

ผลของไม้มะเกลือ พะยอม และเคี่ยม ต่อจุลินทรีย์ในน้ำตาลโตนด
ด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์
Effects of Ebony (*Diospyros mollis* Griff), White meranti
(*Shorea roxburghii* G. Don) and Resak tembaga
(*Cotylelobium lanceolatum* Craib) on Microbes in Palm Nectar
using Metagenomics Technique

ณัฐนิชา วงษา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ผลของไม้มะเกลือ พะยอม และเคี่ยม ต่อจุลินทรีย์ในน้ำตาลโตนด
ด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์

ณัฐนิชา วงษา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

นางสาวณัฐธิชา วงษา
นางสาวณัฐธิชา วงษา
สาขา วิชา
สาขาวิชา
อาจารย์ผู้ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา 2565

ผลของไม้มะเกลือ พะยอม และเคี่ยม ต่อจุลินทรีย์ในน้ำตาปลาโต
ด้วยเทคนิคผสมผสาน
Effects of Ebony (*Diospyros mollis* Griff), White Meranti
(*Shorea roxburghii* G. Don) and Resak Tembaga
(*Cotylelobium lanceolatum* Craib) on microbes in palm
nectar using metagenomics technique

ชื่อ-นามสกุล
สาขาวิชา
อาจารย์ผู้ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา 2565

นางสาวณัฐธิชา วงษา
นางสาวณัฐธิชา วงษา
สาขา วิชา
สาขาวิชา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปาลิตา ตุ่นอู่ตัน, ป.ร.ด.)
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปาลิตา ตุ่นอู่ตัน, ป.ร.ด.)

กรรมการ
กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปาน, ป.ร.ด.)
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปาน, ป.ร.ด.)

กรรมการ
กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์เจริญชัย, Ph.D.)
ผู้ช่วยศาสตราจารย์เจริญชัย, Ph.D.)

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ผู้อำนวยการกองกลางมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ผู้อำนวยการกองกลางมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

S. Salik
S. Salik

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร
คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

(อาจารย์ผู้สอน, Ph.D.)
(อาจารย์ผู้สอน, Ph.D.)

วันที่ 12 เดือน กันยายน พ.ศ. 2565
วันที่ 12 เดือน กันยายน พ.ศ. 2565

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของไม้มะเกลือ พะยอม และเคี่ยม ต่อจุลินทรีย์ในน้ำตาลโตนดด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์
ชื่อ-นามสกุล	นางสาวณัฐนิชา วงษา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์เจริญ เจริญชัย, Ph.D.
ปีการศึกษา	2565

บทคัดย่อ

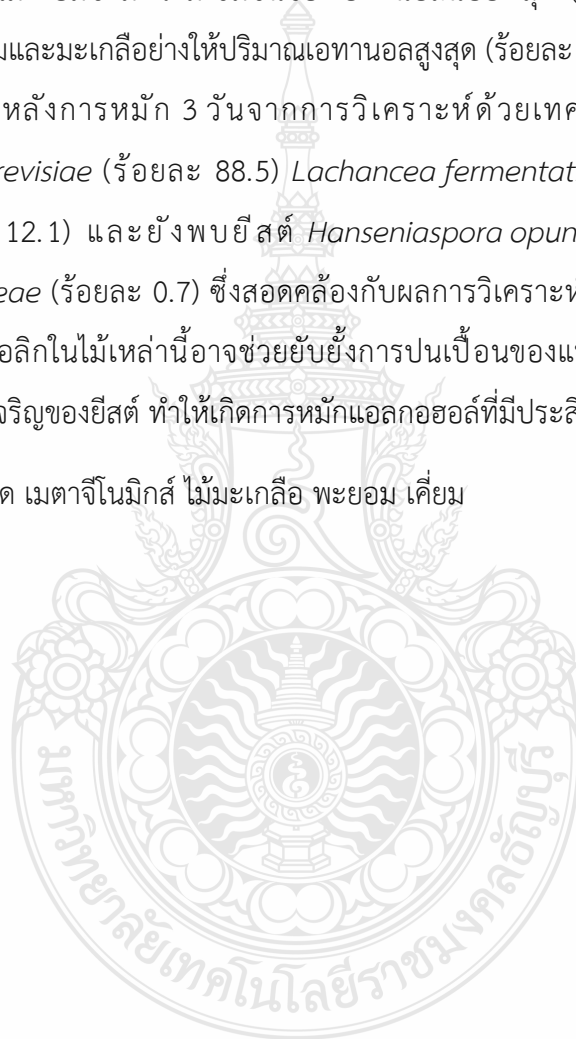
งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาองค์ประกอบของไม้มะเกลือ (*Diospyros mollis* Griff) พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don) และเคี่ยม (*Cotylelobium lanceolatum* Craib) ที่มีผลต่อการหมักน้ำตาลโตนด 2) ศึกษาผลของไม้มะเกลือ พะยอม และเคี่ยม ต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักน้ำตาลโตนดด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์

ศึกษาองค์ประกอบของไม้มะเกลือ พะยอม และเคี่ยม โดยวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ สารไนโตรเจน และโปรตีน ศึกษาผลของไม้มะเกลือ พะยอม และเคี่ยมต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักน้ำตาลโตนดด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์ โดยมี 5 สิ่งทดลองได้แก่การหมักน้ำตาลโตนดโดยไม่ใส่ไม้ (สิ่งทดลองควบคุม) ใส่พะยอม มะเกลือสด มะเกลือย่าง และเคี่ยม วิเคราะห์การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักด้วยการเพาะเชื้อด้วยอาหาร Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC Agar) และ Plate Count Agar ผสม cycloheximide ร้อยละ 0.01 วิเคราะห์ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมัก คัดเลือกโคโลนีของยีสต์และแบคทีเรียจากงานเลี้ยงเชื้อไประบุชนิดด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำตะกอนจุลินทรีย์จากการหมักทั้ง 5 สิ่งทดลองไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์

ผลการวิจัยพบว่า 1) ไม้มะเกลือ พะยอม และเคี่ยม มีปริมาณสารฟีนอลิกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) โดยพะยอมมีปริมาณมากที่สุดคือ 288.73 mg GAE/g รองลงมาได้แก่เคี่ยม มะเกลือย่าง และมะเกลือสด มีปริมาณ 282.60, 130.50 และ 50.47 mg GAE/g ตามลำดับ ปริมาณไนโตรเจนของเคี่ยมมีปริมาณมากที่สุดคือ 3.096 TN% รองลงมาคือมะเกลือสด พะยอม และมะเกลือย่าง ที่มีปริมาณ 1.566, 1.270 และ 0.866 TN% ตามลำดับ ปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด คือเคี่ยม 45.847 mg QE/g รองลงมาคือ พะยอม มะเกลือสด และมะเกลือย่าง ที่มีปริมาณ 40.941, 35.529

และ 32.391 mg QE/g ตามลำดับ ปริมาณโปรตีนของไม้ต่างๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$) โดยค่าที่สูงที่สุดคือ ร้อยละ 0.828 และ 2) การศึกษาผลของไม้มะเกลือ พะยอม และเคี่ยม ต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักน้ำตาลโตนด พบว่าสิ่งทดลองควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียมากกว่าสิ่งทดลองที่ใช้ไม้ทั้ง 4 สิ่งทดลองตลอดระยะเวลาการหมัก 3 วัน และจะมีปริมาณกรดมากกว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดลดลงช้ากว่า และปริมาณเอทานอลน้อยกว่า ยกเว้นสิ่งทดลองที่ใช้ไม้เคี่ยมซึ่งมีความเข้มข้นของเอทานอลน้อยที่สุด (ร้อยละ 0.11 โดยปริมาตร) การหมักด้วยไม้พะยอมและมะเกลือทำให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด (ร้อยละ 3.42 และ 3.28 ตามลำดับ) ยีสต์ที่พบมากที่สุดหลังการหมัก 3 วันจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* (ร้อยละ 88.5) *Lachancea fermentati* (ร้อยละ 15.7) *Candida tropicalis* (ร้อยละ 12.1) และยังพบยีสต์ *Hanseniaspora opuntiae* (ร้อยละ 3.2) และ *Hanseniaspora vineae* (ร้อยละ 0.7) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ สารฟีนอลิกในไม้เหล่านี้อาจช่วยยับยั้งการปนเปื้อนของแบคทีเรีย และสารประกอบไนโตรเจนช่วยในการเจริญของยีสต์ ทำให้เกิดการหมักแอลกอฮอล์ที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: น้ำตาลโตนด เมตาจีโนมิกส์ ไม้มะเกลือ พะยอม เคี่ยม



Thesis Title	Effects of Ebony (<i>Diospyros mollis</i> Griff), White Meranti (<i>Shorea roxburghii</i> G. Don) and Resak Tembaga (<i>Cotylelobium lanceolatum</i> Craib) on Microbes in Palm Nectar Using Metagenomics Technique
Name-Surname	Miss Natnicha Wongsa
Program	Food Technology
Thesis Advisor	Assistant Professor Charoen Charoenchai, Ph.D.
Academic Year	2022

ABSTRACT

The purposes of this research were: 1) to study the compositions of ebony (*Diospyros mollis* Griff), white meranti (*Shorea roxburghii* G. Don), and resak tembaga (*Cotylelobium lanceolatum* Craib) affecting the fermentation of palm nectar and 2) to examine the effects of ebony, white meranti and resak tembaga on the microbial changes during the fermentation of palm nectar using metagenomics technique.

Compositions of ebony, white meranti and resak tembaga were determined by analyzing phenolics, flavonoids, nitrogen, and protein contents. Effects of ebony, white meranti and resak tembaga on the microbial changes during fermentation of palm nectar were studied using metagenomics technique. There were five fermentation treatments. These were fermentation of palm nectar only (control) and fermentations with the addition of white meranti, fresh ebony, roasted ebony, and resak tembaga. Microbial growth during fermentation was observed by plating fermenting nectar on Dicholran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC Agar) and Plate Count Agar with 0.01 % cycloheximide. Titratable acidity, pH, total soluble solids and ethanol concentrations were measured during the course of fermentation. Colonies of yeasts and bacteria were selected and identified by nucleotide sequencing. Microbial sediments were collected from all fermentation treatments and analyzed using metagenomics technique.

The results revealed that: 1) the three types of wood had statistically significant difference ($p < .05$) in the amounts of phenolic compounds. White meranti had the highest content

at 288.73 mg GAE/g, followed by resak tembaga, roasted ebony, and fresh ebony with 282.60, 130.50, and 50.47 mg GAE/g, respectively. The nitrogen content of resak tembaga was the highest at 3.096 TN%, followed by fresh ebony, white meranti and roasted ebony at 1.566, 1.270, and 0.866 TN%, respectively. The highest levels of flavonoid content were resak tembaga at 45.847 mg QE/g followed by white meranti, fresh ebony, and roasted ebony at 40.941, 35.529, and 32.391 mg QE/g, respectively. There was no statistically significant difference ($p < .05$) of protein contents among the various kinds of woods, with the highest value being 0.828 %. 2) Effects of ebony, white meranti, and resak tembaga on the microbial changes during palm nectar fermentation showed that the control had higher bacterial growth during 3 days of fermentation than the other four treatments with the addition of woods, and gave higher amounts of acid, slower reduction of total soluble solids, and lower ethanol concentrations, except for resak tembaga which had the lowest ethanol concentration (0.11 %v/v). Fermentations with white meranti and roasted ebony yielded the highest ethanol concentrations (3.42 and 3.28 %v/v, respectively). After three days of fermentation the most common yeasts revealed by metagenomics technique were *Saccharomyces cerevisiae* (88.5 %), *Lachancea fermentati* (15.7 %), *Candida tropicalis* (12.1 %), *Hanseniaspora opuntiae* (3.2 %) and *Hanseniaspora vineae* (0.7 %). These results corresponded with those obtained by nucleotide sequence analysis. Phenolic compounds in these woods could help reduce bacterial contamination and the nitrogen compounds help the growth of yeasts, resulting in more efficient alcoholic fermentation.

Keywords: palm nectar, metagenomics, *Diospyros mollis*, *Shorea roxburghii*,
Cotylelobium lanceolatum

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร. เจริญ เจริญชัย เป็นอย่างสูงที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ ทั้งในส่วนของการเรียน และงานวิจัย

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรีที่ให้การศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา พร้อมทั้งให้การสนับสนุนการวิจัยและอำนวยความสะดวกในเรื่องของการใช้สถานที่อุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ระหว่างปฏิบัติงานทดลอง และขอบคุณศูนย์การเรียนรู้เศรษฐกิจพอเพียงอนุรักษ์तालิตนด ตำบล ห้วยกรด อำเภอย่อยกรด จังหวัดชัยนาท ที่อำนวยความสะดวกในการให้ความรู้ และเก็บเกี่ยววัตถุดิบ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่อบรม สั่งสอนมาจนถึงบัดนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร เจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร เจ้าหน้าที่ห้องสมุดคณะ อุตสาหกรรมเกษตร เจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัย และเจ้าหน้าที่ห้องสมุดกลางที่ให้ความรู้คำแนะนำ และคำปรึกษาต่างๆ และขอขอบคุณเพื่อนๆ และน้อง ๆ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยี อาหารและปริญญาดรี สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

และท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอกราบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติผู้ใหญ่ทุกท่าน ที่ให้การ อบรม สั่งสอนเสมอมา ขอขอบคุณสมาชิกในครอบครัว ที่มอบแรงกายแรงใจให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดระยะเวลาการศึกษา และการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงถึงวันนี้

ณัฐนิชา วงษา

5 กันยายน 2565

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	(3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	(5)
กิตติกรรมประกาศ.....	(7)
สารบัญ.....	(8)
สารบัญตาราง.....	(12)
สารบัญภาพ.....	(15)
บทที่ 1 บทนำ.....	(17)
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	(17)
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	(19)
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	(19)
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	(20)
2.1 ลักษณะทางสรีรวิทยาและนิเวศวิทยาของมะเกลือ.....	(20)
2.1.1 การใช้ประโยชน์ของต้นมะเกลือ.....	(22)
2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและนิเวศวิทยาของพะยอม.....	(23)
2.2.1 การใช้ประโยชน์ของต้นพะยอม.....	(25)
2.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและนิเวศวิทยาของเคี่ยม.....	(27)
2.3.1 การใช้ประโยชน์ของต้นเคี่ยม.....	(28)
2.4 ตาลโตนด.....	(29)
2.4.1 ลักษณะทางสรีรวิทยาและนิเวศวิทยาของตาลโตนด.....	(30)
2.4.2 พันธุ์ของตาลโตนดในประเทศไทย.....	(31)
2.4.3 การใช้ประโยชน์ต้นตาลโตนด.....	(33)
2.4.4 น้ำตาลโตนด.....	(34)
2.4.5 วิธีการเก็บน้ำตาลสดจากต้นตาลตัวผู้.....	(35)

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.6 วิธีการเก็บน้ำตาลสดจากต้นตาลตัวเมีย.....	(35)
2.4.7 องค์ประกอบของน้ำตาลโตนด.....	(35)
2.4.8 จุลินทรีย์ในน้ำตาลโตนด.....	(37)
2.5 เมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics).....	(40)
2.5.1 แนวทางในการศึกษาเมตาจีโนมิกส์.....	(43)
2.5.2 การใช้ประโยชน์เมตาจีโนมิกส์.....	(44)
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	(47)
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	(47)
3.2 สารเคมี.....	(49)
3.3 วิธีการทดลอง.....	(51)
3.3.1 ศึกษาการวิเคราะห์คุณสมบัติบางประการของมะเกลือ พะยอม และ เคี่ยม.....	(51)
3.3.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างหมักน้ำตาลโตนด.....	(55)
3.4 สถานที่ในการดำเนินการวิจัย.....	(59)
3.5 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย.....	(59)
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล.....	(60)
4.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติบางประการของมะเกลือ พะยอม และเคี่ยม.....	(60)
4.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักน้ำตาลโตนด.....	(62)
4.3 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักน้ำตาลโตนด.....	(63)
4.4 ผลวิเคราะห์ทางเคมีในระหว่างการหมักน้ำตาลโตนด.....	(66)
4.4.1 ความเป็นกรด- เบส (pH).....	(66)
4.4.2 ปริมาณของแข็งละลายน้ำได้ทั้งหมด (TSS, °Brix).....	(66)
4.4.3 ปริมาณกรดระกวางการหมักน้ำตาลโตนด.....	(67)
4.4.4 ปริมาณเอทานอลของน้ำตาลโตนดวันที่ 3.....	(68)
4.4.5 ลักษณะสัญญาณวิทยาของจุลินทรีย์.....	(69)

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5 การวิเคราะห์ต้นไม้สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ตามลำดับยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย และ D1/D2 บนยีน 26s rDNA ของยีสต์.....	(70)
4.6 การวิเคราะห์จุลินทรีย์น้ำตาลเมาระหว่างการหมักด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์.....	(74)
4.7 การประเมินทางประสาทสัมผัสของน้ำตาลโตนดที่หมักด้วยไม้นชนิดต่างๆ.....	(76)
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....	(78)
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	(78)
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	(80)



สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บรรณานุกรม.....	(81)
ภาคผนวก.....	(92)
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี.....	(93)
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์จำนวนโคโลนี.....	(98)
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	(100)
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐาน.....	(111)
ภาคผนวก จ แบบประเมินทางประสาทสัมผัส.....	(114)
ภาคผนวก ฉ ภาพการทดลอง.....	(116)
ภาคผนวก ช ผลการวิเคราะห์ต่างๆ.....	(119)
ประวัติผู้เขียน.....	(123)



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำตาลสด.....	(36)
ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติของน้ำตาลสดอายุการเก็บเกี่ยว 12 ชั่วโมง ที่ใส่เปลือกไม้พะยอมและไม้ใส่เปลือกไม้พะยอม.....	(36)
ตารางที่ 2.3 ชนิดของยีสต์ที่พบในน้ำตาลสดและน้ำตาลเมาของต่างประเทศ.....	(39)
ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ของมะเกลือ พะยอม เคี้ยว.....	(61)
ตารางที่ 4.2 ปริมาณไนโตรเจนและปริมาณโปรตีนในมะเกลือ พะยอม และเคี้ยว.....	(62)
ตารางที่ 4.3 ปริมาณการผลิตแอลกอฮอล์(%v/v) ของน้ำตาลโตนดหลังการหมัก 3 วัน.....	(68)
ตารางที่ 4.4 เอกลักษณ์ของลำดับ (%) ของลำดับยีน 16S rRNA และ D1/D2 บนยีน 26s rDNA ของที่ได้จากน้ำตาลโตนด.....	(72)
ตารางที่ 4.5 ร้อยละของฟังไจในน้ำตาลโตนดทั้ง 5 สิ่งทดลองจากการวิเคราะห์ด้วยเมตา จีโนมิกส์.....	(75)
ตารางที่ 4.6 ผลการทดลองสอบการยอมรับประสาทสัมผัสการดมกลิ่นด้านความชอบ รวมจากน้ำตาลโตนดหลังจากการหมัก 3 วัน.....	(77)
ตารางผนวกที่ ก.1 แสดงสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล โดยเทคนิค แก๊สโครมาโทกราฟีเฟรมไอออนเซชัน.....	(94)
ตารางผนวกที่ ก.2 ปริมาณสารละลายเอทานอล (EtOH) และ n-propanol ในการเตรียม Standard preparation.....	(95)
ตารางผนวกที่ ข.1 จำนวนโคโลนีทั้งหมดในน้ำตาลโตนดบนอาหาร DRBC ตั้งแต่วันที่ 0-3.....	(99)
ตารางผนวกที่ ข.2 ผลโคโลนีทั้งหมดในน้ำตาลโตนดบนอาหาร PCA ตั้งแต่วันที่ 0-3.....	(99)
ตารางผนวกที่ ค.1 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร DRBC (Log cfu/ml) วันที่ 0.....	(101)
ตารางผนวกที่ ค.2 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร DRBC (Log cfu/ml) วันที่ 1.....	(101)

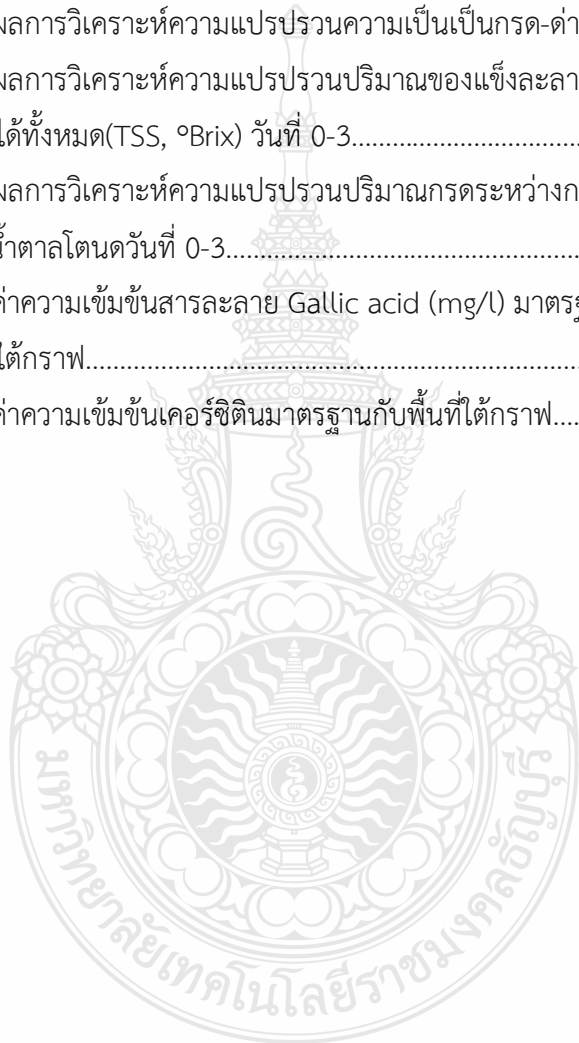
สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางผนวกที่ ค.3 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร DRBC (Log cfu/ml) วันที่ 2.....	(101)
ตารางผนวกที่ ค.4 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร DRBC (Log cfu/ml) วันที่ 3.....	(102)
ตารางผนวกที่ ค.5 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร PCA (Log cfu/ml) วันที่ 0.....	(102)
ตารางผนวกที่ ค.6 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร PCA (Log cfu/ml) วันที่ 1.....	(102)
ตารางผนวกที่ ค.7 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร PCA (Log cfu/ml) วันที่ 2.....	(103)
ตารางผนวกที่ ค.8 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร PCA (Log cfu/ml) วันที่ 3.....	(103)
ตารางผนวกที่ ค.9 ค่าความเป็นกรด-ด่าง วันที่ 0-3.....	(103)
ตารางผนวกที่ ค.10 ปริมาณของแข็งละลายน้ำได้ทั้งหมด (TSS, °Brix) วันที่ 0-3.....	(104)
ตารางผนวกที่ ค.11 ปริมาณกรดระหว่างการหมักน้ำตาลโตนด วันที่ 0-3.....	(104)
ตารางผนวกที่ ค.12 ปริมาณไนโตรเจนของน้ำตาลโตนด.....	(105)
ตารางผนวกที่ ค.13 ค่าปริมาณโปรตีนของน้ำตาลโตนด.....	(106)
ตารางผนวกที่ ค.14 ค่าปริมาณฟลาโวนอยด์ของน้ำตาลโตนด.....	(107)
ตารางผนวกที่ ค.15 ค่าปริมาณฟีนอลิกของน้ำตาลโตนด.....	(108)
ตารางผนวกที่ ค.16 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทดสอบทางประสาทสัมผัสทาง ด้านกลิ่นของน้ำตาลโตนด.....	(109)
ตารางผนวกที่ ค.17 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณโปรตีนของน้ำตาลโตนด.....	(109)
ตารางผนวกที่ ค.18 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณไนโตรเจนของน้ำตาลโตนด.....	(109)

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางผนวกที่ ค.19 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด.....	(109)
ตารางผนวกที่ ค.20 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด.....	(110)
ตารางผนวกที่ ค.21 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความเป็นเป็นกรด-ด่าง วันที่ 0-3.....	(110)
ตารางผนวกที่ ค.22 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของแข็งละลายน้ำ ได้ทั้งหมด(TSS, °Brix) วันที่ 0-3.....	(110)
ตารางผนวกที่ ค.23 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณกรดระหว่างการหมัก น้ำตาลโตนในวันที่ 0-3.....	(110)
ตารางผนวกที่ ง.1 ค่าความเข้มข้นสารละลาย Gallic acid (mg/l) มาตรฐานกับพื้นที่ ใต้กราฟ.....	(112)
ตารางผนวกที่ ง.2 ค่าความเข้มข้นคอร์ซิดินมาตรฐานกับพื้นที่ใต้กราฟ.....	(112)



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 ลักษณะของใบไม้มะเกลือ.....	(20)
ภาพที่ 2.2 ลักษณะของดอกของไม้มะเกลือ.....	(21)
ภาพที่ 2.3 ลักษณะของพะยอม (ลำต้น ใบ ดอก และผล).....	(24)
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของสารตัวใหม่สกัดจากเปลือกพะยอม.....	(25)
ภาพที่ 2.5 ลักษณะของเคี่ยม.....	(28)
ภาพที่ 2.6 ส่วนประกอบของผลตาลโตนดสุก.....	(31)
ภาพที่ 2.7 ตาลพันธุ์หม้อ.....	(32)
ภาพที่ 2.8 ตาลพันธุ์ไข่.....	(32)
ภาพที่ 2.9 ตาลพันธุ์ลูกผสม.....	(32)
ภาพที่ 2.10 ขั้นตอนในการศึกษาเมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics).....	(42)
ภาพที่ 2.11 ขั้นตอนการทำ Sequence –based metagenomic เพื่อศึกษาลำดับเบส ของ 16S rRNA และหาความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่ ศึกษาโดย phylogenetic trees.....	(43)
ภาพที่ 4.1 แสดงถึงตัวอย่างการหมักน้ำตาลโตนดแบบธรรมชาติ 5 สิ่งทดลอง (วันที่ 0 และวันที่ 3)	(63)
ภาพที่ 4.2 ตัวอย่างไม้ที่ใช้ในการทดลองการหมักน้ำตาลโตนด.....	(63)
ภาพที่ 4.3 แนวโน้มการเจริญของยีสต์น้ำตาลโตนด วันที่ 0 ถึง วันที่ 3.....	(64)
ภาพที่ 4.4 แนวโน้มการเจริญของแบคทีเรียน้ำตาลโตนด วันที่ 0 ถึง วันที่ 3.....	(65)
ภาพที่ 4.5 ความเป็นกรด-เบส (pH) การหมักน้ำตาลโตนดในตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง เวลา 3 วัน.....	(66)
ภาพที่ 4.6 ปริมาณของแข็งละลายน้ำได้ทั้งหมด (TSS, °Brix) ในน้ำตาลโตนดในตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง เป็นเวลา 3วัน.....	(67)
ภาพที่ 4.7 ปริมาณกรดระกวางการหมักในน้ำตาลโตนดในตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง เวลา 3 วัน..	(68)
ภาพที่ 4.8 ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA + ร้อยละ 0.01 Cycloheximide และ ลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	(69)

สารบัญญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4.9 ลักษณะโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BRBC และลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	(70)
ภาพที่ 4.10 แผนภูมิวิวัฒนาการแบบ Neighbor-joining ของเชื้อแบคทีเรีย CN308 CN309 และ CN310 เทียบกับเชื้อในสกุล <i>Pantoea anthophila</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> และ <i>Escherichia coli</i>	(73)
ภาพที่ 4.11 แผนภูมิวิวัฒนาการแบบ Neighbor-joining ของเชื้อยีสต์ CN113 และ CN114 เทียบ กับเชื้อในสกุล <i>Saccharomyces cerevisiae</i> และ <i>Lachancea fermentati</i>	(73)
ภาพที่ 4.12 กราฟแสดงชนิดของฟังไจในน้ำตาลโตนดที่ตรวจพบยีสต์ด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์.....	(76)
ภาพผนวกที่ ง.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารละลาย Gallic acid (mg/l) มาตรฐานกับพื้นที่ใต้กราฟ.....	(111)
ภาพผนวกที่ ง.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นความเข้มข้นเคอร์ซีตินมาตรฐานกับพื้นที่ใต้กราฟ.....	(112)
ภาพผนวกที่ จ.1 แบบประเมินการยอมรับคุณภาพประสาทสัมผัสของหมักน้ำตาลโตนด.....	(115)
ภาพผนวกที่ ฉ.1 กระบวนการเตรียมทดสอบประสาทสัมผัสของน้ำตาลโตนด.....	(117)
ภาพผนวกที่ ฉ.2 ตัวอย่างเชื้อบนอาหาร PCA Agar ทำการ SpreadPlate.....	(117)
ภาพผนวกที่ ฉ.3 ตัวอย่างเชื้อบนอาหาร DRBC Agar ทำการ SpreadPlate.....	(118)
ภาพผนวกที่ ช.1 ผลการวิเคราะห์การจดจำแนกจุลินทรีย์.....	(120)
ภาพผนวกที่ ช.2 ผลการส่งวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography GC-MS).....	(121)

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำตาลเมา หรือ กะแซ่ เป็นเครื่องดื่มท้องถิ่นที่มีน้ำตาลสดที่ได้จากช่อดอกของต้นมะพร้าว หรือ ต้นตาล โดยภูมิปัญญาชาวบ้านจะนำน้ำตาลสดเก็บไว้ในกระบอกไม้ไผ่ และใส่ไม้พะยอมช่วยถนอมรักษา น้ำตาลสด พะยอมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Shorea roxburghii* G.Don อยู่ในวงศ์ Dipterocarpaceae ชื่อสามัญเรียกว่า White Meranti และมีชื่อเรียกอื่นๆ ที่ต่างแตกไปตามภูมิภาคเช่น พะยอม (กลาง) กะยอม (เชียงใหม่) ขะยอม (ลาว) ขะยอมดงหรือพะยอมดง (เหนือ) แคน (เลย) เชียงหรือเชียง (กะเหรี่ยง เชียงใหม่) พะยอมทอง (สุราษฎร์ธานี ปราจีนบุรี) ยางหยวก (น่าน) [1] สารสำคัญที่พบใน พะยอม ได้แก่ Catechol Pyrogallol และ Tanin [2] ซึ่งโดยทั่วไปจะใส่ไม้พะยอมในน้ำตาลสดเพื่อการ ถนอมน้ำตาลสดในระหว่างการเก็บเกี่ยวน้ำตาล และในการหมักจะใช้ไม้มะเกลือส่วนทางภาคใต้นิยมใช้ ไม้เคี่ยมทั้งการถนอมและการหมัก มะเกลือมีชื่อพื้นเมืองต่างกันแล้วแต่ท้องถิ่น เช่น มักเกลือ (เขมรและ ตราด) มะเกลือ (ภาคกลาง) เกลือ (ภาคใต้) มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Ebony ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Diospyros mollos* Griff วงศ์ Ebenaceae [3] มะเกลือเป็นต้นไม้ขนาดใหญ่เขียวชอุ่มตลอดทั้งปี พบใน ป่าเบญจพรรณ และป่าดิบ ในประเทศไทยพบมากใน จังหวัดนครปฐม เพชรบุรี ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี กาญจนบุรี และนครราชสีมา มีสารสำคัญที่พบในผลของมะเกลือ คือ Tannin, Diospyrol, Diospyroquinone, Sterols, Organic acids, Aphrogenic principle, Invertine, emulsine และ Hydroquinone principle [4] มะเกลือมีประโยชน์มากมาย เช่น ลูกสดเป็นยาถ่ายพยาธิ และใช้เป็น สีย้อมผ้าซึ่งจะได้สีดำ รากใช้ต้มแก้ไอ เจียน แก้วลม และเปลือกเอามาอย่างใส่ในน้ำตาลสดทำให้เกิดการ หมักขึ้น เรียกว่า น้ำตาลเมา [3] ส่วนต้นเคี่ยมเป็นต้นไม้ประจำจังหวัดสุราษฎร์ธานี มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Cotylelobium lanceolatum* Craib อยู่ในวงศ์ Dipterocarpaceae จัดเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ ลำต้น ตรง มีความสูงโดยประมาณ 20 – 40 เมตร เปลือกสีน้ำตาล เปลือกด้านในเป็นสีน้ำตาลอ่อน ขึ้นได้ทั่วไป ตามป่าดงดิบทางภาคใต้ของประเทศไทย พม่า มาเลเซีย และอินโดนีเซีย ต้นเคี่ยมมีสารที่สำคัญคือ Ampelopsin F, Isoampelopsin F, Viniferin, Vaticanol A, Vaticanol E, Vaticanol G และ Lyoniresinol ต้นเคี่ยมเป็นดรชนีเพื่อชีวิตได้ว่าพื้นนั้นเหมาะสมต่อการทำการเกษตรหรือไม่ อีกทั้งยัง ใช้ใส่ในการหมักน้ำตาลโตนดเพื่อให้มีรสกลมกล่อม [5] โดยยังไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์อธิบายถึง บทบาทของการใช้ไม้ทั้งสามชนิดในการหมักน้ำตาลโตนดโดยสันนิษฐานว่า อาจเป็นเพราะ มีสารโพลีฟีนอลช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อน อย่างไรก็ตามจากการวิจัยของอารี (2546) [1] ที่ศึกษา

