# การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และเคมีระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าว เพื่อผลิตสุรากลั่นและการปรับปรุงการหมักโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์

# Microbial and Chemical Changes During Coconut Sugar Fermentation for Distilled Spirit Production and Improvement of Fermentation Using Yeast Starter

**อัศม์เดช พลอาสา**

**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร**
**ปริญญาคหกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์**
**คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์**
**มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี**
**ปีการศึกษา 2565**
**ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี**

# การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และเคมีระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าว เพื่อผลิตสุรากลั่นและการปรับปรุงการหมักโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์

อัศม์เดช พลอาสา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาคหกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์
คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นงานวิจัยที่เกิดจากการค้นคว้าและวิจัย ขณะที่ข้าพเจ้าศึกษาอยู่ในคณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ดังนั้นงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถือเป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี และข้อความต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้ข้าพเจ้าขอรับรองว่าไม่มีการคัดลอกหรือนำงานวิจัยของผู้อื่นมานำเสนอในชื่อของข้าพเจ้า

This thesis consists of research materials conducted at Faculty of Home Economics, Rajamangala University of Technology Thanyaburi and hence the copyright owner. I hereby certify that the thesis does not contain any forms of plagiarism.

อัศม์เดช พลอาสา

(นายอัศม์เดช พลอาสา)

COPYRIGHT © 2022
FACULTY OF HOME ECONOMICS TECHNOLOGY
RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THANYABURI

ลิขสิทธิ์ พ.ศ. 2565
คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และเคมีระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวเพื่อผลิตสุรากลั่นและการปรับปรุงการหมักโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์<br>Microbial and Chemical Changes During Coconut Sugar Fermentation for Distilled Spirit Production and Improvement of Fermentation Using Yeast Starter |
| **ชื่อ – นามสกุล** | นายอัศม์เดช พลอาสา |
| **สาขาวิชา** | เทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | ผู้ช่วยศาสตราจารย์เจริญ เจริญชัย, Ph.D. |
| **ปีการศึกษา** | 2565 |

---

**คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์**

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์อรวัลภ์ อุปถัมภานนท์, ปร.ด.)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์สาวิตรี วทัญญูไพศาล, Ph.D.)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เจริญ เจริญชัย, Ph.D.)

คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์สาคร ชลสาคร, Ph.D.)
วันที่ 8 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2566

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และเคมีระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวเพื่อผลิตสุรากลั่นและการปรับปรุงการหมักโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ |
| **ชื่อ – นามสกุล** | นายอัศม์เดช พลอาสา |
| **สาขาวิชา** | เทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | ผู้ช่วยศาสตราจารย์เจริญ เจริญชัย, Ph.D. |
| **ปีการศึกษา** | 2565 |

# บทคัดย่อ


การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาข้อมูลพื้นฐานในการผลิตสุรากลั่นชุมชนกรณีศึกษาของผู้ประกอบการ อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ที่พบในกล้าเชื้อข้าวกล้องและระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าว ศึกษาการหมักน้ำตาลมะพร้าวเพื่อผลิตสุรากลั่นโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ และเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสระหว่างสุรากลั่นแบบดั้งเดิมกับสุรากลั่นที่ใช้กล้าเชื้อยีสต์

วิธีการวิจัย ศึกษากระบวนการผลิตสุรากลั่นจากน้ำตาลมะพร้าวของผู้ประกอบการจังหวัดราชบุรี ที่เป็นกรณีศึกษาโดยการสัมภาษณ์และการสังเกต เก็บตัวอย่างระหว่างการหมักกล้าเชื้อข้าวกล้องและการหมักน้ำตาลมะพร้าว มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Spread Plate และวิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ค่า pH ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปร้อยละกรดแลคติก และปริมาณแอลกอฮอล์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT) นำจุลินทรีย์ที่พบมาระบุสปีชีส์ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล ทดลองการผลิตสุรากลั่นจากน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ ณ สถานที่ผลิตของผู้ประกอบการ เปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสกับสุรากลั่นแบบดั้งเดิม โดยทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคจำนวน 100 คน ด้วยวิธี Central Location Test (CLT) และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยการทดสอบความชอบ (Paired Preference Test) วิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัยพบว่า กระบวนการผลิตสุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าว เริ่มจากการผลิตกล้าเชื้อข้าวกล้องเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักแอลกอฮอล์ มีส่วนผสม ได้แก่ ข้าวกล้อง ลูกแป้งสุรา แป้งข้าวเจ้า และผงสมุนไพรจีน ใช้ระยะเวลาผลิต 3 วัน นำไปหมักกับน้ำตาลมะพร้าวในโอ่งมังกร ที่เติม

น้ำจากร่องสวนมะพร้าว หมักต่ออีก 4 วัน นำส่วนที่เป็นน้ำส่ามากลั่น โดยเหลือตะกอนเมล็ดข้าวก้นโอ่ง ซึ่งสามารถเติมน้ำตาลมะพร้าวและน้ำจากร่องสวนเพื่อหมักใหม่ได้อีกอย่างน้อย 40 ครั้ง กล้าเชื้อข้าวกล้องมีปริมาณยีสต์และราในวันที่ 3 ของการหมัก 6.71 ± 0.15 และ 6.74 ± 0.44 Log CFU/g ตามลำดับ หลังการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องเป็นเวลา 3 วัน มีปริมาณยีสต์ในช่วง 7.42 ± 0.20 – 7.72 ± 0.21 Log CFU/ml ตลอดการหมัก 40 ครั้ง และปริมาณแบคทีเรีย 9.18 ± 0.21 Log CFU/ml ในการหมักครั้งที่ 1 และลดลงเหลือ 6.04 ± 0.33 Log CFU/ml ในการหมักครั้งที่ 40 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้น เฉลี่ย 15 องศาบริกซ์ ค่า pH อยู่ในช่วง 2.84 ± 0.01 – 3.46 ± 0.03 มีปริมาณกรดแลคติกร้อยละ 1.04 ± 0.08 ในครั้งที่ 1 และลดลงเหลือร้อยละ 0.65±0.05 ในครั้งที่ 40 มีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 7.62 ± 2.04 โดยปริมาตร ในครั้งที่ 1 และเหลือร้อยละ 2.51 ± 0.42 ในครั้งที่ 40 จุลินทรีย์ที่พบ ได้แก่ ยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Dekkera bruxellensis* รา *Rhizopus microspores* และ *Aspergillus flavus* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis, Kocuria rhizophila, Weissella paramesenteroides* และ *Brachybacterium paraconglomeratum* การผลิตสุรากลั่นจากน้ำตาลมะพร้าวด้วยยีสต์ผงที่ทำเป็นกล้าเชื้อเหลวในอัตราส่วนร้อยละ 2 ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้น 16 องศาบริกซ์ ค่า pH เริ่มต้นที่ 3.5 และเติมสาร Diammonium Phosphate (DAP) ร้อยละ 0.1 สามารถหมักได้ใกล้เคียงกับการผลิตสุรากลั่นแบบดั้งเดิม เมื่อเปรียบเทียบการประเมินทางประสาทสัมผัสโดยผู้บริโภคต่อคุณลักษณะของสุรากลั่นที่ผลิตได้ พบว่า ในด้านความใส ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ในด้านกลิ่น รสชาติ ความรู้สึกหลังกลืน และความชอบโดยรวม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงนำปัจจัยคุณภาพทั้ง 4 ด้าน ไปทดสอบว่าผลิตภัณฑ์ใดได้คะแนนความชอบมากกว่ากัน พบว่า ไม่มีลักษณะทางประสาทสัมผัสใดที่สามารถระบุความชอบของผู้บริโภคว่าชอบผลิตภัณฑ์สุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าวทั้ง 2 แบบมากกว่ากัน ที่ระดับความระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

