่วนบน amberlite และ bagasse เชื้อไม่เจริญและไม่สร้างกลิ่น

Pastore และคณะ (1994) ศึกษาการสร้างกลิ่นของรา *Neurospora sp.* ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้าน (beiju) จำนวน 8 สายพันธุ์ เชื้อส่วนใหญ่สร้างกลิ่นที่น่าพอใจเป็นกลิ่นผลไม้

Bramorski และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตสารหอมระเหยโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* เมื่อเลี้ยงใน casava bagasse ผสม soybean meal (5:5w/w) และผลิตกลิ่นได้เมื่อเลี้ยงบน amaranth grain และพบว่า มีเอทานอลมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์, acetaldehyde, 1-propanol, ethyl acetate, ethyl propionate และ 3-methyl butanol

Arnold และ Senter (1998) ใช้เทคนิค Solid phase Microextraction (SPME) ในการสกัดเพื่อเปรียบเทียบสารหอมระเหยจากแบคทีเรียที่แยกได้จากกระบวนการทำสตว์ปีก โดยใช้ไฟเบอร์ Polydimethylsiloxane SPME fibers แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี พบว่า แบคทีเรียสามารถสร้างสาร ได้แก่ ethanol, 1-Propanol, 3-Methyl butanol, 3-Methyl-1-butanol, Octanol, Phenylethyl alcohol, 9-Decene-1-ol, Decanol, Indole, Dodecanol, cis-7-Tetradecene-1-ol, Tetradecanol ในปริมาณที่แตกต่างกัน

Baptista และคณะ (1998) เปรียบเทียบการวิเคราะห์สารที่ไม่ระเหย catechins และสารหอมระเหยจาก Azorean green teas โดยใช้ HPLC และ SPME /GC พบว่า Azorean green tea มีปริมาณ Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ในปริมาณที่สูง และปริมาณคาเฟอีนที่ต่ำ ซึ่งทำให้เป็นผลดีต่อการบริโภคของมนุษย์

Wan และคณะ (1999) ใช้เทคนิค Solid Phase Microextraction ในการสกัดสารหอมระเหยจาก kiwifruit แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี พบว่า มีองค์ประกอบของสาร ได้แก่ Heptanal, Ethyl hex-3-enoate, 6-Methylhept-5-en-2-one, Acetic acid, c/t-2-Nonenal(mixture) และ c/t-2-Decenal(mixture) และองค์ประกอบอื่น ๆ อีก เช่น (pent-4-enal, t,t-Nona-2,4-dienal, 2-Nonanone, Ethyl octanoate, Butyrolactone และ 2-Propenyl butanoate

หลักการสกัดสารด้วยวิธี Solid Phase Microextraction (SPME)

Solid Phase Microextraction (SPME) เป็นเทคนิคการสกัดสารประกอบอินทรีย์โดยสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกดูดซับ (Absorb) ด้วยฟิวซิลิกาไฟเบอร์ (fused silica fiber) ที่เคลือบไว้ที่ปลายเข็มของ SPME เมื่อไฟเบอร์นี้ถูกฉีดผ่านเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีซึ่งมีความร้อน สารตัวอย่างจะระเหยเข้าสู่คอลัมน์

ขั้นตอนการสกัดสารตัวอย่าง

1. เตรียมสารตัวอย่างที่ต้องการสกัด ใส่ลงในไวแอลที่มีเซฟต์ม ในกรณีที่ต้องการทำ internal standard ให้เติม internal standard ลงไปด้วย แล้วปิดฝาไวแอลให้แน่นแล้ววางไวแอลลงบนเตาให้ความร้อนที่สามารถกวนได้ (hot plate & stirrer) แล้วปรับความร้อนตามความเหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ต้องการสกัดพร้อมทั้งกวนสารด้วย
2. ชุดอุปกรณ์ยึดไฟเบอร์ (SPME holder) เมื่อประกอบไฟเบอร์แล้ว บักเข็มลงในไวแอล โดยปรับความยาวของปลายเข็มให้เหมาะสมโดยไม่ให้ปลายเข็มสัมผัสกับสารตัวอย่าง
3. ดันให้ไฟเบอร์โผล่ออกจากปลายเข็มโดยไม่ให้ไฟเบอร์จุ่มในสารตัวอย่าง ปลดไฟเบอร์ดูดซับสารระเหยตามระยะเวลาที่เหมาะสม
4. ปรับให้ไฟเบอร์กลับเข้าที่เดิม แล้วดึง SPME holder ทั้งชุด ออกจากไวแอล
5. นำ SPME holder ทั้งชุดไปฉีดเข้าช่องฉีดตัวอย่าง (injection port) ของเครื่อง GC โดยกดปลาย SPME holder เพื่อดันให้ไฟเบอร์ออกแล้วล็อคตำแหน่งไว้ ปลดไฟเบอร์จากความร้อนจากช่องฉีดตัวอย่างของเครื่อง GC ให้สารระเหยเข้าสู่คอลัมน์ ตามระยะเวลาที่เหมาะสม
6. เลื่อนไฟเบอร์กลับเข้าตำแหน่งเดิม แล้วดึง SPME holder ออกจากช่องฉีดตัวอย่าง

ชนิดของไฟเบอร์และการใช้งาน

ไฟเบอร์มีให้เลือกใช้งานได้หลายชนิด ขึ้นอยู่กับ น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ความมีขั้ว (polarity) ของสารที่ต้องการสกัดมาวิเคราะห์

สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย

เวลา เริ่มดำเนินการ เดือน ตุลาคม 2543

เสร็จสิ้น เดือน ตุลาคม 2544

สถานที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกหาเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารให้กลิ่นรส
2. เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตสารให้กลิ่นรสในอุตสาหกรรม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารให้กลิ่นรสและมีศักยภาพที่จะนำไปใช้ผลิตสารให้กลิ่นรสในอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์การทำวิจัย

1. เครื่องชั่ง
 2. เครื่องแก้ว เช่น ขวดรูปชมพู่ หลอดทดลอง ไวแอล จานเลี้ยงเชื้อ
 3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
 4. แท่งแก้ว อิมเม็ชเช็ล ปากคืบ สไลด์ ห่วงเช็ล
 5. ตะเกียงแอลกอฮอล์
 6. กล้องจุลทรรศน์
 7. ตู้บ่มเชื้อ
 8. หม้อนึ่งความดัน
 9. ตู้บ่มเชื้อ
 10. เครื่องโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี
 11. เทอร์โมมิเตอร์
 12. แท่งแม่เหล็กสำหรับกวน (magnetic bar)
 13. เตาให้ความร้อนพร้อมแท่งแม่เหล็กสำหรับกวน (hot plate & stirrer)
 14. ชุดสกัด Solid Phase Microextraction (SPME) พร้อมไฟเบอร์สกัด
 15. ขาดัง
2. สารเคมี
- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในการแยกเชื้อยีสต์ เช่น yeast extract, malt extract, peptone วุ้น กลูโคส กรดเกลือ (HCl) โซเดียมไฮดรอกไซด์ และอื่น ๆ รวมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับจัดจำแนกชนิดของเชื้อ เช่น น้ำตาลชนิดต่าง ๆ

วิธีการวิจัย

1. การแยกเชื้อยีสต์

เก็บตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ เช่น อาหารหมัก ดิน ดอกไม้ ใบไม้ ผลไม้ มาทำการแยกเชื้อยีสต์โดยใช้ spread plate technique โดยชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเจือจางตามลำดับ ให้มีความเข้มข้นเหมาะสมแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร YM (YM agar) ซึ่งเตรียมโดยมีส่วนประกอบคือ ยีสต์สกัด (yeast extract) 3 กรัมต่อลิตร, มอลท์สกัด (malt extract) 3 กรัมต่อลิตร, เปปโตน(peptone) 5 กรัมต่อลิตร, กลูโคส(glucose) 10 กรัมต่อลิตร, วุ้น(agar) 15 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอช เป็น 4.5 ด้วย 1 M HCl ซึ่งเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตร 1 ลิตร ตั้งไฟอ่อน ๆ ให้วุ้นละลาย เทใส่ขวด ปิดจุกสำลี นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเทใส่จานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อด้วยตู้อบฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น 15-20 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้อาหารวุ้นแข็ง จากนั้นดูตัวอย่างที่เจือจางแล้วใส่ลงในอาหารแข็ง แล้วใช้แท่งแก้วจุ่มแอลกอฮอล์เผาไฟ 2-3 ครั้ง เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหารวุ้น แล้วบ่มเชื้อโดยคว่ำจานเพาะเชื้อ ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกเก็บโคโลนีของเชื้อยีสต์มาทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยใช้ streak plate technique บนอาหารแข็งสูตร YM แล้วเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในอาหารวุ้นผิวเอียง (YM slant) เพื่อใช้ในการคัดเลือกในขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกหาเชื้อยีสต์ที่ผลิตสารให้กลิ่นรส

การคัดเลือกขั้นต้น

นำเชื้อยีสต์ที่แยกได้และเชื้อยีสต์ที่มีผู้รวบรวมไว้ทั้งหมด มาทำการคัดเลือกหาเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตสารให้กลิ่น โดยเลี้ยงเชื้อใน YM slant เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเทียบเชื้อ 2-3 ลูบ ใส่ในอาหารเหลวสูตร YM (YM broth) ส่วนประกอบเหมือน YM agar แต่ไม่ต้องเติมวุ้น ซึ่งมีปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตรบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มตั้งทิ้งไว้โดยเขย่าทุก 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการสร้างกลิ่นโดยใช้วิธีการดมกลิ่น เลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถสร้างกลิ่นหอมเป็นที่น่าพอใจไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

3. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ที่ผลิตสารให้กลิ่นรส

นำเชื้อยีสต์ที่สามารถสร้างกลิ่นหอมเป็นที่น่าพอใจ มาจัดจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์โดยศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) โดยตรวจสอบรูปร่างของเซลล์, ศึกษาคุณลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Physiological and Biochemical characteristics) โดยทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ และยืนยันผลการจัดจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ที่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute Scientific and Technological Research)

4. การศึกษาการผลิตสารให้กลิ่นรสในระดับห้องปฏิบัติการ

4.1 การเลี้ยงเชื้อยีสต์

นำเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้ว่าสามารถสร้างกลิ่นหอมเป็นที่พอใจ มาเลี้ยงใน YM slant เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเชยเชื้อ 2-3 ลูป ใส่ในอาหารเหลวสูตร YPD (YPD broth) ซึ่งประกอบด้วย ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร, เปปโตน 20 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง

4.2 วิธีการสกัดสารหอมระเหย

นำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ในข้อ 4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บรรจุขวดไวแอล (vial) ขนาด 20 มิลลิลิตร ใส่แท่งแม่เหล็กเพื่อช่วยในการกวน รีบปิดฝาพร้อม septumทันที ตั้งไว้บน hot plate & stirrer กวน ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ให้ความร้อนจนสารละลายที่จะสกัดมี อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เพื่อให้สารระเหยอยู่ในส่วนที่ว่างของขวดไวแอลนาน 10 นาที จากนั้นนำมาสกัดโดยใช้ชุดสกัด Solid Phase Microextraction (SPME) ซึ่งชนิดของไฟเบอร์ที่ใช้คือ Carbowax/Divinylbenzene (CW/DVB) ใช้เวลาในการสกัดนาน 15 นาที แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) ทันที

4.3 วิธีการวิเคราะห์สารให้กลิ่น

เครื่องมือที่ใช้ : แก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี Hewlet Packard Model HP 6890

คอลัมน์ : Capillary column HP-5MS 5% Phenyl Methyl siloxane ยาว 30 เมตร

เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

อุณหภูมิ injector : 240 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ oven : อุณหภูมิเริ่มต้น 45 องศาเซลเซียส 3 นาที 100 องศาเซลเซียส 1 นาที 200 องศาเซลเซียส 1 นาที 210 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ 45 ถึง 210 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 20 องศาเซลเซียสต่อนาที

ใช้ Mode splitless

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การแยกเชื้อยีสต์

ตารางที่ 1 จำนวนเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ

แหล่งที่แยกเชื้อ	จำนวนเชื้อยีสต์ที่แยกได้
ดอกไม้และผลไม้	107
ดิน	14
อาหารหมัก	11
ลูกแป้ง	7
แหล่งอื่น ๆ เช่น ยางไม้ เปลือกไม้ ใบไม้	5
รวม	144

2. การคัดเลือกขั้นต้น

ตารางที่ 2 แสดงแหล่งตัวอย่างที่แยกเชื้อยีสต์ และลักษณะของกลิ่นจากน้ำหมักจากเชื้อยีสต์ในอาหาร YM broth ทดสอบกลิ่นโดยการดม