ผลของไม้พะยอมและไม้เกลือต่อจุลินทรีย์ในการหมักน้ำตาลโตนด และน้ำตาลสด ไม่พบว่าไม้พะยอม และมะเกลือสามารถยับยั้งการเจริญของอะซิดิกแบคทีเรียได้ แต่พบว่าไม้มะเกลือมีส่วนช่วยให้ ยีสต์ *Candida colliculose* เจริญได้ดี และไม้พะยอมสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก บางชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*

การศึกษาประชากรผสมของจุลินทรีย์ในน้ำตาลสด และการหมักน้ำตาลโตนดในอดีต ต้องอาศัย เทคนิคการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cultural Techniques) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast malt (YM) และ Potato dextrose agar (PDA) เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะรูปร่าง และสีโคโลนี [6] แต่เนื่องจากในน้ำตาลโตนด มีจุลินทรีย์ผสมหลายชนิด การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นงาน ที่สิ้นเปลืองแรงงานและเวลา และอาศัยความชำนาญในการสังเกตลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงจะศึกษาผลของไม้มะเกลือ พะยอม และเคี่ยม ต่อการแปลงเปลี่ยนของ จุลินทรีย์ในระหว่างการหมักน้ำตาลโตนด ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคเมตาจีโนมิกส์ ซึ่งเป็นวิธีการ ที่ใช้ในการศึกษาวิเคราะห์จีโนมของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในหนึ่งชุมชน (community) หรือในตัวอย่าง ธรรมชาติ โดยวิธีการสกัดดีเอ็นเอออกมาจากตัวอย่างที่ต้องการศึกษาโดยตรง ไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยง เชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นเทคนิคเมตาจีโนมิกส์จึงครอบคลุมไปถึงการศึกษาจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ [7] โดยการใช้ยีน 16S rRNA ในการวิเคราะห์โดยการออกแบบไพรเมอร์ (Primer) ที่จำเพาะต่อการเพิ่ม จำนวนของดีเอ็นเอซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้จำแนกสปีชีส์ (Species) ของจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถใช้ในการศึกษา วิวัฒนาการและความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสของยีน ที่สร้าง 16S rRNA [8]

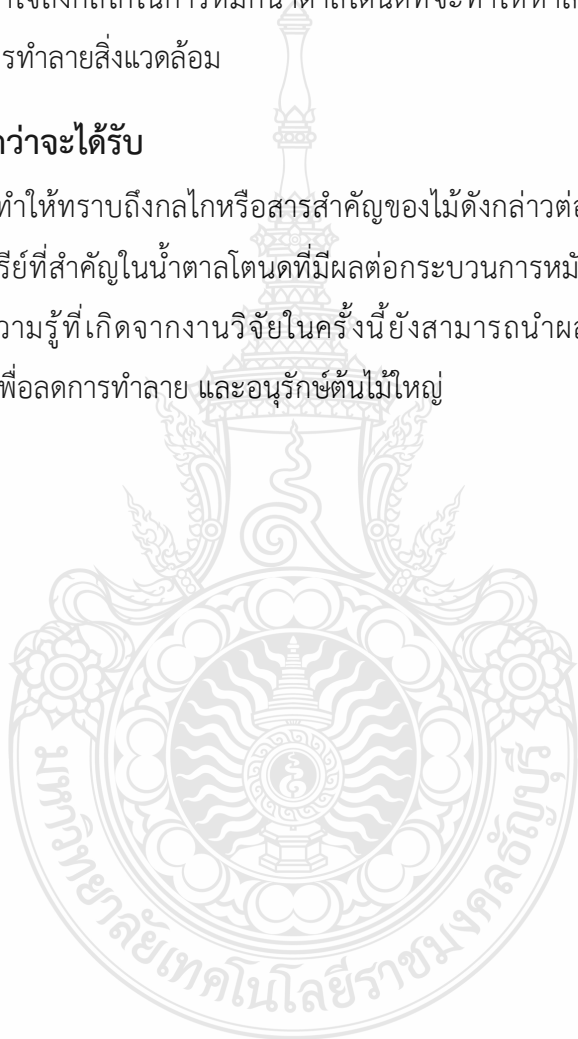
งานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิคนี้เพื่อศึกษาผลของมะเกลือ พะยอม และเคี่ยม ต่อจุลินทรีย์ในน้ำตาล โตนด และอิทธิพลต่อการหมักแอลกอฮอล์ หรือ น้ำตาลโตนด ด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์ ซึ่งอาจทำให้ สามารถหาสิ่งทดแทนในการหมักน้ำตาลโตนดได้ เพื่อลดการทำลายต้นไม้เหล่านี้ ซึ่งเป็นไม้ใหญ่ได้ เพื่อเป็นการอนุรักษ์รักษาต้นไม้ใหญ่ และให้ทรัพยากรไม้มะเกลือ พะยอม และเคี่ยม ไม่ถูกทำลาย ลดการตัดไม้ทำลายป่า เพื่อเพิ่มพื้นที่สีเขียวให้กับประเทศ และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ สามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบของไม้มะเกลือ พะยอม และเคี่ยม ที่มีผลต่อการหมักได้แก่ สารฟีนอลิกและ สารไนโตรเจน
- 1.2.2 เพื่อศึกษาผลของไม้มะเกลือ พะยอม และเคี่ยม ต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ ในระหว่างการหมักน้ำตาลโตนดด้วยเทคนิคมาตรฐานและเทคนิคเมตาจีโนมิกส์
- 1.2.3 เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกในการหมักน้ำตาลโตนดที่จะทำให้หาสิ่งทดแทนการใช้ไม้ดังกล่าว เพื่อลดการทำลายสิ่งแวดล้อม

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การวิจัยนี้จะทำให้ทราบถึงกลไกหรือสารสำคัญของไม้ดังกล่าวต่อการทำปฏิกิริยาต่อน้ำตาลโตนด และกลุ่มจุลินทรีย์ที่สำคัญในน้ำตาลโตนดที่มีผลต่อกระบวนการหมักและจัดจำแนกโดยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์ องค์ความรู้ที่เกิดจากงานวิจัยในครั้งนี้ยังสามารถนำผลที่ได้รับมาพัฒนาเพื่อหาสารทดแทนการใช้ไม้ เพื่อลดการทำลาย และอนุรักษ์ต้นไม้ใหญ่





บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางสรีรวิทยา และนิเวศวิทยาของมะเกลือ

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Eeicales

Family: Ebenaceae

Genus: *Diospyeos*

Specific: *Diospyros mollis*

มะเกลือมีชื่อสามัญว่า Ebony tree ชื่อวิทยาศาสตร์ *Diospyros mollis* Griff ในประเทศไทย มีชื่อเรียกพื้นเมืองที่หลากหลายตามภูมิภาคท้องถิ่น เช่น มะเกลือ (ภาคกลาง) มะเกีย (ภาคเหนือ) เกลือ (ภาคใต้) มักเกลือ (ตราด) ฝิเผา (เงี้ยว - เหนือ) [9] มะเกลือเป็นต้นไม้ใหญ่พบได้ในป่าเบญจพรรณที่ราบทั่วไป พบมากในเฉพาะประเทศไทย โดยเฉพาะจังหวัด นครปฐม ราชบุรี เพชรบุรี ลพบุรี และนครราชสีมา ไม้มะเกลือเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางจนถึงใหญ่ สูง 10 - 30 เมตร เรือนยอดเป็นพุ่มกลม ลำต้นเป็นพุ่ม กิ่งอ่อนห้อยลง และมีขนนุ่ม เปลือกสีดำ และสีเทา แก่นสีดำ สนิท ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปไข่หรือรูปไข่แกมขอบขนาน กว้าง 1.5 - 4 เซนติเมตร ยาว 4 - 8 เซนติเมตร ปลายใบแหลมหรือมน ฐานใบแหลมหรือมนหรือเบี้ยว ขอบใบเรียบ ท้องใบเห็นเส้นใบชัด ใบอ่อนมีขน ใบแก่จะเกลี้ยงไม่มีขนก่อนร่วงมีสีเหลือง (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของใบไม้มะเกลือ

ที่มา : ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ www.qsbg.org

(วันที่สืบค้น 17 กุมภาพันธ์ 2563)

ดอกมะเกลือเป็นดอกแยกเพศต้นของดอกเพศผู้เป็นช่อดอกแบบกระจุกสั้นๆ ช่อละ 3 ดอก ดอกเพศเมียเป็นดอกเดี่ยว กลีบเลี้ยง กลีบดอกอย่างละ 4 กลีบ โคนกลีบเชื่อมปลายแยก กลีบดอกเป็นรูปเหยือกน้ำ ออกดอกช่วงเดือนเมษายนถึงกรกฎาคม ผลมีลักษณะกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร กลีบเป็นจุก ผลด้านในมีลักษณะเป็นกลีบ 4 กลีบ (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะของดอกของไม้มะเกลือ

ที่มา : ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ www.qsbg.org
(วันที่สืบค้น 17 กุมภาพันธ์ 2563)

ผลมะเกลือเมื่อแก่จะมีสีเทาเขียว เมื่อผลแห้งเป็นสีดำ ผลจะเริ่มแก่ช่วงเดือนสิงหาคม ถึงธันวาคม เปลือกนอกสีเทาดำ แตกเป็นเกล็ดเปลือกในสีเหลืองอ่อน ถ้าทิ้งไว้จะกลายเป็นสีดำ ใบแห้ง ผลแห้ง และแก่นสีดำ ในเปลือกไม้และเปลือกผล มีองค์ประกอบทางเคมีหลักอยู่ 3 ประเภท เช่นเดียวกับเนื้อไม้ ได้แก่ โฮโลเซลลูโลส (Holocellulose) ลิกนิน (Lignin) และสารแทรก (Extractive) โดยปริมาณ และชนิดของสารในองค์ประกอบแต่ละประเภทมีมากน้อยต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของไม้ ส่วนของไม้และถิ่นที่ปลูกของต้นไม้ โดยปกติปริมาณสารแทรก และลิกนินในเปลือกไม้จะสูงกว่าในเนื้อไม้มากแต่ปริมาณโฮโลเซลลูโลสในเปลือกไม้จะต่ำกว่าในเนื้อไม้ [10] มะเกลือพบในป่าผสมผลัดใบ แล้งสูง ที่ความสูงจากระดับน้ำทะเล 5 - 500 เมตร ต่างประเทศพบในพม่า และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นพันธุ์ไม้เขตร้อน เป็นไม้ที่เป็นที่ต้องการมากที่สุดในการค้าไม้ เมืองสุลาเวสีเหนือในอินโดนีเซีย เป็นหนึ่งในที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของไม้มะเกลือ (*Diospyros mollis* Griff) มะเกลือมีมากมายแพร่หลายกระจายอยู่ตามธรรมชาติ เช่น อินโดจีน พม่า ไทย คาบสมุทรมมาเลเซีย สุมาตราชวา เกาะบอร์เนียว ซาราวัก บรูไน ซาบา กาลิมันตันตะวันออก ฟิลิปปินส์ เซเลเบส โมลุกกา และนิวกินี รวมถึงการแพร่กระจายของมะเกลือในอินโดนีเซียรวมถึงเกาะบอร์เนียว (Kutai, Bulungan, Berau, Tarakan, Tidung), Sulawesi (Minahasa, Bolaang Mongondow, Gorontalo, Poso, Banggai, Muna), Moluccas (Morotai, Buru, Tanimbar, Halmahera) และ West Papua ทุกวันนี้

จำนวนของไม้มะเกลือกำลังลดลงอันเนื่องมาจากการใช้ประโยชน์จำนวนมากในอดีตแม้ว่าไม้มะเกลือจะมีการกระจายทางธรรมชาติอย่างกว้างขวางในภาคต่างๆ แต่ก็อาจนำไปสู่ความขาดแคลนหรือแม้แต่การสูญเสียมูลค่าพันธุ์กรรมความหลากหลาย ดังนั้นเราจำเป็นต้องอนุรักษ์ *Diospyros mollis* Griff เป็นทรัพยากรพันธุกรรมข้อมูลเกี่ยวกับการเติบโต ระบุสภาพแวดล้อมเพื่อการเติบโตที่เหมาะสมและที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ [11] จากงานวิจัย Kinho (2015) [12] ไม้มะเกลือมีความสามารถในการปรับตัวสูงในสวนรุกชาติของ MFRI จนถึงอายุ 2 ปีหลังปลูกพบว่าค่าร้อยละเฉลี่ยของอัตราการรอดชีวิตโดยรวมคือ 98% และปริมาณที่เพิ่มขึ้นของการใช้ปุ๋ยในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความสูง และการเจริญเติบโตของเส้นผ่านศูนย์กลาง แม้ว่าจะมีการแสดงที่แตกต่างกันในการเจริญเติบโตสูง และเส้นผ่านศูนย์กลางในกลุ่มการรักษา Ebenaceae เป็นพืชไม้ยืนต้นขนาดกลางและส่วนใหญ่เกิดขึ้นในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนด้วยการเป็นตัวแทนขนาดเล็กในเขตอบอุ่น [13] และจากระบบการจำแนกประเภทของอินฟาเรดกับ (Ebenoideae และ Lissocarpoideae) และจำพวก (*Diospyros*, *Euclea*, *Royena* และ *Lissocarpa*) ปรากฏว่าระบบการจำแนกประเภททั้งหมดสำหรับสกุล *Diospyros* สกุลนี้เป็นสกุลที่ใหญ่ที่สุดที่มีการกระจายอย่างกว้างขวาง และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ [14]

มะเกลือมีสารสำคัญคือ Tannin, Diospyrol (ถูกออกซิไดซ์ง่าย), Diospyroquinone, Sterols, Organic acids, Aphrogenic principle, Invertine, Emulsine และ Hydroquinone principle [4]

2.1.1 การใช้ประโยชน์ของต้นมะเกลือ

จากการศึกษาของสุภักตร์ และ ธีระ (2550) [11] การคัดแยกราเอนโดไฟต์จากมะเกลือพบราจำนวน 11 ไอโซเลต นำราเอนโดไฟต์ทั้งหมดมาศึกษา และจำแนกเป็นราในชั้นดิวิชันดิเวเทโรไมซีส (Subdivision Deuteromycotina) ได้ 9 ไอโซเลต ราในชั้นดิวิชันแอสโคไมซีส (Subdivision Ascomycota) 1 ไอโซเลต และราในจีนสแอสเปอร์จิลลัส 1 ไอโซเลต นำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Shigella* Type A, *Escherichia coli* และ *Salmonella* Type B

การศึกษาฤทธิ์ของไม้พะยอม และไม้มะเกลือในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดบนอาหารวุ้นโดยคัดเลือกเป็นแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษในอาหาร ได้แก่ *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Bacillus subtilis* (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $10^5 - 10^6$ cfu/ml) เลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงต่อบนอาหาร NB เป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าไม้มะเกลือไม่มีการยับยั้งจุลินทรีย์แต่อย่างใด แต่พบว่าในไม้มะเกลืออาจมีสารบางชนิดซึ่งช่วยเร่งอัตราการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ

ยังช่วยควบคุมการสร้างกรดแลคติกของยีสต์ *Candida colliculosa* เมื่อเพิ่มปริมาณไม้มะเกลืออัตรา การเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้น [1]

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบต่างๆ จากสายพันธุ์ *Diospyros* ใน ไม้มะเกลือทำการศึกษา Phenolic compound พบว่าของมะเกลือมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ Anthelmintic และศึกษา Chemical compounds จากผลของมะเกลือ พบสารประกอบทางเคมี ดังนี้ Lupeol, A-amyrine, B-sitosterol, Diospyrol, 1, 8 dihydroxynaphthalene, 8-dihydroxy-2-acetyl-3-methyl และ Naphthalene [15]

การใช้ผลสดของมะเกลือต้องระมัดระวัง ไม่ควรให้สัตว์รับประทานเกิน 20 เท่า ของน้ำหนักตัว ถ้ามีการรวมตัวกับสารประกอบพวกฟีนอลิกจะทำให้การดูดซึมได้ดีขึ้นอาจมีผล ทำให้สัตว์ตาบอดได้ควรมีการแทรกดีเกลือหรือน้ำมันละหุ่ง เพื่อช่วยการขับถ่ายและป้องกันการอุดตัน ลำไส้เนื่องจากตัวเต็มวัยของพยาธิไส้เดือน [16]

2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและนิเวศวิทยาของพะยอม

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Order: Malvales

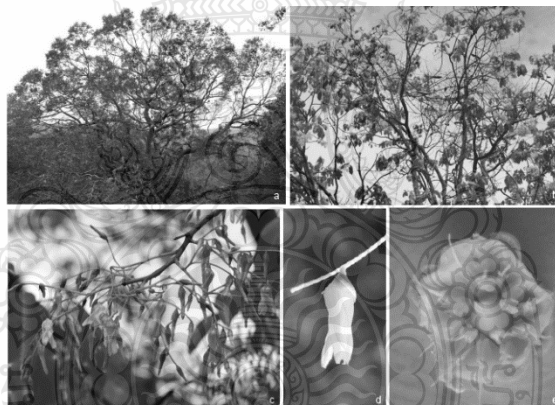
Family: Dipterocarpaceae

Genus: Shorea

Specific: *Shorea roxburghii*

พะยอมมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Shorea roxburghii* G. Don และมีชื่อพ้องทางพฤกษศาสตร์คือ *Shorea talura* Roxb. อยู่ในวงศ์ Dipterocarpaceae มีชื่อสามัญคือ White Meranti และมีชื่อเรียก อื่นๆ คือ กะยอม (เชียงใหม่) พะยอม (ลาว) พะยอมตง (ภาคเหนือ) แคน (ร้อยเอ็ด) เชียง เชียง (กะเหรี่ยง เชียงใหม่) พะยอมทอง (สุราษฎร์ธานี, ปราจีนบุรี) ยางหยวก (น่าน) กระจายพันธุ์ ตามธรรมชาติเป็นพืชที่มีการกระจายพันธุ์อยู่ในเขตอินเดียนวันออก พม่า ไทย ศรีลังกา เวียดนาม ฟิลิปปินส์ คาบสมุทรมอินโดจีน และมาเลเซีย ที่สูงจากระดับน้ำทะเล 60 - 1,200 เมตร ในประเทศไทย พบขึ้นตามป่าเบญจพรรณแล้งชื้น และป่าดิบแล้งทั่วไปแม้แต่ในป่าพรุที่มีน้ำแช่ขังก็ยังมีพะยอมขึ้นอยู่ ตามธรรมชาติทุกภาคของไทย เช่นในบริเวณสำนักงานโครงการพิบูลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ในเขตจังหวัดนครราชสีมาเป็นต้น ถิ่นกำเนิดดั้งเดิมของพะยอมอยู่ในทวีปเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พะยอมออกดอกระหว่างเดือนธันวาคมจนถึงกุมภาพันธ์ จะผลัดใบหมดหรือเกือบหมดก่อน

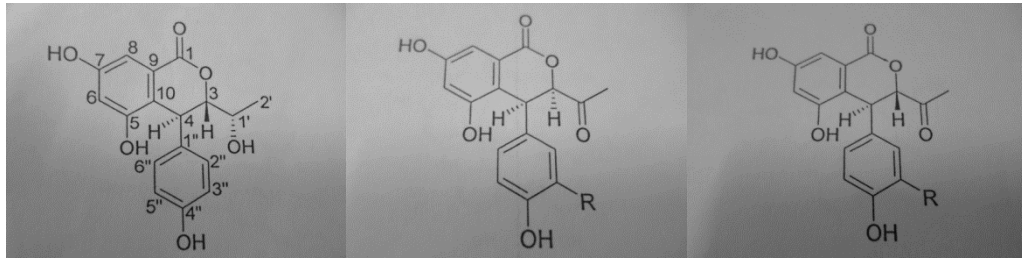
ออกดอกและผลิใบใหม่ก่อนผลิซ่อดอกเล็กน้อย ออกผลระหว่างเดือนมกราคมจนถึงมีนาคม เปลือกพะยอมถูกใช้เป็นยาสมุนไพรและกันบูดสำหรับเครื่องตีแบบดั้งเดิมในประเทศไทย นอกจากนี้เปลือกยังถูกใช้ในการรักษาโรคบิดท้องร่วงและอหิวาตกโรคในการแพทย์พื้นบ้านของอินเดีย [1] ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ พะยอมเป็นไม้ต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่สูง 15 - 40 เมตร เป็นไม้ผลัดใบ ลำต้นเปลวตรง กิ่งอ่อนเกลี้ยง เรือนยอดเป็นพุ่มกลม เปลือกหนาสีน้ำตาลหรือเทา แตกเป็นร่องตามยาวลำต้นและเป็นสะเก็ดหนาเปลือกในสีน้ำตาลอ่อนปนเหลืองและมีทางสีน้ำตาลแก่ผ่าน เส้นรอบลำต้นอาจถึง 300 เซนติเมตร ใบจะมีลักษณะใบเดี่ยวออกสลับ รูปขอบขนานกว้าง 3.5 - 6.5 เซนติเมตร ยาว 8 - 15 เซนติเมตร ปลายมนหรือเป็นติ่งสั้นๆ โคนมน ขอบเป็นคลื่นผิวเกลี้ยงเป็นมัน ดอกจะมีลักษณะดอกสีขาว กลิ่นหอมจัดออกเป็นช่อใหญ่ตามกิ่งและปลายกิ่ง กลีบเลี้ยง 5 กลีบ โคนเชื่อมติดกัน กลีบดอก 5 กลีบ เรียงเวียนกันแบบก้านเมื่อบานเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 - 2 เซนติเมตร เกสร ตัวผู้ 15 อัน ผลจะมีลักษณะรูปรีกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงเจริญไปเป็นปลียาว 3 ปลีกลีบ 2 ปลีกลีบคล้ายผลยางมีลักษณะดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 ลักษณะของพะยอม (ลำต้น ใบ ดอก และผล)

ที่มา : Solomon (2011) [18]

สารสำคัญที่พบในพะยอมสารชนิดใหม่ที่มีการค้นพบซึ่งอยู่ในระหว่างการศึกษาดังที่ทางเภสัชชาติ ได้แก่ Phayomphenol A1, Phayomphenol A2, 1'S-dihydrophayomphenol A2, Phayomphenol B1 และ Phayomphenol B2 [17] ดังภาพที่ 2.4



1'S-dihydrophayomphenol A2 Phayomphenol A1: R=H Phayomphenol A2: R=H

Phayomphenol B1: R=OH Phayomphenol B2: R=OH

ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของสารตัวใหม่สกัดจากเปลือกพะยอบ

ที่มา : Morikawa *et al.*, (2012) [17]

2.2.1 การใช้ประโยชน์ของต้นพะยอบ

พะยอบเป็นพันธุ์ไม้ที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีมากประโยชน์ของไม้พะยอบมีหลายอย่าง เช่น เนื้อไม้ ใช้ในงานก่อสร้างต่างๆ ถ้ามีการแช่น้ำยาจะใช้ได้ทนทาน นิยมใช้ทำหมอนรางรถไฟ เส้า ชี้อ รอด ตง คาน ทำเรือขุด ต่อเรือ กล่าวกันว่าทนเปรียงได้ดี ใช้ แฉว พาย เส้ากระโดงเรือ เครื่องมือทางเกษตร ครก สาก กระเดื่อง ลูกหีบ ทำส่วนประกอบของเกวียน ตัวถังรถทำกระเบื้องไม้ ประโยชน์ทางด้านสมุนไพร เนื้อไม้ และเปลือกต้มกับน้ำใช้ดื่มเป็นยาฝาดสมาน แก้ท้องเดิน และลำไส้อักเสบ ดอกใช้ปรุงเป็นยาหอมแก้ลม บำรุงหัวใจ และลดไข้ ประโยชน์อื่นๆ เปลือกหรือชิ้นไม้เล็กๆ ใช้ใส่เครื่องหมักดองหรือกระบอกกรองรับน้ำตาลโดนดและมะพร้าวเพื่อกันเสีย เปลือกมีปริมาณแทนนินชนิด Pyrogallol และ Catechol สูงจึงนิยมใช้พอกหนังและอาจใช้รับประทานกับใบพลูแทนหมาก ดอกอ่อน รับประทานได้ใช้ผัดกับไข่หรือชุบไข่ทอดก็ได้ ดอกสดๆ นำมาลวกใช้จิ้มเป็นผักจิ้มน้ำพริกใช้ผสมน้ำมันทาไม้ ยาเรือ [19]

การศึกษาคุณลักษณะของอาหารสมุนไพรไทยจากการสกัดเมทานอลจากเปลือกพะยอบพบว่า สามารถยับยั้งการเพิ่มระดับไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาในหนู และการศึกษาทางเคมีของพะยอบพบว่ามี Stilbenoids หลายชนิด เช่น Resveratrol และ Oligomers [17]

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกพะยอบพบว่าสารสกัดจากเปลือกพะยอบมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum* sp. ที่แยกได้จากพริก และมะละกอด้วยวิธี Tissue transplanting technique โดยนำเปลือกพะยอบทั้งแบบสด และแห้งมาสกัดด้วยน้ำ และเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ในอัตราส่วนสกัด 1 : 5 ทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนได้สารสกัดที่เข้มข้นทำการเลี้ยงเชื้อราที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อราสูตร Potato dextrose agar ที่ผสมสารสกัดในแต่ละความเข้มข้น (5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน จากการศึกษาพบว่าทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเปลือกต้น

พะยอมทั้งสดและแห้งที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici* และ *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด (ร้อยละ 100) โดยไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ในขณะที่ทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ได้เพียงเล็กน้อย 1.0 เซนติเมตร (ร้อยละ 71.41) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมพบการเจริญของเส้นใยมีขนาดความกว้างของโคโลนีเท่ากับ 3.5 เซนติเมตร และ *Colletotrichum gloeosporioides* 0.3 เซนติเมตร (ร้อยละ 92.50) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกต้นพะยอมด้วยเอทานอลร้อยละ 95 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เป็นสาเหตุก่อโรคแอนแทรคโนสในพริกและมะละกอได้ [19]

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งได้แก่สาร Hopeafuran, α -viniferan, Hopeahainol A และ Hopeahainol C ซึ่งแยกได้จากเปลือกส่วนลำต้นของพะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don) ในจังหวัดขอนแก่นประเทศไทย ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่คือ Diptoindonesin D ผลต่อ Diptoindonesin D ได้รับการตรวจหาฤทธิ์ต้านจุลชีพและมีค่าความเข้มข้นของการยับยั้งขั้นต่ำ (MIC) ที่มีนัยสำคัญเท่ากับ 4.68 และ 9.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อ *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* ตามลำดับ [20]

จากการศึกษาการต้านไขมันในเลือดสูงจากเปลือกของ *Shorea roxburghii* พบว่าเปลือกของ พะยอมที่สกัดด้วยเมทานอล สามารถยับยั้งการเพิ่มระดับไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาของหนูที่ได้รับน้ำมันมะกอก และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสของตับอ่อน ($IC_{50} = 31.6$ ไมโครกรัม / มล.) จากสารสกัดดังกล่าวได้ทำการแยกสารประกอบได้ ดังนี้ 3-acetyl-4-phenyl-3, 4 dihydroisocoumarins, Phayomphenols A₁ (1) และ A₂ (2) และสารประกอบอื่น ๆ อีกจำนวน 22 ชนิด โดยอาศัยหลักทางเคมี และสเปกโตรสโกปีรวมถึงการวิเคราะห์ด้วยรังสีเอ็กซ์สารที่แยกได้มี Oligostilbenoids หลายชนิด ได้แก่ (-) Hopeaphenol (3) และ (+) Isohopeaphenol (4) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการยับยั้งการเพิ่มระดับไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา ขนาด 200 มก. /กก. po และประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสตับอ่อน ($IC_{50} = 32.9$ และ $26.5 \mu M$ ตามลำดับ) [17]

2.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและนิเวศวิทยาของเคี่ยม

Kingdom: Plantae

Order: Malvales

Family: Dipterocarpaceae

Genus: *Cotylelobium*

Specific: *Cotylelobium melanoxylon*

เคี่ยมมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Cotylelobium melanoxylon* Craib มีชื่อพื้นเมือง เช่น เคี่ยมขาว เคี่ยมดำ เคี่ยมแดง เป็นไม้ยืนต้นใน วงศ์ Dipterocarpaceae ชื่อสามัญ Resak Tembaga พบในคาบสมุทรมลายูและคาบสมุทรมลายูมีการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่เฉพาะเจาะจงเนื่องจากพบเฉพาะในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ไทย อินโดนีเซีย และมาเลเซีย ไปจนถึงเกาะบอร์เนียว ในประเทศไทยต้นเคี่ยมจะพบได้ทั่วไปทางตอนใต้ของประเทศ เช่น ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี กระบี่ ตรัง นครศรีธรรมราช เป็นต้น ต้นเคี่ยมขึ้นอยู่ในป่าดงดิบชื้น สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 10 - 100 เมตร ลักษณะดินที่ขึ้นจะเป็นดินร่วนปนทราย ระบายน้ำได้ดี ลำต้นตรง ไม่มีพุ่ม ใบเล็กสีเขียวเข้มอมดำ ผิวแตกเป็นร่องลึกหลุดออกได้ ใบเดี่ยว เรียบเป็นมัน ดอกช่อ ดอกสีเหลืองอ่อน บานเต็มที่ กลีบดอกบิดห่อเข้าหากัน ผลเดี่ยวมีปีกสีเขียวทรงลูกข้าง ผลแก่สีน้ำตาล ปลิวตามลมได้ เนื้อไม้แข็งแรง ทนทาน ใช้ในงานก่อสร้าง เปลือกไม้ใส่ในภาชนะรองรับน้ำตาลไม่ให้บูดเน่า ใช้เป็นยาห้ามเลือด แก้ท้องร่วง [21] ต้นเคี่ยมจัดเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ลำต้นตั้งตรง มีความสูงประมาณ 20 - 40 เมตร ลักษณะเรือนยอดเป็นพุ่มทึบ รูปเจดีย์แบบต่ำๆ ส่วนเปลือกต้นเป็นสีน้ำตาล เปลือกเรียบ มีรอยต่างสีเทาและสีเหลืองสลับกัน และมีต่อมระบายอากาศกระจายอยู่ทั่วไป เปลือกด้านในเป็นสีน้ำตาลอ่อน มีขนสีตามลำต้นและจะจับกันเป็นก้อนสีเหลืองเมื่อทิ้งไว้นานๆ ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการใช้เมล็ด (โดยเด็ดปีกออกก่อนการนำไปเพาะ) และวิธีการตอนกิ่ง เจริญเติบโตได้ในดินทุกชนิด ชอบดินร่วนและดินร่วนปนทรายที่มีการระบายน้ำได้ดี ชอบความชื้นสูง และแสงแดดปานกลาง โดยต้นเคี่ยมสามารถพบขึ้นได้ทั่วไปตามป่าดงดิบทางภาคใต้ตั้งแต่จังหวัดชุมพรลงไป และทางภาคใต้ของพม่าลงไปจนถึงภาคเหนือของประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซีย ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี ต้นเคี่ยมมี 2 ชนิด คือ เคี่ยมขาว และเคี่ยมดำ ซึ่งเคี่ยมดำเปลือกต้นจะหนาและแข็งกว่าเปลือกต้นเคี่ยมขาว ใบเคี่ยมมีลักษณะเป็นรูปไข่ ปลายใบเรียวหรือหยักเป็นติ่งยาว ส่วนโคนใบมน ใบมีขนาดกว้างประมาณ 2 - 5 เซนติเมตร และยาวประมาณ 5 - 18 เซนติเมตร แผ่นใบหนา ส่วนท้องใบมีขนสีน้ำตาลปนสีเหลือง ดอกเคี่ยมเป็นดอกสีขาวกลิ่นหอม ออกดอกเป็นช่อตามยาวที่ปลายกิ่งและตามง่ามใบ ผลเคี่ยมเป็นรูปทรงกลม มีขนาดเล็ก ผลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.7 เซนติเมตร [22] โดยมีลักษณะโดยทั่วไปดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 ลักษณะของเคี่ยม

ที่มา : กานต์ลีรี (2561) [22]

2.3.1 การใช้ประโยชน์ของเคี่ยม

เนื้อไม้เคี่ยมมีความละเอียด แข็ง และเหนียว มีความทนทานสูงมาก จึงนิยมนำไปทำเรือ ใช้ในงานก่อสร้างทั้งส่วนพื้น กระดาน เสาเรือหรือสิ่งปลูกสร้างอื่นๆ เป็นต้น ใช้ลากเรือในการย้ายบ้านหรือทำเลื่อนชักพระ ทำเครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆ เป็นต้น เปลือกใช้หุบผสมกับชันใช้สำหรับยาเรือ ต้นเคี่ยมใช้ผสมในน้ำยางทาไม้ น้ำมันทาไม้ และน้ำมันชักเงา แถบภาคใต้นิยมใช้เปลือกไม้เคี่ยมนำมาตัดเป็นชิ้นขนาดเล็กใส่ในกระบอกตากรองรับน้ำตาลจากต้นตาล โดยรสฝาดของไม้เคี่ยมจะช่วยรักษาน้ำตาลไม่ให้บูดเร็วหรือบูดก่อนการนำมาเคี้ยว ในประเทศไทยมีการใช้ ต้นเคี่ยมในการแพทย์แผนไทยเพื่อเป็นยาสมานแผลระบายและการแข็งตัวของเลือด [23]

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามีการใช้เปลือกและใบเคี่ยมในการรักษาโรคบางชนิด เช่น ท้องเสีย มาลาเรีย เบาหวาน [24] โดยในเปลือกไม้เคี่ยมมีสารที่สำคัญคือ Ampelopsin F, Isoampelopsin F, Viniferin, Vaticanol A, Vaticanol E, Vaticanol G และ Lyoniresinol ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นยาต้านเบาหวาน [23] นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ แทนนิน และสารประกอบซาโปนิน สารสกัดจากเปลือกยังมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* FNCC 0061 และ *Pseudomonas aeruginosa* FNCC 0063 [25]