**คำสำคัญ :** น้ำตาลมะพร้าว สุรากลั่นชุมชน กล้าเชื้อข้าวกล้อง กล้าเชื้อยีสต์

| | |
|---|---|
| **Thesis Title** | Microbial and Chemical Changes During Coconut Sugar Fermentation for Distilled Spirit Production and Improvement of Fermentation Using Yeast Starter |
| **Name – Surname** | Mr. Assadej Phonarsa |
| **Program** | Home Economics Technology |
| **Thesis Advisor** | Assistant Professor Charoen Charoenchai, Ph.D. |
| **Academic Year** | 2022 |

# ABSTRACT

The study aimed to (1) study the primary data of community distilled spirit production of a producer in Muang District, Ratchaburi Province as a case study, (2) analyze the changes in microbial groups found in brown rice starter and during coconut sugar fermentation, (3) study the fermentation of coconut sugar for distilled spirit using dried yeast starter cultures, and (4) compare the sensory qualities between traditional distilled spirit and that using yeast starter cultures.

Research methods were as follows: the production process of distilled spirit from coconut sugar by the producer in Ratchaburi Province as the case study was gathered by interviews and observations. Samples were taken during brown rice starter fermentations and coconut sugar fermentations. The microbial changes were analyzed by spread plate method. Chemical analyses were performed for total soluble solids, pH values, total acid contents expressed as percent lactic acid and alcohol contents. The experimental design was Completely Randomized Design, CRD. Average values were compared using Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) The species of microorganisms isolated were identified by molecular techniques. The production of distilled spirit from coconut sugar using dried yeast cultures was carried out at the production site of the producer. Sensory qualities of the resulting spirit were compared with those of the traditionally produced spirit using Consumer Acceptance Test with 100 subjects by Centra Location

Test CLT). Paired Preference Test was performed. Data were statistically analyzed at 95% confidence level.

The results showed that community distilled spirits from coconut sugar production process was initiated by the fermentation of brown rice starters to be used as starter cultures for alcoholic fermentation. Raw materials for the starters were brown rice, Look-pang (Thai starter balls), rice flour, and Chinese herbal powder mixture. It took 3 days to produce. Then the rice starter was mixed with coconut sugar in earthen water jars filled with water from the coconut orchard irrigation channels and fermented for another 4 days. The fermented liquid was then distilled, leaving rice sediments that remained at the bottom of the jar, to which coconut sugar and water from the irrigation channels can be added to ferment for at least another 40 times. Yeast and mold populations after 3 days of fermentation of the brown rice starter were 6.71 ± 0.15 and 6.74 ± 0.44 Log CFU/g, respectively. After 4 days of fermentation of coconut sugar using the brown rice starter, yeast growth was 7.42 ± 0.20 – 7.72 ± 0.21 Log CFU/ml over 40 fermentation cycles. Bacteria population was 9.18 ± 0.21 Log CFU/ml during the first fermentation and decreased to 6.04 ± 0.33 Log CFU/ml during the 40$^{th}$ fermentation. Initially total soluble solids averaged at 15 $^{o}$Brix, and pH ranged from 2.84 ± 0.01 – 3.46 ± 0.03. The amount of lactic acid was 1.04 ± 0.08% in the first fermentation and decreased to 0.65 ± 0.05% in the 40$^{th}$ batch, with an alcohol content of 7.62 ± 2.04 (%v/v) in the first batch and reduced to 2.51 ± 0.42 (%v/v) in the 40$^{th}$ one. The microorganisms found included the yeasts *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Dekkera bruxellensis*, the molds *Rhizopus microspores*, *Aspergillus flavus*, and bacteria *Bacillus subtilis*, *Kocuria rhizophila*, *Weissella paramesenteroides*, and *Brachybacterium paraconglomeratum*.

Distilled spirit from coconut sugar was produced by inoculating dried yeast that was made into liquid starter and inoculated at the ratio of 2% of coconut sugar liquid with initial total soluble solids of 16 $^{o}$Brix, pH 3.5 and supplemented with 0.1% diammonium phosphate (DAP). The fermentations were comparable to those produced

traditionally. When comparing the sensory attributes of the produced distilled spirit using sensory evaluation by the consumers, it was found that there was no difference in clarity. However, there were statistically significant differences in terms of smell, taste, aftertaste, and overall preferences. Therefore, the four quality attributes were used to determine which product the consumers preferred over the other. It was found that none of the sensory characteristics could indicate the preferences of the consumers whether they preferred either of the two types of community distilled spirits from coconut sugar at 95% confidence level.

**Keyword**: coconut sugar, community distilled spirits, brown rice starters, yeast starter

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีได้รับความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจริญ เจริญชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ในการให้คำปรึกษาตั้งแต่หัวข้อวิทยานิพนธ์ข้อมูลและคำแนะนำต่าง ๆ แนวทางการเขียนเนื้อหาและการวิเคราะห์ของงานวิจัย สนับสนุนทุนการศึกษาและครุภัณฑ์ในการปฏิบัติงาน ตลอดจนให้กำลังใจ ซึ่งเป็นแรงกระตุ้นได้อย่างดียิ่ง อีกทั้งยังได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิทยานิพนธ์ให้เป็นอย่างดี ผู้เขียนรู้สึกซาบซึ้งใจและสำนึกในพระคุณขอกราบขอบพระคุณไว้ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อรวัลภ์ อุปถัมภานนท์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์สาวิตรี วทัญญูไพศาล ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้กรุณาชี้แนะแนวทางและคำแนะนำตลอดจนข้อสังเกตต่าง ๆ ทำให้เกิดการพัฒนาแนวความคิดและไตร่ตรองปัญหาได้อย่างรอบคอบ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ของเนื้อหาอย่างครบถ้วน

ขอขอบคุณ ห้างหุ้นส่วนจำกัด ไพศาลนันทน์ ซึ่งเป็นผู้ประกอบการผลิตสุรากลั่นชุมชน ตราไก่เก้า ที่ให้ความอนุเคราะห์วัตถุดิบ สถานที่ในการปฏิบัติงาน และให้ความรู้ในกระบวนการผลิตสุรากลั่นชุมชน