แหล่ง / รหัสเชื้อ	ลักษณะ	หมายเหตุ
<u>ดอกไม้</u>		
K4	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K14	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K18	ไม่หอม	
K19	ไม่หอม	
5-3-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
5-8-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
5-9-1	ไม่หอม	
5-13-1	ไม่หอม	
5-14-1	ไม่หอม	
5-15-1	ไม่หอม	
5-19-1	ไม่หอม	
5-23-1	ไม่หอม	
<u>ดอกไม้</u>		
6-1-1	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
6-5-16	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
6-7-1	ไม่หอม	
6-11-1	ไม่หอม	
6-13-1	ไม่หอม	
6-14-1	ไม่หอม	
6-19-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์ และกลิ่นคล้ายนมแมว
6-20-1	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
6-21-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
6-22-1	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
6-23-1	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
6-24-1	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
6-26-1	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว

ตารางที่ 2 (ต่อ)

แหล่ง / รหัสเชื้อ	ลักษณะ	หมายเหตุ
F1	ไม่หอม	
F2	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
F1-2	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
F2-2	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
7-4-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์และกลิ่นคล้ายนมแมว
7-5-1	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
7-6-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
7-8-1	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมวอ่อน ๆ
7-12-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
7-13-1	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
7-18-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์ และกลิ่นคล้ายนมแมว กลิ่นแรง
7-19-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
7-22-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
7-25-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
DD2-28-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
<u>ดอกไม้</u>		
DD3-15-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
DD2-22-1	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
<u>ผลไม้</u>		
K3	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K5	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K6	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมวอ่อน ๆ
K8	ไม่หอม	
K9	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
K10	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
K16	ไม่หอม	
K17	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K24	ไม่หอม	
K27	หอม	แอลกอฮอล์
K28	ไม่หอม	

ตารางที่ 2 (ต่อ)

แหล่ง / รหัสเชื้อ	ลักษณะ	หมายเหตุ
K44	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว กลิ่นแรง
K45	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
K47	ไม่หอม	
K54	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K55	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K59	ไม่หอม	
K60	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
K62	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K66	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมวอ่อน ๆ
K67	ไม่หอม	
K68	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมวอ่อน ๆ
K69	ไม่หอม	
K72	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K74	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
<u>ผลไม้</u>		
K89	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K92	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
5-25-1	ไม่หอม	
5-26-1	ไม่หอม	
5-28-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
5-39-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
5-42-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
5-46-1	ไม่หอม	
5-47-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
6-3-1	ไม่หอม	
6-11-1	ไม่หอม	
6-15-1	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมวอ่อน ๆ
6-17-1	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
6-18-1	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว

ตารางที่ 2 (ต่อ)

แหล่ง / รหัสเชื้อ	ลักษณะ	หมายเหตุ
7-1-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
7-7-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์และกลิ่นคล้ายนมแมว
7-9-1	หอม	กลิ่นนมแมวอ่อน ๆ
7-10-1	ไม่หอม	
7-14-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
7-15-1	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
7-17-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์และกลิ่นคล้ายนมแมว
7-19-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
7-20-1	ไม่หอม	
7-21-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
7-24-1	ไม่หอม	
DD2-3-2	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
DD1-9-1	ไม่หอม	
<u>ผลไม้</u>		
DD3-13-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
DD1-1-3	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
DD2-3-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
MD1-7-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
MD1-12-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
MD2-7-2	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
MD2-5-2	ไม่หอม	
MD1-9-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์และกลิ่นคล้ายนมแมว
MD3-7-1	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
MD3-11-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
MD1-12-1	ไม่หอม	
MD1-7-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์และกลิ่นคล้ายนมแมว
MD1-2-1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์และกลิ่นคล้ายนมแมว กลิ่นแรง

ตารางที่ 2 (ต่อ)

แหล่ง / รหัสเชื้อ	ลักษณะ	หมายเหตุ
<u>ดิน</u>		
K12	ไม่หอม	
K13	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมวอ่อน ๆ
K58	ไม่หอม	
K61	ไม่หอม	
K70	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K95	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K301	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
K302	ไม่หอม	
K401	ไม่หอม	
K403	ไม่หอม	
K404	หอม	กลิ่นคล้ายขนุน
K503	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมวอ่อน ๆ
K703	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
<u>อาหารหมัก</u>		
K32	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K34	ไม่หอม	
K35	หอม	กลิ่นคล้ายนมแมว
K36	ไม่หอม	
K38	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K47	ไม่หอม	
K48	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K64	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K71	ไม่หอม	
K81	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K85	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
<u>ลูกแป้ง</u>		
LP1	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
LP2	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

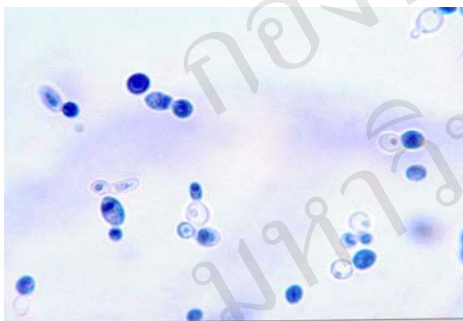
แหล่ง / รหัสเชื้อ	ลักษณะ	หมายเหตุ
LP3	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
LP4	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
LP5	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
LP6	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
LP7	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
<u>แหล่งอื่น ๆ เช่น ยางไม้ เปลือกไม้ ขนมะเดื่อ น้ำผึ้ง น้ำตาลปี๊ป</u>		
K1	ไม่หอม	
K49	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K50	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K79	หอม	กลิ่นแอลกอฮอล์
K90	ไม่หอม	

จากการแยกเชื้อยีสต์จากแหล่งต่าง ๆ บนอาหาร YM agar ได้เชื้อยีสต์ทั้งหมดจำนวน 144 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 1 ได้ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิตสารให้กลิ่นในขั้นต้น โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่แยกได้ในอาหาร YM broth ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร บ่มไว้โดยเขย่าทุก 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง แล้วทดสอบด้วยการดมกลิ่น จากผลการทดลองในตารางที่ 2 พบว่า เชื้อยีสต์ให้ทั้งกลิ่นหอมและกลิ่นไม่หอม ซึ่งส่วนใหญ่เชื้อยีสต์จะให้กลิ่นหอมของแอลกอฮอล์ และมีกลิ่นคล้ายกลิ่นนมแมว เป็นส่วนใหญ่ ในขั้นตอนนี้ได้คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ให้กลิ่นเป็นที่น่าสนใจและให้กลิ่นในปริมาณมาก มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไปจำนวน 4 ไอโซเลท คือ เชื้อยีสต์ 7-18-1, MD1-2-1, K44, และ K404 ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ที่แยกได้จาก ดอกไม้ ผลไม้ มะเขือเทศ และดินจากโรงนม ตามลำดับ

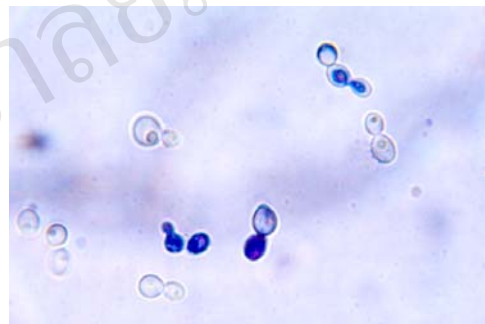
3. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ที่ผลิตสารให้กลิ่นรส

นำเชื้อยีสต์ที่สามารถสร้างกลิ่นหอมเป็นที่น่าสนใจและให้กลิ่นในปริมาณมากมาจัดจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ โดยตรวจสอบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) โดยตรวจสอบรูปร่างของเซลล์, ศึกษาคุณลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

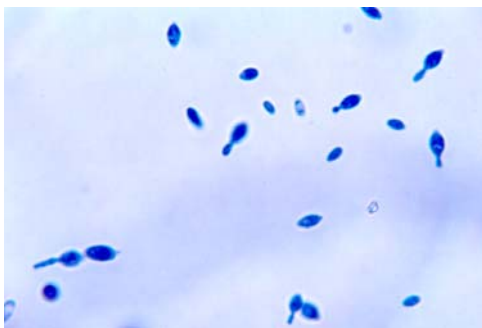
(Physiological and Biochemical characteristics) โดยทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ จากผลการจัดจำแนกเชื้อยีสต์ที่สามารถสร้างกลิ่นที่น่าพอใจทั้ง 4 ไอโซเลท คือ 7-18-1, MD1-2-1, K44 และ K404 พบว่า เชื้อยีสต์สายพันธุ์ 7-18-1 มีลักษณะโคโลนี สีครีม ผิวหน้าโคโลนีค่อนข้างด้าน โคโลนีกลม ขอบเรียบ มีลักษณะเชลล์กลมรี (ภาพที่ 1ก) และมีความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 จากผลการจัดจำแนก พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ 7-18-1 เป็น *Candida pelliculosa* เชื้อยีสต์สายพันธุ์ MD1-2-1 มีลักษณะโคโลนีสีครีม ผิวหน้าโคโลนีค่อนข้างด้าน โคโลนีกลม ขอบเรียบ เชลล์กลมรี (ภาพที่ 1ข) และมีความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 5 จากผลการจัดจำแนกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ MD1-2-1 เป็น *Candida norvegica* เชื้อยีสต์สายพันธุ์ K44 มีลักษณะโคโลนีสีครีม ผิวหน้าโคโลนีค่อนข้างด้าน โคโลนีกลม ขอบเรียบ เชลล์รียาว (ภาพที่ 1ค) และเมื่อทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 5 จากผลการจัดจำแนกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ K44 พบว่า เป็น *Candida valida* และเชื้อยีสต์สายพันธุ์ K404 มีลักษณะโคโลนีสีขาวแห้ง คล้ายเชื้อรา โคโลนีกลม ขอบเรียบ เชลล์รูปรางท่อนต่อเป็นสายยาวและสามารถสร้าง arthrospore ได้ (ภาพที่ 1ง)) และมีความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 6 จากผลการจัดจำแนกเชื้อยีสต์ K404 พบว่า เป็น *Geotrichum* sp.



ก)



ข)



ภาพที่ 1 ลักษณะเชลล์ของยีสต์ ก) สายพันธุ์ 7-18-1 ข) สายพันธุ์ MD 1-2-1 ค)สายพันธุ์ K44
ง) สายพันธุ์ K404 กำลังขยาย 1000 เท่า

ตารางที่ 3 แสดงคุณลักษณะความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ 7-18-1

ชนิดของน้ำตาล	ความสามารถในการใช้น้ำตาล
galactose	+
actidione	-
saccharose	+
N-acetyl-d-glucosamine	-
DL-lactate	+
L-arabinose	-
cellobiose	-
raffinose	+
maltose	+
trehalose	+
2-keto-d-gluconate	-
α -methyl-D-glucosamine	+
sorbitol	+
D-xylose	+
ribitol	-
glycerol	+
rhamnose	-
palatinose	+
erythritol	+
melibiose	-
glucoronate	-
melezitose	+
gluconate	-
levulinate	-
manitol	+
lactose	-
inositol	-
lactose	-
inositol	-
glucose	+
sorbose	-
glucosamine	-

ตารางที่ 4 แสดงคุณลักษณะความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของเชื้อยีสต์

สายพันธุ์ MD1-2-1

ชนิดของน้ำตาล	ความสามารถในการใช้น้ำตาล
galactose	-
actidione	-
saccharose	-
N-acetyl-d-glucosamine	-
DL-lactate	+
L-arabinose	-
cellobiose	+
raffinose	-
maltose	-
trehalose	-
2-keto-d-gluconate	-
α -methyl-D-glucosamine	-
sorbitol	-
D-xylose	+
Ribitol	-
glycerol	+
rhamnose	-
palatinose	-
erythritol	-
melibiose	-
glucoronate	-
melezitose	-
gluconate	-
levulinate	-
manitol	-
lactose	-
inositol	-
lactose	-
inositol	-
glucose	+
sorbose	-
glucosamine	-

ตารางที่ 5 แสดงคุณลักษณะความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์

K44

ชนิดของน้ำตาล	ความสามารถในการใช้น้ำตาล
galactose	-
actidione	-
saccharose	-
N-acetyl-d-glucosamine	+
DL-lactate	-
L-arabinose	-
cellobiose	-
raffinose	-
maltose	-
trehalose	-
2-keto-d-gluconate	-
α -methyl-D-glucosamine	-
sorbitol	-
D-xylose	-
ribitol	-
glycerol	+
rhamnose	-
palatinose	-
erythritol	-
melibiose	-
glucoronate	-
melezitose	-
gluconate	-
levulinate	-
manitol	-
lactose	-
inositol	-
lactose	-
inositol	-
glucose	+
sorbose	-
glucosamine	+