จากงานวิจัยของ Chana-Thaworn (2011) [26] ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียจากการสารสกัดของเนื้อไม้เคี่ยมพบว่าสารสกัดจากเคี่ยมที่ระดับความเข้มข้น 3 - 5 เท่า สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิดได้ คือ *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes*

การศึกษาหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกและแก่นไม้ของต้นเคี่ยม พบสารต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละ 86.28 และ 81.38) และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (23.15 และ 20.05 mgGAE/g) [27]

การศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด จากใบเคี่ยมพบว่าใบเคี่ยมมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดคือ 158.14 mg จากปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าใบเคี่ยมสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* และ *Vibrio cholera* [28]

ศึกษาสารกลุ่มฟีนอลิก และแทนนิน ที่สกัดได้จากส่วนของลำต้น และใบเคี่ยมซึ่งมีผลยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เกิดจากแบคทีเรียหลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่าสารสกัดเอทานอลจากเคี่ยมสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholera* และแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* [29]

ศึกษาสารสกัดจากไม้เคี่ยมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เกิดจากแบคทีเรียที่แยกจากต้นตาล 6 กลุ่ม ได้แก่ *Acetobacter*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus* *Micrococcus* และ *Saccharomyces* พบว่าสารสกัดจากเคี่ยมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* และ *Bacillus cereus* ได้ [30]

2.4 ตาลโตन्द

Kingdom: Plantae

Division: Angiospermae

Class: Monocotyledoneae

Ordo: Arecales

Family: Arecaceae (sin. Palmae)

Genus: Borassus

Species: Borassus flabellifer Linn

ตาลโตन्द มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Borassus flabellifer* Linn. เป็นพืชตระกูลปาล์มชนิดหนึ่งจากปาล์ม 20 จินัส 1,500 สปีชีส์ เป็นพืชที่พบทั่วไปในเขตร้อน ในประเทศไทยมีตาลโตन्दจำนวนมาก ซึ่งพบมากในจังหวัดเพชรบุรี กาญจนบุรี นครปฐม อยุธยา สงขลา และปัตตานี โดยจังหวัดที่มีต้นตาลโตन्दมากที่สุด คือ จังหวัดสงขลา มีต้นตาลประมาณ 1,262,771 ต้น [31] ตาลโตन्दเป็นที่รู้จักกันใน

ชื่อ Tala ใน Odia, Tnaot ในภาษาเขมร, Thot Not ในภาษาเวียดนาม, Tari in ภาษาฮินดี, Tal ในภาษาเบงกาลี, เรื่อง Hannu หรือ Tateningu ในภาษากันนาดา, Nungu ในภาษาทมิฬ, Pana Nangu ในภาษามาลายาลัม Thaati Munjalu ในเตลูกู, Munjal ในภาษาอูรดู, Lontar ในอินโดนีเซีย, Siwalan [32]

2.4.1 ลักษณะทางสรีรวิทยาและนิเวศวิทยาของตาลโตนด

ตาลโตนดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในวงศ์หมาก-มะพร้าว (Arecaceae) อยู่ในวงศ์ย่อย Coryphoideae พบได้ทั่วไปในเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้แก่ บังกลาเทศ อินเดีย ลาว พม่า และไทย ลักษณะทั่วไปของตาลโตนดมีลำต้นเดี่ยวไม่แตกกิ่งก้านสาขา มีความสูงได้ถึง 30 เมตร เป็นต้นแยกเพศ คือ ต้นเพศผู้และเพศเมียอยู่คนละต้นกัน (Dioecious plant) ประชาชนแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จะนิยมใช้ประโยชน์จากหลายส่วนของตาลโตนด เช่น ลำต้นใช้ในงานปลูกสร้าง ผลอ่อน และผลแก่ใช้รับประทาน ต้นตาลโตนดมีความแข็งแรง ทนทาน และอายุยืนยาวโดยประมาณ 80 - 100 ปี โตเต็มที่สูงประมาณ 2,700 เซนติเมตร (90 ฟุต) หรืออาจมากกว่านั้น มีเส้นรอบวงโคนต้นอยู่ระหว่าง 60 - 120 เซนติเมตร (2 - 4 ฟุต) มีใบเป็นรูปพัด (Fan leaf) ขนาดใหญ่แข็ง และหนา โดยจะให้ผลผลิตหลังจากปลูกแล้วประมาณ 10 - 15 ปี สามารถขึ้นได้บนดินทุกชนิดทนทั้งความร้อน ความแห้งแล้ง และน้ำท่วม มีรากลึกลงมากโดยรากของตาลโตนดไม่แผ่ออกด้านข้าง ตาลโตนดที่ขึ้นอยู่ทั่วไปมีลักษณะและส่วนประกอบดังนี้ [33]

ราก รากเป็นเส้นกลมยาวเป็นกระจุกคล้ายมะพร้าวแต่หยั่งลึกลงไปในดินลึกลงมาก ไม่แผ่ไปตามผิวดินเหมือนรากมะพร้าวโอกาสที่จะโคนล้มจึงยาก

ลำต้น ตาลโตนดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีลักษณะสูงชะลูด ความสูงโดยทั่วไปประมาณ 18 - 20 เมตร โตเต็มที่สูงประมาณ 15 - 27 เมตร บางต้นอาจสูงถึง 30 เมตร ลำต้นตรงหรือโค้งเล็กน้อย โคนต้นอวบใหญ่ประมาณ 1 เมตร เมื่อความสูงประมาณ 4 เมตร ลำต้นจะเริ่มเรียวยาว วัดโดยรอบได้ประมาณ 40 เซนติเมตร ระยะความสูง 10 เมตร นับจากพื้นดิน เปลือกลำต้นขรุขระมีสีซี้ถ้าเป็นวงซ้อนๆ กัน

ใบ มีลักษณะเป็นรูปใบพัด (Fan leaf หรือ Palmate) มีขนาดใหญ่ และหนา โดยแต่ละใบจะมีใบย่อย เรียกว่า Segment ซึ่งจะแตกออกจากจุดๆ เดียวกันที่ปลายก้านใบ ยอดตาลแต่ละต้นประกอบด้วยใบตาลประมาณ 25 - 40 ใบ แล้วแต่อายุตาล ใบมีสีเขียว ใบแก่จะมีสีน้ำตาลอ่อนห้อยแนบลำต้น

ดอก ออกดอกเป็นช่อโดยดอกตัวผู้และตัวเมียจะอยู่แยกต้นกัน ช่อดอกของตัวผู้เรียกว่า “วงตาล” แตกแขนงออกเป็น 2 - 4 วงต่อช่อ ความยาวของวงประมาณ 30 - 40 เซนติเมตร ในแต่ละวงมีดอกเล็กๆ ต้นตัวผู้ต้นหนึ่งจะมีช่อดอก 3 - 9 ช่อ ส่วนช่อดอกของต้นตัวเมียเรียกว่า

“ปลีตาล” ต้นตัวเมียจะออกช่อหลังต้นตัวผู้เล็กน้อยประมาณ 10 ช่อ ขนาดใหญ่และชุ่มน้ำหวานมากกว่า ในแต่ละช่อจะมีดอกน้อยกว่าดอกตัวผู้ โดยทั้งตัวผู้และต้นตัวเมียจะทยอยออกช่อเรื่อย ๆ สามารถเก็บน้ำตาลได้ตลอดปี

ผล จะออกกับต้นตัวเมียเท่านั้น ระยะเวลาตั้งแต่ออกดอกจนถึงเก็บผลอ่อนใช้เวลาประมาณ 75 - 80 วัน โดยแต่ละทะลายจะมี 10 - 20 ลูก ผลอ่อนสีเขียว ผลแก่สีน้ำตาลเข้มถึงดำ เนื้อภายในเป็นเส้นใยละเอียดเมื่อสุกจะประกอบไปด้วยแป้งและน้ำตาล มีสีเหลืองแก่ และมีกลิ่นหอม นิยมใช้ทำขนมตาล ส่วนประกอบของผลตาลแบ่งออกเป็น 5 ส่วน คือ เปลือกชั้นนอก (Exocarp) ส่วนที่เป็นเส้นใย (Mesocarp) ส่วนที่เป็นกะลาแข็งหุ้มเมล็ด (Endocarp) ส่วนเนื้อในเมล็ด (Endosperm) และส่วนเมล็ด (Embryo) [34] ดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 ส่วนประกอบของผลตาลโตนดสุก

ที่มา : มารวย (2541) [34]

ลอนตาลโตนดตัวเมียจะมีลูกตาลเป็นทะลาย ต้นตาลโตนด 1 ต้น สามารถให้ลูกตาลเฉลี่ย 10 - 13 ทะลายต่อปี ใน 1 ทะลายจะมีผลเฉลี่ย 5 - 10 ผล ลูกตาล 1 ผล จะมีลอนตาลประมาณ 2 - 3 ลอน ขึ้นอยู่กับฤดูกาลแทงช่อดอก ลอนตาลจะเป็นเนื้อสีขาว อ่อนนุ่ม มีรสหวานมัน [34]

2.4.2 พันธุ์ของตาลโตนดในประเทศไทย

พันธุ์ของตาลโตนดที่ปลูกทั่วไป มีอยู่ 3 พันธุ์ ได้แก่

ตาลโตนดพันธุ์หม้อ ลำต้นตรงใหญ่แข็งแรง ลูกใหญ่ ผลค่อนข้างดำ เปลือกหนาใน 1 ผล มี 2 - 4 เมล็ดจะให้ผลเมื่ออายุ 10 ปีขึ้นไป (ภาพที่ 2.7) [35]

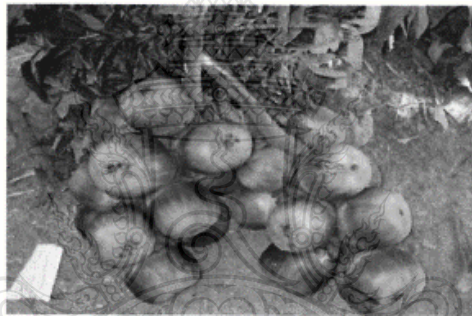


ภาพที่ 2.7 ตาลพันธุ์หม้อ

ที่มา : จันทรเพ็ญ (2544) [35]

1 ผล มี 2 - 4

เมล็ด ให้ผลเมื่ออายุมากกว่า 10 ปีขึ้นไป เกษตรกรไม่นิยมปลูกเพราะเมล็ดมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 2.8)



ภาพที่ 2.8 ตาลพันธุ์ไข่

ที่มา : จันทรเพ็ญ (2544) [35]

2 - 3

เมล็ด ให้ผลเมื่ออายุมากกว่า 10 ปีขึ้นไป (ภาพที่ 2.9)



ภาพที่ 2.9 ตาลพันธุ์ลูกผสม

ที่มา : จันทรเพ็ญ (2544) [35]

2.4.3 การใช้ประโยชน์ต้นตาลโตนด

ประโยชน์ด้านระบบนิเวศ ต้นตาลที่ขึ้นตามท้องทุ่งนาปกติจะมีนกชนิดต่างๆ เช่น นกฮูก นกเค้าแมว ทำรังบนต้นอยู่เสมอ นกเหล่านี้จะช่วยควบคุมแมลง ให้ปุ๋ยแก่नाข้าวโดยมูลของมัน และต้นตาลจะช่วยป้องกันลมพายุนอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงสภาพดินให้ดีขึ้นด้วย [36]

นอกจากนี้น้ำตาลสดที่ได้จากช่อดาลสามารถนำมาทำน้ำตาลปึกใช้ประกอบอาหารคาวหวานได้หลายอย่างมากมาย เปลือกแก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และลดกรดในกระเพาะ รากต้มดื่มแก้ร้อนใน กระหายน้ำ แก้ไข้ ขับพยาธิ ส่วนของวงตาลแก่โรคชาง กาบหรือก้านใบสดนำมาอังไปบิบน้ำ แก้ท้องร่วง ท้องเสีย [37]

ผนังชั้นกลาง (Mesocarp) ของผลของตาลโตนดเมื่อสุกเต็มที่จะมีสีเหลือง ซึ่งนิยมนำมาคั้นเพื่อเตรียมเป็นแป้งตาลโตนดและนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของการทำขนม เช่น ขนมตาล ไอศกรีม และเค้ก สำหรับน้ำสามารถนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลได้จากการตรวจสอบรายงานการวิจัย พบว่าการผลิตเอทานอลจากผลตาลโตนดยังมีน้อย ซึ่งงานวิจัยแรกที่มีการศึกษาการผลิตแอลกอฮอล์จากตาลโตนด คือ งานวิจัยของ Teeparuksapun (2019) [38] ซึ่งได้นำส่วนของผลตาลโตนดมาใช้ในการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae*

ขวัญใจ (2561) [65] ศึกษา น้ำเลี้ยงจากช่อดอกเพศผู้ และเพศเมีย นำไปต้มเพื่อเป็นเครื่องดื่ม หรือนำมาเคี่ยวทำน้ำตาล น้ำตาลที่ได้จากตาลโตนดมีแร่ธาตุและสารอาหารหลายชนิด เช่น แคลเซียม โพแทสเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส ไทอามีน ไรโบฟลาวิน วิตามินเอ ซี ปี1 ปี2 ปี3 และปี6 ซึ่งสารอาหารเหล่านี้ ไม่สามารถพบได้ในน้ำตาลทราย นอกจากนี้ น้ำตาลโตนดยังให้ค่าดัชนีน้ำตาลที่ต่ำ (Glycemix index, GI) อยู่ที่ 35 - 42 ซึ่งน้อยกว่าน้ำตาลทรายที่มีค่าดัชนีน้ำตาลที่สูงอยู่ที่ 58 - 82

Masayuki (2007) [39] ได้การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดเอทานอลของเปลือกหุ้มเมล็ดของ *Borassus flabellifer* พบว่าสามารถยับยั้ง *Aspergillus brasiliensis* และ *Bacillus subtilis* ด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 22 มิลลิเมตร และ 23 มิลลิเมตร ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์สารสกัด *Borassus flabellifer* พบว่ามี Saponins, Tannins, Flavonoids and Glycosides

Subashini (2015) [40] ศึกษาการวิเคราะห์ทางเคมีโดยแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (GCMS) พบสารประกอบ 28 ชนิด คือ Resorcinol, Phenol กรด Pentanoic, Glycerin, 10-undecenyl ester, Octadecanoic acid และ n-Hexadecanoic acid สารประกอบเหล่านี้สามารถนำมาใช้สำหรับการใช้งานที่หลากหลาย เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบต้านจุลชีพ และต้านมะเร็ง

Ramya (2018) [41] สารพฤกษเคมีในเนื้อสดของลูกตาลอุดมไปด้วยวิตามิน A และ C ในขณะที่ Sap หรือน้ำตาลมี n-Hexadecanoic acid, Pentanoic acid, 10-undecenyl ester, Octadecanoic acid, Phenol, 3,4,5-trimethoxy-, Phenol, 5- (1,5- dimethyl-4-hexenyl)-2-methyl-, (R)-, Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5- dihydroxy-6-methyl-, Resorcinol, Phenol, 2,6-dimethoxy-,6H-Purin-6-one, 2-amino- 1,7-dihydro, 6H-Purin-6-one, 2-amino-1,7-dihydro-, 1,4- Benzenediol, 2-methoxy, Phenol, 3,4-dimethoxy, Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-, Phenol, 4-[2-(dimethylamino) ethyl], 1-Butanol, 2-amino-3-Hydroxy-4-methoxybenzoic acid

Pramod (2013) [42] รายงานฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตาลโตนด (*Borabus flabellifer* Linn) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ DPPH assay พบ (2, 2-Diphenyl-1 picryl hydrazyl) และ ABTS (2, 2-azinobis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) การวิเคราะห์พฤกษเคมีพบ Saponins, Tannins, Flavonoids, Carbohydrates, Amino acids และ ฟีนอล

การศึกษาสารสกัดแอลกอฮอล์ (ALEBF) ของ *Borabus flabellifer* ต่อสภาวะน้ำตาลในเลือดของหนูปกติและหนูที่เป็นเบาหวาน ในเวลา 7 วัน พบว่าหนูที่เป็นเบาหวานตอบสนองต่อสารสกัด (ALEBF) ของ *Borabus flabellifer* โดยระดับน้ำตาลในเลือดลดลง และมีระดับน้ำตาลในเลือดที่ขึ้นลดระดับอินซูลินเมื่อเปรียบเทียบกับ dexamethasone ในหนูที่ไม่ได้รับสารสกัด [43]

2.4.4 น้ำตาลโตนด

น้ำตาลโตนด มีชื่อสามัญเป็นภาษาอังกฤษว่า Palmyra palm เป็นน้ำตาลที่ได้จากช่อดอกของต้นตาลโตนด (*Borassus flabellifer* Linn.) เป็นพืชตระกูลปาล์มที่สามารถขึ้นได้ในเขตร้อนพบโดยทั่วไปในแถบทวีปเอเชีย เช่น ไทย พม่า อินเดียน เขมร และศรีลังกา [44] ในประเทศไทยพบได้ที่จังหวัด นครปฐม สุพรรณบุรี ชัยนาท เพชรบุรี สงขลา เป็นต้น [33] น้ำตาลโตนดสดสามารถนำมาแปรรูปผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด เช่น น้ำตาลเข้มข้น น้ำส้มสายชูหมัก น้ำตาลโตนดพาสเจอร์ไรซ์ และ น้ำตาลโตนดสเตอริไลซ์ เป็นต้น [45]

น้ำตาลเป็นสารให้ความหวานธรรมชาติที่ได้จากผลไม้โดยไม่ต้องใช้สารเคมีสังเคราะห์ สารเติมแต่งหรือสารกันบูด ชื่อดั้งเดิมของน้ำตาลโตนดคือ Gur ในอินเดียเหนือและ Panela ในเม็กซิโกและอเมริกาใต้ มีแร่ธาตุ โปรตีนและวิตามิน น้ำตาลโตนดมีคุณค่าทางโภชนาการที่ดีและคุณค่าทางยาเป็นยาอายุรเวท อินเดียผลิตน้ำตาลโตนดมากกว่า 70% ของทั้งหมด [45] การผลิตอยู่ในอุตสาหกรรมในอินเดียด้วยการควบคุมคุณภาพไม่ดี สภาวะการจัดเก็บค่าน้ำตาลโตนดที่ระดับผู้ผลิต เกษตรกรแย่มาก เพราะเก็บไว้ในโกดัง ของใช้ในครัวเรือนและระบบจัดเก็บในสภาพที่ไม่ถูกสุขลักษณะไม่ได้รับการ

บำรุงรักษาอย่างเข้มงวดซึ่งทำให้มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและไม่ทำให้เกิดโรคหลายชนิดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเหล่านี้ อาจทำให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์รวมถึงภาพลักษณ์โดยรวมของน้ำตาลโตนด.

2.4.5 วิธีการเก็บน้ำตาลสดจากต้นตาลตัวผู้

ขนาดต้นตาลที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวน้ำตาลหวาน คือ หลังจากที่ยอดงวงยาวประมาณ 50 เซนติเมตร ดอกบานพอประมาณให้รวบงวงตาลเข้าด้วยกันใช้ไม้คาบตาล บีบงวงเบาๆ วันละครั้ง ทำติดต่อกันประมาณ 3 - 4 วัน แล้วหักปลายงวงทิ้งประมาณ 1 นิ้ว ใส่กระบอกรับน้ำทิ้งไว้ประมาณ 3 คืน วันถัดมาขึ้นเหน้าในกระบอกรับน้ำทิ้งไว้ 1 คืน แล้วลองปาดตาลโดยทำในตอนเช้าถ้ามีน้ำไหลซึมออกมาไม่หยุดถือว่าใช้ได้ โดยใช้กระบอกรับน้ำตาลสด ซึ่งทำจากไม้ไผ่ใส่ไม้พะยอมหรือไม้เคี่ยม ที่ตัดเป็นชิ้นๆ ขนาด 3 - 5 กรัม โดยไม้เคี่ยมหรือไม้พะยอมจะช่วยป้องกันและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ไม่ให้น้ำตาลสดเน่าเสีย [33] [45] [46]

2.4.6 วิธีการเก็บน้ำตาลสดจากต้นตาลตัวเมีย

เวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บน้ำตาลหวานคือ หลังจากช่อดอกบานเป็นจั่นแล้ว ขนาดเท่า ลูกมะขวิดหรือใหญ่กว่าให้ขนาดตาลระหว่างจั่นโดยใช้ไม้คาบตาลขนาดติดต่อกันประมาณ 3 วัน หักปลายจั่นทิ้ง ประมาณ 1 นิ้ว ปาดจั่นดูถ้ามีน้ำไหลออกมาไม่หยุดแสดงว่าใช้ได้ หลังจากนั้นใช้กระบอกรับไม้ไผ่ที่มีการเติมไม้เคี่ยมหรือไม้พะยอม ประมาณ 3 - 5 กรัม แขนงรองรับน้ำตาลสด โดยทั่วไปเกษตรกรไม่นิยมเก็บน้ำตาลหวานจากต้นตัวเมีย ส่วนใหญ่จะปล่อยให้ออกจั่นติดผลเพื่อเก็บผลตาลมากกว่า [33] ช่วงเวลาที่เก็บน้ำตาลอยู่ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงปลายเดือนพฤษภาคม โดยแต่ละวันจะเก็บน้ำตาล 2 ครั้ง คือช่วงเช้ามีดกับช่วงบ่าย โดยเฉลี่ยต้นตาลตัวเมียจะให้ น้ำตาลวันละ 4 - 5 ลิตรต่อต้น ส่วนต้นตาลตัวผู้ จะให้น้ำตาลวันละ 3 ลิตรต่อต้น [33] นอกจากนี้พบว่า การเก็บน้ำตาลโตนดในตอนเช้าให้ปริมาณมาก และมีความหวานสูงกว่าการเก็บน้ำตาลในช่วงบ่ายอีกด้วย [44]

2.4.7 องค์ประกอบของน้ำตาลโตนด

จากการศึกษาของกรมส่งเสริมการเกษตร (2544) [33] รายงานว่า น้ำตาลโตนดสด ประกอบไปด้วยปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ร้อยละ 11.54 (น้ำตาลอินเวอร์ท) น้ำตาลซูโครสร้อยละ 13 - 17 น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.8 โปรตีน ร้อยละ 0.002 - 0.03 ค่าพีเอชประมาณ 4.69 ปริมาณทั้งหมดเท่ากับ ร้อยละ 0.098 และค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ เท่ากับ 13.93° บริกซ์ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำตาลสด

องค์ประกอบ	น้ำตาลสด (a)	น้ำตาลสด (b)
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	5.09	5.76
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด	13.08	11.20
ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (%)	12.34	10.91
ปริมาณความเป็นกรดทั้งหมด (% as Lactic acid)	0.036	0.032

ที่มา : (a) เรณูกา (2545) [46]

(b) สุภารัตน์ (2547) [45]

จากตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำตาลสดจากรายงานก่อนหน้านี้ เปรียบเทียบกันพบว่าระยะเวลาระหว่างรองรับน้ำตาลสดที่ต้น จะส่งผลถึงคุณภาพน้ำตาลสด จะมีผลให้ค่า pH ของน้ำตาลสดลดลง และสอดคล้องกับปริมาณกรดเพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียพวกกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้น [45] [46]

การพิจารณาองค์ประกอบของน้ำตาลสดควรจะต้องแยกความแตกต่างระหว่าง Sweet toddy และ Toddy ออกจากกัน โดย Sweet toddy คือ น้ำตาลสดที่สดจริงๆ ยังไม่มีกระบวนการทำให้บูดเกิดขึ้น และส่วนของ Toddy คือ น้ำตาลสดที่เกิดการบูดขึ้นในสภาวะที่ใส่ไม้พะยอมหรือไม่ใส่ไม้พะยอม [47] ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติของน้ำตาลสดอายุการเก็บเกี่ยว 12 ชั่วโมงที่ใส่เปลือกไม้พะยอมและไม่ใส่เปลือกไม้พะยอม

คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมี	ใส่ไม้พะยอม	ไม่ใส่ไม้พะยอม
วิตามิน ซี (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	0.08	0.09
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (มิลลิกรัม/100มิลลิลิตร)	13.80	14.20
น้ำตาล (กรัม/100มิลลิลิตร)	12.34	13.11
กรด (กรัม/100มิลลิลิตร)	0.04	0.13

ที่มา: ดัดแปลงจากอินทธีมา (2557) [47]

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติของน้ำตาลสดอายุการเก็บเกี่ยว 12 ชั่วโมงที่ใส่เปลือก
ไม้พะยอมและไม้ใส่เปลือกไม้พะยอม (ต่อ)

คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมี	ใส่ไม้พะยอม	ไม่ใส่ไม้พะยอม
โปรตีน (กรัม/100มิลลิตร)	0.37	0.32
เถ้า (กรัม/100มิลลิตร)	1.04	1.00
ความชื้นร้อยละ	84.47	84.65
ค่าความเป็นกรด-เบส (pH)	5.09	4.15

ที่มา: ดัดแปลงจากอินทธีมา (2557) [47]

2.4.8 จุลินทรีย์ในน้ำตาลโตนด

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบในน้ำตาลสด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus vulgatus*, *Aerobacter aerogens*, *Actinomyces*, *Saccharomyces*, *Penicillium Mucor*, และ *Aspergillus* [48]

Savitree *et al.* (2020) [49] ศึกษาชุมชนยีสต์ในน้ำตาลมะพร้าวสด ตาลโตนด และน้ำตาลต้นจาก และความสามารถในการหมักเอทานอลของยีสต์ที่แยกได้ โดยนำเก็บตัวอย่างน้ำตาล 30 ตัวอย่าง รวบรวมจากภาคกลาง (สมุทรสงคราม, เพชรบุรี และชัยนาท) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (ฉะเชิงเทรา) และภาคใต้ของประเทศไทย (นครศรีธรรมราช และตรัง) แยกยีสต์ออกจากตัวอย่างน้ำตาลสดแต่ละตัวอย่างโดยใช้เทคนิค Serial dilution ตัวอย่างที่เจือจาง 0.1 มิลลิตร กระจายตัวอย่างบน Yeast extract-malt extract (YM) (สารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.3 สารสกัดจากมอลต์ร้อยละ 0.3 เปปโตนร้อยละ 0.5 และ น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 1 วุ้นเสริมร้อยละ 0.02 Chloramphenicol และโซเดียมโพรพิโอเนต ร้อยละ 0.025) และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน เลือกโคโลนีของยีสต์ที่มีลักษณะต่างกันทำให้บริสุทธิ์โดยการทำ Cross streaking ซ้ำๆ บนวุ้น YM ยีสต์ที่แยกได้บริสุทธิ์จะถูกนำไปเลี้ยงใน YM broth ที่เสริมด้วยกลีเซอรอลร้อยละ 10 (v/v) และเก็บรักษาในช่องแช่แข็งที่ -80°C และนำตัวอย่างมาทำการหาลำดับดีเอ็นเอ และการระบุยีสต์โดยใช้เทคนิค PCR พบสายพันธุ์ที่มีโอกาสพบมากที่สุดใต้น้ำตาลสดของมะพร้าว ตาลโตนด และต้นจาก คือ *Saccharomyces Cerevisiae* ร้อยละ 76.67, 86.70 และ 100 ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจนในชุมชนยีสต์จากน้ำตาลของปาล์มทั้งสามชนิด รวม 199 ไอโซเลท ชื่อ *Candida sanyaensis* 26 สายพันธุ์ *Candida tropicalis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Lachancea fermentati*, *Lachancea thermotolerans*, *Pichia kudriavzevii* และ *Saccharomyces Cerevisiae* ผลิตปริมาณเอทานอล

สูงตั้งแต่ 69.57-76.74 g/L ผลการวิจัยพบว่ายีสต์ในน้ำตาลของปาล์มสามารถมีบทบาทในการหมักน้ำตาลตามธรรมชาติ

Aline *et al.* (2006) [50] วิเคราะห์ทางชีวภาพเพื่อปรับปรุงคุณภาพของน้ำตาลโตนดจากการวิเคราะห์สามารถแยกเชื้อ ได้แก่ *Acinetobacter*, *Bordetella*, *Corynebacterium*, *Enterococcus* และ *Xanthomonas* เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ มีฤทธิ์ต้านยาปฏิชีวนะหลายชนิดซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ และสัตว์ ดังนั้นจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ในการผลิตน้ำตาลโตนดจะต้องมีการจัดการคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของน้ำตาลโตนดอย่างดีที่สุด และยังพบจุลินทรีย์ 8 ชนิดซึ่งแยกได้จากน้ำตาลโตนดที่เก็บไว้ ได้แก่ *Alcalogenes*, *Xanthomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Alteromona* *Bordetella* และ *Enterococcus*. ยีสต์ และจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ *Leuconostoc mesentroides*, *Leuconostoc dextranicum* และ *Aerobacter arogenes* [51]

Leong (1953) [52] ศึกษาน้ำตาลเมานำมาจากร้านเหล้าในแหล่งต่างๆ ของประเทศสิงคโปร์ พบ เดกโตรส ร้อยละ 1.94 กรดอะซิติก ร้อยละ 0.42 ซูโครส ร้อยละ 1.13 แอลกอฮอล์ ร้อยละ 5.01 และโปรตีน ร้อยละ 0.22 และยังพบว่ามีความสัมพันธ์และองค์ประกอบต่างๆ ของยีสต์ทำให้น้ำตาลเมาน่าเพิ่มคุณค่าทางสารอาหาร คือ วิตามินบี 1 เพิ่มขึ้น

Faparusi (1974) [53] ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำตาลที่หมักเป็นเวลา 7 วันพบว่าภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก จุลินทรีย์ที่มีบทบาทมากที่สุดคือ *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* หลังจาก 48 ชั่วโมง ตรวจสอบพบว่า *Acetobacter* sp. และหลังจาก 72 ชั่วโมง หลังการหมักตรวจสอบเชื้อยีสต์อีกกลุ่มหนึ่งซึ่งประกอบด้วย *Pichia* sp., *Schizosaccharomyces pombe* และ *Candida mycoderma* นอกจากนี้ยังพบเชื้อราพวก *Aspergillus flavus*, *Mucor* sp. และ *Rhizopus* sp.