ขอบคุณสถานที่และเจ้าหน้าที่คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ศูนย์รังสิต ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ รวมถึงอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง และความสะดวกระหว่างการดำเนินการวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่าง ๆ ขอขอบพระคุณพ่อ แม่ ครอบครัว และผู้มีพระคุณทุกท่านที่สนับสนุนกำลังทรัพย์และให้กำลังใจตลอดระยะเวลาการศึกษาวิจัย

ท้ายนี้ผู้เขียนขอขอบคุณเพื่อน ๆ ที่ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือด้วยดีเสมอมา และขอขอบคุณเจ้าของผลงาน เอกสารและงานวิจัยทุกท่าน ที่ได้ให้ผู้เขียนค้นคว้าได้นำมาอ้างอิงในการวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมทั้งขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนให้ความสนับสนุนช่วยเหลือที่ไม่ได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย

อัศม์เดช พลอาสา

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... (3)

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... (5)

กิตติกรรมประกาศ..... (8)

สารบัญ..... (9)

สารบัญตาราง..... (10)

สารบัญรูป..... (14)

บทที่ 1 บทนำ..... 16

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 16

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 17

1.3 สมมติฐานการวิจัย..... 17

1.4 ขอบเขตการวิจัย..... 17

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 18

บทที่ 2 วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 19

2.1 สุรากลั่นชุมชน..... 19

2.2 ความหมายของการหมัก..... 30

2.3 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมัก..... 38

2.4 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์..... 48

2.5 น้ำตาลมะพร้าว..... 51

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 59

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 64

3.1 วัตถุดิบ..... 64

3.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ..... 64

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี..... 65

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย..... 66

3.5 ระยะเวลาและแผนปฏิบัติในการทดลอง..... 71

3.6 สถานที่ทำการวิจัย..... 71

# สารบัญ (ต่อ)


หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล..... 72

4.1 การศึกษากระบวนการผลิตและต้นทุนในการผลิตสุรากลั่นของผู้ประกอบการอำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี ที่เป็นกรณีศึกษา..... 72

4.2 ผลศึกษาการจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกล้าเชื้อข้าวกล้อง..... 79

4.3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และเคมีระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อข้าวกล้อง..... 83

4.4 การระบุสปีชีส์ที่จุลินทรีย์ที่พบในกระบวนการผลิต..... 88

4.5 ผลการปรับปรุงกระบวนการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์..... 93

4.6 ต้นทุนในการผลิตสุรากลั่นโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์..... 102

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 104

5.1 สรุปผลการศึกษากระบวนการผลิตและต้นทุนผลิตสุรากลั่นของผู้ประกอบการที่กรณีศึกษา..... 104

5.2 สรุปผลการทดลองปรับปรุงกระบวนการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์..... 105

5.3 ข้อเสนอแนะ..... 105

บรรณานุกรม..... 107

ภาคผนวก..... 113

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์..... 114

ภาคผนวก ข ตารางข้อมูลวิเคราะห์ทางสถิติ..... 118

ภาคผนวก ค ผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์..... 124

ภาคผนวก ง รายงานผลการวิเคราะห์..... 127

ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์..... 132

ภาคผนวก ฉ แบบสอบถามและตารางการวิเคราะห์..... 141

ภาคผนวก ช ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์..... 147

ประวัติผู้เขียน..... 151

# สารบัญตาราง


| | | หน้า |
|---|---|---|
| ตารางที่ 2.1 | ตำรับลูกแป้งสุรา | 23 |
| ตารางที่ 2.2 | ตัวอย่างสายพันธุ์ยีสต์หรือรหัสทางการค้าสำหรับไวน์ | 24 |
| ตารางที่ 2.3 | สารเคมีปนเปื้อน จุดเดือดและความเป็นพิษในสุรากลั่น | 29 |
| ตารางที่ 2.4 | จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทต่าง ๆ | 38 |
| ตารางที่ 2.5 | คุณสมบัติและองค์ประกอบของน้ำตาลมะพร้าวเคี่ยว | 58 |
| ตารางที่ 2.6 | องค์ประกอบของน้ำตาลมะพร้าวเคี่ยว | 59 |
| ตารางที่ 2.7 | คุณคาทางโภชนาการของน้ำตาลมะพร้าวเคี่ยว | 59 |
| ตารางที่ 3.1 | สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีเฟลมไอออไนเซชัน | 68 |
| ตารางที่ 3.2 | ปริมาณสารละลาย Ethanol และ n-propanol ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน | 68 |
| ตารางที่ 4.1 | ปริมาณวัตถุดิบในการผลิตสุรากลั่นชุมชน | 73 |
| ตารางที่ 4.2 | ผลการระบุสายพันธุ์ยีสต์ที่พบในกระบวนการผลิตโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) | 88 |
| ตารางที่ 4.3 | ผลการระบุสายพันธุ์ราที่พบในกระบวนการผลิตโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) | 90 |
| ตารางที่ 4.4 | ผลการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียที่พบในกระบวนการผลิตโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) | 91 |
| ตารางที่ 4.5 | ผลการสำรวจข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถามจำนวน 100 คน | 96 |
| ตารางที่ 4.6 | ผลข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมและทัศนคติของผู้ตอบแบบสอบถาม | 98 |
| ตารางที่ 4.7 | ผลการทดสอบความแตกต่าง ระหว่างผลิตภัณฑ์สุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อยีสต์และสุรากลั่นสูตรดั้งเดิม | 100 |

# สารบัญตาราง (ต่อ)


| | | หน้า |
|---|---|---|
| ตารางที่ 4.8 | ผลการทดสอบระหว่างสุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อยีสต์ผง และแบบดั้งเดิมชอบตัวอย่างใดมากกว่า | 101 |
| ตารางที่ 4.9 | ปริมาณวัตถุดิบและต้นทุนผลิตสุรากลั่นโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ | 102 |
| ตารางที่ ข.1 | การเปลี่ยนแปลงปริมาณรา Log CFU/g ในกล้าเชื้อข้าวกล้องระหว่างการหมัก 3 วัน | 119 |
| ตารางที่ ข.2 | การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์ Log CFU/g ในกล้าเชื้อข้าวกล้องระหว่างการหมัก 3 วัน | 119 |
| ตารางที่ ข.3 | การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์ Log CFU/ml ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องทั้ง 3 รอบ ตลอดการหมัก 4 วัน | 120 |
| ตารางที่ ข.4 | การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรีย Log CFU/ml ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วย กล้าเชื้อข้าวกล้องทั้ง 3 รอบ ตลอดการหมัก 4 วัน | 120 |
| ตารางที่ ข.5 | การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องทั้ง 3 รอบ ตลอดการหมัก 4 วัน | 121 |
| ตารางที่ ข.6 | การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องทั้ง 3 รอบ ตลอดการหมัก 4 วัน | 121 |
| ตารางที่ ข.7 | การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละโดยปริมาตร) ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องทั้ง 3 รอบ ตลอดการหมัก 4 วัน | 122 |
| ตารางที่ ข.8 | การเปลี่ยนแปลงปริมาณของกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดแลคติก) ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องทั้ง 3 รอบ ตลอดการหมัก 4 วัน | 122 |
| ตารางที่ ข.9 | การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และเคมีระหว่างหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อยีสต์ | 123 |
| ตารางที่ ฉ.1 | Critical Number of Correct Responses in a Duo-Trio or One-Sided Directional Difference Test (Entries are xa,n) | 146 |