ตารางที่ 6 แสดงคุณลักษณะความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์

K404

ชนิดของน้ำตาล	ความสามารถในการใช้น้ำตาล
galactose	+
actidione	+
saccharose	-
N-acetyl-d-glucosamine	-
DL-lactate	+
L-arabinose	-
cellobiose	-
raffinose	-
maltose	-
trehalose	-
2-keto-d-gluconate	-
α -methyl-D-glucosamine	-
sorbitol	+
D-xylose	+
Ribitol	-
glycerol	+
rhamnose	-
palatinose	-
erythritol	-
melibiose	-
glucoronate	-
melezitose	-
gluconate	-
levulinate	-
manitol	+
lactose	-
inositol	-
lactose	-
inositol	-
glucose	+
sorbose	+
glucosamine	-

3. การศึกษาการผลิตสารให้กลิ่นรสในระดับห้องปฏิบัติการ

เมื่อนำน้ำหมักจาก YPD broth ที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ 7-18-1 ที่ 48 ชั่วโมง มาสกัดแยกสารหอมระเหยด้วยวิธี Solid Phase Microextraction (SPME) พบว่า มีองค์ประกอบที่สามารถบอกชนิดได้ดังแสดงจากค่าโครมาโตแกรมและแมสสเปคตรัม ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลโครมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟีที่วิเคราะห์จากองค์ประกอบน้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ 7-18-1

<u>Peak No.</u>	<u>Compound</u>	<u>Retention time</u>
1	3-Methyl-1-butanol	3.08
2	2-Methyl-1-butanol	3.14
3	Isoamyl acetate	5.17
4	Ethyl acetate	9.62

ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟีของน้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ 7-18-1

ภาพที่ 3 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะเป็น 3-Methyl-1- butanol

ภาพที่ 4 แมสสเปกตรัมของ 3-Methyl-1- butanol

ภาพที่ 5 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะเป็น 2-Methyl-1- butanol

ภาพที่ 6 แมสสเปกตรัมของ 2-Methyl-1- butanol

ภาพที่ 7 แมสสเปคตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะเป็ Isoamyl acetate

ภาพที่ 8 แมสสเปคตรัมของ Isoamyl acetate

ภาพที่ 9 แมสสเปคตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะเป็ Ethyl acetate

ภาพที่ 10 แมสสเปคตรัมของ Ethyl acetate

เมื่อนำน้ำหมักจาก YPD broth ที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ MD1-2-1 ที่ 48 ชั่วโมง มาสกัดแยกสารหอมระเหยด้วยวิธี Solid Phase Microextraction พบว่า มีองค์ประกอบที่สามารถบอกชนิดได้ดังแสดงจากค่าโครมาโตแกรมและแมสสเปกตรัม ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลโครมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟีที่วิเคราะห์จากองค์ประกอบน้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ MD1-2-1

<u>Peak No.</u>	<u>Compound</u>	<u>Retention time</u>
1	3-Methyl-1-butanol	3.10
2	2-Methyl-1-butanol	3.16
3	Unidentified	3.41

ภาพที่ 11 โครมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟีของน้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ MD1-2-1

ภาพที่ 12 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะเป็ 3-Methyl-1-butanol

ภาพที่ 13 แมสสเปกตรัมของ 3-Methyl-1-butanol

ภาพที่ 14 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะเป็ 2-Methyl-1-butanol

ภาพที่ 15 แมสสเปกตรัมของ 2-Methyl-1-butanol

กองห้องสมุด
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ภาพที่ 16 แมสสเปคตรัมของฟีด unidentified

เมื่อนำน้ำหมักจาก YPD broth ที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ K44 ที่ 48 ชั่วโมง มาสกัดแยกสารหอมระเหยด้วยวิธี Solid Phase Microextraction พบว่า มีองค์ประกอบที่สามารถบอกชนิดได้ดังแสดงจากค่าโครมาโตแกรมและแมสสเปคตรัม ในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลโครมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟีที่วิเคราะห์จากองค์ประกอบน้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ K44

<u>Peak No.</u>	<u>Compound</u>	<u>Retention time</u>
1	3-Methyl-1-butanol	3.08
2	2-Methyl-1-butanol	3.15
3	Isoamyl acetate	5.17
4	Amylpropionate	6.33
5	Phenylethyl alcohol	8.24
6	Ethyl acetate	9.62
7	Phenylethyl propionate	10.40

ภาพที่ 17 โครมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟีของน้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ K44

ภาพที่ 18 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะเป็ 3-Methyl-1-butanol

ภาพที่ 19 แมสสเปกตรัมของ 3-Methyl-1-butanol

ภาพที่ 20 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะเป็ 2-Methyl-1-butanol

ภาพที่ 21 แมสสเปกตรัมของ 2-Methyl-1-butanol

ภาพที่ 22 แมสสเปคตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะ เป็น Isoamyl acetate

ภาพที่ 23 แมสสเปคตรัมของ Isoamyl acetate

ภาพที่ 24 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะเป็ Amylpropionate

ภาพที่ 25 แมสสเปกตรัมของ Amylpropionate

ภาพที่ 26 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะ เป็น Phenylethyl alcohol

ภาพที่ 27 แมสสเปกตรัมของ Phenylethyl alcohol

ภาพที่ 28 แมสสเปคตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะเป็น Ethyl acetate

ภาพที่ 29 แมสสเปคตรัมของ Ethyl acetate

ภาพที่ 30 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะ เป็น Phenylethyl propionate

กองห้องสมุด
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ภาพที่ 31 แมสสเปกตรัมของ Phenylethyl propionate

เมื่อนำน้ำหมักจาก YPD broth ที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ K404 ที่ 48 ชั่วโมง มาสกัดแยกสารหอมระเหยด้วยวิธี Solid Phase Microextraction พบว่า มีองค์ประกอบที่สามารถบอกชนิดได้ดังแสดงจากค่าโครมาโตแกรมและแมสสเปคตรัม ในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงผลโครมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟีที่วิเคราะห์จากองค์ประกอบน้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ K404

<u>Peak No.</u>	<u>Compound</u>	<u>Retention time</u>
1	3-Methyl-1-butanol	3.10
2	Ethyl isovalerate	4.861
3	Isoamyl acetate	5.17
4	1- Butanol	5.20
5	Unidentified	7.67
6	Phenylethyl alcohol	8.24
7	unidentified	11.37

ภาพที่ 32 แสดงโครมาโตแกรมแก๊สโครมาโตกราฟีของน้ำหมักจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์ K404

ภาพที่ 33 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะเป็ 3-Methyl-1-butanol

ภาพที่ 34 แมสสเปกตรัมของ 3-Methyl-1-butanol

ภาพที่ 35 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะเป็ Ethyl isovalerate

ภาพที่ 36 แมสสเปกตรัมของ Ethyl isovalerate

ภาพที่ 37 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะเป็ Isoamyl acetate

ภาพที่ 38 แมสสเปกตรัมของ Isoamyl acetate

ภาพที่ 39 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะเป็ 1- Butanol

ภาพที่ 40 แมสสเปกตรัมของ 1- Butanol

กองห้องสมุด
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ภาพที่ 41 แมสสเปกตรัมของฟีด unidentified

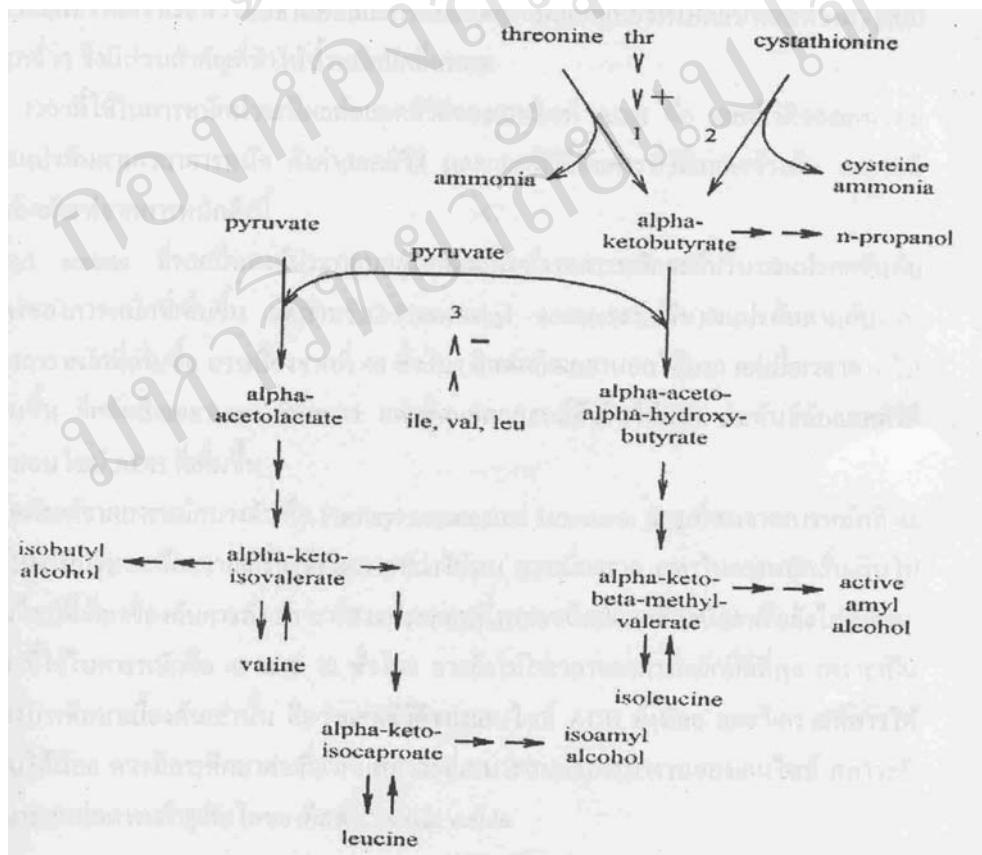
ภาพที่ 42 แมสสเปกตรัมของพีคจากโครมาโตแกรมที่คาดว่าจะเป็ Phenylethyl alcohol

ภาพที่ 43 แมสสเปกตรัมของ Phenylethyl alcohol

ภาพที่ 44 แมสสเปกตรัมของพืช unidentified

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบที่ให้กลิ่นจากน้ำหมักของเชื้อยีสต์ที่สร้างกลิ่นหอม ทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 7-18-1, MD1-2-1, K44 และ K404 พบว่า สารที่วิเคราะห์ได้จากน้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ 7-18-1 พบสารที่เป็นพวกแอลกอฮอล์ คือ 3-Methyl-1-butanol, 2-Methyl-1-butanol และเอสเตอร์ ได้แก่ Isoamyl acetate, Ethyl acetate และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบที่ให้กลิ่นจากน้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ MD1-2-1 พบสารที่เป็นพวกแอลกอฮอล์ คือ 3-Methyl-1-butanol, 2-Methyl-1-butanol และ สารที่ไม่สามารถ identified ได้ อีก 1 ชนิด จากการวิเคราะห์องค์ประกอบที่ให้กลิ่นจากน้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ K44 พบว่า มีสารพวกแอลกอฮอล์ คือ 3-Methyl-1-butanol, 2-Methyl-1-butanol, Phenyl ethylalcohol และเอสเตอร์ ได้แก่ Isoamyl acetate, Amyl propionate, Ethyl acetate และ Phenylethyl propionate จากการวิเคราะห์องค์ประกอบที่ให้กลิ่นจากน้ำหมักของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ K404 พบว่า มีสารพวกแอลกอฮอล์ ได้แก่ 3-Methyl-1-butanol, 2-Methyl-1-butanol, Phenylethyl alcohol และเอสเตอร์ ได้แก่ Ethyl isovalerate, Isoamyl acetate และ สารที่ identified ไม่ได้ อีก 2 ชนิด

จากผลการทดลองจะเห็นว่า เชื้อยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ สร้างสารที่มีองค์ประกอบคล้าย ๆ กัน คือมีองค์ประกอบเป็นสารอินทรีย์ 2 ประเภทใหญ่ คือ แอลกอฮอล์ และเอสเทอร์ และสารพวกแอลกอฮอล์ ได้แก่ 3-Methyl-1-butanol, 2-Methyl-1-butanol ที่เชื้อยีสต์สร้างขึ้นจัดเป็นพวก higher alcohol ซึ่งน่าจะมีที่มาจากเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโนที่มีสายโซ่ (branched chain amino acids) (ภาพที่ 45) และยังพบว่ามี 2-phenylethyl alcohol อยู่เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์จากการหมักด้วย และสารประกอบเอสเทอร์ที่เชื้อยีสต์สร้างขึ้น ได้แก่ Ethyl acetate, Amyl propionate, Phenylethyl propionate, Ethyl isovalerate, Isoamyl acetate ซึ่งน่าจะมีที่มาจากปฏิกิริยาเอสเทรีฟิเคชันระหว่างเอทานอลและกรดคาร์บอกซิลิกโดยมีเอนไซม์ไลเปส (lipase) ที่อยู่ในตัวทำลายอินทรีย์เร่งปฏิกิริยาย้อนกลับของการไฮโดรไลซ์เอสเทอร์ องค์ประกอบของผลิตภัณฑ์จากการหมักที่สำคัญตัวหนึ่งคือ Ethyl acetate ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาเอสเทรีฟิเคชันระหว่างเอทานอลและกรดอะซิติกเป็นเอสเทอร์ที่ให้กลิ่นหอมหวานแบบผลไม้สุกฉ่ำ ๆ จึงมีส่วนสำคัญที่ทำให้น้ำหมักมีกลิ่นหอม