Okolie (2013) [54] ศึกษาการหมักไวน์ปาล์มซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แบบดั้งเดิมจากต้นปาล์มของชุมชน Idiaba, Abeokuta, Ogun State, ไนจีเรีย วิเคราะห์จากลำดับ 16s rRNA พบแบคทีเรียกรดแลคติกที่สำคัญ ได้แก่ *Lactobacillus* sp, *Lactobacillus casei* strain zhang, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp *dextranicum*, *Leuconostoc lactis*, *Pediococcus parvulus* strain Bpe- 299, *Acetobacter pomorum*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacterium bacterium*, *Acidovorax* sp, *Comamonas* sp, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus piscifermentans* กรดแลคติกที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดสภาวะเป็นกรดในไวน์ปาล์ม

Okolie et al. (2013) [54] ศึกษาแบคทีเรียในน้ำตาลเมาจากต้นปาล์ม *Elaeis sp.* และ *Raphia sp.* ในประเทศไนจีเรีย พบว่าแบคทีเรียที่มักพบมากมี 5 จี๊นัส คือ *Micrococcus*, *Leuconotoc*, *Streptococcus*, *Lactobabillus* และ *Acetobacter* โดยเฉพาะในกลุ่ม Lactic acid Bacteria และ Gram Negative Bacteria จะสร้างกรดทำให้ pH ของน้ำตาลลดลงจาก 7.0 เหลือประมาณ 4.5 เป็นต้น [55] เช่นเดียวกันกับการศึกษาวิจัยของ Leong (1953) [53] ศึกษาแบคทีเรียในน้ำตาลสดจากปาล์ม *Elaeis guinensis* พบแบคทีเรียที่คล้ายคลึงกัน

ปราโมทย์ (2525) [56] ได้ศึกษายีสต์ในน้ำตาลสด น้ำตาลเมา ลูกแป้งสุรา และเชื้อสายพันธุ์ดีที่คัดเลือกเพื่อการผลิตแอลกอฮอล์ พบว่าชนิดของยีสต์ในน้ำตาลสด เช่น *Candida saka*, *Candida sorbosn*, *Torulopsis condia*, *Pichia ohmeri*, *Saccharomycodes ludwigii* และ *Candida sp.* ส่วนน้ำตาลเมาพบ *Saccharomycos chevalieri* เป็นต้น ซึ่งก่อนหน้านี้นี้ ปราโมทย์ (2521) [6] ได้รวบรวมข้อมูลสายพันธุ์ยีสต์ที่พบในน้ำตาลสดและน้ำตาลเมาของต่างประเทศ (ดังแสดงในตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 ชนิดของยีสต์ที่พบในน้ำตาลสดและน้ำตาลเมาของต่างประเทศ

ชนิดของยีสต์	ทวีปเอเชีย	ทวีปแอฟริกา
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>		ลิเบีย
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	อินเดีย	กานา, ไนจีเรีย, Gold coast
<i>Saccharomyces chevalieri</i>	ฟิลิปปินส์, ปากีสถาน	คองโก
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>		คองโก
<i>Saccharomyces florentinus</i>		ไนจีเรีย
<i>Saccharomyces laghbi</i>		ลิเบีย
<i>Saccharomyces pastorianus</i>		คองโก
<i>Saccharomyces rosei</i>		ไนจีเรีย
<i>Saccharomyces vafer</i>		ไนจีเรีย
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ปากีสถาน, ญี่ปุ่น	ลิเบีย, ไนจีเรีย, Gold coast
<i>Saccharomyces spp.</i>	-	ไนจีเรีย
<i>Saccharomyces bailii</i> var. <i>bailii</i>	ฟิลิปปินส์	-
<i>Candida sp.</i>	ฟิลิปปินส์	ไนจีเรีย

ที่มา: ดัดแปลงจาก ปราโมทย์ (2521) [6]

ตารางที่ 2.3 ชนิดของยีสต์ที่พบในน้ำตาลสดและน้ำตาลเมาของต่างประเทศ (ต่อ)

ชนิดของยีสต์	ทวีปเอเชีย	ทวีปแอฟริกา
<i>Candida krusei</i>	-	Gold coast
<i>Candida nycoderma</i>	-	ไนจีเรีย, Gold coast
<i>Endomycopsis fibuligera</i> var. <i>monospora</i>	ญี่ปุ่น	-
<i>Endomycopsis vini</i>	-	ไนจีเรีย
<i>Hansenula</i> sp.	-	Gold coast
<i>Kloeckera apiculata</i>	ญี่ปุ่น, ฟิลิปปินส์	ไนจีเรีย, Gold coast
<i>Pichi</i> spp.	-	ไนจีเรีย
<i>Pichia vini</i> var. <i>vini</i>	ญี่ปุ่น, ฟิลิปปินส์	
<i>Pichia farnose</i>	ญี่ปุ่น	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	ญี่ปุ่น	ไนจีเรีย

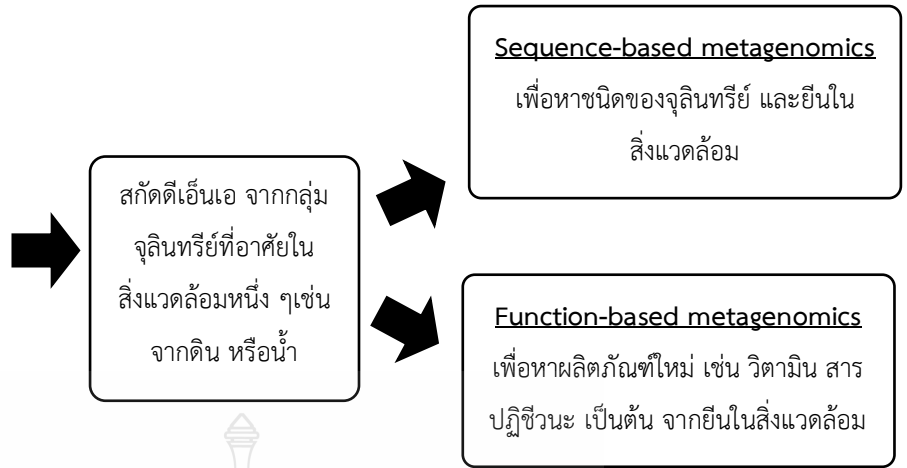
ที่มา: ดัดแปลงจาก ปราโมทย์ (2521) [6]

จากการศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในน้ำตาลโตนดสดที่เก็บเกี่ยวแบบวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร จากอำเภอสิงหนคร และอำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา พบว่าตัวอย่างน้ำตาลโตนดสดที่ใช้ไม่เคี้ยวและไม่ใช้ไม้เคี้ยวเป็นวัตถุดิบเสียมีปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นทั้งหมดเท่ากับ 10^8 และ 10^9 cfu/ml ตามลำดับ สำหรับปริมาณโคลิฟอร์มพบว่า ทั้งในตัวอย่างที่ใช้ไม้เคี้ยวและไม่ใช้ไม้เคี้ยว มีปริมาณสูงถึง 10^3 cfu/ml [57]

2.5 เมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics)

เมตาจีโนมิกส์ คือ การวิเคราะห์จีโนมของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในหนึ่งชุมชน (Community) โดยคำนิยามนั้นจะแตกต่างจาก Genomics ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ดีเอ็นเอในจีโนมของเซลล์หนึ่งเซลล์ หรือสิ่งมีชีวิตหนึ่งชนิดเท่านั้น [58] ในภาษกรีกคำแปลที่เหมาะสมที่สุดของคำว่า “Meta” ก็คือ “เกินกว่า” หรือ “เหนือกว่า” (หรือคำว่า Beyond ใน ภาษาอังกฤษ) ดังนั้นศัพท์คำนี้จึงแปลได้ว่า “การ ศึกษาจีโนมที่เกินกว่าหนึ่งจีโนมขึ้นไป” [58] ศัพท์คำนี้ได้ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในงานตีพิมพ์เมื่อปีค.ศ.1998 ในงานวิจัยศึกษาจุลินทรีย์ในดินโดยใช้การโคลนนิ่งดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติ ด้วยวิธีแบบสุ่ม [59] ต่อมาคำนิยามนี้ก็ได้รับการเปลี่ยนแปลงไป โดยได้รวมถึง

การศึกษาใดๆ ก็ตามที่เป็นการศึกษาวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตทั้งหมด (ในที่นี้คือ จุลินทรีย์) ในหนึ่งชุมชนชีวตัวอย่างของการวิเคราะห์ เช่น การศึกษาโดยตรงถึงความหลากหลายของลำดับเบสของยีน 16S rRNA จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ไปจนถึงการสกัด และวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมโดยไม่ต้องเพาะเชื้อ [60] ทั้งนี้อาจจะมีข้อโต้แย้งว่าถ้ามีการเพาะเลี้ยงเชื้อในตัวอย่างๆ หนึ่ง ก่อนเพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนประชากรสิ่งมีชีวิตที่สนใจให้มากขึ้น หรือเพื่อให้สปอร์ในตัวอย่างนั้นๆ แยกออกมาก่อนแล้วจึงทำการศึกษาก็อาจจะเรียกว่าเป็นวิธีเมตาจีโนมิกส์ได้เช่นกัน ดังนั้นคำนิยามดังกล่าวจึงควรที่จะมีไว้แบบกว้างๆ ไม่จำกัดให้เฉพาะลงไปให้มากนัก [58] โดยสรุปแล้วคำนิยามที่ใช้ในปัจจุบันของเมตาจีโนมิกส์คือการศึกษาดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างธรรมชาติซึ่งรวมถึงจีโนมของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในหนึ่งตัวอย่างทั้งนี้ จุลินทรีย์ที่อยู่ในตัวอย่างธรรมชาติที่ศึกษานั้น ส่วนใหญ่เพาะเลี้ยงไม่ได้ (Unculturable) ดังนั้นเมตาจีโนมิกส์ จึงครอบคลุมไปถึงการศึกษาจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงไม่ได้ด้วยการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากสิ่งแวดล้อม เริ่มต้นในปี พ.ศ. 2528 โดย [61] และทีมงานของเขา อย่างไรก็ตามคำศัพท์ใหม่ของ Metagenome เกิดขึ้นในปี 1998 โดยนักวิจัยชื่อ Handelsman เมตาจีโนมิกส์ คือการศึกษาจีโนมจากชุมชนจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม [62] [63] คำศัพท์อื่นๆ ของเมตาจีโนมิกส์ ได้แก่ จีโนมิกส์ชุมชนจีโนมิกส์สิ่งแวดล้อมและจีโนมิกส์ประชากร [64] เมตาจีโนมิกส์มีทิศทางในการศึกษาแบ่งออกเป็นสองการศึกษาหลัก ได้แก่ เมตาจีโนมิกส์เชิงโครงสร้าง และเมตาจีโนมิกส์เชิงหน้าที่ ข้อดีของการศึกษาเมตาจีโนมิกส์ เช่นการตรวจจับแบคทีเรียอาร์เคียไวรัส และยูคาริโอต จัดทำโปรไฟล์ของสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ในทุกโดเมน การวิเคราะห์จีโนมที่ใช้งานได้ ศึกษาวิวัฒนาการ และการตรวจหาเชื้อโรค เป็นต้น มีการใช้เทคนิค และวิธีการที่นำไปสู่เป้าหมายค่อนข้างหลากหลาย และพัฒนาไปพร้อมๆ กับการศึกษาโดยขั้นตอนแรกคือการสกัดแยกสารพันธุกรรม (โดยเน้น DNA) จากสิ่งมีชีวิตทั้งหมดในสิ่งแวดล้อมที่สนใจศึกษาโดยตรงซึ่งอาจมาจากดิน น้ำทะเล ตะกอนใต้ทะเล ปากของมนุษย์ ลำไส้ของมนุษย์ เป็นต้น ปัจจุบันยังมีการสกัด RNA หรือโปรตีนทั้งหมดมาศึกษาด้วย จากนั้นนำเอา DNA ที่ได้ไปสร้างเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (Metagenomic library) โดยการโคลนเข้าไปในเวกเตอร์แล้วนำเวกเตอร์ส่งถ่ายเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน (Host) คัดเลือกโคลนไปศึกษาหาลำดับเบสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ซึ่งในปัจจุบันการใช้เทคนิคในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ใหม่ๆ สามารถทำได้โดยตรงจากตัวอย่าง DNA ที่สกัดโดยไม่ต้องสร้าง library ซึ่งทำให้รวดเร็วมากยิ่งขึ้นกว่าเดิม การศึกษาจุลินทรีย์โดยวิธีเมตาจีโนมิกส์สามารถแบ่งตามวัตถุประสงค์ในการศึกษาได้ เป็น Function based metagenomics และ Sequence-based metagenomics ดังภาพที่ 2.10

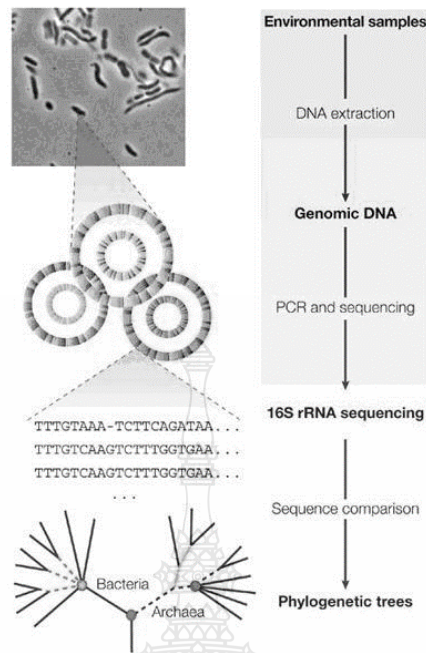


ภาพที่ 2.10 ขั้นตอนในการศึกษาเมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics)

ที่มา : โชติมา (2553) [8]

Function-based Metagenomics มีวัตถุประสงค์การศึกษาเพื่อค้นหาสิ่งที่จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ผลิตได้ เช่น เอนไซม์ ยาปฏิชีวนะ หรือผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ไม่สามารถแยกได้มาก่อนจากจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ ซึ่งอาจทำได้โดยการสกัดโปรตีนหรือเมทาบอลไลท์เพื่อนำไปศึกษาหรืออาศัยการสร้าง Library จาก DNA ที่สกัดได้ แล้วนำไปคัดเลือกลำโพงหรือโปรตีนใหม่ๆ ที่แสดงออกโดยแบคทีเรียที่มีชิ้นดีเอ็นเอชิ้นนั้น ๆ อยู่

Sequence-based metagenomics เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการศึกษาจุลินทรีย์โดยมีวัตถุประสงค์การศึกษาเพื่อระบุว่ากลุ่มประชากรที่ศึกษานั้นเป็นจุลินทรีย์ชนิดใดบ้างโดยการใช้ยีน 16S rRNA ในการวิเคราะห์โดยการออกแบบ Primer ที่จำเพาะต่อการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้จำแนก Species ของจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสของยีนที่สร้าง 16S rRNA ขั้นตอนการทำ (ดังภาพที่ 2.11) [66]



ภาพที่ 2.11 ขั้นตอนการทำ Sequence –based metagenomic เพื่อศึกษาลำดับเบสของ 16S rRNA และหาความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่ศึกษาโดย Phylogenetic trees

ที่มา : Tringe (2005) [66]

2.5.1 แนวทางในการศึกษาเมตาจีโนมิกส์

กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาเมตาจีโนมิกส์นั้น เริ่มตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในสิ่งแวดล้อมโดยตรง จากนั้นจึงวิเคราะห์ดีเอ็นเอเหล่านั้นโดยใช้แนวทางหลักๆ 3 แนวทาง คือ

2.5.1.1 ดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้จะถูกนำไปใช้เป็น Template เพื่อเพิ่มจำนวนในส่วนลำดับเบสของยีน *16S rRNA* หรือ *18S rRNA* ด้วยวิธีการ Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อศึกษาชนิดจุลินทรีย์ในชุมชนนั้น ๆ [67]

2.5.1.2 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะถูกนำไปเข้าสู่เวกเตอร์พาหะที่เหมาะสมและนำไปเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน เพื่อสร้างเป็น Metagenomic library [59] เพื่อศึกษาวิเคราะห์คุณสมบัติที่น่าสนใจได้ นับตั้งแต่การบ่งชี้ลำดับวิวัฒนาการ (Phylogenetic marker) เช่น การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *16S rRNA* ยีน *recA* หรือยีน อื่น ๆ ด้วยวิธี Hybridization หรือ Multiplex PCR (Stein, 1996) จนไปถึงการค้นหาเอนไซม์หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ (Knietsch, 2003) ซึ่งแบ่งออกได้เป็นวิธีคัดเลือกโดยอ้างอิงคุณสมบัติจำเพาะที่ต้องการศึกษา (Functionbased) หรือคัดเลือกโดยอ้างอิงลำดับเบสของยีนที่ต้องการ (Sequence-based) [68] [69]

2.5.1.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดของเมตาจีโนมิกส์ที่สกัดมาได้ ซึ่งวิธีการนี้ได้กลายเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ โดยใช้เทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสที่พัฒนาขึ้นใหม่ เช่น Pyrosequencing [69]

2.5.2 การใช้ประโยชน์เมตาจีโนมิกส์

Laetitia (2019) [70] ได้ใช้หลักเมตาจีโนมิกส์ประกอบ (MAGs) จาก DNA สิ่งแวดล้อมที่สกัดจากน้ำพุร้อนสองแห่งภายในระบบนิเวศภูเขาไฟบนคาบสมุทร Kamchatka ประเทศรัสเซีย ทำการศึกษาแยกเชื้อจุลินทรีย์ ความหลากหลายของจุลินทรีย์ รวบรวมจีโนมของแบคทีเรีย และอาร์เคีย โดยใช้ DNA ที่โคลนยีน 16S rRNA สรุปว่าสายวิวัฒนาการประกอบไปด้วยจีโนมจุลินทรีย์ที่มีอยู่ 3,240 สปีชีส์

Dang (2019) [71] สามารถใช้เมตาจีโนมิกส์เพื่อระบุสารชีวภาพเพื่อนำมาใช้ระบุชนิดพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับ Biocontrol ของมอสคลับที่พบมากในประเทศนิวซีแลนด์ ตรวจสอบโรคในพืชของ *Selaginella* ที่เป็นเนื้อร้าย ซึ่งอ่านจากลำดับของ *Xanthomonas translucens* และ *Pseudomonas syringae* มีความสัมพันธ์กันกับประชากรของ *Selaginella*

Palme (2017) [72] ศึกษา Metagenomic DNA sequencing ใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาอายุขีวนะความต้านทานในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันรวมถึง Microbiota ของมนุษย์

จากการศึกษาของ Agyirifo *et al.* (2019) [73] ศึกษาชุมชนจุลินทรีย์ของเมล็ดโกโก้ในการหมักตามธรรมชาติใน Amazon biome โดยใช้ การตรวจหาชุมชนจุลินทรีย์โดยวิธี Metagenomics โดยใช้แพลตฟอร์ม Illumina HiSeq พบว่า ชุมชนจุลินทรีย์คือ ประกอบด้วยกลุ่มยีสต์ เช่น *Pichia* และ *Candida* กลุ่มเชื้อราเส้นใย เช่น *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Fusarium*, กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Leuconostoc*, *Lactococcus* และ *Lactobacillus* กลุ่มแบคทีเรียกรดอะซิติก เช่น *Acetobacter* และ *Gluconobacter* กลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรีย และบาซิลลัส

Wu *et al.* (2017) [74] ทำการศึกษาชุมชนจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่เกิดขึ้นจากการหมักกรดอะซิติกของน้ำส้มสายชูแบบดั้งเดิมที่ผลิตจากธัญพืช ใช้เทคนิคเมตาจีโนมิกส์เพื่อหาถึงเครือข่ายเมตาบอลิซึมของแหล่งกำเนิดจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการสังเคราะห์รสชาติของน้ำส้มสายชูจากธัญพืชโดยน้ำส้มสายชูที่ใช้ คือน้ำส้มสายชูหอม Zhenjiang จากนั้น Bora *et al.* (2016) [75] ทำการศึกษาชุมชนของจุลินทรีย์ในการหมักไวน์ข้าว ผ่านวิธีการ Metagenomics ที่เกี่ยวข้องกับ Illuminebased วิธีการเรียงลำดับจีโนมทั้งหมด การศึกษาความหลากหลายของชุมชนจุลินทรีย์พบจุลินทรีย์ที่ผลิตอะไมเลส เช่น *Rhizopus delemar*, *Mucor circinelloides* และ *Aspergillus sp.* จุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล ได้แก่ *Meyerozyma guilliermondii* *Wickerhamomyces ciferrii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Debaryomyces hansenii*, *Ogataea parapolymorpha* และ *Dekkera*

bruxellensis แบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นบ่อยที่สุด *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc lactis*, *Weissella cibaria*, *Lactococcus lactis*, *Weissella paramesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, etc.

Verce et al. (2019) [76] ได้ทำการศึกษาน้ำ Kefir ซึ่งเป็นเครื่องดื่มผลไม้รสเปรี้ยวที่มีแอลกอฮอล์ และน้ำตาลเล็กน้อยซึ่งทำโดยการหมักสารละลายซูโครสในน้ำมะเดื่อแห้ง และเมล็ดคิเฟอร์น้ำ และจัดลำดับด้วยเมตาจีโนมิกส์ เพื่อตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีอยู่สองจุดในระหว่างการหมัก kefir โดยละเอียด ทั้งในสุรา Kefir และในเมล็ด Kefir ในน้ำ จากการตรวจสอบพบสายพันธุ์จุลินทรีย์ คือ *Lactobacillus harbinensis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus paracasei* และ *Lactobacillus* สายพันธุ์คล้ายกับ *Lactobacillus hordeimali* มีอยู่ในน้ำ kefir แล้วพบว่าตรวจสอบ *Bifidobacterium aquikefiri* และยีสต์สองสายพันธุ์คือ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Dekkera bruxellensis* จากการวิเคราะห์เชิงฟังก์ชันของชุดข้อมูล Metagenomic ทำให้สามารถเชื่อมโยงการผลิตกรดแลคติกกรดอะซิติกเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์กับกลุ่มย่อยของสายพันธุ์จุลินทรีย์ได้

Hong et al. (2016) [77] นำเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทั่วไปในประเทศจีน Chinese Rice Wine (CRW) เพื่อตรวจสอบอิทธิพลขององค์ประกอบของจุลินทรีย์ที่มีต่อคุณภาพของ Chinese Rice Wine (CRW) และการจัดลำดับสำหรับตัวอย่างไวน์ 110 ตัวอย่าง ในยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียและเชื้อรา Internal Transcribed Spacer II (ITS2) Bioinformatic การวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าคุณภาพเริ่มต้นยีสต์และไวน์สุดท้ายมีความสัมพันธ์กับองค์ประกอบทางอนุกรมวิธานของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งค้นพบการเน่าเสียของไวน์มีผลมาจากการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus* นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์ตัวอย่างไวน์จากตัวอย่าง 20 ตัวอย่างจำนวน 3 ชุดจากกลุ่มตัวอย่าง 110 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์ Metagenomics ผลการวิจัยพบว่าการเน่าเสียของไวน์เกิดจากการเติบโตอย่างรวดเร็วของ *Lactobacillus brevis* ในช่วงแรกของการหมักการวิเคราะห์การทำงานของยีนแสดงให้เห็นถึงความสำคัญ เช่นการสังเคราะห์ไบโอตินการหมักมอลแลคติกและการผลิตกรดไขมันสายสั้นผลิตภัณฑ์เหล่านี้นำไปสู่ข้อสรุปว่าการกิจกรรมของจุลินทรีย์มีผลต่อคุณภาพไวน์ดังนั้นการดูแลจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการจึงมีความสำคัญสำหรับโรงเบียร์แบบใช้เครื่องจักร

Djeni (2020) [78] ศึกษาไวน์ปาล์มซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แบบดั้งเดิมที่บริโภคกันมากที่สุดใแอฟริกาตะวันตกมีจุลินทรีย์และสารเมตาโบไลต์ที่ซับซ้อนซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อคุณภาพและมูลค่าโดยรวมของผลิตภัณฑ์ ในการศึกษาในปัจจุบันได้ใช้วิธี Metagenomic และ Metabolomic แบบผสมผสานเพื่ออธิบายโครงสร้างชุมชนของจุลินทรีย์และรายละเอียดการเผาผลาญของน้ำหมักจากปาล์ม 3 ชนิด (*Elaeis guineensis*, *Raphia hookeri*, *Borassus aethiopicum*) พบว่า

Lactobacillaceae ร้อยละ 47, *Leuconostocaceae* ร้อยละ 16 และ *Acetobacteriaceae* ร้อยละ 28 เป็นแบคทีเรียที่มีอยู่มากที่สุดและ *Saccharomyces cerevisiae* ร้อยละ 87 ซึ่งเป็นยีสต์ที่เด่นในเครื่องดื่มเหล่านี้



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)

- Spectrophotometer (ยี่ห้อ Metertech รุ่น SP-830 plus)
- Parafilm
- หลอดทดลอง
- กระจกกรอง 0.45 ไมครอน
- ขวดสีชา
- ขวดปรับปริมาตร
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) (ยี่ห้อ Hettich รุ่น EBA 20)
- ไมโครปิเปต (Micropipette) (ยี่ห้อ Onilab รุ่น MicroPette plus)

3.1.2 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (Kjeldahl Method)

- ขวดปรับปริมาตร
- เครื่องซั่งอย่างละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง 5
- ขวดย่อยไฮโดรคลอริก Kjeldahl Flask
- เครื่องกลั่น
- ขวดรูปชมพู่
- บิวเรตต์
- ขาตั้ง และตัวจับบิวเรตต์

3.1.3 วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์

- ไมโครปิเปต (Micropipette) (ยี่ห้อ Onilab รุ่น MicroPette plus)
- หลอดทดลอง
- Spectrophotometer (ยี่ห้อ Metertech รุ่น SP-830 plus)
- น้ำกลั่น

3.1.4 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (Kjeldahl Method)

- ขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีน (Kjeldahl Apparatus)
- เครื่องย่อย (Digestion Apparatus) (ยี่ห้อ Buchi รุ่น K-350)
- เครื่องกลั่น (Distillation) (ยี่ห้อ Buchi รุ่น K-350)
- ขาดังและบิวเรตสำหรับไทเทรตสารละลาย
- ขวดรูปชมพู่ขนาด (Erlenmeyer flask) 250 มิลลิลิตร
- กระจกตวงขนาด 25, 100 และ 300 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น
- ปีกเกอร์
- Glass bead or boiling chip
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

3.1.5 วิเคราะห์การหมักน้ำตาลโตนดแบบธรรมชาติ (Spontaneous)

- เครื่องรีแฟรกโตมิเตอร์ (Atago type n-1)
- ไมโครปิเปต (Micropipette) (ยี่ห้อ Onilab รุ่น MicroPette plus)
- จานเพาะเชื้อ
- หลอดทดลอง
- ขวดฝาเกลียว (Blue cap bottle)
- ลูป (Loop)
- pH Meter
- ไม้มะเกลือ (ตำบลห้วยกรด อำเภอสรรคบุรี จังหวัดชัยนาท)
- น้ำตาลโตนดสด (ตำบลห้วยกรด อำเภอสรรคบุรี จังหวัดชัยนาท)
- ไม้พะยอม (ตำบลห้วยกรด อำเภอสรรคบุรี จังหวัดชัยนาท)
- ไม้เคี่ยม (อำเภอบ้านนาสาร จังหวัดสุราษฎร์ธานี)
- เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer) (ยี่ห้อ VELP รุ่น ZX3)

3.1.6 วิเคราะห์จุลินทรีย์โดยเมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics)

- ไมโครปิเปต (Micropipette) (ยี่ห้อ Onilab รุ่น MicroPette plus)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (ยี่ห้อ Hettich รุ่น EBA 20)

- หลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์
- กระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมคอน

3.2 สารเคมี

3.2.1 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)

- Folin-Ciocalteu reagent (ภาคผนวก ก)
- โซเดียมไบคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
- เอทานอลบริสุทธิ์ (Absolute ethanol) 99.9%
- กรดแกลลิก (Gallic acid monohydrate) จากบริษัท Sigma-Aldrich

3.2.2 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (Kjeldahl Method)

- กรดบอริก (H_3BO_3)
- คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- เอทิล แอลกอฮอล์ 90 - 95% ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)
- กรดไฮโดรคลอริก 36 -38% (HCl)
- Methyl red
- Methylene blue
- โพแทสเซียม ซัลเฟต (K_2SO_4)
- กรดซาลิไซลิก ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{COOH}$)
- โซเดียมคาร์บอเนต (Anhydrous Na_2CO_3)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- โซเดียมไทโอซัลเฟต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- กรดซัลฟูริก 93 - 98% (H_2SO_4)
- ซิงค์คลอไรด์ (Zn)
- สารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก (HCl) 1 นอร์มอล

3.2.3 วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์

- โซเดียมไนไตรท (NaNO_2)
- เควอเวทิน (Quercetin)
- เมทานอล (CH_3OH)

- อลูมิเนียมไนเตรต ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.2.4 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (Kjeldahl Method)

- กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)
- คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4)
- โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)
- กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.1 N (HCl)
- โพแทสเซียม ซัลเฟต (K_2SO_4)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- กรดบอริก
- เมทิลออเรนจ์
- Bromocresol green
- เอทานอล ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

3.2.5 วิเคราะห์การหมักน้ำตาลโตนดแบบธรรมชาติ (Spontaneous)

- Cycloheximide
- Rose Bengal Chloramphenicol agar
- Plate Count Agar (PCA)
- Peptone

3.2.4 วิเคราะห์จุลินทรีย์โดยเมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics)

3.2.4.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA

- Lysis buffer (Teis-HCl , NaCl , EDTA , SDS)
- Proteinase K
- RNase A
- โซเดียมอะซิเตท (Sodium citrate)
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
- Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol
- Sodium Acetate
- Ethanol

- Isopropanol
- Absolute ethanol
- SE buffer

3.2.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

- *Tap* DNA polymerase
- dNTP (dATP dTTP cTP gTP)
- DNA Sample
- แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)
- TE buffer
- Buffer A
- Primer

3.2.4.3 สารเคมีที่ใช้การทำ Gel Electrophoresis

- Agarose gel
- Loading buffer
- Ethidium bromide
- TBE buffer

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 วิเคราะห์คุณสมบัติบางประการของมะเกลือ พะยอม และเคี่ยม

3.3.1.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

นำตัวอย่างมะเกลือสด มะเกลืออย่าง พะยอม และเคี่ยม ทำการบดละเอียด 100 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร สกัดด้วยวิธีการแช่ (Soaking extraction) ที่งัวที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน และกรองผ่านกระดาษกรอง 1 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดสีชา เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป [79]

3.3.1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งกรดแกลลิก 0.025 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์และปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตรในขวดปรับ ปริมาตรจากนั้นนำสารละลายมาตรฐาน กรดแกลลิกเข้มข้น 1000

มิลลิกรัม/ลิตร มาเจือจางด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ให้ความเข้มข้นเป็น 0, 50, 100 และ 150 มิลลิกรัม/ลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (A_{765}) [79]

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)

วิเคราะห์ตามวิธีการทดลองของ AOAC (1995) [80] นำตัวอย่างบดอย่างหยาบ 100 กรัม แช่ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แช่ไว้เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ จำนวน 1 มิลลิลิตร ถ้าสารละลายขุ่นนำไปปั่นเหวี่ยงและนำส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดสี เติมสารละลาย 10% Folin - Ciocalteu Reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ร้อยละ 7.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ สารละลายผสมกัน และตั้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที (ถ้าสารละลายขุ่นนำไปปั่นเหวี่ยงและนำเอา สารละลายใสมาวิเคราะห์) เมื่อเกิดปฏิกิริยา สารละลาย จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (A_{765}) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์โดยทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดดังสมการที่ 3.1 จากกราฟมาตรฐานปริมาณกรดแกลลิก ในช่วง 20 – 100 ไมโครกรัม

การคำนวณปริมาณสารฟีนอลิกในตัวอย่างสารสกัด

$$\text{mg GAE/g DW} = \left(\frac{\text{OD}_{765} - 0.0064}{\text{slope}} \right) \frac{\text{dilution} \times \text{volume}}{1000 \times W} \quad (3.1)$$

W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

Slope คือความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

Volume คือปริมาตรของสารสกัดทั้งหมด (ml)

Dilution คือค่าการเจือจางตัวอย่างก่อนนำมาวิเคราะห์

3.3.1.3 วิเคราะห์ไนโตรเจน (Kjeldahl Method)

การเตรียมรีเอเจนต์ (Reagent)

วิเคราะห์ตามวิธีการทดลองของ AOAC (1995) [80] สารละลายกรดบอริก ร้อยละ 4 ชั่งกรดบอริก จำนวน 40 กรัม ใส่ปิ๊กเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาณ 500 มิลลิลิตร นำไปต้มจนละลายหมด เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลง สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 50 ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์จำนวน 500 กรัม ใส่ปิ๊กเกอร์

ขนาด 2000 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 800 มิลลิลิตร โดยทำการละลายในตู้ดูดควัน เติมน้ำกลั่นให้ได้ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คน ให้เข้ากัน (หมายเหตุ เตรียมให้มีความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มากเกินไป) สารละลาย Mixed indicator ชั่งเมทริลเรต จำนวน 0.20 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 200 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นร้อยละ 90 - 95 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ชั่งเมทริลเรต บลู จำนวน 0.10 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 200 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นร้อยละ 90 - 95 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำสารละลายข้อ Mixed indicator มาเทรวมกัน คนให้เข้ากัน Mixed catalyst ผสมคอปเปอร์ซัลเฟต และโพแทสเซียมซัลเฟต ในอัตราส่วน 1 : 9 โดยน้ำหนัก

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล นำกรดไฮโดรคลอริก ร้อยละ 36 - 38 จำนวน 86 มิลลิลิตร หรือสารละลายมาตรฐานกรด ไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล จำนวน 1000 มิลลิลิตร (1 Ampoule for 1000 ml) ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5000 มิลลิลิตร ปรับ ปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล (Standardization) ซึ่งโซเดียมคาร์บอเนต ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 0.2 กรัม ใส่ Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาณ 100 มิลลิลิตร หยดสารละลาย Mixed indicator 2 - 3 หยด จะได้ สารละลายสีเขียวอ่อน นำไป ไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล จนถึงจุดยุติจะได้สารละลายสีชมพูง บันทึบผล คำนวณหาความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก [80] ดังสมการที่ 3.2

$$N(\text{HCl}) = \frac{52.99 \times \text{ปริมาตร HCl (ml)}}{\text{Wt. Na CO (g)} \times 1000} \quad (3.2)$$

$$52.99 = \text{สมมูลของ Na}_2\text{CO}_3$$

3.3.1.4 วิธีวิเคราะห์ไนโตรเจน (Nitrogen)

วิเคราะห์ตามวิธีการทดลองของ AOAC (1995) [80] ตัวอย่างจำนวน 0.3xxx - 0.5xxx มิลลิลิตร ใส่ Kjeldahl flask ขนาด 800 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาณ 2 กรัม เติมน้ำกลั่นร้อยละ 93 - 98 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที และโซเดียมไฮโอซัลเฟต จำนวน 5 กรัม นำไปตั้งบนเตาสำหรับย่อยตัวอย่าง ทำการย่อยตัวอย่างโดยใช้ ไฟปานกลาง จนกระทั่งได้สารละลายสีน้ำตาล ปิดไฟ และตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน Mixed catalyst จำนวน

10 กรัม และทำการย่อยอีกครั้งจนได้สารละลายสีเขียวใส ปิดไฟทิ้งไว้ให้เย็น เติมสารละลายกรดบอริก ร้อยละ 4 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร และสารละลาย Mixed indicator ปริมาณ 4 - 5 หยด ทำการกลั่นจน ได้ปริมาตรของสารละลายใน Erlenmeyer flask ปริมาณ 350 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปไตเตรท กับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล บันทึกผล วิเคราะห์แบลงค์ (Blank) โดยไม่ใส่ ตัวอย่างทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนดังสมการที่ 3.3

$$\text{คำนวณ \%Total N} = \frac{N(\text{HCl}) \times \{ml(\text{HCl}) - ml(\text{blank})\} \times 14.0067 \times 100}{\text{Wt. of sample (g)} \times 1000} \quad (3.3)$$

$$14.0067 = \text{น้ำหนักอะตอมของไนโตรเจน}$$

3.3.1.5 วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์

สร้างกราฟมาตรฐาน Quercetin โดยวิธี Aluminium nitrate colorimetric method โดยปิเปตโซเดียมไนเตรทร้อยละ 5 ปริมาณ 0.15 มิลลิลิตร ลงในสารละลายควอเวิทิน (Quercetin) ในเมทานอล 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที เติมอลูมิเนียมไนเตรทร้อยละ 10 ปริมาณ 0.15 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 12 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร หาปริมาณ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบด้วยวิธีเช่นเดียวกับสารมาตรฐานควอเวิทิน (Quercetin) หา ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ด้วยวิธีเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน Quercetin โดยปิเปตตัวอย่าง 20 - 100 [81]