# สารบัญรูป


| | | หน้า |
|---|---|---|
| รูปที่ 2.1 | แผนภูมิการผลิตสาโทและสุรากลั่น | 21 |
| รูปที่ 2.2 | ลักษณะเครื่องกลั่นแบบธรรมดา (Pot Still) | 28 |
| รูปที่ 2.3 | กราฟแสดงช่วงการเจริญของจุลินทรีย์ | 35 |
| รูปที่ 2.4 | การจัดเรียงตัวของแบคทีเรีย | 40 |
| รูปที่ 2.5 | (ก) สปอร์สืบพันธุ์ของราแบบไม่อาศัยเพศ และ (ข) สปอร์สืบพันธุ์ของราแบบอาศัยเพศ | 44 |
| รูปที่ 2.6 | (ก) ลักษณะของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และ (ข) ลักษณะภายในของเซลล์ยีสต์ | 46 |
| รูปที่ 2.7 | ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อจากการใช้ยีสต์แห้งและยีสต์สด | 49 |
| รูปที่ 2.8 | วิธีการปาดปลายจั่นมะพร้าว | 52 |
| รูปที่ 2.9 | การโน้มงวงตาล | 52 |
| รูปที่ 2.10 | การซึมไหลของน้ำตาลใสจากจั่นมะพร้าว | 53 |
| รูปที่ 2.11 | การรองน้ำตาลใสด้วยกระบอกพลาสติก | 54 |
| รูปที่ 2.12 | การกรองเอาเศษเปลือกไม้ออกจากน้ำตาลใส | 55 |
| รูปที่ 2.13 | โคครอบปากกระทะ | 55 |
| รูปที่ 2.14 | การหมุนกระทะให้ด้านข้างกระทะได้รับความร้อน | 56 |
| รูปที่ 2.15 | (ก) การใช้เหล็กกระทุ้งเพื่อกวนให้น้ำตาลข้น และ (ข) ลักษณะน้ำตาลข้นหลังใช้เหล็กกระทุ้ง | 57 |
| รูปที่ 2.16 | (ก) น้ำตาลปึก และ (ข) น้ำตาลปี๊บ | 57 |
| รูปที่ 3.1 | แผนภูมิปฏิบัติในการทดลองงานวิจัย | 72 |
| รูปที่ 4.1 | (ก) การหุงข้าวกล้องบนกระทะใบบัวบนเตาแก๊ส (ข) การพักข้าวกล้องที่หุงให้เย็นด้วยเครื่องเป่าลม (ค) ส่วนผสมลูกแป้งบดละเอียด แป้งข้าวเจ้า และผงสมุนไพรจีน (ง) การคลุกข้าวกล้องกับลูกแป้ง แป้งข้าวเจ้า และผงสมุนไพรจีน (จ) กระสอบป่านบรรจุข้าว และ (ฉ) กล้าเชื้อข้าวกล้องที่หมักครบ 3 วัน | 74 |

# สารบัญรูป (ต่อ)


หน้า

รูปที่ 4.2 (ก) การละลายน้ำตาลปี๊บด้วยเครื่องผสมปูน (ข) กล้าเชื้อข้าวกล้องและเกลือเมล็ดในโอ่ง (ค) การเทน้ำตาลปี๊ปที่ละลายน้ำลงในโอ่ง (ง) การเติมน้ำจากร่องสวนลงโอ่ง และ (จ) น้ำตาลมะพร้าวที่หมักด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องในโอ่งมังกรที่แช่ในอ่างซีแมนต์..... 75

รูปที่ 4.3 (ก) การดูดส่วนที่เป็นน้ำส่าเพื่อนำไปกลั่น (ข) ส่วนตะกอนเมล็ดข้าวและที่เหลือก้นโอ่ง (ค) เครื่องกลั่นสุราที่มีอ่างน้ำเป็น Condenser (ง) ลักษณะน้ำสุราที่กลั่นได้ และ (จ) ถังบรรจุสุรากลั่น..... 76

รูปที่ 4.4 (ก) ตะกอนเมล็ดข้าวที่สมบูรณ์ และ (ข) ตะกอนเมล็ดข้าวที่ไม่สามารถนำกลับมาใช้ได้..... 77

รูปที่ 4.5 ลักษณะของจุลินทรีย์ที่พบในกล้าเชื้อข้าวกล้อง บนอาหารเลี้ยง DRBC Agar..... 79

รูปที่ 4.6 (ก) ลักษณะสัณฐานวิทยาของรา RB201 (ข) ลักษณะสัณฐานวิทยาของรา RB202 และ (ค) ลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ RB108..... 80

รูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์และรา Log CFU/g ระหว่างกระบวนการหมักกล้าเชื้อข้าวกล้องเป็นระยะเวลา 3 วัน ณ สถานประกอบการ (ก) ปริมาณยีสต์ และ (ข) ปริมาณเชื้อรา..... 82

รูปที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ (Log CFU/ml) ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อข้าวกล้องเป็นระยะเวลา 4 วัน (ก) ปริมาณยีสต์ และ (ข) ปริมาณแบคทีเรีย..... 84

รูปที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อข้าวกล้องเป็นระยะเวลา 4 วัน (ก) ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์), (ข) ค่า pH, (ค) ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละแลคติก) และ (ง) ปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละโดยปริมาตร)..... 86

รูปที่ 4.10 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน D1/D2 domain of 26S rRNA gene ของยีสต์ ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยโปรแกรม MEGA 11 89

รูปที่ 4.11 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน ITS rDNA ของเชื้อรา ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยโปรแกรม MEGA 11..... 90

# สารบัญรูป (ต่อ)


หน้า

รูปที่ 4.12 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยโปรแกรม MEGA 11..... 91

รูปที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ (Log CFU/ml) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปแบบกรดแลคติก (ร้อยละ) ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อยีสต์เป็นระยะเวลา 4 วัน..... 95

รูปที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงระหว่างปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) และปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละโดยปริมาตร) ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อยีสต์ เป็นระยะเวลา 4 วัน..... 95

รูปที่ 4.15 ต้นทุนการผลิตสุรากลั่นชุมชนน้ำตาลมะพร้าวระหว่างสุรากลั่นแบบดั้งเดิมและสุรากลั่นที่เติมกล้าเชื้อยีสต์..... 103

รูปที่ ค.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายที่ 40 เท่า โดยการย้อมสี Methylene Blue..... 125

รูปที่ ค.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของราที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายที่ 40 เท่า โดยการย้อมสี Methylene Blue..... 125

รูปที่ ค.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดยการย้อมแกรม (Gram Staining)..... 126