ภาพที่ 45 แสดงการเกิด higher alcohol จากเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโนที่มีสายโซ่

สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองสามารถแยกเชื้อยีสต์จากแหล่งต่าง ๆ ได้จำนวน 144 ไอโซเลท และได้เชื้อยีสต์ที่ให้กลิ่นหอมเป็นที่น่าพอใจจำนวน 4 ไอโซเลทคือ ยีสต์สายพันธุ์ 7-18-1, MD1-2-1, K44 และ K404 ซึ่งแยกได้จากดอกไม้ ผลไม้ และดินจากโรงนม ตามลำดับ และจากการจัดจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ที่สร้างกลิ่นที่น่าพอใจทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่า เป็น *Candida pelliculosa*, *Candida norvigiga*, *Candida valida*, และ *Geotrichum* sp. ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์สารที่เป็นองค์ประกอบที่ให้กลิ่นจากน้ำหมักของเชื้อยีสต์แต่ละชนิด พบว่า สารส่วนใหญ่เป็นพวกแอลกอฮอล์ และ เอสเทอร์ โดยเชื้อยีสต์ 7-18-1 สร้างสารพวกแอลกอฮอล์ ได้แก่ 3-Methyl-1-butanol, 2- Methyl-1-butanol และ เอสเทอร์ ได้แก่ Isoamyl acetate, Ethyl acetate เชื้อยีสต์ MD1-2-1 สร้างสารพวกแอลกอฮอล์ ได้แก่ 3-Methyl-1-butanol, 2- Methyl-1-butanol และสารที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ 1 ชนิด เชื้อยีสต์ K44 สร้างสารพวกแอลกอฮอล์ ได้แก่ 3-Methyl-1-butanol, 2- Methyl-1-butanol, Phenylethyl alcohol และ เอสเทอร์ ได้แก่ Isoamyl acetate, Amylpropionate, Ethyl acetate, Phenylethyl propionate และเชื้อยีสต์ K404 สร้างสารพวกแอลกอฮอล์ ได้แก่ 3-Methyl-1-butanol, 1- Butanol, Phenylethyl alcohol และ เอสเทอร์ ได้แก่ Ethyl isovalerate, Isoamyl acetate และสารที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้อีก 2 ชนิด

จากการทดลองเนื่องจากผู้ทดลองใช้วิธีการสกัดด้วย SPME จากน้ำหมักเลยโดยไม่ได้นำวิธีการสกัดสารด้วยวิธีการอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น การกลั่นภายใต้ความดันต่ำ แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายและระเหยตัวทำละลายเพื่อให้สารเข้มข้นขึ้น ซึ่งอาจช่วยทำให้ได้สารที่ต้องการจะวิเคราะห์ มีความเข้มข้นมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- เกรียงศักดิ์ ไชยโรจน์. 2526. เอนไซม์ จุลินทรีย์ และเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในอาหาร. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 38-74.
- เกรียงศักดิ์ ไชยโรจน์. 2531. การสกัด และแยกสารระเหย. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 201.
- สันติ ทิพยางค์. 2536. การผลิตสารให้กลิ่นรสโดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ. วิทยาศาสตร์การอาหาร. 23 (3) :166-175.
- สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล. 2529. การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในการผลิตสารให้กลิ่นรส. วิทยาศาสตร์การอาหาร. 17(1) : 1-6.
- สุกานดา วณิชวัฒน์. 2538. การผลิตสารให้กลิ่นรสจากจุลินทรีย์. วิทยาศาสตร์ มข. 23(2) : 60-71.
- อังคณา ปัญญารักษ์. 2544. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากยีสต์ *Candida valida* และวิเคราะห์องค์ประกอบผลิตภัณฑ์จากการหมัก. รายงานปัญหาพิเศษ. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 47.
- Akita, O., Ida, T., Obata, T. and Hara, S. (1990) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* producing a large quantity of β -phenethyl alcohol and β -phenethyl acetate, *J. Ferment and Bioeng.*, 9, 125-128.
- Albertazzi, E. Cardillo, R. Servi, S. and Zucchi, G. (1994) Biogenertion of phenylethanol and 2- phenylethyl acetate important aroma components. *Biotech. Letts.* 16 , 491-496.
- Arnold, J. W. and Senter, S.D. (1998) Use of Digital Aroma Technology and SPME GC-MS to compare volatile compounds produced by bacteria isolated from processed poultry. *J. Sci. Food Agric.* 78, 343-348.
- Baptista, J.A., Tavares, J.F.P. and Carvalho, C.B. (1998) Comparison of catechins and aromas among different green teas using HPLC/SPME-GC. *Food Research International.* 3(10) 729-736.
- Bramorski, A., Christen, P. and Ramirez, M. Soccol, C.R. and Revah, S. (1998) Production of volatile compounds by edible fungus *Rhizopus oryzae* during solid state cultivation on tropical agro-industrial substrates. *Biotech. Letts.* 20, 359-362.

- Christen, P. and Raimbault, M. (1991) Optimization of cultural medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. *Biotech. Letts.* 13, 521-526.
- Christen, P. Villegas, E. and Revah, S. (1994) Growth and aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in various fermentation media. *Biotech. Letts.* 16, 1183-1188.
- Jiang, J. (1995) Volatile metabolite produced by *Kluyveromyces lactis* and their changes during fermentation. *Process Biochem.* 31, 635-640.
- Haffner, T. and Tressl, R. (1996) Biosynthesis of (R)- γ - decanolactone in the yeast *Sporobolomyces odoratus*. *Agric. Biol. Chem.* 44, 1218-1223.
- Pastore, G.M. Park, Y.K. and Min, D.B. (1994) Production of fruity aroma by *Neurospora* from beiju. *Mycol. Res.* 98, 1300-1302.
- Pastore, G.M., Sato, H.H. Yang, T.S., Park, Y.K. and Min D.B. (1994) Production of fruity aroma by newly yeast. *Biotech. Letts.* 16, 389-392.
- Pawliszyn, J. (1999) Applications of solid phase microextraction. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 655 p.
- Piggot, J.R. and Peterson, A (1994) Understanding natural flavors. Chapman & Hall, 318 p.
- Romano, P. Brandolini, V. Ansaloni, C. and Menziani, E. (1998) The production of 2,3-butanediol as a differentiation character in wine yeasts. *World J. of Microbiol & biotech.* 14, 649-653.
- Sluis C.V.D., Wolken, W.A.M. ,Giuseppin, M.C.F. (1999) Effect of threonine, cystathionine and the branched chain amino acids on the metabolism of *Zygosaccharomyces rouxii*. *Enz. Microbiol. Tech.* 26, 292-300.
- Wan, X.M., Stevenson, R.J., Chen, X.D. and Melton, L.D. (1999) Application of headspace solid phase microextraction to volatile flavour profile development during storage and ripening of kiwifruit. 32, 175-183.
- Zironi, R., Romano, P. Suzzi, G., Battistuta, F. and Comi, G. (1993) Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Letts.* 15, 235-238.

รายงานการสอบทานงบการเงินระหว่างกาลโดยผู้สอบบัญชีรับอนุญาต

เสนอ ผู้ถือหุ้นของบริษัท ซีพีอาร์ โกมุ อินดัสเตรียล จำกัด(มหาชน)

ข้าพเจ้าได้สอบทานงบดุลรวมและงบดุลเฉพาะบริษัท ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548 งบกำไรขาดทุนรวม และงบกำไรขาดทุนเฉพาะบริษัท สำหรับงวดสามเดือนและสำหรับงวดหกเดือน สิ้นสุดวันที่ 30 มิถุนายน 2548 งบแสดงการเปลี่ยนแปลงส่วนของผู้ถือหุ้นรวมและงบแสดงการเปลี่ยนแปลงส่วนของผู้ถือหุ้นเฉพาะบริษัท และงบกระแสเงินสดรวมและงบกระแสเงินสดเฉพาะบริษัท สำหรับงวดหกเดือนสิ้นสุดวันที่ 30 มิถุนายน 2548 ของบริษัท ซีพีอาร์ โกมุ อินดัสเตรียล จำกัด(มหาชน) และบริษัทย่อย และเฉพาะของบริษัท ซีพีอาร์ โกมุ อินดัสเตรียล จำกัด(มหาชน) ซึ่งผู้บริหารของกิจการเป็นผู้รับผิดชอบต่อความถูกต้องและครบถ้วนของข้อมูลในงบการเงินระหว่างกาลเหล่านี้ ส่วนข้าพเจ้าเป็นผู้รับผิดชอบในการรายงานต่องบการเงินระหว่างกาลดังกล่าวจากผลการสอบทานของข้าพเจ้า

ข้าพเจ้าได้ปฏิบัติตามสอบทานตามมาตรฐานการสอบบัญชีที่เกี่ยวกับการสอบทาน ซึ่งกำหนดให้ข้าพเจ้าต้องวางแผนและปฏิบัติตามสอบทาน เพื่อให้ได้ความเชื่อมั่นอย่างพอประมาณว่างบการเงินระหว่างกาลแสดงข้อมูลที่ขัดต่อข้อเท็จจริงอันเป็นสาระสำคัญหรือไม่ การสอบทานนี้มีขอบเขตจำกัดโดยส่วนใหญ่ใช้วิธีการสอบถามบุคลากรของกิจการและการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลทางการเงิน จึงให้ความเชื่อมั่นน้อยกว่าการตรวจสอบตามมาตรฐานการสอบบัญชีที่รับรองทั่วไป ดังนั้นข้าพเจ้าจึงไม่อาจแสดงความเห็นต่องบการเงินระหว่างกาลที่สอบทานได้

ข้าพเจ้าไม่พบสิ่งที่เป็นเหตุให้เชื่อว่างบการเงินระหว่างกาลดังกล่าวไม่ถูกต้องตามที่ควรในสาระสำคัญตามหลักการบัญชีที่รับรองทั่วไปจากการสอบทานของข้าพเจ้า

งบการเงินรวมและงบการเงินเฉพาะของบริษัท สำหรับปี สิ้นสุดวันที่ 31 ธันวาคม 2547 ของบริษัท ซีพีอาร์ โกมุ อินดัสเตรียล จำกัด(มหาชน) และบริษัทย่อยและของเฉพาะบริษัท ซีพีอาร์ โกมุ อินดัสเตรียล จำกัด(มหาชน) ได้มีการตรวจสอบโดยผู้สอบบัญชีอื่นในสำนักงานเดียวกัน และเสนอรายงานไว้อย่างไม่มีเงื่อนไข ตามรายงานลงวันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2548 และงบดุลรวมและงบดุลเฉพาะบริษัท ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2547 ที่แสดงเปรียบเทียบเป็นส่วนหนึ่งของงบการเงินดังกล่าว

นอกจากนี้งบกำไรขาดทุนรวมและงบกำไรขาดทุนเฉพาะบริษัท สำหรับงวดสามเดือนและสำหรับงวดหกเดือน สิ้นสุดวันที่ 30 มิถุนายน 2547 งบแสดงการเปลี่ยนแปลงส่วนของผู้ถือหุ้นรวมและงบแสดงการเปลี่ยนแปลงส่วนของผู้ถือหุ้นเฉพาะบริษัท และงบกระแสเงินสดรวมและงบกระแสเงินสดเฉพาะบริษัท สำหรับงวดหกเดือนสิ้นสุดวันที่ 30 มิถุนายน 2547 ของบริษัท ซีพีอาร์ โกมุ อินดัสเทรียล จำกัด(มหาชน) และบริษัทย่อย และเฉพาะของบริษัท ซีพีอาร์ โกมุ อินดัสเทรียล จำกัด(มหาชน) ที่แสดงเปรียบเทียบมีการสอบทานโดยผู้สอบบัญชีอื่นในสำนักงานเดียวกัน ซึ่งได้รายงานอย่างมีเงื่อนไขเกี่ยวกับการถูกจำกัดขอบเขต เนื่องจากงบกำไรขาดทุนเฉพาะบริษัท งบแสดงการเปลี่ยนแปลงส่วนของผู้ถือหุ้นเฉพาะบริษัท และงบกระแสเงินสดเฉพาะบริษัท ที่นำมาเปรียบเทียบเป็นข้อมูลที่จัดทำโดยผู้บริหาร ตามรายงานลงวันที่ 20 สิงหาคม 2547