3.3.1.6 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (Kjeldahl Method)

วิเคราะห์ตามวิธีการทดลองของ AOAC (1995) [80]

1. ชั่งตัวอย่าง 2 - 5 กรัม (ควรมีโปรตีนประมาณ 5 กรัม) ใส่ลงใน Kjeldahl flask เติม Mixed catalyst: CuSO_4 0.1 กรัม, NaSO_4 2 กรัม และ conc. H_2SO_4 25 กรัม (สารผสม ระหว่าง คอปเปอร์ซัลเฟต: โพแทสเซียม ซัลเฟต อัตราส่วน 1:10) นำไปย่อยบน Heating mantle โดยให้ความร้อนอ่อนๆ จนกระทั่งหมดฟอง แล้วค่อยเพิ่มความร้อนอุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส จนกระทั่ง สารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น

2. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อย 10 - 15 มิลลิลิตร นำหลอดย่อยมาต่อเข้ากับ เครื่องกลั่น

3. เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 40 ปริมาณ 40 - 50 มิลลิลิตร (เข้มข้นร้อยละ 40 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร)

4. นำ Receiving flask ที่มีกรดบอริกร้อยละ 4 (เตรียมโดยตมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรให้ร้อน แล้วใส่ผงกรดบอริกลงไป 4.0 กรัม ต้มจนละลายหมดทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลงแล้วจึงเติมน้ำ) อยู่ 20 - 25 มิลลิลิตร และเติม Indicator (Mixed indicator: Methylred 0.1 กรัม: Bromocresol green 0.1 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร) เรียบร้อยแล้วมารองรับสารละลายที่กลั่นได้

5. กลั่นจนได้สารละลายประมาณ 25 มิลลิลิตร

6. ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วย 0.1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอมชมพู

7. ทำ Blank ตามข้อ 1-7 โดยไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

8. คำนวณหาปริมาณโปรตีนดังสมการที่ 3.4

การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีนี้ ควรทำตัวอย่างไว้ตรวจสอบ เรียกว่า Blank (โดยใส่สารเคมีและขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง)

$$\text{การคำนวณปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(A - B) \times N \times 1.4 \times F}{\text{Wt.}} \quad (3.4)$$

A คือปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank (มิลลิลิตร)

Wt คือน้ำหนักของตัวอย่าง

N คือความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (N)

F คือค่าแฟคเตอร์ (Conversion factor เท่ากับ 5.95)

3.3.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างหมักน้ำตาลโตนด

3.3.2.1 การหมักน้ำตาลโตนดแบบธรรมชาติ

นำน้ำตาลสดที่เก็บจากต้นตาลจากแหล่งเก็บเกี่ยวที่ ตำบลห้วยกรด อำเภอสรรคบุรี จังหวัดชัยนาท ใส่กระบอกโดยไม่ใส่ไม้พะยอมตามที่เคยปฏิบัติ นำน้ำตาลสด 500 มิลลิลิตร บรรจุในขวดฝาเกลียว (Blue cap bottle) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แบ่งเป็น 5 สิ่งทดลอง เติมน้ำชนิดต่างๆ 100 กรัม ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 น้ำตาลโตนด (สิ่งทดลองควบคุม)

สิ่งทดลองที่ 2 น้ำตาลโตนด และพะยอม

สิ่งทดลองที่ 3 น้ำตาลโตนด และมะเกลือสด

สิ่งทดลองที่ 4 น้ำตาลโตนด และมะเกลืออย่าง (อย่างมะไม้เกลือด้วยไฟอ่อนให้ผิวไหม้มะเกลือมีผิวสีน้ำตาลอ่อน)

สิ่งทดลองที่ 5 น้ำตาลโตนด และเคี่ยม

หมักที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.3.2.2 วิเคราะห์จุลินทรีย์ระหว่างการหมักด้วยวิธีเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิเคราะห์การเจริญของยีสต์และแบคทีเรียในระหว่างการหมักด้วยวิธี Spread Plate นำตัวอย่างที่อยู่ระหว่างการหมักทำการเจือจางด้วยเปปโตน (Peptone) ร้อยละ 0.1 ให้มีปริมาณความเข้มข้น (10^1 - 10^7 cfu/ml) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC Agar) ที่มีสาร Chloramphenicol สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และ Dichloran จำกัดขนาดสปอร์ราได้ ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Spread Plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเปิดตัวอย่างที่ระดับเจือจางต่างๆ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ที่เติมสารละลาย Cycloheximide ร้อยละ 0.01 เพื่อยับยั้งการเจริญของยีสต์ [82] ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธี Spread Plate บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับเฉพาะจานที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30 – 300 โคโลนีรายงานผลมีหน่วยเป็น Log cfu/ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไประบุสปีชีส์ของจุลินทรีย์ต่อไป [83]

3.3.2.3 ระบุเชื้อจุลินทรีย์โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกจนบริสุทธิ์ (Pure Culture) ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน ได้แก่ สี ขนาด ความมันวาว และลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำโคโลนีที่คัดเลือกได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลที่สามารถระบุชนิดของจุลินทรีย์ได้ถึงระดับสปีชีส์ ได้แก่ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 26S rRNA gene เพื่อระบุชนิดของยีสต์ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS rRNA region เพื่อระบุชนิดของรา และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene เพื่อระบุชนิดแบคทีเรีย ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank ด้วยโปรแกรม

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ศึกษาความคล้ายคลึงระหว่างกลุ่มของสายดีเอ็นเอตั้งแต่ สองสายขึ้นไป (Multiple Sequence Alignment) และสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic Tree) ด้วยวิธี Neighbor - joining Method ด้วยโปรแกรม MEGA 11 โดยมีค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ [7]

3.3.2.4 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

นำตัวอย่างในขั้นตอนที่ 3.3.2.1 นำมาวัดความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณของแข็งละลายน้ำได้ทั้งหมด (TSS, °Brix) ด้วยเครื่องรีแฟรกโตมิเตอร์ หลังจากการหมักวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) (ตารางผนวกที่ ก.1)

3.3.2.5 การประเมินทางประสาทสัมผัส

การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยให้คะแนนความชอบโดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน โดยการทดสอบด้านกลิ่นให้คะแนนความชอบแต่ละตัวอย่างแบบมีทิศทางทำให้คะแนนความแตกต่างไปทางมากกว่าหรือน้อยกว่าโดยให้คะแนน 1-5 ระดับ (5 = ชอบมากที่สุด 4 = ชอบมาก 3 = ชอบปานกลาง 2 = ชอบน้อย 1 = ชอบน้อยที่สุด) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test; DMRT [83]

3.3.2.6 การวิเคราะห์จุลินทรีย์ระหว่างการหมักด้วยเมตาจีโนมิกส์

เมตาจีโนมิกส์เป็นวิธีการที่ใช้ในการศึกษาวิเคราะห์จีโนมของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในหนึ่งชุมชน (Community) หรือในตัวอย่างธรรมชาติ โดยวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการศึกษาโดยตรง โดยไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เก็บตัวอย่างน้ำตาลโตนดหลังการหมัก วันที่ 3 เก็บใส่หลอดเซนตริฟิวก์นำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) จนได้ตะกอนจุลินทรีย์รวม 15 กรัม เพื่อใช้ในการเตรียมสกัด DNA ต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ ดัดแปลงมาจาก Nazir (2016) [63] นำตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มี Lysis buffer 1.2 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ นาน 15 นาที ดูดสารละลายใส่ในหลอดใหม่ เติมน RNase 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เติมนสารฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25 : 14 : 1) 600 ไมโครลิตร ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ นาน 15 นาที ดูดสารละลายใส่ส่วนบนใส่หลอดใหม่ ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 3 โมลาร์ pH 5.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเอทานอลความเข้มข้น 100% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บไว้ใน

อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูและซับให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี Gel Electrophoresis

Gel Electrophoresis

นำดีเอ็นเอตัวอย่างจำนวน 5 ไมโครลิตร ใส่ลงช่องใส่ตัวอย่างของแผ่นเจล (1% Agarose gel) ที่วางบนบัลลิสต์เจล ที่มี TBE Buffer 0.5X ภาพใต้กระแสไฟฟ้า 100 v เป็นเวลา 60 นาทีแล้ว นำแผ่น Agarose gel มาย้อมด้วย Ethidium bromide นาน 15 นาทีและ ตรวจแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ถ่ายภาพด้วย Gel documentation และเปรียบเทียบขนาดของจีโนมสารที่สกัดได้ [85]

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

นำดีเอ็นเอตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์แบบคู่ เพื่อนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการของ [85] โดยทำปฏิกิริยาปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCL pH8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 100µM (dNTP dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.4 µM Primer, 50 ng/µl Genomic DNA ของยีสต์ ถูกขยายด้วยไพรเมอร์ 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') และ 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') [86] และส่วน ITS1 ของ เชื้อราถูกขยายด้วยไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') และไพรเมอร์รีเวิร์ด ITS1R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') [87] D1/D2 บนยีน 26S rDNA ขยายไพรเมอร์ NL-1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') และ NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') [88] และ 0.1 unit *Taq* DNA มาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycle) PTC [85] เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยมี PCR Profile คือ

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสนาน 10 วินาที จำนวน 40 รอบ
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที จำนวน 40 รอบ
4. Extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จำนวน 40 รอบ
5. Final extention ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 40

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปแยกแแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Electrophoresis โดยใช้ร้อยละ 1.2 Agarose gel ใน 0.5x TBE buffer โดยแบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 6 ไมโครลิตร ผสมกับ Loading dye 2 ไมโครลิตร เมื่อได้สารสกัดของดีเอ็นเอจึงนำเข้าสู่ขั้นตอนวิธีการเมตาจีโนมิกส์เป็นวิธีการที่ใช้ในการศึกษาวิเคราะห์จีโนมของจุลินทรีย์ทั้งหมด

ตัวอย่าง DNA ที่ผ่านการสกัด ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสจากนั้นส่วนที่ยื่นออกมาของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะถูกแปลงเป็นปลายใช้ T4 DNA polymerase, Klenow DNA Polymerase และ T4 Polynucleotide Kinase หลังจากเพิ่มฐาน 'A' ที่ปลาย 3' ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอแล้วนำไปทำการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล

การวิเคราะห์อนุกรมวิธานโดยใช้การอ่านลำดับ Metagenomic ทั้งหมด

ในการวิจัยครั้งนี้ศึกษาเฉพาะเมตาจีโนมิกส์ของยีสต์ และราช่วงยีนที่ใช้ในการวิเคราะห์จากลำดับยีน ITS ซึ่งเก็บตัวอย่างน้ำตาลเมาหลังการหมัก วันที่ 3 ส่งวิเคราะห์ที่ Technical Application Specialist for Next Generation Sequencing and Gene Art Gibthai Co., Ltd. เพื่อใช้การเตรียมสกัด DNA และ Bioinformatics analysis การอ่านลำดับเบส จัดทำโปรไฟล์อนุกรมวิธานที่หลากหลาย ได้แก่ BLAST อัลกอริทึม BLAST blastn ถูกใช้เพื่อจัดเรียงลำดับ

3.4 สถานที่ในการดำเนินการวิจัย

ห้องปฏิบัติการ อาคารเฉลิมพระเกียรติ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

อาคารปฏิบัติวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

3.5 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เริ่มตั้งแต่ กุมภาพันธ์ 2563 ถึง มีนาคม 2565

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติบางประการของมะเกลือ พะยอม และเคี่ยม

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ของมะเกลือ พะยอม และ เคี่ยมได้แสดงผลดังตารางที่ 4.1 พบว่า มะเกลืออย่าง มะเกลือสด พะยอม และเคี่ยมมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด 130.507, 50.479, 288.735 และ 282.607 mg GAE/g ตามลำดับ จากผลดังกล่าวจะเห็นว่าพะยอม และเคี่ยมมีสารฟีนอลิกสูงที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และรองลงมาคือมะเกลืออย่าง และมะเกลือสดมีปริมาณน้อยที่สุด และจะเห็นได้ว่ามะเกลือสดน้อยกว่ามะเกลืออย่าง เนื่องจากความชื้นที่ลดลงทำให้ปริมาณต่างๆ เพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณฟลาโวนอยด์ พบว่า เคี่ยมมี 45.847 mg QE/g พะยอม 40.941 mg QE/g มะเกลือสด 35.529 mg QE/g และมะเกลืออย่าง 32.391 mg QE/g ตามลำดับ ปริมาณฟลาโวนอยด์ของเคี่ยมและพะยอมมีปริมาณใกล้เคียงกันไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมะเกลือมีปริมาณฟลาโวนอยด์น้อยที่สุด พบว่า พะยอม และเคี่ยมมีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากที่สุดเป็นการยืนยันการใช้ไม้พะยอม และเคี่ยมใส่ในการเก็บเกี่ยวน้ำตาลโตนดเพื่อยับยั้งแบคทีเรียเนื่องจากมีสารฟีนอลิก ทั้งนี้อารี [1] พบว่าสารสกัดไม้พะยอมยังมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดที่เป็นสาเหตุให้เกิดความเป็นพิษในอาหาร เช่น *Bacillus cereus*, *B. subtilis* และ *Staphylococcus aureus* การยับยั้งมีผลมาจากแทนนินในไม้ และจากการศึกษาของปุ่นฉานี (2554) [28] ได้ทำการศึกษากิจกรรมสารฟีนอลิกทั้งหมดจากใบเคี่ยมมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดคือ 158.14 mg จากปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ซึ่งจากรายงานปริมาณฟีนอลิกที่สูงสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* และ *Vibrio cholera* และการศึกษาของ Suchanuch และ Punnanee (2012) [29] ทำการศึกษากลุ่มฟีนอลิก และแทนนินที่สกัดได้จากส่วนของลำต้น และใบเคี่ยมซึ่งมีผลยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เกิดจากแบคทีเรียหลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ในไม้มะเกลือมีงานวิจัยพบว่า มะเกลือมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพคือ Anthelmintic และศึกษาสารเคมี จากผลของมะเกลือ พบสารประกอบทางเคมี เช่น Lupeol, Amyrine, B-sitosterol, Diospyrol, 1, 8 dihydroxynaphthalene, 8-dihydroxy-2-acetyl-3-methyl และ Naphthalene [15] นอกจากสารเหล่านี้ยังพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ แทนนิน และ สารประกอบ

ซาโปนิน Matsuda *et al.*, (2009) [23] ได้อ้างไว้ว่าไม้พะยอมนั้นจะให้น้ำฝาดพบชนิด Pyrogallol และ Catechol ซึ่งสารทั้งสองชนิดคือแทนนินนั่นเอง แทนนินนั้นมีความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนได้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ของมะเกลือ พะยอม เคี้ยว

สิ่งทดลอง	สารฟีนอลิกทั้งหมด และ ฟลาโวนอยด์	
	ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg QE/g)
มะเกลือสด	50.479±2.957 ^c	35.529±1.971 ^b
มะเกลือย่าง	130.507±2.071 ^b	32.391±3.104 ^c
พะยอม	288.735±1.025 ^a	40.941±0.660 ^a
เคี้ยว	282.607±1.935 ^a	45.847±0.705 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$)

จากการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณโปรตีน ของมะเกลือ พะยอม และเคี้ยวได้ผลดังตารางที่ 4.2 พบว่า เคี้ยวมีปริมาณไนโตรเจนมากที่สุดคือ 3.096 TN% รองลงมาคือมะเกลือสด 1.566 TN% พะยอม 1.270 TN% และมะเกลือย่าง 0.866 TN% ตามลำดับ ซึ่งทางภาคใต้ใช้เคี้ยวในกระบอกรองตาลระหว่างการเก็บเกี่ยวน้ำตาลโตนด และกระบวนการหมักน้ำตาลซึ่งงานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่บ่งชี้ว่าการใช้เคี้ยวทั้งระหว่างการร่อนน้ำตาล และการหมักน้ำตาลนั้นอาจเป็นเพราะเคี้ยวมีสารฟีนอลิกสูง ซึ่งช่วยถนอมรักษาน้ำตาลจากการเสื่อมเสียจากแบคทีเรีย และมีปริมาณไนโตรเจนที่เป็นแหล่งสารอาหารในการหมักของยีสต์ ส่วนปริมาณโปรตีนของทั้ง 4 สิ่งทดลอง ดังตารางที่ 4.2 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อยู่ในช่วงร้อยละ 0.5 – 0.8 จากงานวิจัยของอารี [1] พบว่าในการวิเคราะห์ไนโตรเจนในไม้ นั้น ผลการวิเคราะห์ที่ได้จะเป็นไนโตรเจนทั้งหมดไม่ว่าจะอยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ หรือ อนินทรีย์ก็ตาม พบว่าในไม้มะเกลือย่างมีไนโตรเจนทั้งหมด 0.991 กรัมต่อไม้มะเกลือปิ้ง 100 กรัม ซึ่งใกล้เคียงกับผลการวิจัยนี้ คือปริมาณไนโตรเจน 0.866 TN% ส่วนไม้พะยอมมีไนโตรเจนทั้งหมด 0.186 กรัมต่อไม้พะยอม 100 กรัม ซึ่งน้อยกว่าผลการวิจัยดังกล่าว [1] ที่พบว่าพะยอมมีค่า 1.270 TN%

ตารางที่ 4.2 ปริมาณไนโตรเจน และโปรตีนของมะเกลือ พะยอม และเคี่ยม

สิ่งทดลอง	ปริมาณไนโตรเจน และ โปรตีน	
	ปริมาณไนโตรเจน (TN%)	ปริมาณโปรตีน ^(ns) (%)
มะเกลือสด	1.566±0.057 ^b	0.731±0.254
มะเกลืออย่าง	0.866±0.057 ^d	0.564±0.425
พะยอม	1.270±0.034 ^c	0.828±0.994
เคี่ยม	3.096±0.005 ^a	0.824±0.417

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > .05$)

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq .05$)

4.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักน้ำตาลโตนด

การหมักน้ำตาลโตนดแบบธรรมชาติโดยการเตรียมน้ำตาลโตนด จากตำบลห้วยกรด อำเภอสรรคบุรี จังหวัดชัยนาท แบ่งเป็น 5 สิ่งทดลอง (ภาพที่ 4.1) คือ สิ่งทดลองที่ 1 น้ำตาลโตนด (สิ่งทดลองควบคุม)

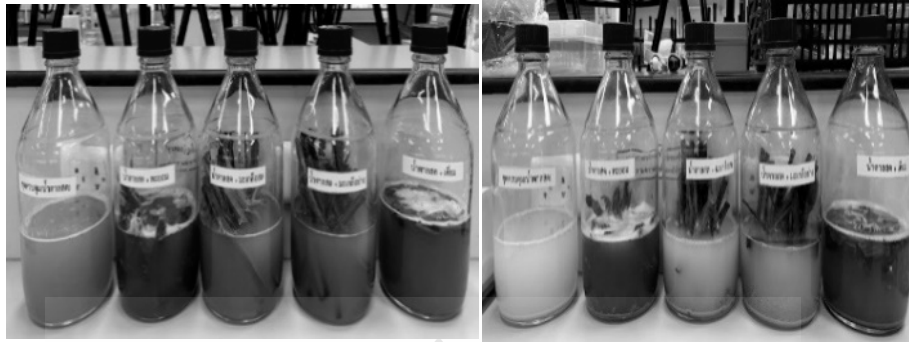
สิ่งทดลองที่ 2 น้ำตาลโตนด และพะยอม (ภาพที่ 4.2)

สิ่งทดลองที่ 3 น้ำตาลโตนด และมะเกลือสด (ภาพที่ 4.2)

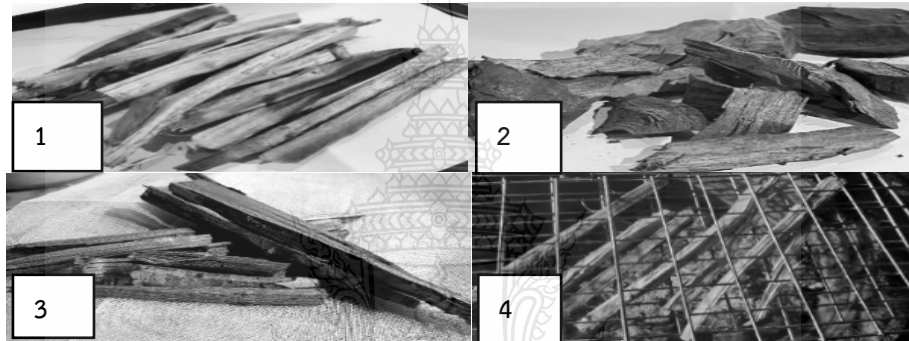
สิ่งทดลองที่ 4 น้ำตาลโตนด และมะเกลือ (อย่างมะไม้เกลือด้วยไฟอ่อนให้ผิวมะเกลือมีผิวสีน้ำตาลอ่อน) (ภาพที่ 4.2)

สิ่งทดลองที่ 5 น้ำตาลโตนด และเคี่ยม (ภาพที่ 4.2)

การหมักน้ำตาลโตนดวันแรกแสดงดังภาพที่ 4.1 พบว่าน้ำหมักมีสีที่ใสตามธรรมชาติของน้ำตาลโตนด ไม่มีตะกอนขุ่นของยีสต์เกิดฟองเล็กน้อย จนวันที่ 1-2 เริ่มมีตะกอนขุ่นจำนวนมากเริ่มตกตะกอนอยู่ด้านใต้ขวดเกิดฟองที่เกิดการหมักมีก๊าซเกิดขึ้น ชุดควบคุมเริ่มมีกลิ่นบูดเช่นเดียวกับมะเกลือสด เนื่องจากมีการปนเปื้อนแบคทีเรียทำให้เกิดการบูดเสีย ส่วนมะเกลืออย่าง และเคี่ยมมีจะกลิ่นหอมของไม้ที่ใส่และหอมมากกว่าสิ่งทดลองควบคุม ส่วนพะยอมมีกลิ่นของแอลกอฮอล์เล็กน้อย และในวันที่ 3 พบว่าทั้ง 5 สิ่งทดลองไม่เกิดฟองก๊าซ แต่พบมีตะกอนของจุลินทรีย์จำนวนมากอยู่ด้านใต้ของขวด จากการศึกษาของ Browning *et al.* (1916) [89] ได้ทำการศึกษาในลักษณะที่คล้ายคลึงกัน โดยใช้ น้ำตาลสดจากมะพร้าวในการหมัก และใช้เปลือกไม้ของ *Vateria acuminata* พบว่า นอกจากแทนนินในไม้จะช่วยยับยั้งการเน่าเสียในน้ำตาลสดแล้วยังช่วยให้น้ำตาลสดลักษณะใสเพิ่มขึ้น เนื่องจากเกิดการตกตะกอนของโปรตีนในน้ำตาลสด



ภาพที่ 4.1 แสดงถึงตัวอย่างการหมักน้ำตาลโตนดแบบธรรมชาติ 5 สิ่งทดลอง วันที่ 0 และวันที่ 3

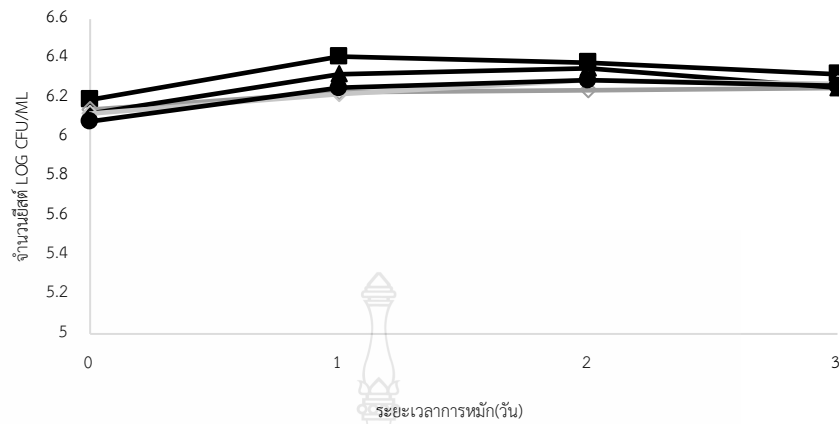


ภาพที่ 4.2 ตัวอย่างไม้ที่ใช้ในการทดลองการหมักน้ำตาลโตนด

(1 พะยอม 2 เคี่ยม 3 มะเกลือสด และ 4 มะเกลือย่าง)

4.3 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักน้ำตาลโตนด

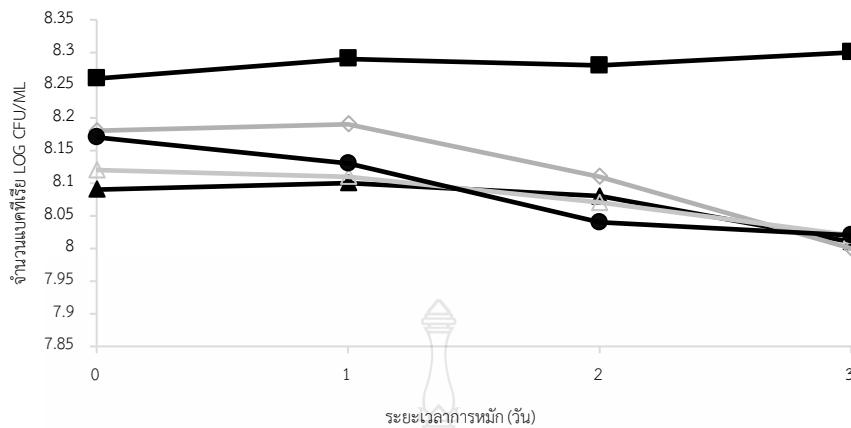
ระหว่างเก็บตัวอย่างการหมักน้ำตาลโตนดทั้ง 5 สิ่งทดลอง ได้แก่ สิ่งทดลองควบคุม น้ำตาลโตนดที่ใส่พะยอม มะเกลือสด มะเกลือย่าง และเคี่ยม นำมาวิเคราะห์ปริมาณยีสต์ด้วยอาหาร Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC Agar) พบปริมาณเชื้อยีสต์เริ่มต้น 6.41 ± 0.07 , 6.18 ± 0.12 , 6.29 ± 0.16 , 6.35 ± 0.09 และ 6.19 ± 0.01 Log cfu/ml ตามลำดับ วันที่ 1 ถึง 2 มีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และวันที่ 3 ปริมาณยีสต์ 6.31 ± 0.12 , 6.25 ± 0.01 , 6.46 ± 0.05 , 6.27 ± 0.03 และ 6.26 ± 0.08 Log cfu/ml ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 แนวโน้มการเจริญของยีสต์น้ำตาลโตนด วันที่ 0 ถึง วันที่ 3 ชดควบคุม(■) น้ำตาลสด+พะยอม(▲) น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง(Δ) น้ำตาลสด+มะเกลือสด(◊) น้ำตาลสด+เคี่ยม(●)

ปริมาณยีสต์ทั้ง 5 สิ่งทดลองในระหว่างการหมักเป็นเวลา 3 วัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางผนวกที่ ค.4) ดังนั้นปริมาณสารฟีนอลิก และไนโตรเจนในไม้ที่ใส่ไม่มีผลต่อการปริมาณยีสต์

เมื่อนำตัวอย่างน้ำตาลโตนดระหว่างการหมักไปวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียด้วยอาหาร PCA + ร้อยละ 0.01 Cycloheximide ปริมาณแบคทีเรียในสิ่งทดลองควบคุมมีปริมาณสูงกว่าสิ่งทดลองที่ใส่ไม้ต่างๆแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางผนวกที่ ค.8) ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่ม 8.26 ± 0.10 , 8.10 ± 0.04 , 8.18 ± 0.01 , 8.12 ± 0.02 และ 8.17 ± 0.04 Log cfu/ml ตามลำดับ ปริมาณเชื้อในชุดควบคุมวันที่ 1 ถึงวันที่ 2 มีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้นกว่าทั้ง 4 สิ่งทดลอง และในวันที่ 3 พบปริมาณเชื้อ 8.30 ± 0.01 , 8.02 ± 0.04 , 8.01 ± 0.02 , 8 ± 0.01 และ 8.02 ± 0.07 Log cfu/ml ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.4



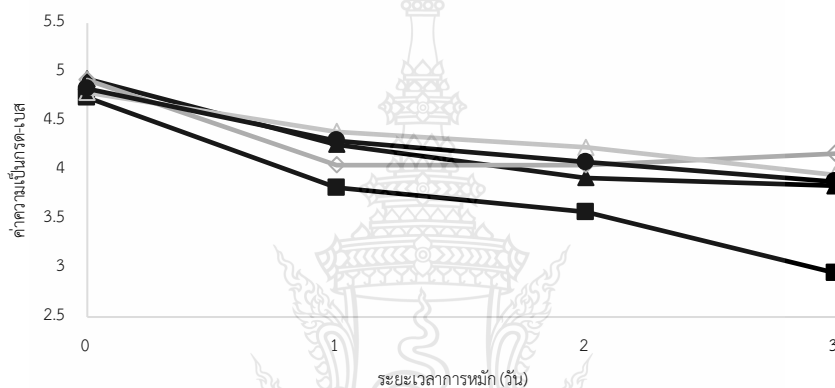
ภาพที่ 4.4 แนวโน้มการเจริญของแบคทีเรียน้ำตาลโดนด วันที่ 0 ถึง วันที่ 3 ชูดควบคุม(■) น้ำตาลสด+พะยอบม(▲) น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง(△) น้ำตาลสด+มะเกลือสด(◇) น้ำตาลสด+เคี่ยม(●)

ทำให้เห็นได้ว่า ไม่แต่ละชนิดที่ใส่มีผลต่อการหมัก ซึ่งพบว่าชูดควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียที่สูงขึ้นทำให้เกิดการเน่าเสีย จากการวิจัยของอารี [1] ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของไม้มะเกลือในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดบนอาหารวุ้นโดยคัดเลือกแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษในอาหาร ได้แก่ *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Bacillus subtilis* จากการทดลองพบว่าไม้มะเกลือไม่มีการยับยั้งจุลินทรีย์แต่อย่างใด แต่พบว่าไม้มะเกลืออาจมีสารบางชนิดซึ่งช่วยเร่งอัตราการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และยังช่วยควบคุมการสร้างกรดแลคติกของยีสต์ *Candida colliculosa* เมื่อเพิ่มปริมาณไม้มะเกลืออัตราการเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้น ในไม้มะเกลือ และไม้มะเกลือมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงจากปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด พบสารฟีนอลิกสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* และ *Vibrio cholera* [28] ซึ่งมีส่วนทำให้การเจริญของแบคทีเรียมีจำนวนที่น้อยกว่าชูดควบคุม

4.4 ผลวิเคราะห์ทางเคมีในระหว่างการหมักน้ำตาลโตนด

4.4.1 ความเป็นกรด - เบส (pH)

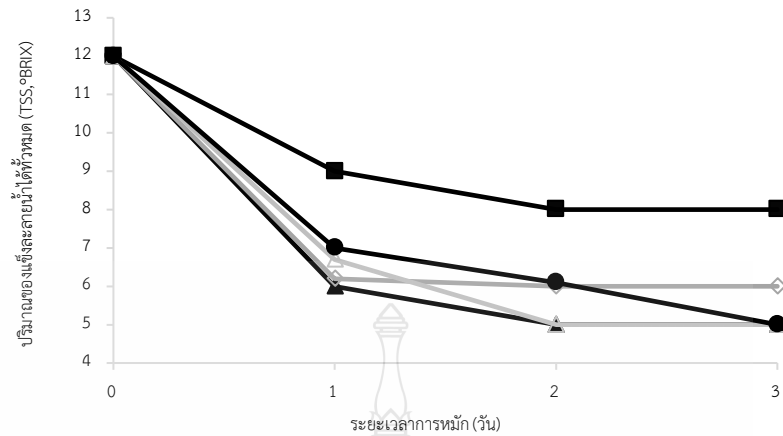
ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด - เบส (pH) มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ในช่วงวันที่ 2 – 3 ซึ่งในวันที่ 3 ค่า pH ของสิ่งทดลองควบคุมน้ำตาลโตนดที่ใส่พะยอม มะเกลือสด มะเกลืออย่าง และเคี่ยม มีค่า 2.95, 4.17 และ 3.88 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.5) ค่ากรด - เบส (pH) ของสิ่งทดลองควบคุมมีค่าต่ำกว่าสิ่งทดลองอื่นๆ แสดงว่าแบคทีเรียสร้างกรดมากกว่าเนื่องจากไม้ที่ใส่น้ำตาลโตนด ช่วยควบคุมปริมาณของแบคทีเรีย



ภาพที่ 4.5 ความเป็นกรด-เบส (pH) การหมักน้ำตาลโตนดในตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง เวลา 3 วัน ชุดควบคุม(■) น้ำตาลสด+พะยอม(▲) น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง(△) น้ำตาลสด+มะเกลือสด(◇) น้ำตาลสด+เคี่ยม(●)

4.1.2 ปริมาณของแข็งละลายน้ำได้ทั้งหมด (TSS, °Brix)