# บทที่1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ก่อนที่มนุษย์จะรู้จักจุลินทรีย์ที่เป็นความรู้ทางวิทยาศาสตร์ในปัจจุบัน ในอดีตมนุษย์ได้มีการหมักอาหารเพื่อเป็นการถนอมอาหารเก็บไว้บริโภคในยามขาดแคลน ทำให้การหมักซึมซับเข้าไปในวัฒนธรรมประจำท้องถิ่นกลายเป็นมรดกตกทอดจากบรรพบุรุษมาสู่อนุชนปัจจุบัน เป็นผลให้เกิดการพัฒนากระบวนการหมักที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น มีการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาก่อให้เกิดกระบวนการหมักที่รวดเร็วขึ้น จุลินทรีย์ที่เป็นตัวการหมักก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ ที่มนุษย์นำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เช่น การใช้ยีสต์สำหรับหมักเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ที่เป็นเครื่องดื่มที่นิยมดื่มกันโดยทั่วไปเช่น ไวน์ เบียร์ และสาเก รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการกลั่น เช่น บรั่นดี วิสกี้ เป็นต้น [1] การผลิตเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์จากวัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น เบียร์ สาเก สาโท ต้องอาศัยกระบวนการเปลี่ยนแป้ง (Starch) ให้เป็นน้ำตาลที่สามารถหมักได้ (Fermentable Sugar) ซึ่งในอดีตจะอาศัยเอนไซม์อะไมเลส (Amylase) จากเชื้อราหรือจากการงอกของเมล็ดธัญพืชเพื่อการเปลี่ยนน้ำตาลที่สามารถทำให้เกิดการหมักได้เป็นแอลกอฮอล์ [2]

เช่นเดียวกับในเขตสวนมะพร้าวของจังหวัดราชบุรีมีการนำน้ำตาลมะพร้าวมาหมักเพื่อผลิตเป็นสุรากลั่นที่สืบทอดกันมาหลายสิบปี ซึ่งกระบวนการทำสุรากลั่นนั้นเป็นองค์ความรู้ที่พัฒนาขึ้นจากการสั่งสมถ่ายทอดและพัฒนาจากประสบการณ์ โดยใช้วัตถุดิบที่หาได้ในท้องถิ่น ขั้นตอนในการผลิตเป็นสุรากลั่น เริ่มจากนำน้ำตาลมะพร้าวที่เคี่ยวเองจากน้ำตาลสดที่เก็บได้จากสวนมาละลายน้ำ มาหมักกับข้าวกล้อง ลูกแป้งและสมุนไพรจีนที่ใช้เป็นกล้าเชื้อข้าวกล้องสำหรับการหมักแอลกอฮอล์ ในโอ่งที่แช่น้ำไว้ในอ่างซีเมนต์ หรือแช่ในร่องสวน เมื่อหมักได้แอลกอฮอล์จึงนำไปกลั่น โดยจะสูบแต่ส่วนของน้ำไปกลั่นเท่านั่น ซึ่งจะเหลือเม็ดข้าวและตะกอนไว้โนโอ่ง เพื่อจะเป็นกล้าเชื้อสำหรับในการหมักครั้งต่อไป จากประสบการณ์ที่ผู้ประกอบการผลิตสุรากลั่นมาหลายปีปัญหาที่พบบ่อย ได้แก่ ระยะเวลาในการหมักน้ำตาลมะพร้าวที่ไม่แน่นอน ปริมาณสุรากลั่นที่ได้น้อย และวัตถุดิบสมุนไพรจีนที่หาซื้อได้ยาก ซึ่งทำให้คุณภาพของสุรากลั่นที่ได้ไม่สม่ำเสมอ ต้นทุนในการผลิตเพิ่มขึ้น และปริมาณสุรากลั่นที่ได้น้อยลง

จากปัญหาดังกล่าว จึงทำให้ผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะปรับปรุงกระบวนการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ เพื่อพัฒนาคุณภาพของน้ำหมักจากน้ำตาลมะพร้าวที่ทำให้ผลิตสุรากลั่นได้ปริมาณที่สม่ำเสมอ และเปรียบเทียบลักษณะทางประสาทสัมผัสระหว่างสุรากลั่นที่ใช้กล้าเชื้อข้าวกล้องในการหมักกับสุรากลั่นที่ใช้กล้าเชื้อยีสต์ จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนากระบวนการการหมักน้ำตาลมะพร้าวเพื่อผลิตเป็นสุรากลั่นต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาข้อมูลพื้นฐานในการผลิตสุรากลั่นชุมชนกรณีศึกษาของผู้ประกอบการ อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี

1.2.2 เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบในกล้าเชื้อข้าวกล้องและระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าว

1.2.3 เพื่อศึกษาการหมักน้ำตาลมะพร้าวสำหรับผลิตสุรากลั่นโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์

1.2.4 เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสระหว่างสุรากลั่นแบบดั้งเดิมกับสุรากลั่นที่ใช้กล้าเชื้อยีสต์

## 1.3 สมมติฐานการวิจัย

การปรับปรุงกระบวนการหมักน้ำตาลมะพร้าวเพื่อผลิตสุรากลั่นโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ ทำให้คุณภาพของการหมักน้ำตาลมะพร้าว ปริมาณสุรากลั่น และปริมาณแอลกอฮอล์ของสุรากลั่นมีคุณภาพที่สม่ำเสมอและแน่นอน ที่ดีกว่าการใช้กล้าเชื้อข้าวกล้องสำหรับหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ และสุรากลั่นที่ผลิตได้มีรสชาติไม่แตกต่างจากการผลิตแบบดั้งเดิม

## 1.4 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษากระบวนการหมักน้ำตาลมะพร้าวเพื่อผลิตสุรากลั่นชุมชนแบบดั้งเดิม กรณีศึกษาของผู้ประกอบการ อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี โดยสัมภาษณ์ผู้ประกอบการด้านต้นทุนในการผลิต และสังเกตขั้นตอนระหว่างการหมักเพื่อผลิตสุรากลั่น ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์และเคมี จากนั้นนำข้อมูลมาพัฒนาสุรากลั่นจากน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในด้านต้นทุน ระยะเวลาในการหมัก และคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคระหว่างสุรากลั่นแบบดั้งเดิมกับสุรากลั่นจากน้ำตาลมะพร้าวใช้กล้าเชื้อยีสต์ เพื่อพัฒนาสุรากลั่นชุมชนของผู้ประกอบการ อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรีที่เป็นกรณีศึกษา

## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักกล้าเชื้อข้าวกล้องและการหมักน้ำตาลมะพร้าวที่เป็นปัจจัยสำคัญทำให้ผู้ประกอบการผลิตสุรากลั่นได้ตามแบบดั้งเดิม

1.5.2 ผู้ประกอบการสามารถผลิตสุรากลั่นจากน้ำตาลมะพร้าวหมักโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ซึ่งสามารถลดต้นทุน ระยะเวลาในการหมักที่แน่นอน และได้คุณภาพที่สม่ำเสมอ

1.5.3 สุรากลั่นที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อยีสต์มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสเทียบเท่า สุราที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อแบบดั้งเดิม