บริษัท สำนักงาน เอ เอ็ม ซี จำกัด

(นางสาวสุกัญญา สุทธิประเสริฐ)

ผู้สอบบัญชีรับอนุญาต เลขที่ 5063

กรุงเทพมหานคร

วันที่ 21 กรกฎาคม 2548

บริษัท ซีพีอาร์ โกมุ อินดัสเตรียล จำกัด (มหาชน) และบริษัทย่อย

งบดุล

ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548 และวันที่ 31 ธันวาคม 2547

(หน่วย : พันบาท)

		งบการเงินรวม		งบการเงินเฉพาะบริษัท	
		2548	2547	2548	2547
		ยังไม่ได้ตรวจสอบ สอบทานแล้ว	ตรวจสอบแล้ว	ยังไม่ได้ตรวจสอบ สอบทานแล้ว	ตรวจสอบแล้ว
<u>สินทรัพย์</u>					
สินทรัพย์หมุนเวียน					
เงินสดและรายการเทียบเท่าเงินสด		91,828	11,939	84,858	9,628
ลูกหนี้การค้าและตัวเงินรับ	(หมายเหตุ 4)	58,770	50,641	58,618	49,887
สินค้าคงเหลือ	(หมายเหตุ 5)	62,383	39,453	60,821	37,865
เงินลงทุนชั่วคราว	(หมายเหตุ 6)	10,000	-	10,000	-
สินทรัพย์หมุนเวียนอื่น		6,090	1,478	4,039	1,452
รวมสินทรัพย์หมุนเวียน		229,071	103,511	218,336	98,832
สินทรัพย์ไม่หมุนเวียน					
เงินลงทุนซึ่งบันทึกโดยวิธีส่วนได้เสีย	(หมายเหตุ 7)	-	-	31,513	14,562
เงินลงทุนในบริษัทที่เกี่ยวข้องกัน-สุทธิ	(หมายเหตุ 8)	2,170	2,170	2,170	2,170
ที่ดิน อาคารและอุปกรณ์-สุทธิ	(หมายเหตุ 9)	308,879	254,576	251,987	245,551
เงินฝากคดการะค้าประกัน	(หมายเหตุ 15.1)	2,000	-	1,600	-
สินทรัพย์ไม่หมุนเวียนอื่น		873	287	89	96
รวมสินทรัพย์ไม่หมุนเวียน		313,922	257,033	287,359	262,379
รวมสินทรัพย์		542,993	360,544	505,695	361,211

หมายเหตุประกอบงบการเงินเป็นส่วนหนึ่งของงบการเงินนี้

บริษัท ซีพีอาร์ โกมุ อินดัสเตรียล จำกัด (มหาชน) และบริษัทย่อย

งบดุล

ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548 และวันที่ 31 ธันวาคม 2547

(หน่วย : พันบาท)

	งบการเงินรวม		งบการเงินเฉพาะบริษัท	
	2548	2547	2548	2547
	ยังไม่ได้ตรวจสอบ สอบทานแล้ว	ตรวจสอบแล้ว	ยังไม่ได้ตรวจสอบ สอบทานแล้ว	ตรวจสอบแล้ว
<u>หนี้สินและส่วนของผู้ถือหุ้น</u>				
<u>หนี้สินหมุนเวียน</u>				
เจ้าหนี้การค้าและตัวเงินจ่าย	28,341	15,811	29,810	16,991
ส่วนของเงินกู้ยืมระยะยาวที่ถึงกำหนดชำระในปี (หมายเหตุ 11)	30,667	23,089	30,667	23,089
เงินกู้ยืมจากกรรมการ (หมายเหตุ 3.2)	-	221	-	-
เงินกู้ยืมจากบุคคลที่เกี่ยวข้องกัน (หมายเหตุ 3.2)	10,000	-	-	-
ภาษีเงินได้นิติบุคคลค้างจ่าย	13,296	15,500	13,296	15,500
หนี้สินหมุนเวียนอื่น	24,768	18,460	19,002	22,558
รวมหนี้สินหมุนเวียน	107,072	73,081	92,775	78,138
<u>หนี้สินไม่หมุนเวียน</u>				
เงินกู้ยืมระยะยาว (หมายเหตุ 11)	96,245	82,474	96,245	82,474
รวมหนี้สินไม่หมุนเวียน	96,245	82,474	96,245	82,474
รวมหนี้สิน	203,317	155,555	189,020	160,612

หมายเหตุประกอบงบการเงินเป็นส่วนหนึ่งของงบการเงินนี้

บริษัท ซีพีอาร์ โกมุ อินดัสเตรียล จำกัด (มหาชน) และบริษัทย่อย

งบดุล

ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548 และวันที่ 31 ธันวาคม 2547

(หน่วย : พันบาท)

	งบการเงินรวม		งบการเงินเฉพาะบริษัท	
	2548	2547	2548	2547
	ยังไม่ได้ตรวจสอบ สอบทานแล้ว	ตรวจสอบแล้ว	ยังไม่ได้ตรวจสอบ สอบทานแล้ว	ตรวจสอบแล้ว
ส่วนของผู้ถือหุ้น				
ทุนเรือนหุ้น (หมายเหตุ 12)				
ทุนจดทะเบียน				
หุ้นสามัญ 199,000,000 หุ้น มูลค่าหุ้นละ 1.00 บาท	199,000	199,000	199,000	199,000
ทุนที่ออกและชำระแล้ว				
หุ้นสามัญ 199,000,000 หุ้น มูลค่าหุ้นละ 1.00 บาท	199,000	-	199,000	-
หุ้นสามัญ 144,000,000 หุ้น มูลค่าหุ้นละ 1.00 บาท	-	144,000	-	144,000
ส่วนเกินมูลค่าหุ้นสามัญ (หมายเหตุ 12)	55,824	-	55,824	-
ส่วนเกินทุนจากการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนการถือหุ้นในบริษัทย่อย (หมายเหตุ 7)	963	963	963	963
กำไรสะสม				
จัดสรรแล้ว				
สำรองตามกฎหมาย	5,079	2,694	5,079	2,694
ยังไม่ได้จัดสรร	55,809	52,942	55,809	52,942
รวมส่วนของผู้ถือหุ้นบริษัท ซีพีอาร์ โกมุ อินดัสเตรียล จำกัด(มหาชน)	316,675	200,599	316,675	200,599
ส่วนของผู้ถือหุ้นส่วนน้อย	23,001	4,390	-	-
รวมส่วนของผู้ถือหุ้น	339,676	204,989	316,675	200,599
รวมหนี้สินและส่วนของผู้ถือหุ้น	542,993	360,544	505,695	361,211

หมายเหตุประกอบงบการเงินเป็นส่วนหนึ่งของงบการเงินนี้

บริษัท ซีฟิอาร์ โกมุ อินดัสเตรียล จำกัด(มหาชน) และบริษัทย่อย
หมายเหตุประกอบงบการเงิน
วันที่ 30 มิถุนายน 2548 และ 2547 (ยังไม่ได้ตรวจสอบ/สอบทานแล้ว)
และวันที่ 31 ธันวาคม 2547 (ตรวจสอบแล้ว)

1. หลักเกณฑ์ในการจัดทำงบการเงินและนโยบายการบัญชี

1.1 งบการเงินระหว่างกาลได้จัดทำขึ้นตามหลักการบัญชีที่รับรองทั่วไปในประเทศไทย และแสดงโดยใช้รูปแบบย่อตามที่กำหนดไว้ในมาตรฐานการบัญชี ฉบับที่ 41 เรื่อง “งบการเงินระหว่างกาล” รวมทั้งเพิ่มเติมรายการในงบการเงินพื้นฐาน อันได้แก่ งบดุล งบกำไรขาดทุน งบแสดงการเปลี่ยนแปลงส่วนของผู้ถือหุ้น และงบกระแสเงินสด โดยถือตามรูปแบบที่กำหนดไว้ในประกาศกรมทะเบียนการค้า เรื่อง “กำหนดรายการย่อที่ต้องมีในงบการเงิน (พ.ศ. 2544)” เพื่อให้เป็นไปตามประกาศคณะกรรมการกำกับหลักทรัพย์และตลาดหลักทรัพย์และข้อบังคับของตลาดหลักทรัพย์แห่งประเทศไทย

นโยบายการบัญชีที่สำคัญสำหรับงบการเงินระหว่างกาลนี้เป็นนโยบายการบัญชีที่ใช้กับงบการเงินสำหรับปีสิ้นสุดวันที่ 31 ธันวาคม 2547 ดังนั้นงบการเงินระหว่างกาลนี้ควรอ่านควบคู่ไปกับงบการเงินสำหรับปี พ.ศ. 2547

1.2 บริษัทฯ ได้จัดทำงบการเงินเป็นภาษาไทยตามหลักการบัญชีที่รับรองทั่วไปในประเทศไทยซึ่งหลักการบัญชีที่ใช้อาจแตกต่างจากหลักการบัญชีที่รับรองทั่วไปในประเทศอื่น ๆ เพื่อความสะดวกของผู้อ่านงบการเงิน บริษัทฯ ได้จัดทำงบการเงินฉบับภาษาอังกฤษโดยแปลจากงบการเงินฉบับภาษาไทยนี้ เพื่อวัตถุประสงค์ของการรายงานภายในประเทศ

2. หลักเกณฑ์ในการจัดทำงบการเงินรวม

2.1 ในการจัดทำงบการเงินรวม ถือหลักการรวมเฉพาะบริษัทย่อยของบริษัท ซีฟิอาร์ โกมุ อินดัสเตรียล จำกัด (มหาชน) โดยมีอำนาจควบคุมนโยบายทางการเงิน การดำเนินงาน และถือหุ้นทางตรง ซึ่งถือหุ้นในบริษัทอื่นที่เกินกว่าร้อยละ 50 ของทุนจดทะเบียนของบริษัทเหล่านั้น บริษัท ซีฟิอาร์ โกมุ อินดัสเตรียล จำกัด(มหาชน) ถือหุ้นในบริษัทย่อยตามอัตราส่วนดังนี้

ชื่อบริษัท	จัดตั้งขึ้นในประเทศ	ประเภทกิจการ	อัตราร้อยละของการลงทุน
บริษัท ซีจีไอ เมททัล อินดัสเตรียล จำกัด	ประเทศไทย	ผลิตและจำหน่ายผลิตภัณฑ์จากเหล็ก	70.00
บริษัท ยูซอน ไพพ์ (ไทยแลนด์) จำกัด	ประเทศไทย	ผลิตและจำหน่ายผลิตภัณฑ์จากท่อเหล็ก	51.00

- 2.2 งบการเงินรวมจัดทำขึ้นโดยใช้นโยบายการบัญชีเดียวกันสำหรับรายการบัญชีที่เหมือนกันหรือเหตุการณ์การบัญชีที่คล้ายคลึงกัน
- 2.3 เงินลงทุนในบริษัทย่อย บันทึกบัญชีตามวิธีส่วนได้เสียซึ่งรอบระยะเวลาบัญชีของบริษัทย่อย สิ้นสุดวันเดียวกันกับของบริษัท ซีพีอาร์ โกมุ อินดัสเตรียล จำกัด(มหาชน)
- 2.4 ยอดคงค้างและรายการระหว่างบริษัทใหญ่ และบริษัทย่อย เงินลงทุนในบริษัทย่อยและทุนเรือนหุ้นของบริษัทย่อย ได้ตัดออกจากงบการเงินรวมแล้ว

3. รายการกับกิจการและบุคคลที่เกี่ยวข้องกัน

บริษัทฯ มีรายการบัญชีที่เกิดขึ้นกับบริษัทที่เกี่ยวข้องกัน โดยมีผู้ถือหุ้น กรรมการ และ/หรือผู้บริหารในตำแหน่งที่สำคัญร่วมกัน และกับบุคคลที่เกี่ยวข้องกัน โดยยอดคงเหลือ และรายการระหว่างกันที่มีสาระสำคัญระหว่างบริษัทฯ กับบริษัทและบุคคลที่เกี่ยวข้องกัน ดังต่อไปนี้