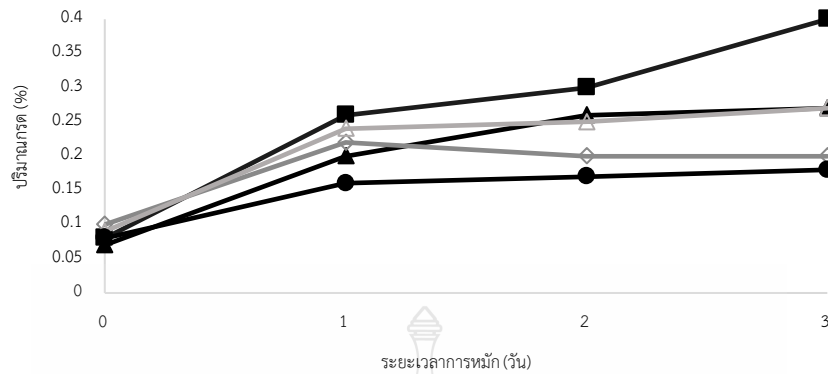
ปริมาณของแข็งละลายน้ำได้ทั้งหมด (TSS) ค่าเริ่มต้นมีค่า 12 องศาบริกซ์ มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ปริมาณ TSS ในวันที่ 3 ของ สิ่งทดลองควบคุม น้ำตาลโตนดที่ใส่พะยอม มะเกลือสด มะเกลืออย่าง และเคี่ยม มีค่า 8,6 และ 5 องศาบริกซ์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.6) โดยสิ่งทดลองควบคุมมีค่า TSS ลดลงต่ำกว่าสิ่งทดลองอื่นๆ อาจเป็นเพราะสารไนโตรเจนในไม้ต่างๆ ช่วยให้ยีสต์สามารถหมักน้ำตาลได้ดีกว่า



ภาพที่ 4.6 ปริมาณของแข็งละลายน้ำได้ทั้งหมด (TSS, °Brix) ในน้ำตาลโตนดในตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง เป็นเวลา 3 วัน ชุดควบคุม(■) น้ำตาลสด+พะยอบ(▲) น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง(◊) น้ำตาลสด+มะเกลือสด(◊) น้ำตาลสด+เคี้ยว(●)

4.4.3 ปริมาณกรดระหว่างการหมักน้ำตาลโตนด

จากการศึกษาพบว่าค่าวัดปริมาณกรด เริ่มต้นร้อยละ 0.08, 0.07, 0.1, 0.09, 0.08 ตามลำดับ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 2 ปริมาณกรดอยู่ที่ 0.3, 0.26, 0.2, 0.25 และ 0.17 ตามลำดับ ตามลำดับ ปริมาณกรดสุดท้ายวันที่ 3 คือ สิ่งทดลองควบคุม 0.40 มีค่ากรดมากกว่า สิ่งทดลองที่ใส่ไม้แต่ละชนิด คือพะยอบร้อยละ 0.27 มะเกลือสดร้อยละ 0.20 มะเกลืออย่างร้อยละ 0.27 และเคี้ยวร้อยละ 0.18 (ภาพที่ 4.7) สอดคล้องกับค่า pH เนื่องจาก สิ่งทดลองควบคุมมีค่า pH ต่ำ และมีค่าปริมาณกรดที่สูงกว่าสิ่งทดลองต่างๆ ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียสร้างกรด และแบคทีเรียบางชนิดทำให้มีปริมาณกรดสูง



ภาพที่ 4.7 ปริมาณกรดระหว่างการหมักในน้ำตาลโตนดในตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง เวลา 3 วัน
 ชุดควบคุม(■) น้ำตาลสด+พะยอม(▲) น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง(△) น้ำตาลสด+มะเกลือสด(◊)
 น้ำตาลสด+เคี่ยม(●)

4.4.4 ปริมาณเอทานอลของน้ำตาลโตนดวันที่ 3

เมื่อหมักน้ำตาลโตนดเป็นเวลา 3 วัน นำตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมครอน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งก่อนนำไปวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography GC-MS) ผลการทดลองพบว่า ปริมาณเอทานอลของน้ำตาลโตนดที่ใส่ พะยอม และมะเกลืออย่างมีค่าสูงที่สุด ได้แก่ ร้อยละ 3.28 - 3.42 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ รองลงมาคือ สิ่งทดลองควบคุม และน้ำตาลโตนดที่ใส่มะเกลือสด ได้แก่ ร้อยละ 2.30 และน้ำตาลโตนดที่ใส่เคี่ยมร้อยละ 0.11 (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณการผลิตแอลกอฮอล์ (%v/v) ของน้ำตาลโตนดหลังการหมัก 3 วัน

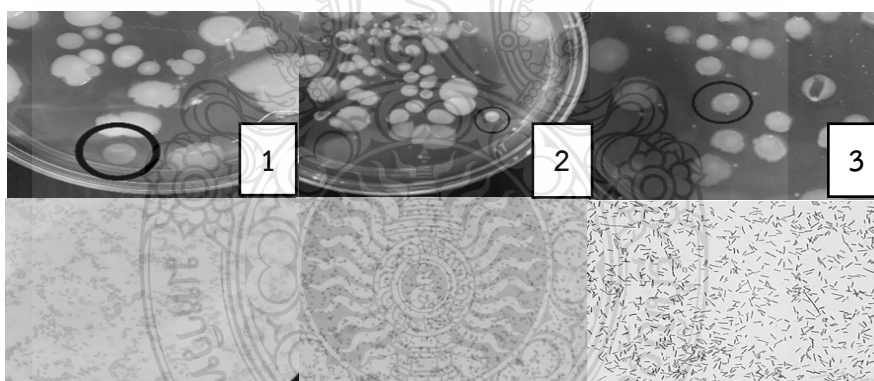
สิ่งทดลอง	ความเข้มข้นเอทานอล (%v/v)
สิ่งทดลองควบคุม	2.30±0.41 ^b
มะเกลือสด	2.30±0.42 ^b
มะเกลืออย่าง	3.28±0.11 ^a
พะยอม	3.42±0.11 ^a
เคี่ยม	0.11±0.00 ^c

หมายเหตุตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$)

เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอล กับปริมาณไนโตรเจนในไม้ต่างๆ ไม่พบความสัมพันธ์ เช่น แม้เคี่ยมมีไนโตรเจนสูงที่สุดแต่ไม่ทำให้ได้เอทานอลสูง ส่วนพะยอม และมะเกลืออย่างทำให้ได้เอทานอลสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ TSS (ภาพที่ 4.6) พะยอม และมะเกลืออย่างที่มีการใช้น้ำตาลได้ดี ดังนั้นการใช้ไม้เคี่ยมหมักน้ำตาลโตนดในภาคใต้จึงอาศัยยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในการหมักมากกว่า ผลของไม้เคี่ยมต่อการเจริญของยีสต์จึงอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

4.4.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์

จากการศึกษาลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์น้ำตาลโตนดบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด คือ PCA + ร้อยละ 0.01 Cycloheximide และ อาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC พบว่า มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างปรากฏขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะโคโลนี สี พื้นผิว ที่แตกต่างกัน จึงนำไปศึกษา ลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาด้านสัณฐานวิทยาพบว่า มีโคโลนีที่แตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ PCA+ ร้อยละ 0.01 Cycloheximide โคโลนีที่พบจะมีลักษณะ โคโลนีสีเหลือง และ สีขาว ลักษณะมันวาว หรือ ผิวขรุขระ พบโคโลนีที่แตกต่างอยู่ 3 แบบคือ หมายเลข 1 โคโลนีสีเหลือง เซลล์มีลักษณะเป็นท่อนสั้น หมายเลข 2 โคโลนีสีขาวมีความมันวาว เซลล์ลักษณะกลมเล็กเป็นคู่ หมายเลข 3 โคโลนีสีขาวผิวขรุขระ เซลล์มีลักษณะเป็นท่อนสั้น ดังภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA + ร้อยละ 0.01 Cycloheximide และลักษณะโคโลนี

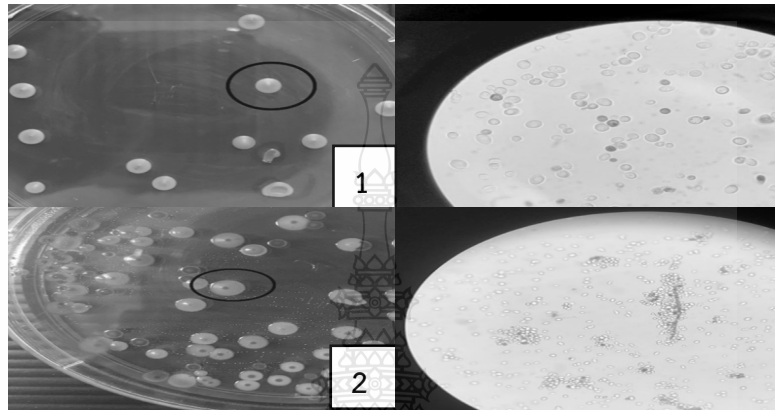
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมแกรม

(หมายเลข 1 โคโลนีสีเหลือง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ลักษณะ ท่อนสั้น

หมายเลข 2 โคโลนีสีขาว มันวาว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ลักษณะ กลมเล็กเป็นคู่

หมายเลข 3 โคโลนีสีขาว ผิวขรุขระ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ลักษณะ เป็นท่อนสั้น)

ลักษณะโคโลนีอาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC โคโลนีที่พบจะมีลักษณะ โคโลนีสีขาวขุ่น และ สีชมพู ลักษณะมันวาว หรือ ผิวขรุขระ จากการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร DRBC พบโคโลนีเซลล์ที่แตกต่างกันอยู่ 2 แบบ คือ โคโลนีสีขาวขุ่นเซลล์ มีลักษณะทรงกลม หมายเลข 2 โคโลนีสีชมพูมีความมันวาวเล็กน้อยมีลักษณะ กลมรี มีเส้นใยเทียม ดังภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.9 ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC และลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมแกรม (หมายเลข 1 โคโลนีสีขาวขุ่น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ลักษณะ รูปทรงกลม หมายเลข 2 โคโลนีสีชมพู ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ลักษณะ กลมรี มีเส้นใยเทียม)

4.5 การวิเคราะห์ต้นไม้สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ตามลำดับยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย และ D1/D2 บนยีน 26s rDNA ของยีสต์

การวิจัยทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์แบคทีเรีย ยีสต์ รา เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย และยีสต์ ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลด้วย เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการสกัดดีเอ็นเอ พบว่าดีเอ็นเอแบคทีเรียบนยีน 16S rDNA บางส่วนของยีนประมาณ 1400 – 1503 bp (ตารางที่ 4.4) ต้นไม้สายวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นจากลำดับยีน 16S rDNA มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้เป็น 3 สกุล ได้แก่ *Pantoea anthophila*, *leuconostoc pseudomesenteroides* และ *Escherichia coli* (ภาพที่ 4.10) และวิเคราะห์ดีเอ็นเอยีสต์ บริเวณโดเมน D1/D2 บนยีน 26S rDNA บางส่วนของยีนประมาณ 578 – 580 bp (ตารางที่ 4.4) ต้นไม้สายวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นบริเวณโดเมน D1/D2 บนยีน 26S rDNA มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการสามารถจัดจำแนกยีสต์เป็น 2 สกุล ได้แก่ กลุ่ม *Saccharomyces cerevisiae* และ *Lachancea fermentati* (ภาพที่ 4.11) ซึ่งจากรายงานของ Savitree et al. (2020)

[49] ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์โดเมน D1/D2 บนยีน 26s rDNA และ ITS ของยีสต์จากน้ำตาลสดซึ่งสายพันธุ์ยีสต์ที่พบมากที่สุดคือ *Saccharomyces cerevisiae* (ร้อยละ 86.70) และ *Lachancea fermentati* ยังพบว่า *Lachancea fermentati* มีการผลิตเอทานอลในปริมาณสูงสุด 76.74 กรัม/ลิตร *Saccharomyces cerevisiae* ประมาณ 69.57 ถึง 76.74 กรัม/ลิตร

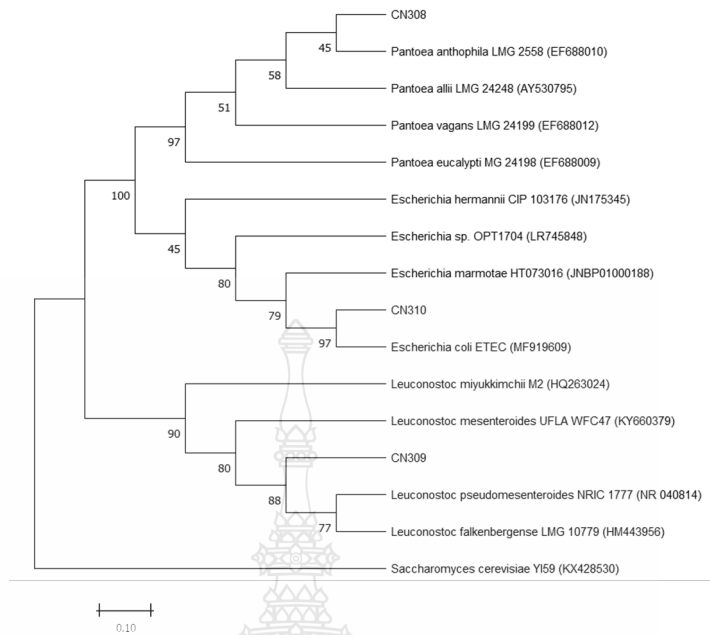
ทำให้พบว่าจากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าแบคทีเรีย แสดงดังภาพที่ 4.8 หมายเลข 1 คือ *Pantoea anthophila* อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นเชื้อก่อโรคพืชที่โดดเด่น และเชื้อโรคฉวยโอกาสของมนุษย์ [90] หมายเลข 2 คือ *Leuconostoc pseudomesenteroides* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับอาหาร และใช้เริ่มต้นในการหมักนมบางชนิด ซึ่งแบคทีเรียประเภทแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจะยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ เนื่องจากค่า pH กรดอินทรีย์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารเคมีอื่นๆ [91] และ หมายเลข 3 คือ *Escherichia coli* พบในงานเพาะเชื้อของชุดควบคุมเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มาจากสำไส้ของสิ่งมีชีวิตที่อาจปนเปื้อนระหว่างหรือหลังการเก็บเกี่ยวน้ำตาลโตนด

จากภาพที่ 4.9 หมายเลข 1 คือ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีลักษณะสมบัติโดดเด่นในการหมักแอลกอฮอล์ โดยพบยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ [92] หมายเลข 2 คือ *Lachancea fermentati* พบมากในการหมักไวน์องุ่น และคอมบูชา เป็นสายพันธุ์การผลิตเบียร์เพื่อสร้างเบียร์เปรี้ยวหรือเบียร์แอลกอฮอล์ต่ำเพราะผลิตกรดแลคติกระหว่างการหมัก[93]

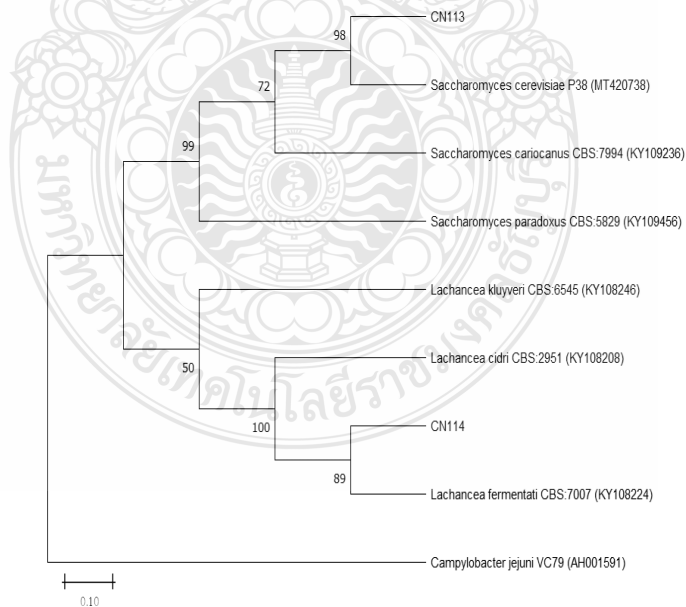


ตารางที่ 4.4 เอกลักษณ์ของลำดับ (%) ของลำดับยีน 16S rRNA และ D1/D2 บนยีน 26s rDNA ของที่ได้จากน้ำตาลโตนด

Morphotypic isolated strains	Nucleotide fragment length (bp)	Query coverage (%)	Sequence identity (%)	The closest match in GenBank (accession number)
CN308	1400	100	99.79	<i>Pantoea anthophila</i> sp. LMG 2558 (EF688010)
CN309	1448	100	100	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> sp. NRIC 1777 (NR040814)
CN310	1503	100	99.80	<i>Escherichia coli</i> ETEC (MF919609)
CN113	580	100	100	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> P38 (MT420738)
CN114	578	100	100	<i>Lachancea fermentati</i> CBS 7007 (KY108224)



ภาพที่ 4.10 แผนภูมิวิวัฒนาการแบบ Neighbor-joining ของเชื้อแบคทีเรีย CN308 CN309 และ CN310 เทียบกับเชื้อในสกุล *Pantoea anthophila*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* และ *Escherichia coli*



ภาพที่ 4.11 แผนภูมิวิวัฒนาการแบบ Neighbor-joining ของเชื้อยีสต์ CN113 และ CN114 เทียบกับเชื้อในสกุล *Saccharomyces cerevisiae* และ *Lachancea fermentati*

4.6 การวิเคราะห์จุลินทรีย์น้ำตาลโตนครหว่างการหมักด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์

การวิเคราะห์จุลินทรีย์ระหว่างการหมักด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์ (ITS) (ตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.12) เชื้อที่พบมากที่สุดในน้ำตาลโตนคร คือ *Saccharomyces cerevisiae* สูงสุดถึงร้อยละ 88.5 แต่เคยมีปริมาณเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* น้อยที่สุด ร้อยละ 67.4 ทำให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำที่สุด (ตารางที่ 4.3) เชื้อที่พบรองลงมาคือ *Lachancea fermentati* พบ ร้อยละ 3.6 – 15.7 พบในเคี่ยมมากที่สุด ซึ่งพบในผลการเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4.11) *Lachancea fermentati* มีความสามารถพิเศษในการผลิตกรดแลคติกจำนวนมากในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ ส่งผลให้เกิดการสะสมของกรดแลคติกทำให้การผลิตเอทานอลลดลง [93] จากตารางพบ *Candida* 2 สปีชีส์ คือ *Candida tropicalis* ร้อยละ 4.0 - 12.1 และ *Candida sojae* ร้อยละ 0.1 – 0.3 พบได้ในน้ำตาลสด จากรายงานของ Savitree et al. (2020) [49] ทำการสำรวจยีสต์ในมะพร้าว ตาลโตนคร และน้ำตาลจาก จากการหมักเอทานอลของยีสต์ที่แยกได้ ซึ่งพบ *Saccharomyces cerevisiae* มีอยู่จำนวนมากในตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด คือ ร้อยละ 76.67, 86.70 และ 100 และยังพบเชื้ออื่นๆ เช่น *Lachancea fermentati*, *Candida tropicalis* เป็นต้น และพบ *Hanseniaspora opuntiae* หลังจากหมักจะมีปริมาณลดลง พบในสิ่งทดลองเพียง ร้อยละ 0.7 - 3.2 ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในน้ำตาลสด โดยจากการทดลองของจรัญธร (2558) [79] ได้รวบรวมน้ำตาลสดจากต้นปาล์ม 3 สายพันธุ์ (*Elaeis guineensis*, *Raphia hookeri* และ *Borassus aethiopum*) นำน้ำตาลสดมาวิเคราะห์โดย MiSeq amplicon และเทคนิคเมตาจีโนมิกส์ โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA และ ITS ความยาวลำดับเบส 450 bp สำหรับแบคทีเรีย และความยาวลำดับเบส 200 - 450 bp สำหรับยีสต์ ยีสต์ที่พบมากในตัวอย่างเหล่านี้คือ *Saccharomyces cerevisiae* ร้อยละ 95.3, 88.4 และ 78.1 ในปาล์มรอน ปาล์มน้ำมัน และปาล์มราเปีย ตามลำดับ รองลงมาคือ *Hanseniaspora* sp. ร้อยละ 9.28 *Hanseniaspora valbyensis* ร้อยละ 11.92 และ *Hanseniaspora guilliermondii* ร้อยละ 8.0 เป็นต้น

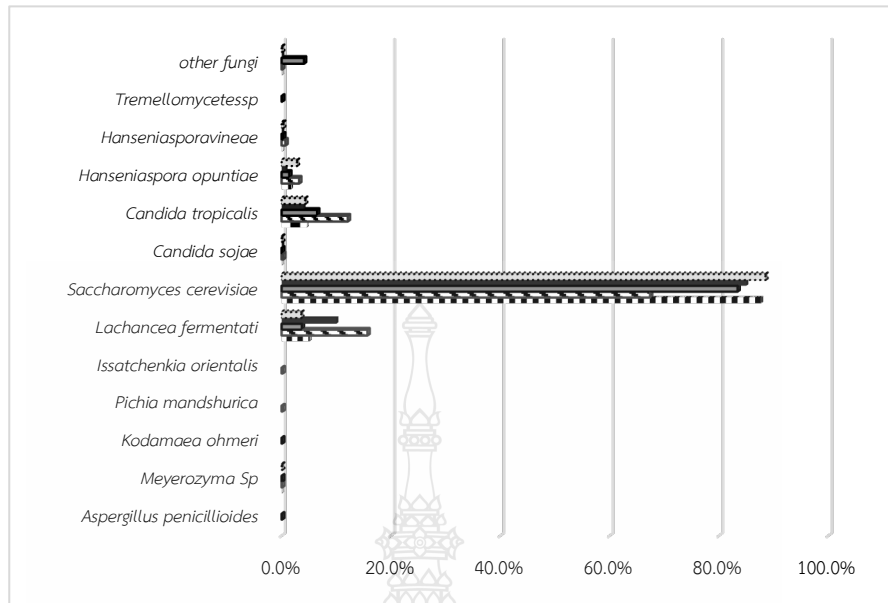
จากตารางที่ 4.5 ยังพบยีสต์ต่างๆ เช่น *Hanseniaspora vineae* ร้อยละ 0.7 *Meyerozyma* sp, *Tremellomycetes* sp, *Pichia mandshurica* และ *Issatchenkia orientalis* ร้อยละ 0.2 และยังพบเชื้อรา ร้อยละ 0.1 คือ *Aspergillus penicillioides* และยังพบฟังไจอื่นๆ ในสิ่งทดลอง เช่น มะเกลือสดพบ ร้อยละ 4.1 ซึ่งบ่งชี้ว่าการใช้มะเกลือสดอาจทำให้มีการปนเปื้อน ทำให้ภูมิปัญญาดั้งเดิมเลือกใช้มะเกลืออย่างแทน

กระบวนการหมักน้ำตาลโตนครจากการศึกษาจำนวนประชากรของยีสต์ในการหมักน้ำตาลโตนคร ทำให้ทราบถึงจำนวนของยีสต์ที่มีผลต่อการหมัก เช่น *Saccharomyces cerevisiae* สูงถึงร้อยละ 88.5 ที่ได้จากธรรมชาติของน้ำตาลโตนครสดโดยไม่ผ่านการเติมยีสต์มีปริมาณที่เพียงพอต่อการหมักแอลกอฮอล์ และจากการหาจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย ของสิ่งทดลองควบคุมมีปริมาณแบคทีเรีย

สูงกว่าสิ่งทดลองที่ใส่ไม้ต่างๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการศึกษาสารประกอบในไม้ตัวอย่างแต่ละชนิดมีสารที่สำคัญต่อการหมักคือ ปริมาณสารฟีนอลิกที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* และแบคทีเรียแกรมบวกเช่น *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* [29] ดังนั้น ในการหมักเราสามารถหาสิ่งทดแทนการใช้ไม้ตัวอย่างเหล่านี้ได้โดยการสร้างสภาพแวดล้อมในการหมักโดยการใช้สารเคมีที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เช่น การใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) เป็นตัวช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการที่อาจทำให้เกิดการเน่าเสีย หรือการออกซิเดชัน [94] ปริมาณไนโตรเจนมีส่วนสำคัญ เป็นแหล่งอาหารของยีสต์ในการหมัก เติมสารเคมีทดแทน เช่น ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใส่ในการหมักน้ำผลไม้ หรือการทำไวน์ เป็นต้น [95]

ตารางที่ 4.5 ร้อยละของฟงไจในน้ำตาลโดนดทั้ง 5 สิ่งทดลองจากการวิเคราะห์ด้วยเมตาจีโนมิกส์

อนุกรมวิธาน	PW ชุด ควบคุม	PW.C น้ำตาล สด+เคี้ยว	PW. D1 น้ำตาลสด+ มะเกลือสด	PW. D2 น้ำตาลสด+ มะเกลืออย่าง	PW. S น้ำตาลสด+ พยอม
<i>Aspergillus penicillioides</i>			0.1%		
<i>Meyerozyma sp</i>	0.1%	0.1%	0.1%		0.1%
<i>Kodamaea ohmeri</i>			0.1%		
<i>Pichia mandshurica</i>		0.2%			
<i>Issatchenkia orientalis</i>		0.2%			
<i>Lachancea fermentati</i>	3.6%	15.7%	3.7%	10.0%	5.1%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	88.5%	67.4%	83.4%	85.0%	87.7%
<i>Candida sojae</i>	0.1%	0.3%	0.1%	0.1%	0.1%
<i>Candida tropicalis</i>	4.3%	12.1%	6.5%	4.0%	4.6%
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	2.8%	3.2%	1.4%	0.7%	1.7%
<i>Hanseniaspora vineae</i>	0.3%	0.7%	0.3%	0.1%	0.2%
<i>Tremellomycetes sp</i>			0.1%		
<i>Fungi sp</i>	0.1%	0.1%	4.1%	0.1%	0.1%



ภาพที่ 4.12 ร้อยละของฟงไจในน้ำตาลโตนดทั้ง 5 สิ่งทดลองจากการวิเคราะห์ด้วยเมตาจีโนมิกส์

ขูดคววม
 น้ำตาลสด + มะเกลืออย่าง
 น้ำตาลสด + มะเกลือสด
 น้ำตาลสด + พะยอม
 น้ำตาลสด + เคี้ยว

4.7 การประเมินทางประสาทสัมผัสของน้ำตาลโตนดที่หมักด้วยไม้ชนิดต่างๆ

เมื่อนำน้ำตาลโตนดหมักด้วยไม้ชนิดต่างๆ ทั้ง 5 สิ่งทดลอง เป็นเวลา 3 วัน นำมาประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน โดยการทดสอบดมกลิ่นให้คะแนน 1 - 5 ระดับ (5 =ชอบมากที่สุด 4 =ชอบมาก 3 =ชอบปานกลาง 2 =ชอบน้อย 1 =ชอบน้อยที่สุด) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6 จากผลการประเมินทางประสาทสัมผัสด้านความชอบด้านกลิ่นโดยผู้ทดสอบ จำนวน 30 คน ผลที่ได้คะแนนคือความชอบอยู่ระดับความชอบปานกลาง โดย น้ำตาลสดและมะเกลืออย่าง ได้คะแนนความชอบมากที่สุด คือ 3.77 รองลงมาคือ น้ำตาลสดและพะยอม และน้ำตาลสดและเคี้ยว และสิ่งทดลองความคุมได้คะแนนความชอบน้อยที่สุดคือ 2.10

ตารางที่ 4.6 ผลการประเมินความชอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นของน้ำตาลโตนดหลังจากการหมัก 3 วัน

สิ่งทดลอง	คะแนนเฉลี่ยการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่น
ชุดควบคุม	2.10 ^d
น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง	3.77 ^a
น้ำตาลสด+พะยอม	3.70 ^b
น้ำตาลสด+เคี่ยม	2.77 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq .05$)



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาคุณสมบัติของไม้พะยอม มะเกลือสด มะเกลืออย่าง และเคี่ยม ที่มีผลต่อการหมักน้ำตาลโตนด พบว่าสารฟีนอลิกในไม้ทั้ง 4 สิ่งทดลอง มีปริมาณ 288.735, 50.479, 130.507 และ 282.607 mg GAE/g ตามลำดับ ซึ่งพะยอม และเคี่ยมมีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุด และจากการวิเคราะห์ไนโตรเจนในไม้ทั้ง 4 สิ่งทดลอง มีปริมาณ 1.270, 1.566, 0.866 และ 3.096 TN% ตามลำดับ ซึ่งเคี่ยมมีปริมาณไนโตรเจน และปริมาณฟีนอลิกสูงสุดมีผลในการยับยั้งเชื้อที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย และทำให้ยีสต์เจริญเติบโตได้ดี ซึ่งเหมาะสำหรับใส่ในกระบอกเก็บน้ำตาลโตนดเพื่อช่วยไม่ให้น้ำตาลโตนดเน่าเสียโดยเร็ว และพบว่าปริมาณโปรตีนของทั้ง 4 สิ่งทดลอง อยู่ในช่วงร้อยละ 0.5 – 0.8 และพบว่าฟลาโวนอยด์ในไม้ทั้ง 4 สิ่งทดลอง มีปริมาณ 40.941, 35.529, 32.391 และ 45.847 mg QE/g ตามลำดับ ปริมาณฟลาโวนอยด์ของเคี่ยม และพะยอมมีปริมาณใกล้เคียงกัน

จากการศึกษาปริมาณยีสต์บนอาหาร Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC Agar) ในสิ่งทดลองควบคุม น้ำตาลโตนดที่ใส่พะยอม มะเกลือสด มะเกลืออย่าง และเคี่ยม พบปริมาณเชื้อยีสต์ 6.31 ± 0.12 , 6.25 ± 0.01 , 6.46 ± 0.05 , 6.27 ± 0.03 และ 6.26 ± 0.08 Log cfu/ml ตามลำดับ ปริมาณยีสต์ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดด้วย Plate Count Agar (PCA) + 0.01 % Cycloheximide พบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 8.30 ± 0.01 , 8.02 ± 0.04 , 8.01 ± 0.02 , 8 ± 0.01 และ 8.02 ± 0.07 Log cfu/ml ตามลำดับ จำนวนแบคทีเรียในชุดควบคุมมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่างจากน้ำตาลสดที่ใส่ไม้ทั้ง 4 ตัวอย่าง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักน้ำตาลโตนดด้วยเทคนิคมาตรฐานและเทคนิคเมตาจีโนมิกส์ จากการคัดเลือกโคโลนีที่แตกต่างกันพบว่า ยีสต์ที่พบมีโคโลนีและลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันอยู่ 2 แบบ และ แบคทีเรีย 3 แบบ ทำการสกัดดีเอ็นเอลำดับยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย และ D1/D2 บนยีน 26s rDNA ของยีสต์ จากผลการทดลองยีสต์ที่พบคือ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Lachancea fermentati* และ แบคทีเรีย คือ *Pantoea anthophila*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* และ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียปนเปื้อนอาจจะปนเปื้อนจากการเก็บเกี่ยวหรือภาชนะที่สัมผัสกับตัวอย่าง

จากการศึกษาด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์ (IST) พบยีสต์ที่พบมากที่สุดคือ *Saccharomyces cerevisiae* ร้อยละ 88.5 และ *Lachancea fermentati* ร้อยละ 15.7 ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญต่อการหมัก และยังพบยีสต์ และฟังไจอีกหลายชนิด ได้แก่ *Candida tropicalis* ร้อยละ 12.1 *Hanseniaspora vineae* ร้อยละ 0.7 *Hanseniaspora opuntiae* ร้อยละ 3.2 *Aspergillus penicillioides*, *Meyerozyma* sp. , *Kodamaea ohmeri*, *Candida sojae* และ *Tremellomyces* sp. ร้อยละ 0.1 *Pichia mandshurica* และ *Issatchenkia orientalis* ร้อยละ 0.2 และยังพบฟังไจอื่นๆ ร้อยละ 4.1 ซึ่งพบมาในมะเกลือสดเกิดจากการปนเปื้อน และจากภูมิปัญญาดั้งเดิมไม่นิยมใส่มะเกลือสดเพราะทำให้เกิดการเน่าเสียในการหมักน้ำตาลโตนด

จากการศึกษาน้ำตาลโตนดหลังการหมัก 3 วัน วัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography GC-MS) พบว่า ปริมาณเอทานอลของ พะยอม และมะเกลืออย่างสูงที่สุด ร้อยละ 3.28 - 3.42 รองลงมาคือ ชูดควบคุม และมะเกลือสด ร้อยละ 2.28 - 2.30 ปริมาณเอทานอลที่เกิดจาก ชูดควบคุมอาจเกิดได้จากการหมักของเชื้อตามธรรมชาติแต่ก็พบว่ามียีสต์ที่มีปริมาณกรดอะซิติกหรือกรดน้ำส้มที่สูงเช่นเดียวกัน และเคี่ยมมีปริมาณเอทานอล ร้อยละ 0.11 ซึ่งถึงแม้เคี่ยมจะมีปริมาณฟีนอลิก และไนโตรเจนที่สูงแต่ก็ไม่มีส่วนช่วยให้ปริมาณเอทานอลสูงตาม เห็นได้จากปริมาณของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีส่วนในการผลิตแอลกอฮอล์มีปริมาณที่น้อยที่สุด ร้อยละ 67.4 ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกที่เคี่ยมมีต่อการหมักเป็นต้น

จากการศึกษาประเมินประสาทสัมผัสด้วยวิธีการเปรียบเทียบความแตกต่างตัวอย่างโดยการให้คะแนน โดยให้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน ผลที่ได้คะแนนการยอมรับความชอบอยู่ระดับความชอบปานกลาง คือ น้ำตาลสดที่ใสไม่มะเกลืออย่าง 3.77 น้ำตาลสดที่ใสไม่พะยอม 3.70 น้ำตาลสดที่ใสไม่เคี่ยม 2.77 และ ลึ่งทดลองควบคุม 2.10 ตามลำดับ ซึ่งผู้ทดสอบมีความชอบน้ำตาลสดที่ใสไม่มะเกลืออย่างมากที่สุด