# บทที่ 2
# วรรณกรรมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยเรื่อง การปรับปรุงกระบวนการหมักน้ำตาลมะพร้าวเพื่อผลิตสุรากลั่นชุมชน มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาข้อมูลพื้นฐานในการผลิตสุรากลั่นชุมชนกรณีศึกษาของผู้ประกอบการ อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบในกล้าเชื้อข้าวกล้องและระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าว ศึกษาการหมักน้ำตาลมะพร้าวเพื่อผลิตสุรากลั่นโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์และเพื่อเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสระหว่างสุรากลั่นแบบดั้งเดิมกับสุรากลั่นที่ใช้กล้าเชื้อยีสต์ โดยผู้วิจัยได้ศึกษาวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังสาระสำคัญดังต่อไปนี้

2.1 สุรากลั่นชุมชน

2.2 ความหมายของการหมัก

2.3 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมัก

2.4 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

2.5 น้ำตาลมะพร้าว

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 สุรากลั่นชุมชน

ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมสุรากลั่นชุมชน (มผช.32/2546) สุรากลั่นชุมชน หมายถึง สุรากลั่นชนิดสุราขาว ซึ่งสุราขาว หมายถึง สุรากลั่นที่กลั่นได้จากน้ำส่าที่ได้จากข้าว หรือน้ำตาล หรือผลไม้ หรือน้ำผลไม้ หรือวัตถุดิบทางการเกษตรใด ๆ ที่มีแป้ง น้ำตาล โดยปราศจากเครื่องย้อม หรือสิ่งปรุงแต่งอื่นนอกจากน้ำ มีแรงแอลกอฮอล์เกินร้อยละ 15 โดยปริมาตร แต่ไม่เกินร้อยละ 40 โดยปริมาตร [3]

2.1.1 การเตรียมน้ำส่าสำหรับกลั่นสุรา [4]

ในการผลิตสุรากลั่นชุมชมมีกระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน ประกอบด้วย วัตถุดิบหลักที่จะใช้หมัก และเชื้อสุรา ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.1.1.1 วัตถุดิบ

1) ข้าวเหนียว มีขั้นตอนการเตรียมการหมักโดยใช้เชื้อรา เพื่อย่อยแป้งในข้าวเหนียวนึ่งสุกให้เป็นน้ำตาล เรียกว่า น้ำต้อย เมื่อครบกำหนดเติมน้ำสะอาดลดไป เรียกขั้นตอนนี้กันทั่วไปว่า การผ่าน้ำ เป็นการเติมน้ำเพื่อให้เกิดกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ใช้เวลาอีกประมาณ 2 สัปดาห์ ขั้นตอนนี้เชื้อยีสต์ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยในโรงงานผลิตสาโทปัจจุบันจะมีการติดตามการหมัก โดยการวัดความหวานและวัดปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่องมืออย่างง่าย เมื่อนำมากลั่นเรียกว่า เหล้าขาวหรือสุรากลั่น โดยทั่วไปจะมีปริมาตรแอลกอฮอล์ร้อยละ 30 – 40 โดยปริมาตร สาโทและเหล้าขาวมีกรรมวิธี ดังแสดงในรูปที่ 2.1

2) กากน้ำตาล (Molasses) เป็นของเหลวข้นที่เป็นของเหลือจากการผลิตน้ำตาลทรายจากน้ำอ้อย ในกระบวนการตกผลึกน้ำตาลนั้นจะสามารถแยกน้ำตาลทรายออกจากน้ำอ้อยเพียงร้อยละ 50 ดังนั้นในกากน้ำตาลจึงมีน้ำตาลเหลืออยู่และสามารถนำไปหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ได้ ในกากน้ำตาลมักจะมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 46 – 49 ส่วนที่เหลือเป็นสารอื่น ๆ ดังนั้นการเตรียมกากน้ำตาลเพื่อการหมักจึงควรปรับความเข้มข้น โดยวัดค่าของแข็งที่ละลายน้ำได้ มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์ (°Brix) จากนั้นเติมน้ำให้เข้มข้นของน้ำตาลเหลือ 24 องศาบริกซ์ ซึ่งจะมีน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 16 เมื่อหมักแล้วจะได้แอลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 6 – 7 โดยปริมาตร หากปรับความเข้มข้นมากกว่านี้ ยีสต์จะเจริญเติบโตไม่ดี เพราะมีความเข้มข้นของสารละลายมากเกินไป อาจทำให้เชื้อตายได้ ในกากน้ำตาลมีวิตามินและแร่ธาตุเพียงพอสำหรับการเจริญของยีสต์แต่อาจเติมไนโตรเจนลงไป เพื่อให้แน่ใจว่ามีเพียงพอ โดยเติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (Diammonium Phosphate, DAP) ลงไป 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนั้นในโมลาส ยังมีแบคทีเรียและยีสต์ปนเปื้อนมา ดังนั้นจึงควรตรวจวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH) และปรับให้มีค่าไม่เกิน 4.5 โดยการเติมกรดซิตริก (Citric Acid) หรือซัลฟูริก (Sulfuric Acid) เพื่อควบคุมแบคทีเรีย

3) ผลไม้ ในการเลือกผลไม้ที่นำมาผลิตไวน์ มักเป็นผลไม้ที่มีรสหวานและเปรี้ยวซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะสมในการหมัก หากผลิตไวน์ที่มีคุณภาพต่ำ เช่น มีกลิ่นน้ำส้มสายชู มีรสเปรี้ยว เนื่องจากปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย หรือเกิดกลิ่นฟองลูกโป่ง (Ethyl Acetate) เมื่อนำไปกลั่นจะได้สุราที่มีกลิ่นน้ำส้ม หรือกลิ่นลูกโป่งวิทยาศาสตร์ จึงไม่ควรนำไวน์ที่เสียแล้วมากลั่นสุรา การผลิตสุรากลั่นจากผลไม้ ต้องใช้ยีสต์ทำไวน์ในการหมักน้ำผลไม้ให้เป็นไวน์ แล้วจึงนำมากลั่น