3.1 รายได้และค่าใช้จ่ายระหว่างกัน

				(หน่วย : พันบาท)	
ประเภทรายการ/ชื่อบริษัท	ความสัมพันธ์	งบการเงินรวม		งบการเงินเฉพาะบริษัท	
		สำหรับงวดหกเดือน		สำหรับงวดหกเดือน	
		สิ้นสุดวันที่ 30 มิถุนายน		สิ้นสุดวันที่ 30 มิถุนายน	
		2548	2547	2548	2547
- มูลค่าการขายสินค้าและบริการ					
บริษัท ซีจีไอ เมททัล อินดัสเตรียล จำกัด	บริษัทย่อย	-	-	1,904	-
บริษัท คินูงาวา (ไทยแลนด์) จำกัด	บริษัทที่เกี่ยวข้องกัน	1,235	1,235	1,235	1,235
- มูลค่ารายได้อื่น					
บริษัท ซีจีไอ เมททัล อินดัสเตรียล จำกัด	บริษัทย่อย	-	-	593	298
บริษัท ยูซอน ไฟฟ์ (ไทยแลนด์) จำกัด	บริษัทย่อย	-	-	848	-
บริษัท คินูงาวา (ไทยแลนด์) จำกัด	บริษัทที่เกี่ยวข้องกัน	2,150	982	2,150	982
- มูลค่าการซื้อสินค้า					
บริษัท ซีจีไอ เมททัล อินดัสเตรียล จำกัด	บริษัทย่อย	-	-	12,590	5,899
บริษัท คินูงาวา (ไทยแลนด์) จำกัด	บริษัทที่เกี่ยวข้องกัน	563	614	563	614

นโยบายการกำหนดราคา

- การซื้อหรือขายสินค้าและการให้บริการเป็นไปตามราคาที่เทียบเคียงได้กับบุคคลภายนอก
- รายได้อื่น ประกอบด้วย การให้บริการและค่าเช่าที่เรียกเก็บเป็นรายเดือนเป็นไปตามเกณฑ์ที่ตกลงร่วมกัน

3.2 สินทรัพย์และหนี้สินระหว่างกัน

		(หน่วย : พันบาท)			
ประเภทรายการ/ชื่อบริษัท	ความสัมพันธ์	งบการเงินรวม		งบการเงินเฉพาะบริษัท	
		ณ วันที่		ณ วันที่	
		30 มิถุนายน 2548	31 ธันวาคม 2547	30 มิถุนายน 2548	31 ธันวาคม 2547
- ลูกหนี้การค้า					
บริษัท ซีจีไอ เมททัล อินดัสเตรียล จำกัด	บริษัทย่อย	-	-	1,279	-
บริษัท คินูงาวา (ไทยแลนด์) จำกัด	บริษัทที่เกี่ยวข้องกัน	319	383	319	383
- ลูกหนี้อื่น					
บริษัท ซีจีไอ เมททัล อินดัสเตรียล จำกัด	บริษัทย่อย	-	-	95	622
บริษัท คินูงาวา (ไทยแลนด์) จำกัด	บริษัทที่เกี่ยวข้องกัน	345	306	345	306
- รายได้ค้างรับ					
บริษัท ยูซอน ไฟฟ์ (ไทยแลนด์) จำกัด	บริษัทย่อย	-	-	848	-
บริษัท คินูงาวา (ไทยแลนด์) จำกัด	บริษัทที่เกี่ยวข้องกัน	2,040	-	2,040	-
- เจ้าหนี้การค้า					
บริษัท ซีจีไอ เมททัล อินดัสเตรียล จำกัด	บริษัทย่อย	-	-	439	4,651
บริษัท คินูงาวา (ไทยแลนด์) จำกัด	บริษัทที่เกี่ยวข้องกัน	5,788	-	5,788	-
- เจ้าหนี้อื่น					
บริษัท คินูงาวา (ไทยแลนด์) จำกัด	บริษัทที่เกี่ยวข้องกัน	-	84	-	84
- เงินกู้ยืมจากกรรมการ	กรรมการและผู้ถือหุ้น				
ยอดต้นงวด		221	37,000	-	37,000
ผู้เพิ่มระหว่างงวด		-	971	-	-
จ่ายคืนระหว่างงวด		(221)	(37,750)	-	(37,000)
ยอดปลายงวด		-	221	-	-
- เงินกู้ยืมจากบุคคลที่เกี่ยวข้องกัน	กรรมการและผู้ถือหุ้น				
ยอดต้นงวด		-	-	-	-
ผู้เพิ่มระหว่างงวด		10,000	-	-	-
จ่ายคืนระหว่างงวด		-	-	-	-
ยอดปลายงวด		10,000	-	-	-

ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548 บริษัทย่อยแห่งหนึ่ง ได้กู้ยืมเงินจากผู้ถือหุ้นรายหนึ่ง เพื่อใช้เป็นเงินทุนหมุนเวียน โดยออกตั๋วเงินจ่ายเป็นจำนวนเงิน 10.00 ล้านบาท เป็นหลักทรัพย์ในการค้ำประกันเงินกู้ดังกล่าว โดยมีกำหนดระยะเวลาชำระคืนในวันที่ 11 กรกฎาคม 2548 อัตราดอกเบี้ยร้อยละ 9.00 ต่อปี

ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2547 บริษัทฯ มีเงินกู้ยืมกรรมการ จำนวน 37.00 ล้านบาท เพื่อซื้อที่ดินที่ใช้ในการดำเนินงานของบริษัทฯ และบริษัทย่อยแห่งหนึ่ง มีเงินกู้ยืมจากกรรมการ จำนวน 0.22 ล้านบาท เป็นเงินกู้ยืมเพื่อทดรองจ่ายค่าใช้จ่ายต่าง ๆ เงินกู้ยืมดังกล่าว ไม่มีการทำสัญญาเป็นลายลักษณ์อักษรและไม่คึดคอกเบี้ยระหว่างกัน ปัจจุบันบริษัทฯ และบริษัทย่อยได้จ่ายชำระแล้วทั้งจำนวน

3.3 ลักษณะความสัมพันธ์

รายชื่อบริษัท	ความสัมพันธ์	เกี่ยวข้องโดย
บริษัท ซีจีไอ เมททัล อินดัสเตรียล จำกัด	บริษัทย่อย	ถือหุ้นทางตรง
บริษัท ยูซอน ไฟฟ์ (ไทยแลนด์) จำกัด	บริษัทย่อย	ถือหุ้นทางตรง
บริษัท คินูงาวา (ไทยแลนด์) จำกัด	บริษัทที่เกี่ยวข้องกัน	ถือหุ้นทางตรงและมีผู้ถือหุ้นร่วมกัน

4. ลูกหนี้การค้าและตัวเงินรับ

ประกอบด้วย

(หน่วย : พันบาท)

	งบการเงินรวม		งบการเงินเฉพาะบริษัท	
	ณ วันที่		ณ วันที่	
	30 มิถุนายน 2548	31 ธันวาคม 2547	30 มิถุนายน 2548	31 ธันวาคม 2547
ลูกหนี้การค้าและตัวเงินรับ-ในประเทศ				
ยังไม่ถึงกำหนดชำระ	36,769	35,314	36,909	34,612
เกินกำหนดชำระไม่เกิน 30 วัน	7,919	1,451	7,627	1,399
เกินกำหนดชำระมากกว่า 30 วัน	102	9	102	9
รวม	44,790	36,774	44,638	36,020
ลูกหนี้การค้า-ต่างประเทศ				
ยังไม่ถึงกำหนดชำระ	13,980	13,867	13,980	13,867
รวม	13,980	13,867	13,980	13,867
รวมทั้งสิ้น	58,770	50,641	58,618	49,887

5. สินค้าคงเหลือ

ประกอบด้วย

(หน่วย : พันบาท)

	งบการเงินรวม		งบการเงินเฉพาะบริษัท	
	ณ วันที่		ณ วันที่	
	30 มิถุนายน 2548	31 ธันวาคม 2547	30 มิถุนายน 2548	31 ธันวาคม 2547
วัตถุดิบ	22,364	12,252	22,250	12,465
สินค้าระหว่างผลิต	12,206	6,477	11,368	5,537
สินค้าสำเร็จรูป	27,087	20,724	26,477	19,863
วัตถุดิบระหว่างทาง	726	-	726	-
รวม	62,383	39,453	60,821	37,865

6. เงินลงทุนชั่วคราว

ประกอบด้วย

(หน่วย : พันบาท)

ชื่อบริษัท	ประเภทกิจการ	สัดส่วน เงินลงทุน	งบการเงินรวมและงบการเงินเฉพาะบริษัท	
			ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548	ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2547
กองทุนรวมอสังหาริมทรัพย์ไทยคอน	กองทุนปิด-ลงทุนในอสังหาริมทรัพย์โดย การซื้อหรือเช่าและจัดหาผลประโยชน์ จากอสังหาริมทรัพย์ดังกล่าวและอื่น ๆ	0.57%	10,000	-

ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548 งบการเงินรวม และงบการเงินเฉพาะบริษัท เงินลงทุนในกองทุนรวมอสังหาริมทรัพย์ไทยคอน เป็นเงินลงทุนที่ไม่กำหนดอายุโครงการ และไม่รับซื้อคืนหน่วยลงทุน

เงินลงทุนชั่วคราว เป็นเงินลงทุนในหน่วยลงทุนในความต้องการของตลาด บริษัทฯ ถือไว้เป็นหลักทรัพย์เพื่อขายแสดงมูลค่าด้วยมูลค่ายุติธรรม ซึ่งคำนวณจากราคาเสนอซื้อครั้งสุดท้าย ณ วันที่สิ้นสุดบัญชี บริษัทฯ รับรู้การเปลี่ยนแปลงมูลค่าเป็นรายการแยกต่างหากในส่วนของผู้ถือหุ้น และจะบันทึกผลกำไรขาดทุนเมื่อบริษัทฯ ได้จำหน่ายเงินลงทุนนั้นไว้ในงบกำไรขาดทุน

7. เงินลงทุนซึ่งบันทึกโดยวิธีส่วนได้เสีย

ประกอบด้วย

(หน่วย : พันบาท)

ชื่อบริษัท	ทุนชำระแล้ว		สัดส่วน		งบการเงินเฉพาะบริษัท			
	ณ วันที่		เงินลงทุน		ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548		ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2547	
	30 มิถุนายน	31 ธันวาคม	30 มิถุนายน	31 ธันวาคม	เงินลงทุน		เงินลงทุน	
	2548	2547	2548	2547	วิธีราคาทุน	วิธีส่วนได้เสีย	วิธีราคาทุน	วิธีส่วนได้เสีย
บริษัทย่อย								
บริษัท ซีจีไอ เมททัล อินดัสเทรียล จำกัด	20,000	12,500	70.00%	70.00%	12,375	12,248	9,125	9,890
บริษัท ชูซอน ไพฟ์ (ไทยแลนด์) จำกัด	40,000	5,100	51.00%	51.00%	20,400	19,265	5,100	4,672
รวม					32,775	31,513	14,225	14,562

เมื่อวันที่ 20 กุมภาพันธ์ 2547 บริษัท ซีจีไอ เมททัล อินดัสเทรียล จำกัด จัดระเบียบจัดตั้งบริษัทโดยมีทุนจดทะเบียน จำนวนเงิน 12.50 ล้านบาท ซึ่งบริษัทฯ ได้ลงทุนในบริษัท ซีจีไอ เมททัล อินดัสเทรียล จำกัด จำนวนเงิน 7.50 ล้านบาท สัดส่วนการถือหุ้นร้อยละ 60.00 โดยบริษัทฯ ซื้อหุ้นในราคามูลค่าที่ตราไว้ และเมื่อวันที่ 8 พฤศจิกายน 2547 บริษัท ซีจีไอ เมททัล อินดัสเทรียล จำกัด ได้เพิ่มทุนจดทะเบียนจากเดิม จำนวนเงิน 12.50 ล้านบาท เป็นจำนวนเงิน 20.00 ล้านบาท โดยการออกหุ้นสามัญเพิ่มเติม จำนวน 0.75 ล้านหุ้น มูลค่าหุ้นละ 10.00 บาท เป็นจำนวนเงิน 7.50 ล้านบาท บริษัทฯ ได้ลงทุนในบริษัท ซีจีไอ เมททัล อินดัสเทรียล จำกัด เพิ่มจากเดิมร้อยละ 60.00 เป็นร้อยละ 70.00 โดยบริษัทฯ ซื้อหุ้นเพิ่มทุนดังกล่าวในราคามูลค่าที่ตราไว้ และจากการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนการถือหุ้นดังกล่าว มีผลทำให้บริษัทฯ มีส่วนเกินทุนจากการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนการถือหุ้นในบริษัทย่อย จำนวนเงิน 0.96 ล้านบาท