ดังนั้นการหมักน้ำตาลเมาซึ่งเป็นวิถีโบราณในการรักษาแปรรูปวัตถุดิบที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น เช่น น้ำตาลโตนดจึงควรมีวิธีการเก็บเกี่ยวที่คำนึงถึงความสะอาดปลอดภัยต่อการบริโภคเพื่อลดเชื้อปนเปื้อนจากการเก็บเกี่ยว ไม้ที่ใช้ในการหมักควรทำความสะอาดก่อนนำไปใช้หมักน้ำตาลโตนด ควรมีการต่อยอดงานวิจัยในการใช้ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์ทำการค้าหรือสารช่วยในการถนอมน้ำตาลสดลดการเน่าเสียเพื่อทดแทนการตัดไม้ทำลายสิ่งแวดล้อมเพราะไม้เหล่านี้เป็นพืชท้องถิ่นเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สมควรอนุรักษ์ไว้

5.2 ข้อเสนอแนะ

- 5.2.1 ควรศึกษาทดลองเพิ่มเติมเกี่ยวเชื้อจุลินทรีย์ที่พบแต่ละชนิดในกระบวนการหมัก และหน้าที่ในการหมักน้ำตาลโตนดโดยศึกษาจุลินทรีย์ที่พบจำนวนมากจากเทคนิค เมตาจีโนมิกส์
- 5.2.2 ควรศึกษาไม้ตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ เพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลของไม้แต่ละชนิด
- 5.2.3 ศึกษากลไกของเคี่ยมต่อปริมาณเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการหมัก



บรรณานุกรม

- [1] อารี แก้วกนกวิจิตร, “ผลของไม้พะยอมและไม้มะเกลือที่มีต่อจุลินทรีย์ในน้ำตาลสด และ น้ำตาลเมา” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, ISBN 974-359-449-3, 2546.
- [2] วรณิภา เฉลิมหมู่, “ประสิทธิภาพของครีมน้ำมันจากสารสกัดหยาบเปลือกต้นพะยอมและเปลือก ต้นคูน” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ศึกษามหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์, 2557.
- [3] พัชรินทร์ เมทินีวงศ์, “การสกัดและการวิเคราะห์หาปริมาณไดออกซิฟิรอลจากมะเกลือ (*Diospyros mollis* Gridd)” วิทยานิพนธ์ (วท.ม.) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2528.
- [4] ลีนา ผู้พัฒนาพงศ์, “สมุนไพรไทย ตอนที่ 5” ห้างจำกัดชุดิมาการพิมพ์, กรุงเทพมหานคร, 2530.
- [5] เมธาวิ คำชู, “การออกแบบชุดลาลองสตรีในสไตล์มินิมอลโดยใช้ผ้าฝ้ายย้อมสีจากเปลือกไม้เคี่ยม” คหกรรมศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร, 2561.
- [6] ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, “การศึกษายีสต์ในน้ำตาลสด น้ำตาลเมา และการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มี ประสิทธิภาพสูงเพื่อการหมักแอลกอฮอล์” วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) มหาลัย เกษตรศาสตร์, 2521.
- [7] อัจฉา บุญมี, “เมตาจีโนมิกส์: ปิดโลกแห่งจีโนมจุลินทรีย์ในธรรมชาติ” วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีที่ 21 ฉบับที่ 1” มกราคม-มีนาคม 2556.
- [8] โชติมา โพธิทรัพย์ และ รศนา วงศ์รัตนชีวิน, “เมตาจีโนมิกส์” ศรีนครินทร์เวชสาร 2553;25(1): 54-8, 2553.
- [9] สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณในไทย, “ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาค 2) / (ภาค 3) ว่าด้วย พฤษชาติ วัตฤชาติ และสัตววัตฤนานาชนิด” ไพศาลศิลป์การพิมพ์กรุงเทพมหานคร, 2520.
- [10] Y.P Chang, R. Mitchell, “Chemical Composition of Common North America Pulpwood Barks”, Tappi. 38(5): 315-320, May 1955.
- [11] สุภักดิ์ ปลิงกระโทก และ ชีระ ธรรมวงศา, “ราเอนโดไฟต์จากมะเกลือและลักษณะทางสัณฐานวิทยา” มหาลัยราชภัฏนครราชสีมา, 2550.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [12] J. Kinho, "The Ability of Adaptation and Early Growth of Nine Types of *Diospyros* in Exit Conservation in North Sulawesi," presented at International Conference on Forest and Biodiversity, *Manado*, 2013.
- [13] B. Wallnöffer, "The biology and systematic of Ebenaceae: a review," *Naturhistorisches Museum Wien*, pp. 485-512, Dec 2001.
- [14] S. Duangjai, J. Munzinger, F. Forest, and R. Samuel, "A multi-locus plastid phylogenetic analysis of the pantropical genus *Diospyros* (Ebenaceae), with an emphasis on the radiation and biogeographic origins of the New Caledonian endemic species," *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 3, pp. 602-620, Jun 2009.
- [15] K. Yoshihira, S. Natora and P. Kanchanapee, "Tetrahedron Letters," *Science Direct*, vol. 8, pp. 4857-4860, 1967.
- [16] ชุนนิตเทสสุขกิจ, “กองวิจัยทางการแพทย์สมุนไพรพื้นบ้าน ตอนที่1”
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุข, หน้า 59, 2526.
- [17] T. Morikawa, S. Chaipech, H. Matsuda, M. Hamao, Y. Umeda, H. Sato, H. Tamura, K. Ninomiya, M. Yoshikawa, Y. Pongpiriyadacha, T. Hayakawa and O. Muraoka, "Anti-hyperlipidemic constituents from the bark of *Shorea roxburghii*," *Natural Medicines*, vol. 66, pp. 516-524, Jan 2012.
- [18] A.J. Solomon Raju, K. Venkata Ramana and P. Hareesh Chand, "Reproductive ecology of *Shorea roxburghii* G. Don (Dipterocarpaceae), an Endangered semievergreen tree species of peninsular India," *Threatened Taxa*, vol. 3(9), pp. 2061-2070, Sep 2011.
- [19] เพชรนิยม ลัทธิธรมย์, “ฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากเปลือกพะยอมในการต้านเชื้อรา *Colletotrichum* sp” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี, 2555.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [20] K. Sudto, P. Saparpakorn, C. Tancharoen, D. Phromyothin, S. Techasakul, S. Khunnawutmanotham, S. Vajrodaya, G. Hui-Ming, X.T. Ren, and P. Hannongbua, "Diptoindonesin D, a potent antibacterial activity against gram-positive bacteria, an inhibitor of penicillin-binding protein 2a from the stem bark of *Shorea roxburghii* G.Don," *Chiang Mai Journal of Science*, vol. 46, pp. 1161-1175, 2562.
- [21] มัณฑนา นวลเจริญ, "พรรณไม้ป่าชายหาด" ปทุมธานี, สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, หน้า 32, 2552.
- [22] กานต์สิริ ธิมาบุตร, "ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเคี่ยมร่วมกับโคโตซานต่อการยับยั้งราก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวและการรักษาคุณภาพของผลเงาะ" วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2561.
- [23] H. Matsuda, Y. Asao, S. Nakamura, M. Hamao, S. Sugimoto, M. Hongo, Y. Pongpiriyadacha, and M. Yoshikawa, "Antidiabetogenic constituents from the Thai traditional medicine *Cotylelobium melanoxylon*," *Chem Pharm Bull*, vol. 57, pp. 487-494, 2016.
- [24] I. Soerianegara, and R.H.J. Lemmens, "Plant resources of South-East Asia No.5(1). Timer trees: Minor commercial timber," *Prosea Foundation*, vol. 5, 1994.
- [25] S.S. Idramsa Endang, H.N. Laurentius and P. Rarastoeti, "Antimicrobial activities of endophytic bacteria isolated from *Cotylelobium melanoxylon* (Hook. F) Pierre.," *Int J Phar Bio Sci*, vol. 7, pp. 666-672, 2016.
- [26] J. Chana-Thaworn, S. Chanthachum, and T. Wittaya, "Properties and antimicrobial activity of edible films incorporated with kiam wood (*Cotylelobium lanceolatum*) extract," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 44, pp. 284-292, 2011.
- [27] R. Kadir, and M.D. Hale, "Antioxidant potential and content of phenolic compounds in extracts of twelve selected Malaysian commercial woodspecies," *European Journal of wood and wood products*, vol. 75, pp. 615-622, 2017.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [28] ปุณณานี สัมภาวะผล, “การสกัดองค์ประกอบ คุณสมบัติบางประการ และการประยุกต์ใช้ของสารสกัดแทนนินจากวัสดุเศษเหลือของพืช” โครงการวิจัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2554.
- [29] W. Suchanuch, and S. Punnanee, "Antibacterial Activity of selected plant by-products against food borne pathogenic bacteria," *International Conference on nutrition and Food sciences*, vol. 39, pp. 126-130, 2012.
- [30] S. Chanthachum, and L.R. Beuchat, "Inhibitory effect of kiam (*Cotylelobium lanceotatum*craih). Wood extract on gram-positive food borne pathogens and spoilage micro-organisms, *Food microbiology*, vol. 14, pp. 603-608, 1997.
- [31] สำนักงานเกษตรจังหวัดสงขลา, “รายงานประจำปีข้อมูลสถิติจำนวนต้นตาลโตนด” 2549.
- [32] B.S.H. Nisa, D.U. Bagus, C.E. Riki, and M.A. Hevi, "The Potential of Developing Siwalan Palm Sugar (*Borassus flabellifer* Linn.) as One of the Bioethanol Sources to Overcome Energy Crisis Problem in Indonesia," *International Conference on Environmental Engineering and Applications IPCBEE*, vol. 17, 2011.
- [33] กรมส่งเสริมการเกษตร, “ตาลโตนดผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปและรูปแบบโรงผลิต” กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพมหานคร, 2544.
- [34] มารวย เมฆานวกุล และ ขวลิต นิยมธรรม, “ปาล์ม” กองแผนงานและโครงการพิเศษ สำนักงานปลัดกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพมหานคร, 2541.
- [35] จันท์เพ็ญ ชุมแสง และ พิทักษ์ อุทัย, “การมีส่วนร่วมของประชาชนในการผลิตพลังงานทดแทนจากวัสดุเหลือทิ้งของตาลโตนด เพื่อเป็นพลังงานทางเลือกในเขตอำเภอคีรีมาศ จังหวัดสุโขทัย” รายงานวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2554.
- [36] พรรณีภา โสคติพันธ์, “วัฒนธรรมตาลโตนดกระบวนการสร้างชุมชนเข้มแข็ง” กรุงเทพมหานคร, 2547.
- [37] นันทวัน บุญยะประภัศร, “สมุนไพรไม้พื้นเมือง (2)” กรุงเทพมหานคร: บริษัท ประชาชน จำกัด, 2541.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [38] K. Teeparuksapun, N. Prasongchan, and N. Podkumnerd, "Ethanol Production from Ripe Palmyra Palm Fruit Pulp Extract using Loog Pang Khao MaK and Loog Pang Satho," *Faculty of Liberal Arts, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Songkhla, Thailand*, 2019.
- [39] Y. Masayuki, "Medicinal flowers. XII (1) new spirostane-type steroid saponins with antidiabetogenic activity from *Borassus flabellifer*," *Chem Pharm Bull*, vol. 55, pp. 308–316, 2007.
- [40] S. Subashini, V. Rameshkannan, and P. Mani, "Phytochemical and GC-MS analysis of Bioactive compounds From *Borassus flabellifer* Linn root," *European Journal of Molecular Biology and Biochemistry*, vol. 2(3), pp. 148-152, 2015.
- [41] S. Ramya, "Review on Traditional and Phyto-Pharmacological Aspects Of *Borassus Flabellifer* (Palmyra Tree)," *Int J Rev Pharmco Heal Res*, vol. 1, 2018.
- [42] H.J. Pramod, A.V. Yadav, V.N. Raje, M. Mohite, and G. Wadkar, "Antioxidant Activity of *Borassus flabellifer* (linn.) Fruits," *Asian J. Pharm Tech*, vol. 3, pp. 16-19, 2013.
- [43] T. Debnath, R. Radhakrishnan, M. Gopal, M. Talwar, and K. Nandakumar, "Hypoglycaemic effects of alcoholic root extract of *Borassus flabellifer* (Linn.) in normal and diabetic rats," *Pak. J. Pharm. Sci*, vol. 26, pp.673-679, Jul 2013.
- [44] กิ๊ยะ เทรบุญย์, “ประเภทและกลไกการทำงานของระบบการผลิตทางการเกษตรของสทิ้งพระในปัจจุบันโครงการวิจัยระบบการผลิตทางการเกษตร” *คณทัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*, 2527.
- [45] สุภารัตน์ เตี้ยไพบูลย์, “ผลของการใช้ความดันสูงและความร้อนต่อคุณภาพของน้ำตาลโตนด” *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*, 2547.
- [46] เรณุกา แจ่มฟ้า, “การผลิตไซรัปจากน้ำตาลสด” *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยนเรศวร*, 2545.
- [47] อินท์ธิมา หิรัญอักษรวงศ์, “การพัฒนาผลิตภัณฑ์ขึ้นกรอบจากน้ำตาลสด” *วิทยานิพนธ์คหกรรมศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร*, 2557.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [48] W.L. Owen, "Microbiology of sugar manufacture and refining," *Handbook of Sugarcane*, pp. 305-319, 1990.
- [49] S. Limtong, S. Am-In, R. Kaewwichian, C. Kaewkrajay and S. Jindamorakot, "Exploration of yeast communities in fresh coconut, palmyra, and nipa palm saps and ethanol-fermenting ability of isolated yeasts," *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, vol. 113, pp. 2077–2095, 2020.
- [50] C.G.O. Aline, S.S.S. Antonio, P.S. Cristina and W.O.S. Clovis, "Microbiological evaluation of sugarcane juice sold at street stands and juice handling conditions in São Carlos, São Paulo, Brazil. Cad. Cad Saúde Pública," *Rio de Janeiro*, vol. 22(5), pp. 111-1114, 2006.
- [51] D.H. Bargey, G.H. John, R.K. Noel, and H.A.S. Peter, "Bargey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition," 1994.
- [52] P.C. Leong, "The nutritive value of coconut toddy," *Brit. J. Nutrition*. 7: 253-259, 1994.
- [53] S.I. Faparusi, "Microorganism from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) tap holes," *J. Food Sci*, vol. 39, pp. 755-757, Jul 1974.
- [54] P.I. Okolie, C.N. Opara, E.C. Emerenini, and S.V.A. Uzochukwu, "Evaluation of bacterial diversity in palm wine by 16S rDNA analysis of community DNA," *Niger. Food J*, vol. 3, pp. 83–90, 2013.
- [55] N. Okafor, "Microbiology of Nigerian palm wine with particular reference to bacteria," *Sfam society for applied microbiology*, vol. 38, pp. 81-88, Apr 1975.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [56] ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, “การศึกษายีสต์ในน้ำตาลสดน้ำตาลเมาและลูกแป้งสุรา และเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกเพื่อการผลิตแอลกอฮอล์” รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 20 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร 1-3 กุมภาพันธ์ 2525, หน้า 75-87, 2525.
- [57] วราวุฒิ โภยสมบัติ, “ศึกษาจุลินทรีย์ในน้ำตาลสด” ปัญหาพิเศษ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2536.
- [58] J.A. Gilbert, and C.L. Dupont, "Microbial metagenomics: Beyond the genome," *Annu. Rev. Marine Sci*, vol. 3, pp. 347-371, Jan 2011.
- [59] J. Handelsman, M.R. Rondon, S.F. Brady, J. Clardy and R.M. Goodman, "Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products," *Chem. Biol*, vol. 5, pp. 245-249, 1998.
- [60] K. Chen, and L. Pachter, "Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities," *PLoS Comp. Biol*, vol. 1, pp. 106-112, 2005.
- [61] N.R. Pace, D.A. Stahl, D.J. Lane, and G.J. Olsen, "Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences," *ASM News*, vol. 51, pp. 4-12, 1985.
- [62] J. Gilbert, "Metagenomics, metadata, and meta-analysis meta - analysis," *Encyclopedia Metagenomics*, pp. 1-4, Jan 2013.
- [63] A. Nazir, "Review on metagenomics and its applications," *IJIR*, vol. 2, pp. 277-286, Jan 2016.
- [64] G. Neelakanta, "Sultana H. The use of metagenomic approaches to analyze changes in microbial communities," *Microbiol Insights*, vol. 6, pp. 37-48, Apr 2013.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [65] ขวัญใจ พิพัฒน์เจริญวงศ์ และ ศุภชัย วุฒิพงศ์ชัยกิจ, “การศึกษาพันธุกรรมของตาลโตนด (*Borassus flabellifer*) ในภาคกลางของประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายเอแอฟแอลพี” บทความวิจัยคณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2561.
- [66] S.G. Tringe, and E.M. Rubin, "Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples," *Nature Reviews Genetics*, vol. 6, pp. 805-14, Oct 2005.
- [67] C.J. Duan, and J.X. Feng, "Mining metagenomes for novel cellulase genes," *Biotechnol. Lett.*, vol. 32, pp. 1765-1775, Jul 2010.
- [68] A. Knietzsch, S. Bowien, G. Whited, G. Gottschalk, and R. Daniel, "Identification and characterization of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase- and diol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, pp. 3048-3060, Jun 2003.
- [69] R. Daniel, "The metagenomics of soil," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, pp. 470-478, Jun 2005.
- [70] G.E. Laetitia, C.L. Wilkins, G.J. Ettinger, and A.E. Jonathan, "Metagenome-assembled genomes provide new insight into the microbial diversity of two thermal pools in Kamchatka," *Russia. Scientific Reports*, vol. 9, pp. 3059, Feb 2019.
- [71] Z. Dang, A. Patricia McLenachan., J.L. Peter, N. Waipara, E.R. Orhan, C. Reynolds, and D. Blanchon, "Metagenome Profiling Identifies Potential Biocontrol Agents for *Selaginella kraussiana* in New Zealand," *Genes*, vol. 10, pp. 106, Feb 2019.
- [72] J.B. Palme, D.G. Joakim Larsson, and E. Kristiansson, "Using Metagenomics to investigate human and environmental resistomes," *AntimicrobChemother*, vol.72, pp. 2690–2703, Oct 2017.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [73] D.S. Agyirifo, M. Wamalwa, E.P. Otwe, I. Galyuon., S. Runo, J. Takrama, and J. Ngeranwa, "Metagenomics analysis of cocoa bean fermentation microbiome identifying species diversity and putative functional capabilities," *Heliyon*, vol. 5, Jul 2019.
- [74] L.H. Wu, Z.M. Lu, X.J. Zhang, Z.M. Wang, Y.J. Yu, J.S. Sh, and Z.H. Xu, "Metagenomics reveals flavour metabolic network of cereal vinegar microbiota," *Food Microbiology*, vol. 62, Jul 2019.
- [75] S.S. Bora, J. Keot, S. Das, K. Sarma, and M. Barooah, "Metagenomics analysis of microbial communities associated with a traditional rice wine starter culture (Xaj-pitha) of Assam, India," *Biotech*, vol. 6, pp. 153, Dec 2016.
- [76] M. Verce, L.D. Vuyst, and S. Weckx, "Shotgun Metagenomics of a Water Kefir Fermentation Ecosystem Reveals a Novel *Oenococcus* Species," *Front Microbiol*, vol. 10, pp. 479, Mar 2019.
- [77] X. Hong, J. Chen, L. Liu, H. Wu, H. Tan, G. Xie, Q. Xu, H. Zou, W. Yu, L. Wang, and L. Qin, "Metagenomic sequencing reveals the relationship between microbiota composition and quality of Chinese Rice Wine," *Sci Rep*, vol. 6, pp. May 2016.
- [78] N. Theodore Djeni, H. Karen Kouame, D.M. Francine Ake, S.T. Laurent Amoikon, K. Marcellin Dje. and K. Jeyaram, "Microbial Diversity and Metabolite Profiles of Palm Wine Produced from Three Different Palm Tree Species in Côte d'Ivoire," *Scientific Reports*, vol. 10, pp. Feb 2020.
- [79] จรินทร์ บุญญานภาพ, ชนิดา พันสวาสดี, ณัฐชัย นุชชม และ กัญจน์ญา เม้าสัว, "การกระจายของชนิดพันธุ์พืชสมุนไพรที่มีสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพื้นที่วนอุทยานเขาหลวง" คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยมหิดล, 2558.
- [80] Association of Official Analytical Chemists, Washington DC. (1995). "Official Methods of Analysis". 16th Edition.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [81] นิธิดา พลโคตร, ฉันทนา อารมณดี, ปรียา พวงสาลี หวังสมนึก และอรรวรรณ มณฑานดิรัตน์, “การตรวจหาปริมาณฟลาโวนอยด์ และปริมาณแคโรทีนในเกสรบัวหลวง” วิทยานิพนธ์ เกษศาตรมหาบัณฑิต สาขาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2556.
- [82] ปาลิดา ตั่งอนุรัตน์, ปริญา ฝาระมี, ชลดา รุ่งเรือง, ธัญญารัตน์ ปัญญาธิง และ เจริญ เจริญชัย, “การพัฒนาการผลิตขนมตาลโดยกล้าเชื้อที่แยกได้จากเนื้อตาลสุก” วารสารวิจัยและพัฒนา วิทยาลัยการณ ในพระบรมราชูปถัมภ์, 2558.
- [83] นิตยา บุญมี, “บทปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร” คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร, 2541.
- [84] อรวัลภ์ อุปถัมภานนท์, “เอกสารประกอบการสอนวิชาการวางแผนการตลาดการประเมิน คุณภาพทางประสาทสัมผัส” คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ธิญบุรี, 2557.
- [85] เบญจมาศ สมวงศ์, ดวงชาติดา กาญจนโสภ, ปารีชาติ นิลวิเชียร, สุรพล ฐิติธนากุล, สรายุทธ อ่อนสนิท และ เยาวพรรณ สนธิกุล, “การสกัดดีเอ็นเอของหม้อข้าวหม้อแกงลิงสาย พันธุ์ *Nepenthes mirabilis*” วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ (II): M02/28-33, 2559.
- [86] Y.H. Zhang, C. Yang, Y. Zhu, R. Guo, and J. Wang, "Pollen morphology observation of eight resources in *Diospyros*," *Acta Hort Sin*, vol. 43, pp. 1167–1174, Jun 2016.
- [87] B.J. Haas, D. Gevers, A.M. Earl, M. Feldgarden, D.V. Ward, G. Giannoukos, D. Ciulla, D. Tabbaa, S.H. Highlander, E. Sodergren, B. Methé, T.Z. DeSantis, J.F. Petrosino, R. Knight, and B.W. Birren, "Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons," *Genome Res*, vol. 21, pp. 494–504, Mar 2011.
- [88] C.P. Kurtzman and C.J. Robnett, "Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences," *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 73, pp. 331-371, May 1998.

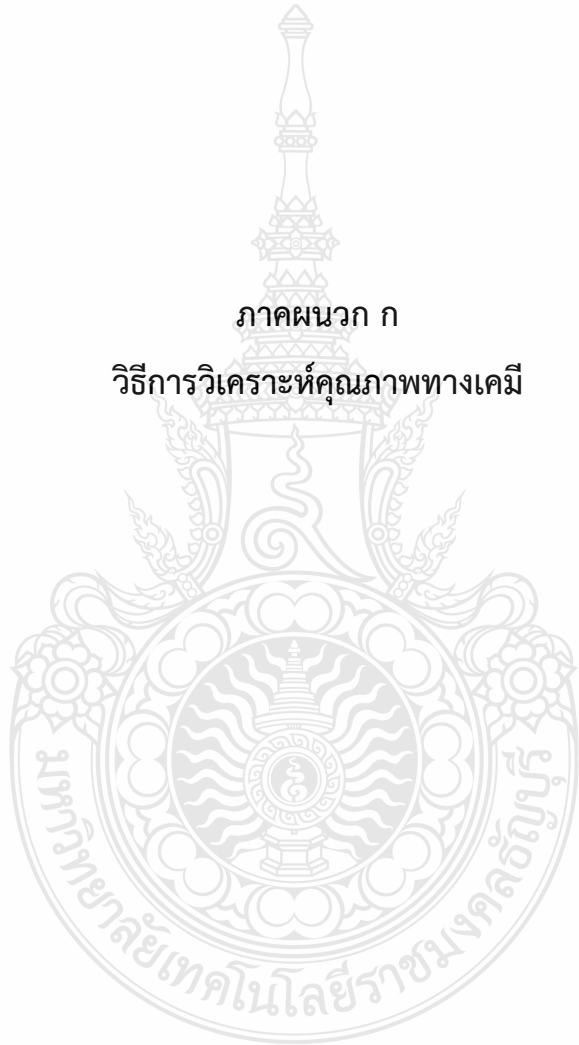
บรรณานุกรม (ต่อ)

- [89] C.K. Browning and C.T. Symons, "Coconut Toddy in Ceylon," *J. Soc. Chem. Ind*, vol. 35, pp. 1158-1162, 1916.
- [90] X. Zhao, L. Gao, H. Huang, Y. Zhao, A. Hanif, H. Wu, Q. Gu, L. Wu and X. Gao, "Exploring the pathogenic function of Pantoeaananatis endogenous plasmid by an efficient and simple plasmid elimination strategy," *Microbiological Research*, vol. 246, May 2021.
- [91] M.E. Stiles, "Bacteriocins Produced by Leuconostoc Species," *Department of Food Science and Nutrition University of Alberta Edmonton, AB, Canada T6G 2P5. J Dairy Sci*, vol. 77, pp. 2718-2724, 1994.
- [92] อภิชนา เตชะวสันตัญญู, "การแยก จำแนก และลักษณะสมบัติของยีสต์และราในลูกแป้งสุราเพื่อการผลิตสาโท" วิทยานิพนธ์ (วท.ม.) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550.
- [93] K. Bellut, K. Krogerus and E. K. Arendt, "*Lachanceafermentati* Strains Isolated from Kombucha: Fundamental Insights, and Practical Application in Low Alcohol Beer Brewing," *Evolutionary and Genomic Microbiology*, Apr 2020.
- [94] T.C. Tan, L.H. Cheng, R. Bhat, G. Rusul and A.M. Easa, "Composition, physicochemical properties and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase from coconut (*Cocos nucifera*) water obtained from immature, mature and overly-mature coconut," *Food Chem*, vol. 1(142), pp. 8-121, Jan 2014.
- [95] A. Osumah and R. Krishnamurthy, "Diamidophosphate (DAP): A Plausible Prebiotic Phosphorylating Reagent with a Chem to BioChem Potential?" *ChemBioChem*, vol. 22, pp. 3001-3009, 2021.

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี



1.วิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง แก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography GC-MS)

1.1 เตรียมความพร้อมและตั้งค่าการใช้งานเครื่อง

ตั้งค่าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีการวิเคราะห์ทุกครั้งจะต้องตั้งค่าสภาวะที่เหมาะสมก่อนใช้งาน

ตารางผนวกที่ ก.1 แสดงสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล โดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีเฟรมไอออนเซ็น

พารามิเตอร์	สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์
แก๊สพา	N ₂
อัตราการไหล (mL/min)	72
อุณหภูมิ (°C)	60
อุณหภูมิของช่องฉีด (°C)	150
อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ (°C)	200
ปริมาตรที่ฉีด (µl)	0.2

2.1 เตรียม Standard preparation ปิเปตสารละลาย Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 5 10 15 และ 20 ตามลำดับ ใส่ขวด Flask ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย n-propanol ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะได้ Standard ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ดังตารางภาคผนวกที่ 2

ตารางผนวกที่ ก.2 ปริมาณสารละลาย EtOH และ n-propanol ในการเตรียม Standard preparation

Standard preparation	ร้อยละ 1 (v/v) ของ EtOH (ml)	ร้อยละ 5 (v/v) ของ n-propanol (ml)	ในปริมาตร (ml)	ความเข้มข้นที่ได้ EtOH	ความเข้มข้นที่ได้ n-propanol	อัตราส่วน EtOH / n-propanol
1	5	50	100	0.05	0.75	0.07
2	10	50	100	0.1	0.75	0.13
3	15	50	100	0.15	0.75	0.20
4	20	50	100	0.2	0.75	0.27

3.1 เตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์

3.1.1 ใช้ Syringe ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่าง กรองตัวอย่างด้วยแผ่นกรอง Syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อให้ตัวอย่างใส

3.1.2 เก็บรักษาตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาวิเคราะห์ขั้นตอนต่อไป ปิดตัวอย่างที่ขวดปรับปริมาตรในขวด flask ใส่ ขวดใส่ตัวอย่าง (Vial) ปริมาตร 2 ส่วน 3 ของขวด

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Compound) โดยวิธี Folin - Ciocalteu colorimetric method ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC. (1990)

2.1 เตรียมสารละลาย

- สารฟอลินความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร (ร้อยละ 10 v/v Folin - Ciocalteu reagent) นำสารละลายฟอลินมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้น เป็นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เช่นใช้สารละลายฟอลิน 10 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตรเป็นต้น
- สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ร้อยละ 7.5 w/v) ชั่ง Na_2CO_3 anhydrous มา 75 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

- เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร โดยชั่งกรดแกลลิก 0.025 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ และปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตรในขวดปรับ ปริมาตรจากนั้นนำสารละลายมาตรฐาน กรดแกลลิกเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร มาเจือจางด้วย เอทานอลบริสุทธิ์ ให้มีความเข้มข้น เป็น 0, 50, 100 และ 150 มิลลิกรัม/ลิตร

2.2 วิธีทดลอง

เตรียมสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 100 microgram/ml ปริมาตร 50 ml

(ซึ่ง gallic acid 0.0050 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml)

เจือจางที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 microgram /ml ปริมาตร 5 ml

(ใช้น้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0 และ gallic acid (100 microgram /ml) 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 ml.