**รูปที่ 2.1** แผนภูมิการผลิตสาโทและสุรากลั่น

**ที่มา** : [5]

4) น้ำตาลมะพร้าว ต้นจาก ต้นตาล เริ่มต้นจากการเก็บน้ำตาลสดจากต้นมะพร้าว หรือต้นตาล โดยใช้กระบอกไม้ไผ่ กระบอกอลูมิเนียมหรือพลาสติก รองน้ำตาลที่หยดจากงวงที่ถูกปาด เพื่อป้องกันการบูดโดยภูมิปัญญาชาวบ้านจึงมีวิธีถนอมรักษาด้วยการใช้ไม้พะยอม ไม้ตะเคียน หรือไม้เคี่ยม ใส่ลงในกระบอกรองน้ำตาล ไม้เหล่านี้เชื่อว่ามีสารเคมีที่หยุดยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่จะทำให้น้ำตาลบูดเสีย แต่การใช้ไม้พะยอมจะทำให้น้ำตาลมีรสขม และช่วยชะลอการบูดเสีย แต่ยังจำเป็นต้องนำน้ำตาลมาต้มเพื่อฆ่าเชื้อก่อนบรรจุขวดขายเป็นน้ำตาลสด ซึ่งปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลสดสเตอริไลส์จะเติมสาร Potassium Metabisulfite (KMS) แทนไม้พะยอมก่อนนำน้ำตาลส่งโรงงานเพื่อฆ่าเชื้อและบรรจุขวด เมื่อได้น้ำตาลสดแล้ว ผู้ผลิตจะนำไม้มะเกลือมาย่างไฟ ตากแดดให้แห้ง หรือโรยเกลือลงไปเล็กน้อย แล้วนำมาใส่ลงในน้ำตาล ไม้มะเกลือจะทำให้เกิดการหมักแอลกอฮอล์อย่างรวดเร็ว เนื่องจากน้ำตาลสดมีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณ 15 – 17 องศาบริกซ์ ดังนั้นน้ำตาลสดจะหมักได้แอลกอฮอล์ร้อยละ 6 – 9 โดยปริมาตร ซึ่งไม่เพียงพอที่จะป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้ หากจะผลิตน้ำตาลเมาจึงควรพาสเจอไรส์ หรืออาจปรับค่า pH ให้เหมาะสมกับการหมัก แต่หากต้องการทำสุรากลั่น ก็ควรป้องกันไม่ให้ถูกอากาศก่อนที่จะนำไปกลั่น

2.1.1.2 ลูกแป้ง [6]

ลูกแป้ง คือ กล้าเชื้อจุลินทรีย์ (Inoculum) ที่เก็บอยู่ในรูปก้อนเชื้อแห้ง ลูกแป้งมักนิยมใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตอาหารหมักหลายชนิดในแถบประเทศเอเชีย ต้นกำเนิดของลูกแป้งเชื้อกันว่าเกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตสุราในประเทศจีน และแพร่ออกสู่ประเทศต่าง ๆ ในเขตภูมิภาคเอเชีย ซึ่งต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการ ขั้นตอน และส่วนผสมที่แตกต่างกันออกไป ชื่อของลูกแป้งนั้นมีการเรียกที่แตกต่างกันออกไปตามประเทศที่ผลิต และมีรูปร่าง ขนาด ชนิดของเชื้อที่พบแตกต่างกัน องค์ประกอบของลูกแป้ง ลูกแป้งมีองค์ประกอบหลักของวัตถุดิบที่ใช้ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1) แป้ง ใช้ได้ทั้งแป้งข้าวและแป้งข้าวเหนียวหรือแป้งผสม แต่พบว่าแป้งข้าวเจ้าล้วนให้ลูกแป้งที่มีคุณภาพดีที่สุด นิยมใช้แป้งที่ได้จากการโม่เอง ไม่ใช้เป็นสำเร็จเพราะแป้งสำเร็จมีการเติมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่น กรด Propionic

2) น้ำ ใช้ในขั้นตอนการนวดแป้งและปั้นลูกแป้ง การนวดแป้งกับน้ำทีละน้อยทำให้แป้งมีความเหนียวและสามารถปั้นได้ นอกจากนี้น้ำเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ลูกแป้งมีความชื้นเพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์

3) ลูกแป้งเก่า นิยมใช้เป็นแหล่งของเชื้อ บางสูตรไม่มีการผสมลูกแป้งเก่าแต่ใช้เชื้อจากธรรมชาติแทน

(4) สมุนไพร เป็นองค์ประกอบที่สำคัญซึ่งแต่ละประเทศจะมีสูตรการผลิตลูกแป้งที่แตกต่างกันหลายตำรับ และมักจะเก็บเป็นความลับที่ถ่ายทอดกันเฉพาะในครัวเรือน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 เป็นตัวอย่างตำรับลูกแป้งสุรา

**ตารางที่ 2.1** ตำรับลูกแป้งสุรา

| องค์ประกอบ | ปริมาณ (กรัม) |
|---|---|
| กระเทียม | 40 |
| ขิง | 40 |
| ข่า | 20 |
| ชะเอม | 40 |
| พริกไทย | 6 |
| ดีปลี | 6 |
| หัวหอม | 20 |
| ข้าวเจ้า | 2,500 |

**ที่มา** : [7]

2.1.1.3 ยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์ที่ใช้สำหรับผลิตแอลกอฮอล์จะอยู่ในสกุล *Saccharomyces cerevisiae* ได้มีการผลิตออกมาจำหน่ายเชิงพาณิชย์มากมาย และมีการพัฒนาคุณสมบัติด้านต่าง ๆ เพื่อให้ผลิตไวน์ที่มีคุณภาพตามชนิดและความต้องการที่ใช้กันมาก เช่น Montrachet และ Pasteur Champagne สำหรับ Montrachet เป็นสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* เป็นไวน์ยีสต์ที่นิยมใช้มากที่สุด ทั้งการหมักไวน์แดงและไวน์ขาวและอาจเรียกว่า Montrachet Red และ Montrachet White เป็นสายพันธุ์ที่เริ่มการหมักรวดเร็วการหมักมีความรุนแรงและทนซัลเฟอร์ไดออกไซด์สูง (Sulfur Dioxide) เหมาะสำหรับการผลิตไวน์แดงและไวน์ขาว แต่หากมีน้ำตาลความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 23.5 จะเจริญเติบโตไม่ดีและทำให้การหมักหยุดชะงักส่วน Pasteur Champagne ใช้กันมากเป็นอันดับสอง เป็นสายพันธุ์ของ *Saccharomyces bayanus* มีอัตราการหมักปานกลางที่ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอลสูง และทนทานต่อเอทานอลที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิใช้ในการหมักทั่วไป นอกจากนี้หากต้องการรักษาให้ไวน์มีคุณลักษณะของผลไม้สีแดงและเผ็ดร้อนของเครื่องเทศก็อาจใช้สายพันธุ์ทางการค้า RC 212 หรือหากต้องการไวน์ขาวมีกลิ่นดอกไม้และผลไม้ ก็อาจใช้ยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า GHM เป็นต้น [8] ดังแสดงในตารางที่ 2.2