เมื่อวันที่ 15 ธันวาคม 2547 บริษัท ยูซอน ไฟฟ์ (ไทยแลนด์) จำกัด จดทะเบียนจัดตั้งบริษัท โดยมีทุนจดทะเบียน จำนวน 40.00 ล้านบาท ซึ่งบริษัทย่อยได้เรียกชำระค่าหุ้นในอัตราร้อยละ 25 ของทุนจดทะเบียน โดยบริษัทฯ ได้ลงทุนในบริษัท ยูซอน ไฟฟ์ (ไทยแลนด์) จำกัด จำนวน 5.10 ล้านบาท สัดส่วนการถือหุ้นร้อยละ 51.00 โดยบริษัทฯ ซื้อหุ้นในราคารวมค่าที่ตราไว้ ทั้งนี้ ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2547 บริษัทย่อยดังกล่าวยังไม่ได้รับชำระค่าหุ้นเป็นเครื่องจักรจากผู้ถือหุ้นส่วนน้อย เนื่องจากอยู่ระหว่างดำเนินการ

ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548 บริษัทย่อยได้เรียกชำระค่าหุ้นครบถ้วนแล้ว โดยได้รับชำระค่าหุ้นเป็นเครื่องจักรซึ่งอยู่ระหว่างติดตั้งจากผู้ถือหุ้นส่วนน้อยแล้ว เมื่อวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2548

8. เงินลงทุนในบริษัทที่เกี่ยวข้องกัน-สุทธิ

ประกอบด้วย

ชื่อบริษัท	ลักษณะธุรกิจ	ทุนชำระแล้ว	สัดส่วน เงินลงทุน	(หน่วย : พันบาท)	
				งบการเงินรวมและงบการเงินเฉพาะบริษัท	
				ณ วันที่	
				30 มิถุนายน 2548	31 ธันวาคม 2547
บริษัท คินงาวา (ไทยแลนด์) จำกัด	ผลิตและจำหน่ายยางขอบประตู และขอบกระจกรถยนต์	100,000	15.00%	11,250	11,250
หัก ค่าเผื่อการลดราคาเงินลงทุน				(9,080)	(9,080)
สุทธิ				2,170	2,170

เมื่อวันที่ 15 มีนาคม 2547 บริษัทฯ ซื้อหุ้นในบริษัท คินงาวา (ไทยแลนด์) จำกัด จำนวน 0.75 ล้านหุ้น มูลค่าที่ตราไว้หุ้นละ 10.00 บาท เป็นจำนวนเงิน 7.50 ล้านบาท และอีกส่วนหนึ่งจำนวน 0.75 ล้านหุ้น ซื้อจากกรรมการในราคาหุ้นละ 5.00 บาท เป็นจำนวนเงิน 3.75 ล้านบาท ซึ่งเป็นราคาที่ต่ำกว่ามูลค่าที่ตราไว้ เนื่องจากบริษัทดังกล่าวมีผลการดำเนินงานขาดทุน

9. ที่ดิน อาคารและอุปกรณ์-สุทธิ

ประกอบด้วย

	(หน่วย : พันบาท)	
	งบการเงินรวม	งบการเงินเฉพาะบริษัท
ราคาตามบัญชี ณ วันที่ 1 มกราคม 2548	254,576	245,551
ซื้อ/รับโอน	66,261	17,472
ค่าเสื่อมราคา	(11,958)	(11,036)
ราคาตามบัญชี ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548	308,879	251,987

ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548 บริษัทฯ ได้จดจำนองที่ดินพร้อมสิ่งปลูกสร้างที่มีอยู่แล้วในปัจจุบันและ / หรือที่จะมีขึ้นในอนาคต และจดจำนองเครื่องจักร และอุปกรณ์บางส่วน ให้กับสถาบันการเงินแห่งหนึ่ง เพื่อเป็นหลักประกันวงเงินสินเชื่อในรูปของเงินเบิกเกินบัญชี และเงินกู้ยืมระยะยาว ตามที่กล่าวในหมายเหตุประกอบ งบการเงินข้อที่ 10 และ 11

ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2547 บริษัทฯ ได้จดจำนองที่ดินพร้อมสิ่งปลูกสร้างที่มีอยู่แล้วในปัจจุบันและ / หรือที่จะมีขึ้นในอนาคต และจดจำนองเครื่องจักร และอุปกรณ์บางส่วน ให้กับสถาบันการเงินแห่งหนึ่ง เพื่อเป็นหลักประกันวงเงินสินเชื่อในรูปของเงินเบิกเกินบัญชี เจ้าหนี้ที่รับสินเชื่อคือ ธนาคารออมสิน จำกัด (มหาชน) และ เงินกู้ยืมระยะยาว ตามที่กล่าวในหมายเหตุประกอบงบการเงินข้อที่ 10 และ 11

ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548 และวันที่ 31 ธันวาคม 2547 บริษัทฯ มีสินทรัพย์ที่คำนวณค่าเสื่อมราคาหมดแล้วแต่ยังใช้งานอยู่ ดังต่อไปนี้

	(หน่วย : บาท)				
	ราคาทุน		อัตราค่า	มูลค่าสุทธิตามบัญชี	
	ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548	ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2547	เสื่อมราคา	ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548	ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2547
เครื่องจักรและเครื่องมือเครื่องใช้	21,592,861.27	11,959,647.27	20%	54.00	36.00
เครื่องตกแต่งและเครื่องใช้สำนักงาน	1,605,699.24	1,520,211.30	20%	34.00	25.00
ยานพาหนะ	4,261,830.84	4,261,830.84	20%	2.00	2.00

10. สินเชื่อที่ได้รับจากธนาคารพาณิชย์และสถาบันการเงิน

ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548 บริษัทฯ มีสินเชื่อที่ได้รับจากธนาคารพาณิชย์แห่งหนึ่งในรูปของเงินเบิกเกินบัญชีวงเงิน 25.00 ล้านบาท และเงินกู้ยืมระยะยาววงเงิน 150.00 ล้านบาท โดยมีที่ดินพร้อมสิ่งปลูกสร้างและเครื่องจักรที่เป็นกรรมสิทธิ์ของบริษัทฯ ไปจดจำนองเป็นหลักประกันวงเงินสินเชื่อดังกล่าว

ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2547 บริษัทฯ มีสินเชื่อที่ได้รับจากธนาคารพาณิชย์แห่งหนึ่งในรูปของเงินเบิกเกินบัญชีวงเงิน 25.00 ล้านบาท เจ้าหนี้ที่รับสินเชื่อคือ ธนาคารออมสิน จำกัด (มหาชน) และเงินกู้ยืมระยะยาววงเงิน 20.00 ล้านบาท และขายลดตั๋วเงินวงเงิน 15.00 ล้านบาท โดยมีที่ดินพร้อมสิ่งปลูกสร้างและเครื่องจักรที่เป็นกรรมสิทธิ์ของบริษัทฯ ไปจดจำนองเป็นหลักประกันวงเงินสินเชื่อดังกล่าว

11. เงินกู้ยืมระยะยาว

ประกอบด้วย

	งบการเงินรวม		งบการเงินเฉพาะบริษัท	
	ณ วันที่		ณ วันที่	
	30 มิถุนายน 2548	31 ธันวาคม 2547	30 มิถุนายน 2548	31 ธันวาคม 2547
เงินกู้ยืมระยะยาว	126,912	105,563	126,912	105,563
หัก ส่วนของเงินกู้ยืมระยะยาวที่ถึงกำหนดชำระในปี	(30,667)	(23,089)	(30,667)	(23,089)
สุทธิ	96,245	82,474	96,245	82,474

การเปลี่ยนแปลงของเงินกู้ยืมระยะยาว สำหรับงวดหกเดือนสิ้นสุดวันที่ 30 มิถุนายน 2548 และสำหรับปีสิ้นสุดวันที่ 31 ธันวาคม 2547 มีดังต่อไปนี้

	งบการเงินรวม		งบการเงินเฉพาะบริษัท	
	30 มิถุนายน 2548	31 ธันวาคม 2547	30 มิถุนายน 2548	31 ธันวาคม 2547
	(หน่วย : พันบาท)			
ราคาตามบัญชีต้นงวด	105,563	-	105,563	-
กู้เพิ่มระหว่างงวด	35,000	115,000	35,000	115,000
จ่ายคืนเงินกู้ระหว่างงวด	(13,651)	(9,437)	(13,651)	(9,437)
ราคาตามบัญชีปลายงวด	126,912	105,563	126,912	105,563

ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548 และวันที่ 31 ธันวาคม 2547 ทั้งจำนวนเป็นเงินกู้ยืมจากธนาคารพาณิชย์แห่งหนึ่ง เพื่อชำระคืนเงินกู้เดิม (Refinance) จากสถาบันการเงินแห่งหนึ่ง จำนวนเงิน 50.00 ล้านบาท ชำระหนี้ค่าที่ดิน จำนวนเงิน 65.00 ล้านบาทและซื้อเครื่องจักร จำนวนเงิน 35.00 ล้านบาท ซึ่งบริษัทฯ ได้นำที่ดินพร้อมสิ่งปลูกสร้าง และเครื่องจักร ที่เป็นกรรมสิทธิ์ของบริษัทฯ ไปจดจำนองเป็นหลักประกันสินเชื่อที่ได้รับจากธนาคารพาณิชย์แห่งหนึ่ง โดยมีอัตราดอกเบี้ยและการจ่ายชำระคืนเงินต้นและดอกเบี้ยดังนี้

อัตราดอกเบี้ย

- ณ วันที่ทำสัญญา อัตราดอกเบี้ยร้อยละ 9.50 ต่อปี ซึ่งเป็นอัตราดอกเบี้ย MRR บวกด้วยมาร์จิ้นร้อยละ 3.25 ต่อปี และตั้งแต่วันที่ 12 พฤษภาคม 2547 เป็นต้นไป สำหรับเงินกู้ยืม จำนวนเงิน 80.00 ล้านบาท และตั้งแต่วันที่ 29 กันยายน 2547 ถึงวันที่ 29 กันยายน 2549 สำหรับเงินกู้ยืม 70.00 ล้านบาท ผู้ให้กู้มีมติอนุมัติให้ ลดอัตราดอกเบี้ยเป็นอัตราร้อยละ 5.25 ต่อปี ซึ่งเป็นอัตราดอกเบี้ย MRR ลบด้วยมาร์จิ้นร้อยละ 0.50 ต่อปี สำหรับระยะเวลา 2 ปีแรก และอัตราดอกเบี้ยร้อยละ 5.75 ต่อปี ซึ่งเป็นอัตราดอกเบี้ย MLR สำหรับระยะเวลา 3 ปีหลัง

การจ่ายชำระคืนเงินต้นและดอกเบี้ย

- เงินต้นและดอกเบี้ยชำระทุกเดือน สำหรับเงินกู้ยืม จำนวนเงิน 80.00 ล้านบาท เริ่มผ่อนชำระตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2547 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2552 สำหรับเงินกู้ยืม จำนวนเงิน 35.00 ล้านบาท เริ่มผ่อนชำระตั้งแต่เดือนตุลาคม 2547 ถึงเดือนพฤษภาคม 2552 และสำหรับเงินกู้ยืม จำนวนเงิน 35.00 ล้านบาท เริ่มผ่อนชำระเดือนมีนาคม 2548 ถึงเดือนตุลาคม 2552 รวมจำนวน 56 งวด จำนวนเงินงวดละ 1.63 ล้านบาท , 0.71 ล้านบาท และ 0.71 ล้านบาท ตามลำดับ

12. ทุนเรือนหุ้น

ตามมติที่ประชุมวิสามัญผู้ถือหุ้น ครั้งที่ 1/2547 เมื่อวันที่ 15 มกราคม 2547 มีมติให้บริษัทฯ เพิ่มทุนจดทะเบียนจากทุนจดทะเบียนเดิม 100.00 ล้านบาท ให้เป็นทุนจดทะเบียน 144.00 ล้านบาท โดยการออกหุ้นสามัญเพิ่มเติม 4.40 ล้านหุ้น มูลค่าหุ้นละ 10.00 บาท บริษัทฯ ได้จดทะเบียนเพิ่มทุนแล้วเมื่อวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2547