ตามลำดับ)

ปรับปริมาตรของสารละลายมาตรฐานด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 5 ml

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

สารละลายมาตรฐาน (0-100 microgram/ml) หรือสารสกัดข้าวปริมาณ 0.4 ml (3 ซ้ำ)

เติม Folin - Ciocalteu 2 ml. ทิ้งไว้ 4 นาที

เติมสารละลาย Na_2CO_3 1.6 ml. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

(สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ความเข้มของสีตามความเข้มข้นของ gallic acid)

นำสารละลายส่วนใสวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm. (ใช้น้ำกลั่นเป็น blank)



พลอตกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ gallic acid (microgram/ml)



คำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่าง

หมายเหตุ ตัวอย่างที่ใช้วัดค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ค่าการดูดกลืนแสงควรอยู่ในช่วงของสารละลายมาตรฐานและไม่ควรเกิน 1 จึงจำเป็นต้องเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนทาปฏิกิริยา



ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์จำนวนโคลง



ตารางผนวกที่ ข.1 ผลจำนวนโคโลนีทั้งหมดในน้ำตาลโตนดบนอาหาร DRBC ตั้งแต่วันที่ 0 - 3

สิ่งทดลอง	จำนวนโคโลนีบนอาหาร DRBC (cfu/ml)			
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
ชุดควบคุม	1.58×10^6	2.62×10^6	2.41×10^6	2.13×10^6
น้ำตาลสด+มะเกลือสด	1.34×10^6	2.08×10^6	2.22×10^6	1.97×10^6
น้ำตาลสด+มะเกลือย่าง	1.34×10^6	1.65×10^6	1.95×10^6	1.89×10^6
น้ำตาลสด+พะยอม	1.41×10^6	1.70×10^6	1.77×10^6	1.81×10^6
น้ำตาลสด+เคี่ยม	1.21×10^6	1.59×10^6	1.96×10^6	1.84×10^6

ตารางผนวกที่ ข.2 ผลโคโลนีทั้งหมดในน้ำตาลโตนดบนอาหาร PCA ตั้งแต่วันที่ 0-3

สิ่งทดลอง	จำนวนโคโลนีบนอาหาร PCA (cfu/ml)			
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
ชุดควบคุม	1.85×10^8	1.95×10^8	1.93×10^8	1.99×10^8
น้ำตาลสด+มะเกลือสด	1.52×10^8	1.55×10^8	1.31×10^8	1.01×10^8
น้ำตาลสด+มะเกลือย่าง	1.34×10^8	1.30×10^8	1.18×10^8	1.06×10^8
น้ำตาลสด+พะยอม	1.25×10^8	1.27×10^8	1.22×10^8	1.03×10^8
น้ำตาลสด+เคี่ยม	1.50×10^8	1.35×10^8	1.10×10^8	1.07×10^8



ตารางผนวกที่ ค.1 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร DRBC (log cfu/ml) วันที่ 0

สิ่งทดลอง	SD (log cfu/ml) ^(ns)
ชุดควบคุม	6.1890±0.11
น้ำตาลสด+มะเกลือสด	6.1177±0.10
น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง	6.2596±0.08
น้ำตาลสด+พะยอม	6.1471±0.06
น้ำตาลสด+เคี่ยม	6.0892±0.14

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<.05)

ตารางผนวกที่ ค.2 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร DRBC (log cfu/ml) วันที่ 1

สิ่งทดลอง	SD (log cfu/ml)
ชุดควบคุม	6.4146±0.07 ^a
น้ำตาลสด+มะเกลือสด	6.2963±0.16 ^{ab}
น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง	6.3592±0.09 ^{ab}
น้ำตาลสด+พะยอม	6.1804±0.12 ^b
น้ำตาลสด+เคี่ยม	6.1936±0.10 ^{ab}

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<.05)

ตารางผนวกที่ ค.3 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร DRBC (log cfu/ml) วันที่ 2

สิ่งทดลอง	SD (log cfu/ml)
ชุดควบคุม	6.3809±0.03 ^c
น้ำตาลสด+มะเกลือสด	6.4742±0.00 ^a
น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง	6.4639±0.09 ^b
น้ำตาลสด+พะยอม	6.2487±0.01 ^d
น้ำตาลสด+เคี่ยม	6.3809±0.10 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<.05)

ตารางผนวกที่ ค.4 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร DRBC(log cfu/ml) วันที่ 3

สิ่งทดลอง	SD (log cfu/ml) ^(ns)
ชุดควบคุม	6.3196±0.02
น้ำตาลสด+มะเกลือสด	6.4688±0.00
น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง	6.2757±0.03
น้ำตาลสด+พะยอม	6.2582±0.01
น้ำตาลสด+เคี่ยม	6.2699±0.01

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<.05)

ตารางผนวกที่ ค.5 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร PCA (log cfu/ml) วันที่ 0

สิ่งทดลอง	SD (log cfu/ml)
ชุดควบคุม	8.2604±0.10 ^a
น้ำตาลสด+มะเกลือสด	8.1816±0.01 ^{ab}
น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง	8.1211±0.02 ^{ab}
น้ำตาลสด+พะยอม	8.0967±0.04 ^b
น้ำตาลสด+เคี่ยม	8.1757±0.04 ^{ab}

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(p<.05)

ตารางผนวกที่ ค.6 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร PCA (log cfu/ml) วันที่ 1

สิ่งทดลอง	SD (log cfu/ml) ^(ns)
ชุดควบคุม	8.2797±0.12
น้ำตาลสด+มะเกลือสด	8.1752±0.13
น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง	8.1107±0.07
น้ำตาลสด+พะยอม	8.1023±0.04
น้ำตาลสด+เคี่ยม	8.1279±0.04

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<.05)

ตารางผนวกที่ ค.7 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร PCA (log cfu/ml) วันที่ 2

สิ่งทดลอง	SD (log cfu/ml) ^(ns)
ชุดควบคุม	8.8275±0.12
น้ำตาลสด+มะเกลือสด	8.1132±0.08
น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง	8.1119±0.08
น้ำตาลสด+พะยอม	8.0557±0.12
น้ำตาลสด+เคี่ยม	8.0422±0.02

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(p<.05)

ตารางผนวกที่ ค.8 ค่าทางสถิติจำนวนโคโลนีของน้ำตาลโตนดบนอาหาร PCA (log cfu/ml) วันที่ 3

สิ่งทดลอง	SD (log cfu/ml)
ชุดควบคุม	8.2959±0.00 ^a
น้ำตาลสด+มะเกลือสด	8.0123±0.02 ^b
น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง	8.0057±0.00 ^b
น้ำตาลสด+พะยอม	8.0258±0.05 ^b
น้ำตาลสด+เคี่ยม	8.0219±0.07 ^b

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<.05)

ตารางผนวกที่ ค.9 ค่าความเป็นเป็นกรด-ด่าง วันที่ 0-3

สิ่งทดลอง	SD
ชุดควบคุม	3.7700±0.67 ^a
น้ำตาลสด+มะเกลือสด	4.2975±0.37 ^b
น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง	4.3400±0.32 ^b
น้ำตาลสด+พะยอม	4.2375±0.44 ^b
น้ำตาลสด+เคี่ยม	4.2725±0.37 ^b

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(p<.05)

ตารางผนวกที่ ค.10 ปริมาณของแข็งละลายน้ำได้ทั้งหมด (TSS, °Brix) วันที่ 0-3

สิ่งทดลอง	SD
ชุดควบคุม	8.3333±0.50 ^a
น้ำตาลสด+มะเกลือสด	6.0667±0.10 ^b
น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง	5.5667±0.85 ^d
น้ำตาลสด+พะยอม	5.3333±0.50 ^d
น้ำตาลสด+เคี่ยม	6.0333±0.86 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวกที่ ค.11 ปริมาณกรดระหว่างการผลิตหมักน้ำตาลโตนด วันที่ 0-3

สิ่งทดลอง	SD
ชุดควบคุม	0.2600±0.12 ^a
น้ำตาลสด+มะเกลือสด	0.1800±0.04 ^c
น้ำตาลสด+มะเกลืออย่าง	0.2125±0.07 ^b
น้ำตาลสด+พะยอม	0.2000±0.08 ^b
น้ำตาลสด+เคี่ยม	0.1475±0.04 ^d

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวกที่ ค.12 ปริมาณไนโตรเจนของน้ำตาลโตนด

ตัวอย่าง	จำนวนซ้ำ	ไนโตรเจน
มะเกลืออย่าง	1	0.112
	2	0.014
	3	0.145
	\bar{X}	0.090
	SD	0.068
มะเกลือสด	1	0.094
	2	0.164
	3	0.093
	\bar{X}	0.117
	SD	0.040
พะยอม	1	0.125
	2	0.122
	3	0.151
	\bar{X}	0.132
	SD	0.016
เคี่ยม	1	0.069
	2	0.125
	3	0.202
	\bar{X}	0.132
	SD	0.067

ตารางผนวกที่ ค.13 ค่าปริมาณโปรตีนของน้ำตาลโตนด

ตัวอย่าง	จำนวนซ้ำ	โปรตีน
มะเกลืออย่าง	1	0.8
	2	0.9
	3	0.9
	\bar{X}	0.87
	SD	0.058
มะเกลือสด	1	1.5
	2	1.6
	3	1.6
	\bar{X}	1.57
	SD	0.058
พะยอม	1	1.29
	2	1.29
	3	1.23
	\bar{X}	1.27
	SD	0.034
เคี่ยม	1	3.10
	2	3.09
	3	3.10
	\bar{X}	3.097
	SD	0.005

ตารางผนวกที่ ค.14 ค่าปริมาณฟลาโวนอยด์ของน้ำตาลโตนด

ตัวอย่าง	จำนวนซ้ำ	ฟลาโวนอยด์
มะเกลืออย่าง	1	26.558
	2	37.147
	3	33.470
	\bar{X}	32.291
	SD	5.376
	มะเกลือสด	1
2		36.779
3		36.411
\bar{X}		35.529
SD		1.861
พะยอม		1
	2	40.014
	3	42.220
	\bar{X}	40.941
	SD	1.143
	เคี่ยม	1
2		45.676
3		47.147
\bar{X}		45.847
SD		1.235

ตารางผนวกที่ ค.15 ค่าปริมาณฟีนอลิกของน้ำตาลโตนด

ตัวอย่าง	จำนวนซ้ำ	ฟีนอลิก
มะเกลืออย่าง	1	1.71
	2	1.69
	3	1.62
	\bar{X}	1.670
	SD	0.047
มะเกลือสด	1	0.62
	2	0.65
	3	0.68
	\bar{X}	0.649
	SD	0.021
พะยอม	1	3.74
	2	3.74
	3	3.70
	\bar{X}	3.73
	SD	0.023
เคี่ยม	1	3.71
	2	3.63
	3	3.64
	\bar{X}	3.66
	SD	0.043

ตารางผนวกที่ ค.16 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านกลิ่นของน้ำตาลโตนด

SOV	df	Sum of squares	Mean Square	F
Treatment	3	43.025	14.342	8.773*
Error	87	142.225	1.635	
Total	120	1263.000		

หมายเหตุ * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq .05$)

ตารางผนวกที่ ค.17 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณโปรตีนของน้ำตาลโตนด

SOV	df	Sum of squares	Mean Square	F
Treatment	3	0.138	0.046	0.427 ^{ns}
Error	8	0.861	0.108	
Total	11	0.998		

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq .05$)

ตารางผนวกที่ ค.18 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณไนโตรเจนของน้ำตาลโตนด

SOV	df	Sum of squares	Mean Square	F
Treatment	3	8.543	2.848	1441.924*
Error	8	0.016	0.002	
Total	11	8.559		

หมายเหตุ * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq .05$)

ตารางผนวกที่ ค.19 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

SOV	df	Sum of squares	Mean Square	F
Treatment	3	124516.204	41505.399	3102.969*
Error	8	107.008	13.376	
Total	11	124623.204		

หมายเหตุ * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq .05$)

ตารางผนวกที่ ค.20 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

SOV	df	Sum of squares	Mean Square	F
Treatment	3	317.878	105.959	12.058*
Error	8	70.302	8.788	
Total	11	388.180		

หมายเหตุ * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวกที่ ค.21 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความเป็นกรด-ด่าง วันที่ 0-3

SOV	df	Sum of squares	Mean Square	F
Treatment	4	2.632	0.658	3.180*
Error	55	11.378	0.207	
Total	59	14.010		

หมายเหตุ * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวกที่ ค.22 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของแข็งละลายน้ำได้ทั้งหมด (TSS, °Brix) วันที่ 0-3

SOV	df	Sum of squares	Mean Square	F
Treatment	4	51.540	12.885	32.456*
Error	55	15.880	0.397	
Total	59	437.220		

หมายเหตุ * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวกที่ ค.23 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณกรดระหว่างการหมักน้ำตาลโตนด วันที่ 0-3

SOV	df	Sum of squares	Mean Square	F
Treatment	4	0.083	0.021	3.319*
Error	55	0.344	0.006	
Total	59	0.427		

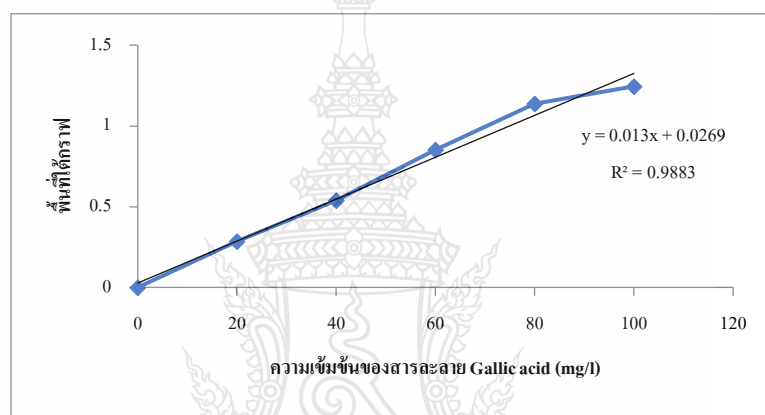
หมายเหตุ * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาคผนวก ง
กราฟมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ง.1 ค่าความเข้มข้นสารละลาย Gallic acid (mg/l) มาตรฐานกับพื้นที่ใต้กราฟ

ความเข้มข้นของสารละลาย Gallic acid (mg/l) (x)	พื้นที่ใต้กราฟ (y)
0	0
20	0.285
40	0.540
60	0.850
80	1.135
100	1.245



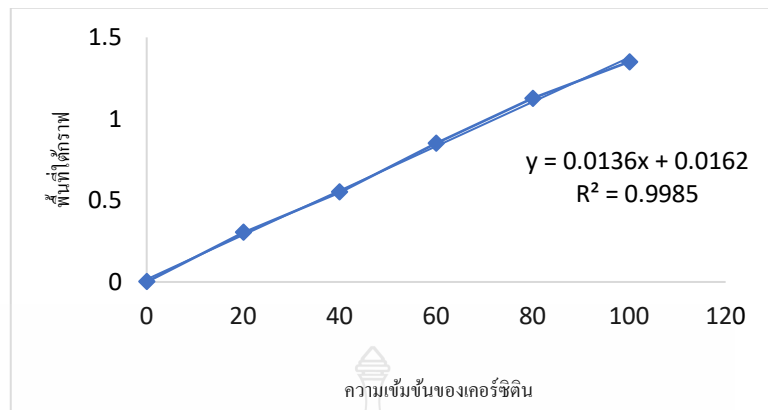
ภาพผนวกที่ ง.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารละลาย Gallic acid (mg/l) มาตรฐานกับพื้นที่ใต้กราฟ

จากสมการเส้นตรง $y = 0.013x$

$x = y/0.013$

ตารางผนวกที่ ง.2 ค่าความเข้มข้นเคอร์ซีตินมาตรฐานกับพื้นที่ใต้กราฟ

ความเข้มข้นของเคอร์ซีติน (x)	พื้นที่ใต้กราฟ (y)
0	0
20	0.302
40	0.550
60	0.850
80	1.125
100	1.350



ภาพผนวกที่ ง.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นความเข้มข้นคอรีซินมาตรฐานกับพื้นที่ได้กราฟ

จากสมการเส้นตรง $y = 0.0136x$

$$x = y/0.0136$$





ภาคผนวก จ
แบบประเมินทางประสาทสัมผัส

ภาพผนวกที่ จ.1 แบบประเมินการยอมรับคุณภาพประสาทสัมผัสของหมักน้ำตาลโตนด

แบบทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่น

ผลิตภัณฑ์ น้ำตาลโตนด

เพศ () ชาย () หญิง

อายุ () 20 - 25 ปี () 26 - 30 ปี () 31 - 35 ปี

() 36 - 40 ปี () 41 - 45 ปี () มากกว่า 46 ปี

คำแนะนำ กรุณาดมตัวอย่างแต่ละรหัสและให้คะแนนตามความชอบตรงตามความรู้สึกในตัวอย่าง
4 ตัวอย่าง โดยใส่ตัวเลขระดับคะแนนลงในช่องว่าง โดยเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้ (5 =ชอบมากที่สุด
4 =ชอบมาก 3 =ชอบปานกลาง 2 =ชอบน้อย 1 =ชอบน้อยที่สุด)

ตัวอย่าง

862

245

458

396

ระดับคะแนน

.....

.....

.....

.....

ขอบคุณค่ะ

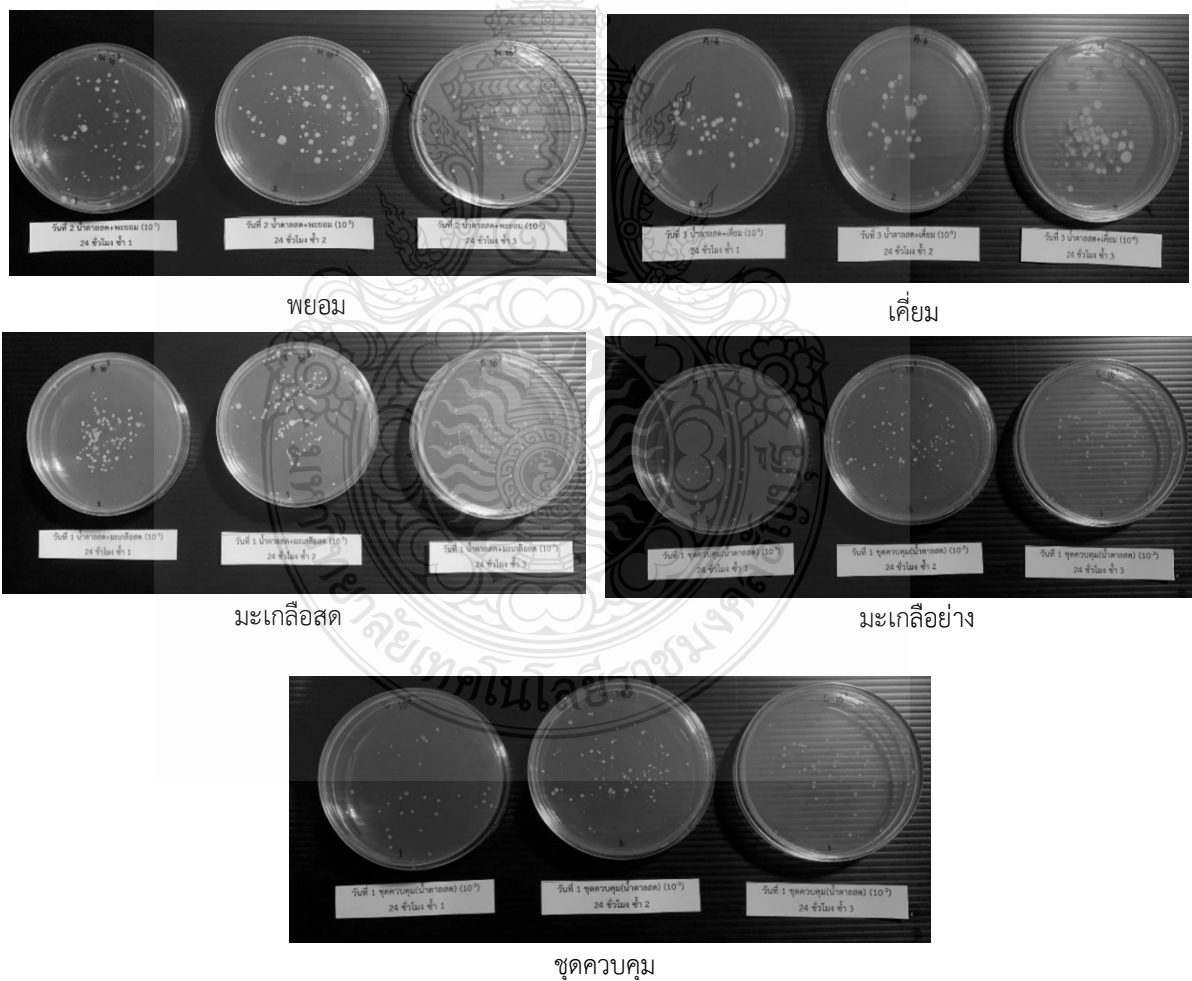




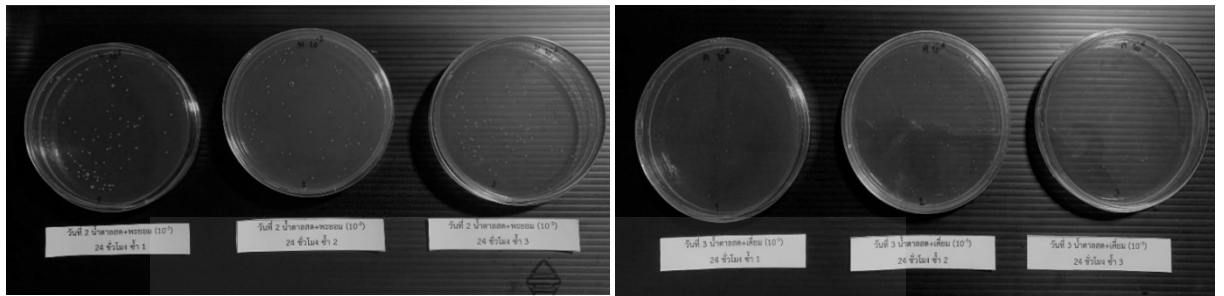
ภาพผนวกที่ ฉ.1 กระบวนการเตรียมทดสอบประสาทสัมผัสของน้ำตาลโตนด



ภาพผนวกที่ ฉ.2 ตัวอย่างเชื้อบนอาหาร PCA Agar ทำการ Spread Plate

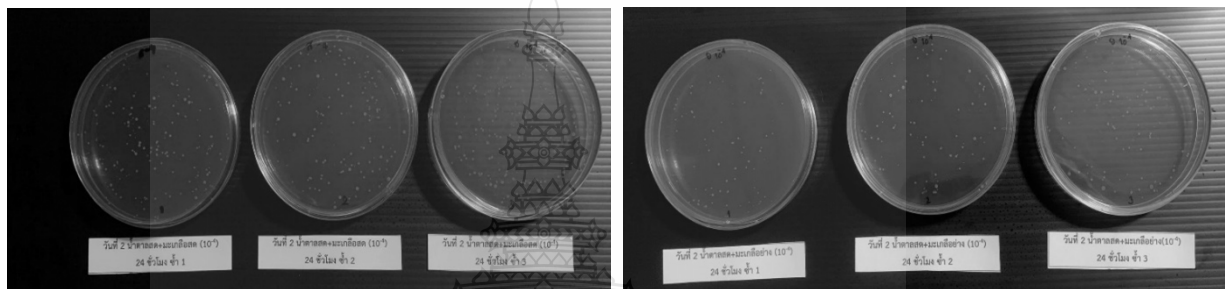


ภาพผนวกที่ ๓.3 ตัวอย่างเชื้อบนอาหาร DRBC Agar ทำการ Spread Plate



พยอม

เคี่ยม



มะเกลือสด

มะเกลือย่าง





ชุดควบคุม



ภาคผนวก ช
ผลการวิเคราะห์ต่าง ๆ

ภาพผนวกที่ ข.1 ผลการวิเคราะห์การจัดจำแนกจุลินทรีย์

		Thailand Bioresource Research Center (TBRC) National Center for Genetic Engineering and Biotechnology Innovation Cluster 2, Tower 8, 8th Floor, Room 817, 143 Thailand Science Park, Phahonyothin Road Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand Tel.: +66 2 1178000 1, Fax: +66 2 1178003			
รายงานผลการจำแนกจุลินทรีย์ / IDENTIFICATION'S REPORT					
ชื่อผู้ขอรับบริการ / Customer's name:	ผศ.ดร. เจริญ เจริญชัย	เลขที่ / No.:	2021ID0822-090		
หน่วยงานและที่อยู่ / Institute and address:	คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี (ศูนย์วิจัย) 2 พหลโยธิน 87 ต. ประชาธิปัตย์ อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี 12130	วันที่ได้รับตัวอย่าง / Sample receive date:	23-สิงหาคม-2564		
		วันที่รายงานผล / Report date:	28-กันยายน-2564		
<input checked="" type="checkbox"/> ผู้ขอรับบริการส่งตัวอย่างเป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อจำแนกชนิด/The customer sent pure isolate for identification <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับบริการส่งเป็นตัวอย่างเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์และได้คัดเลือกมาจำแนกชนิด/The customer sent specimen for isolation and chose isolate(s) identification					
ลำดับที่ No.	รหัสตัวอย่าง Code	วิธีการจำแนกชนิด Method of identification	มีความใกล้เคียงกับ Closely related with	% ความเหมือน % similarity	หมายเหตุ Note
1	CN113	D1/D2 region sequencing	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100% (580/580 nt.)	เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน 26S rRNA gene ของยีสต์รหัส CN113 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ชนิดต่างๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูลออนไลน์โดยใช้โปรแกรม BLASTN พบว่าเหมือนกับ type strain ของ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NRRL Y-12632 ^T (NG_042623) 100% จึงจำแนกยีสต์รหัส CN113 เป็น <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2	CN114	D1/D2 region sequencing	<i>Lochancea fermentati</i>	100% (578/578 nt.)	เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน 26S rRNA gene ของยีสต์รหัส CN114 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ชนิดต่างๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูลออนไลน์โดยใช้โปรแกรม BLASTN พบว่าเหมือนกับ type strain ของ <i>Lochancea fermentati</i> CBS 707 ^T

		Thailand Bioresource Research Center (TBRC) National Center for Genetic Engineering and Biotechnology Innovation Cluster 2, Tower 8, 8th Floor 143 Thailand Science Park, Phahonyothin Road Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand Tel.: +66 2 1178000			
รายงานผลการจำแนกจุลินทรีย์ / IDENTIFICATION'S REPORT					
ชื่อผู้ขอรับบริการ / Customer's name:	ผศ.ดร.เจริญ เจริญชัย	เลขที่ / No.:	2021ID0822-089		
หน่วยงานและที่อยู่ / Institute and address:	คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี (ศูนย์วิจัย) 2 พหลโยธิน 87 ต. ประชาธิปัตย์ อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี 12130	วันที่ได้รับตัวอย่าง / Sample receive date:	23.สิง.2021.		
		วันที่รายงานผล / Report date:	14.ส.ค.2021.		
<input checked="" type="checkbox"/> ผู้ขอรับบริการส่งตัวอย่างเป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อจำแนกชนิด/The customer sent pure isolate for identification <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับบริการส่งเป็นตัวอย่างเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ และได้คัดเลือกมาจำแนกชนิด/The customer sent specimen for isolation and chose isolate(s) identification					
ลำดับที่ No.	รหัสตัวอย่าง Code	วิธีการจำแนกชนิด Method of identification	มีความใกล้เคียงกับ Closely related with	% ความเหมือน % similarity	หมายเหตุ Note
1	RB304	Single strand 16S rDNA sequencing	<i>Kocuria rhizophila</i>	99.79	
2	RB305	Single strand 16S rDNA sequencing	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99.80	
3	RB306	Single strand 16S rDNA sequencing	<i>Brachybacterium paracongolomertatum</i>	99.93	
4	RB307	Single strand 16S rDNA sequencing	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99.80	
5	CN308	Single strand 16S rDNA sequencing	<i>Pantoea anthophila</i>	99.79	
6	CN309	Single strand 16S rDNA sequencing	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100.00	
7	CN310	Single strand 16S rDNA sequencing	Unidentified bacteria in Enterobacteriaceae	-	เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูลพบว่าแบคทีเรียตัวอย่างมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย <i>Escherichia fergusonii</i> มากที่สุด 99.80% (เอกสารแนบ 3) แต่จากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เปรียบเทียบกับแบคทีเรียใกล้เคียงพบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแบคทีเรีย <i>Escherichia</i> และ <i>Shigella</i> ได้ชัดเจน จึงทำให้ไม่สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียตัวอย่างได้แน่ชัด จำเป็นต้องศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่น หรือ whole genome sequencing เปรียบเทียบกับ Type strain เพิ่มเติมเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียตัวอย่าง

ภาพผนวกที่ ข.2 ผลการส่งวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง แก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography GC-MS)



ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพและนาโน
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ถนนรังสิต-นครนายก (กม.13) ธัญบุรี ปทุมธานี 12110
โทรศัพท์ + 66 (0) 2549 3538



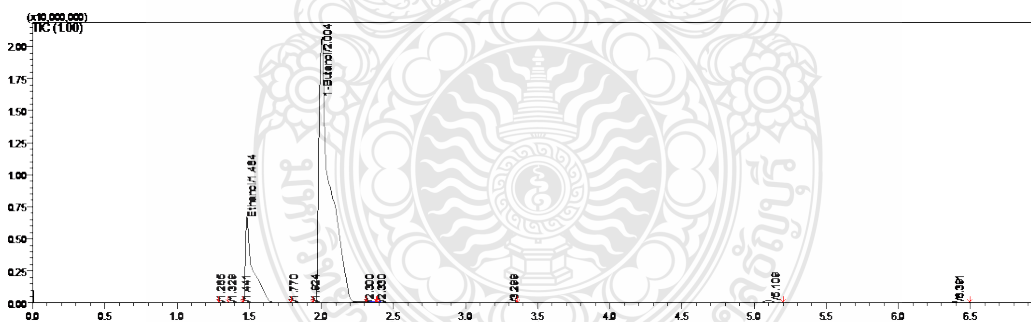
รายงานผลการวิเคราะห์ทดสอบ

เลขที่งาน 014/2565

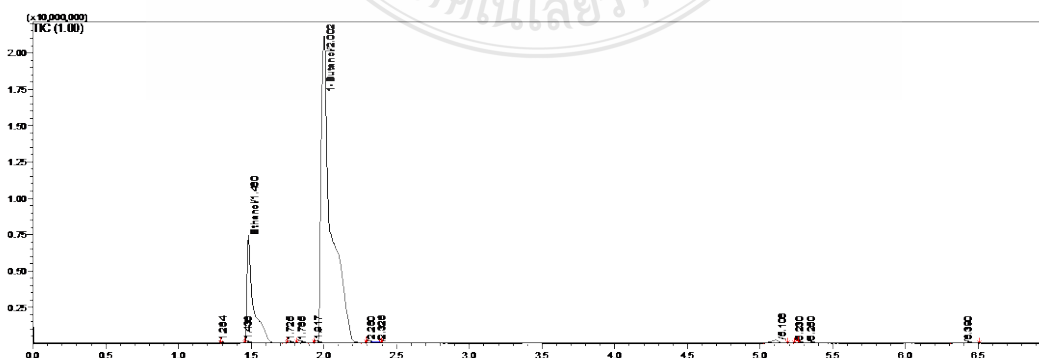
- ชื่อลูกค้า โครงการการพัฒนาการผลิตเชื้อหมักอาหารจากข้าวระดับโรงงานต้นแบบ CRP6405032260
ที่อยู่ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี 39 หมู่ 1 ต.คลองหก อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12110
โทรศัพท์ - โทรสาร -
- รายละเอียดลักษณะ สภาพ และการบ่งชี้ ของตัวอย่างที่ทดสอบ
ตัวอย่างบรรจุในขวดพลาสติกปิดฝาสนิท บรรจุภายในกล่องโฟมอีกหนึ่งชั้น และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- วันที่รับตัวอย่าง วันที่ 8 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2565
- วันที่ทำการทดสอบ วันที่ 8-11 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2565
- ผลการวิเคราะห์ทดสอบ

รายการที่วิเคราะห์	ความเข้มข้นเอทานอล (%v/v)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (±SD)
Control	2.30	0.41
มะเกลือสด	2.30	0.42
เคี่ยม	0.11	0.00
มะเกลือย่าง	3.28	0.11
พยอม	3.42	0.11

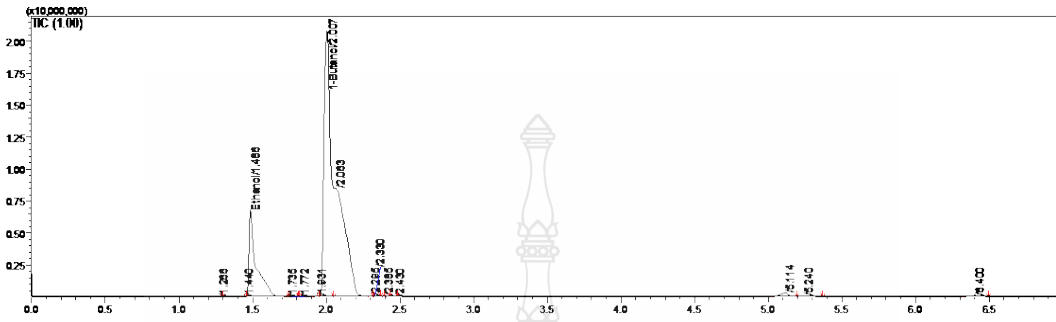
Control



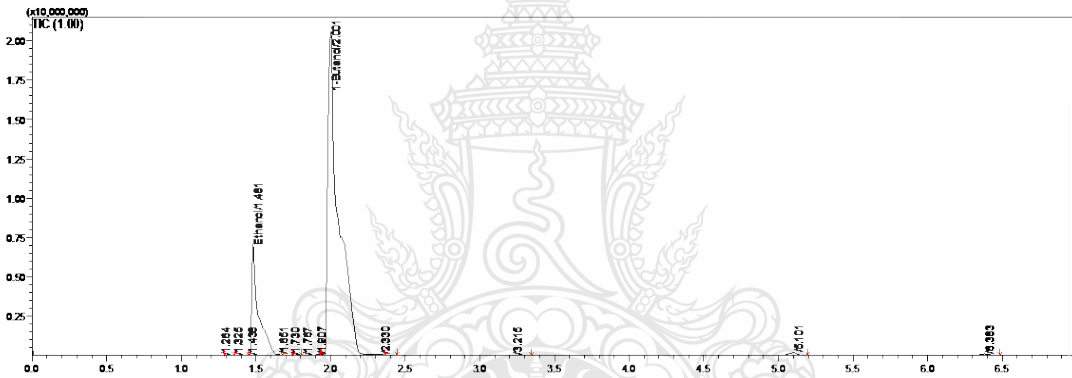
พยอม



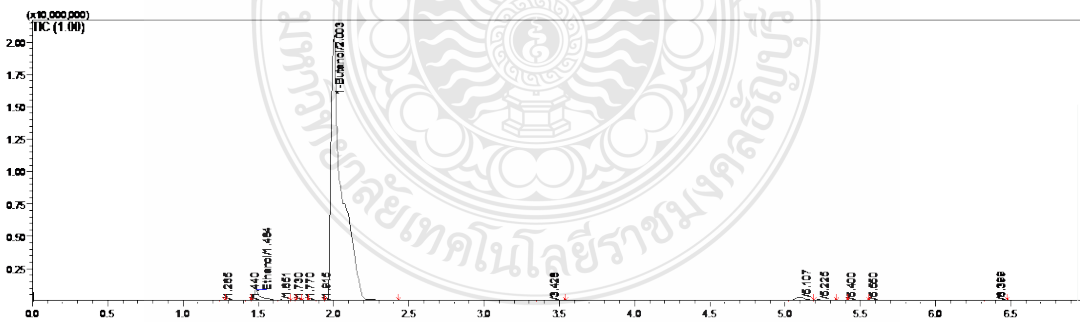
มะเกลืออย่าง



มะเกลือสด



ไคยม



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวณัฐนิชา วงษา

วัน เดือน ปีเกิด 18 สิงหาคม 2538

ที่อยู่ 139/255 หมู่ที่ 7 หมู่บ้านศรีทอง ซอย 5 ตำบลเชียงรากน้อย
อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13180

การศึกษา ปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สาขาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

เบอร์โทรศัพท์ 081-707-0150

อีเมล Natnicha_w@mail.rmutt.ac.th



Biography

Name – Surname Miss Natnicha Wongsā

Date of Birth Auguts 18, 1995

Address 139/255 moo.7 Chiang Rak Noi, Bang Pa-in,
Ayutthaya Thailand 13180

Education Master of Biology

Telephone Number 081-707-0150

Email Address Natnicha_w@mail.rmutt.ac.th