ตามรายงานการประชุมสามัญผู้ถือหุ้น ครั้งที่ 4/2547 เมื่อวันที่ 30 มิถุนายน 2547 มีมติเป็นเอกฉันท์ให้เปลี่ยนแปลงมูลค่าหุ้นที่ตราไว้จากเดิมหุ้นสามัญมูลค่าที่ตราไว้หุ้นละ 10.00 บาท จำนวน 14.40 ล้านหุ้น เป็นจำนวนเงิน 144.00 ล้านบาท ให้เป็นหุ้นสามัญมูลค่าที่ตราไว้หุ้นละ 1.00 บาท จำนวน 144.00 ล้านหุ้น เป็นจำนวนเงิน 144.00 ล้านบาท และให้บริษัทฯ เพิ่มทุนจดทะเบียนจากทุนจดทะเบียนเดิม 144.00 ล้านบาท ให้เป็นทุนจดทะเบียน 199.00 ล้านบาท โดยการออกหุ้นสามัญเพิ่มเติม 55.00 ล้านหุ้น มูลค่าที่ตราไว้หุ้นละ 1.00 บาท เป็นจำนวนเงิน 55.00 ล้านบาท โดยได้จดทะเบียนเปลี่ยนแปลงมูลค่าที่ตราไว้ของหุ้นสามัญ และจดทะเบียนเพิ่มทุนแล้วเมื่อวันที่ 14 กรกฎาคม 2547 ทั้งนี้เป็นการออกหุ้นสามัญเพิ่มทุนเพื่อจำหน่ายให้กับประชาชนทั่วไป โดยจำหน่ายให้กับประชาชนทั่วไป จำนวน 50.00 ล้านหุ้น และให้กับกรรมการและพนักงาน จำนวน 5.00 ล้านหุ้น ครบถ้วนแล้ว เมื่อวันที่ 8 มีนาคม 2548 ในราคาหุ้นละ 2.10 ล้านบาท ทำให้เกิดส่วนเกินมูลค่าหุ้นสามัญ จำนวน 60.50 ล้านบาท และเสียค่าใช้จ่ายในการจัดจำหน่าย และรับประกันหลักทรัพย์ ซึ่งนำมาลดส่วนเกินมูลค่าหุ้นสามัญ จำนวน 4.68 ล้านบาท

13. เงินปันผลจ่าย และสำรองตามกฎหมาย

ตามรายงานการประชุมสามัญผู้ถือหุ้น ครั้งที่ 1/2548 เมื่อวันที่ 29 เมษายน 2548 มีมติเป็นเอกฉันท์ให้จัดสรรกำไรสะสมเป็นสำรองตามกฎหมาย จำนวน 2.39 ล้านบาท และจ่ายเงินปันผลจากผลการดำเนินงานสำหรับปี 2547 แก่ผู้ถือหุ้นของบริษัทฯ จำนวน 199.00 ล้านหุ้น ในอัตราหุ้นละ 0.12 บาท เป็นจำนวนเงิน 23.88 ล้านบาท ในวันที่ 26 พฤษภาคม 2548

ตามรายงานการประชุมสามัญผู้ถือหุ้น ครั้งที่ 1/2547 เมื่อวันที่ 29 เมษายน 2547 มีมติเป็นเอกฉันท์ให้จ่ายเงินปันผลจากผลการดำเนินงานสำหรับปี 2546 แก่ผู้ถือหุ้นของบริษัทฯ จำนวน 10.00 ล้านหุ้น ในอัตราหุ้นละ 2.448 บาท เป็นจำนวนเงิน 24.48 ล้านบาท ในวันที่ 29 เมษายน 2547

14. ภาษีเงินได้นิติบุคคล

ภาษีเงินได้นิติบุคคลคำนวณในอัตราร้อยละ 30 ของกำไรสุทธิทางบัญชีภายหลังบวกกลับรายการปรับปรุงตามประมวลรัษฎากร

15. ภาระผูกพันและหนี้สินที่อาจเกิดขึ้น

นอกจากหนี้สินตามที่ปรากฏในงบการเงินแล้ว ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548 และ วันที่ 31 ธันวาคม 2547 บริษัทฯ และบริษัทย่อย มีภาระผูกพันและหนี้สินที่อาจเกิดขึ้น ดังนี้

- 15.1 บริษัทฯ และบริษัทย่อยมีภาระผูกพันจากการขอให้ธนาคารพาณิชย์แห่งหนึ่งออกหนังสือค้ำประกันการใช้ไฟฟ้า จำนวนเงิน 2.00 ล้านบาท และ 1.60 ล้านบาท ตามลำดับ โดยนำเงินฝากธนาคารประเภทออมทรัพย์ไปเป็นหลักประกัน

- 15.2 บริษัทฯ มีการทำข้อตกลงความช่วยเหลือด้านเทคนิค กับ TOYO TIRE & RUBBER CO., LTD. ซึ่งบริษัทฯ จะต้องจ่ายค่าตอบแทนทุก 6 เดือน ในอัตราร้อยละ 3.00 ของยอดขายสุทธิในประเทศ สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความช่วยเหลือดังกล่าว เป็นระยะเวลา 8 ปี ตั้งแต่วันที่ 16 ตุลาคม 2546 ถึงวันที่ 15 ตุลาคม 2554
- 15.3 บริษัทฯ มีการทำข้อตกลงความช่วยเหลือด้านเทคนิค กับ KINUGAWA RUBBER INDUSTRIAL CO., LTD. จำนวน 3 สัญญา ซึ่งบริษัทฯ จะต้องจ่ายค่าตอบแทนทุกเดือนในอัตราร้อยละ 3.00 ของยอดขายสุทธิในประเทศสำหรับผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความช่วยเหลือดังกล่าว เป็นระยะเวลา 10 ปี ตั้งแต่วันที่ 4 สิงหาคม 2538, 18 พฤศจิกายน 2539 และ 25 มกราคม 2542 เป็นต้นไป
- 15.4 บริษัทฯ และบริษัทย่อยได้ทำสัญญาเกี่ยวกับการก่อสร้างอาคารและสิ่งปลูกสร้างซึ่งยังมีการผูกพันที่จะต้องจ่ายในอนาคตนอกเหนือจากที่บันทึกตามบัญชีแล้วจำนวนเงิน 3.54 ล้านบาทและ 0.45 ล้านบาท ตามลำดับ

16. กองทุนสำรองเลี้ยงชีพพนักงาน

บริษัทฯ ได้จัดให้มีกองทุนสำรองเลี้ยงชีพพนักงาน ตามพระราชบัญญัติกองทุนสำรองเลี้ยงชีพ พ.ศ. 2530 โดยพนักงานและบริษัทฯ ต้องจ่ายเงินสะสมและเงินสมทบเข้ากองทุนตามข้อบังคับของกองทุนสำรองเลี้ยงชีพพนักงาน โดยมีผู้จัดการกองทุนภายนอกเป็นผู้บริหารกองทุนดังกล่าว

17. การเสนอข้อมูลทางการเงินจำแนกตามส่วนงาน

บริษัทฯ และบริษัทย่อย ดำเนินกิจการในส่วนงานทางธุรกิจ คือผลิตชิ้นส่วนยาง และยางติดเหล็ก สำหรับใช้เป็นชิ้นส่วนประกอบรถยนต์ รถจักรยานยนต์ และผลิตภัณฑ์ยางทุกชนิดจากยางธรรมชาติและยางสังเคราะห์ และดำเนินธุรกิจในส่วนงานภูมิศาสตร์เดียวคือในประเทศไทย โดยมีการจำหน่ายผลิตภัณฑ์ทั้งในประเทศและต่างประเทศ สำหรับงวดหกเดือนสิ้นสุดวันที่ 30 มิถุนายน 2548 และ 2547 โดยยอดขายสุทธิในประเทศคิดเป็นประมาณร้อยละ 70.65 และร้อยละ 66.07 ของยอดขายสุทธิรวม ตามลำดับ และยอดขายสุทธิต่างประเทศคิดเป็นประมาณร้อยละ 29.35 และร้อยละ 33.93 ของยอดขายสุทธิรวม ตามลำดับ ดังนั้น รายได้ กำไร และสินทรัพย์ทั้งหมดที่แสดงในงบการเงินจึงเกี่ยวกับส่วนงานธุรกิจ และส่วนงานทางภูมิศาสตร์ตามที่กล่าวไว้

18. เครื่องมือทางการเงิน

นโยบายการบริหารความเสี่ยงทางการเงิน

บริษัท ฯ และบริษัทย่อยไม่มีนโยบายประกอบธุรกรรม ตราสารอนุพันธ์ทางการเงิน เพื่อเก็งกำไรหรือเพื่อการค้า

ความเสี่ยงจากอัตราดอกเบี้ย

ความเสี่ยงจากอัตราดอกเบี้ยที่เกิดขึ้นจากความผันผวนของอัตราดอกเบี้ยในท้องถิ่นตลาดในอนาคต ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผลการดำเนินงานและกระแสเงินสดของบริษัทฯ และบริษัทย่อย ทำให้บริษัทฯ และบริษัทย่อยมีความเสี่ยงจากอัตราดอกเบี้ย เนื่องจากมีเงินฝากกับธนาคารพาณิชย์ และสินเชื่อกับสถาบันการเงิน แต่อย่างไรก็ตาม

สินทรัพย์ทางการเงินและหนี้สินทางการเงินดังกล่าว มีอัตราดอกเบี้ยใกล้เคียงอัตราดอกเบี้ยในท้องตลาด บริษัทฯ และบริษัทย่อย จึงเชื่อว่าจะไม่มีความเสี่ยงที่เป็นสาระสำคัญจากอัตราดอกเบี้ย

ความเสี่ยงด้านการให้สินเชื่อ

บริษัทฯ และบริษัทย่อย ไม่มีความเสี่ยงด้านการให้สินเชื่อที่เกี่ยวข้องกับลูกหนี้การค้า เนื่องจากการขายสินค้าในประเทศและต่างประเทศเป็นการขายให้กับบริษัทที่มีความมั่นคงทางการเงินมีความสามารถในการชำระหนี้ดี และได้ติดต่อซื้อขายกับลูกค้าเหล่านี้มานาน รวมทั้งลูกหนี้การค้าของบริษัทฯและบริษัทย่อย ประกอบด้วยลูกหนี้หลายราย บริษัทฯ และบริษัทย่อย จึงเชื่อว่าจะไม่มีความเสี่ยงจากการที่ลูกหนี้จะไม่ชำระหนี้

ความเสี่ยงด้านอัตราแลกเปลี่ยน

บริษัทฯ และบริษัทย่อย มีสินทรัพย์และหนี้สินที่เป็นเงินตราต่างประเทศ โดยส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับ การขายสินค้า และซื้อสินค้าเป็นเงินตราต่างประเทศ โดย ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2548 มีสินทรัพย์และหนี้สินที่เป็นเงินตราต่างประเทศ ซึ่งยังไม่ได้มีการใช้สัญญาป้องกันความเสี่ยงด้านอัตราแลกเปลี่ยนดังนี้

	<u>งบการเงินรวม</u>		<u>งบการเงินเฉพาะบริษัท</u>	
	<u>สินทรัพย์</u>	<u>หนี้สิน</u>	<u>สินทรัพย์</u>	<u>หนี้สิน</u>
สกุลเงินเยน (หน่วย : ล้านบาท)	37.57	-	37.57	-
สกุลเงินดอลลาร์สหรัฐ (หน่วย : ล้านดอลลาร์สหรัฐ)	-	0.03	-	0.03

มูลค่ายุติธรรม

ราคาตามบัญชีของสินทรัพย์และหนี้สินทางการเงิน ที่แสดงในงบดุลมีมูลค่าใกล้เคียงกับมูลค่ายุติธรรม โดยประมาณ เนื่องจากเป็นสินทรัพย์และหนี้สินทางการเงินระยะสั้น และมีอัตราดอกเบี้ยใกล้เคียงกับท้องตลาด เป็นผลให้สินทรัพย์และหนี้สินทางการเงินดังกล่าว สะท้อนมูลค่ายุติธรรมแล้ว ส่วนเงินลงทุนในหน่วยลงทุนในความ ต้องการของตลาดประเภทเพื่อขายบันทึกด้วยมูลค่ายุติธรรม ณ สิ้นงวดแล้ว

19. เหตุการณ์ภายหลังวันที่ในงบการเงิน

ตามมติที่ประชุมวิสามัญผู้ถือหุ้น ครั้งที่ 1/2548 เมื่อวันที่ 24 พฤษภาคม 2548 มีมติให้บริษัท ย่อยแห่งหนึ่ง เพิ่มทุนจดทะเบียนจากทุนจดทะเบียนเดิม 40.00 ล้านบาท ให้เป็นทุนจดทะเบียน 100.00 ล้านบาท โดยการออกหุ้นสามัญเพิ่มเติม 6.00 ล้านหุ้น มูลค่าหุ้นละ 10.00 บาท และจำหน่ายในราคาที่ตราไว้ บริษัทย่อยดังกล่าวได้จดทะเบียนเพิ่มทุนแล้วเมื่อวันที่ 18 กรกฎาคม 2548 โดยผู้ถือหุ้นส่วนที่เหลือ ได้สละสิทธิไม่จองซื้อหุ้นสามัญดังกล่าว ดังนั้น บริษัทฯ จึงขอใช้สิทธิซื้อหุ้นเพิ่มทุนส่วนนี้แทน และได้เรียกชำระค่าหุ้นในอัตราร้อยละ 40 ของทุน จดทะเบียน โดยบริษัทฯ ได้ลงทุนเพิ่มเป็นจำนวน 24.00 ล้านบาท ทำให้สัดส่วนเงินลงทุนเพิ่มจากเดิมร้อยละ 51 เป็นร้อยละ 80 ของทุนจดทะเบียน