**ตารางที่ 2.2** ตัวอย่างสายพันธุ์ยีสต์หรือรหัสทางการค้าสำหรับไวน์

| ชนิดไวน์ | รหัสการค้า | คุณสมบัติสายพันธุ์ยีสต์ |
|---|---|---|
| ไวน์ขาว<br>ไวน์ผลไม้ | G 74 | สายพันธุ์ *S. cerevisiae* พัฒนาโดยสถาบันวิจัยไกเซนไฮม์ ประเทศเยอรมันนี เลี้ยงอยู่ในน้ำองุ่น (หรือน้ำผลไม้) ทนทานต่ออุณหภูมิสูง |
| ไวน์ขาว<br>ไวน์ผลไม้<br>ไวน์จากน้ำผลไม้เข้มข้น | SIHA 3 | สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ใช้ได้ดีกับน้ำหมักที่ยุติการหมักแบบกระทันหัน เหมาะกับอุณหภูมิช่วงกว้าง 10 – 35 องศาเซลเซียส สามารถเริ่มต้นการหมักได้รวดเร็ว และเจริญได้ดีเหนือยีสต์ป่า ไวน์มีความใส สร้างสารให้กลิ่นตามชนิดผลไม้ที่ใช้ทำ |
| ไวน์ขาว | Enoferm M1 | ทนได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ มีความแข็งแรง และสามารถเริ่มต้นการหมักได้อย่างรวดเร็ว สร้างสารให้กลิ่นพวกเอสเทอร์ในขณะที่สร้างสารให้กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ต่ำมาก |
| ไวน์ผลไม้แอปเปิล | Viniferm C2 | เป็นสายพันธุ์ S. cerevisiae ที่ทนทานต่อความเข้มข้นของน้ำตาลและแอลกอฮอล์สูง ทนที่อุณหภูมิหมักได้ถึง 40 องศาเซลเซียส สามารถทำงานได้ดีแม้แต่ในน้ำผลไม้ที่เจือจางมาก และมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์เหลือต่ำสารมารถนำมาทดลองใช้กับผลไม้เขตร้อนได้ |
| ไวน์องุ่น<br>ไวน์น้ำผึ้ง<br>ไวน์ผลไม้ | KIV 1116 | ทนต่อแอลกอฮอล์ได้ถึงร้อยละ 14 โดยปริมาตร เจริญได้ดีเหนือยีสต์ป่า เหมาะสมกับน้ำหมักที่ยุติการหมักแบบกระทันหันก่อนเวลาอันเหมาะสม |
| ไวน์แดง<br>ไวน์ขาว<br>ไวน์ผลไม้ | Montrachet | เป็นสายพันธุ์ *S. cerevisiae* มีความแข็งแรง ทนทานต่อแอลกอฮอล์สูง ทำให้การหมักเกิดได้อย่างสมบูรณ์ ทนต่อสารประกอบซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ สร้างสารให้กลิ่นหลายชนิด แต่ไม่เหมาะกับน้ำองุ่นหรือน้ำผลไม้ที่มีความขุ่น |
| ไวน์ขาว | Uvaferm GHM | เป็นยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* var. *cerevisiae* เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 16 – 20 องศาเซลเซียส ทนแอลกอฮอล์ได้สูงถึงร้อยละ 14 โดยปริมาตร เหมาะสำหรับการทำไวน์ขาวโดยเฉพาะจากองุ่นพันธุ์สลิง (Riesling) ให้กลิ่นดอกไม้และผลไม้ |

**ตารางที่ 2.2** ตัวอย่างสายพันธุ์ยีสต์หรือรหัสทางการค้าสำหรับไวน์ (ต่อ)

| ชนิดไวน์ | รหัสการค้า | คุณสมบัติสายพันธุ์ยีสต์ |
|---|---|---|
| ไวน์แดง<br>ไวน์ขาว<br>ไวน์ชมพู<br>ไอซ์ไวน์ (Ice wine) | Lalvin V<br>1116 | เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส และเติมสารอาหารเสริมที่เหมาะสมแล้ว จะสร้างสารให้กลิ่นและคงอยู่ในไวน์ได้นานกว่า EC 1118 สร้างสารให้กลิ่นหอมของดอกไม้หลายชนิด เช่น ไอโซเอมิลแอซีเทต (Isoamyl Acetate) เอซิลแอซีเทต (Hexyl Acetate) และฟีนิลเอทิลแอซีเทต (Phenyl ethyl Acetate) เป็นสายพันธุ์ที่มีความทนทานมากเมื่ออยู่ในน้ำหมักที่มีสภาพไม่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ เช่น มีความขุ่นมากขึ้น อุณหภูมิต่ำ หรือมีกรดไขมันจำเป็นเป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจนำมาทดลองใช้กับไวน์ผลไม้เขตร้อนชื้น |
| ไวน์องุ่น<br>ไวน์ฟอง<br>ไวน์ผลไม้ | Ec 1118<br>(Prise de<br>Mousse) | เป็นยีสต์ *S. cerevisiae* var. *bayanus* เจริญได้ดีเหนือยีสต์ป่า เหมาะที่จะเติมลงในไวน์ที่ยุติการหมักแบบกะทันหัน เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 10 – 30 องศาเซลเซียส ทนแอลกอฮอล์ได้สูงถึงร้อยละ 18 โดยปริมาตร ตกตะกอนได้ดี แต่ถ้าน้ำหมักมีสารอาหารที่จำเป็นต่อยีสต์ต่ำ ยีสต์จะสร้างซัลเฟอร์ไดออกไซด์มากถึง 30 มิลลิลิตรกรัมต่อลิตร และจะไปยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียที่จำเป็นในขั้นตอนต่อไป ได้แก่ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย |
| ไวน์ขาว<br>ไวน์ชมพู่ | Lalvin 71B | เป็นยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* var. *cerevisiae* เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 15 – 28 องศาเซลเซียส ทนแอลกอฮอล์ได้สูงถึงร้อยละ 14 โดยปริมาตร ให้ไวน์ที่มีกลิ่นของผลไม้หลายชนิด ช่วยเมแทบอไลต์กรดมาลิกบางส่วน ทำให้กรดมีความแรงลดลง |
| ไวน์แดง<br>ไวน์ผลไม้สีแดง | Lalvin<br>Rhone<br>2323 | เป็น *S. cerevisiae* var. *cerevisiae* เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 15 – 28 องศาเซลเซียส ทนแอลกอฮอล์ได้สูงถึงร้อยละ 15 โดยปริมาตร |

**ตารางที่ 2.2** ตัวอย่างสายพันธุ์ยีสต์หรือรหัสทางการค้าสำหรับไวน์ (ต่อ)

| ชนิดไวน์ | รหัสการค้า | คุณสมบัติสายพันธุ์ยีสต์ |
|---|---|---|
| ไวน์แดง<br>ไวน์ผลไม้สีแดง | Lalvin<br>RC 212 | เป็นยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* var. *cerevisiae* เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 18 – 30 องศาเซลเซียส ทนแอลกอฮอล์ได้สูงถึงร้อยละ 16 โดยปริมาตร เหมาะกับการทำไวน์แดงโดยเฉพาะจากองุ่นพันธุ์พิน์นัวร์ (Pinot Noir) ให้ไวน์ที่มีคุณลักษณะของผลไม้สีแดงและเผ็ดร้อนของเครื่องเทศ |
| ไวน์แดง | Maurivin<br>725 | เป็นยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* var. *cerevisiae* เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 18 – 30 องศาเซลเซียส ทนแอลกอฮอล์ได้สูงถึงร้อยละ 15.5 โดยปริมาตร ใช้ในการทำไวน์แดงจากองุ่นพันธุ์ต่าง ๆ เช่น ชีราส ซินฟานเดล (Zinfandel) คาเบอร์เนต์โซวิยอง (Cabernet Sauvignon) เกรอนาซ (Grenache) และเมอร์โล ให้กลิ่นเฉพาะของผลไม้ |
| ไวน์ขาว | Maurivin<br>AWRI 76 | เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20 – 30 องศาเซลเซียส เกิดฟองน้อยระหว่างการหมัก ทนแอลกอฮอล์ได้สูงถึงร้อยละ 14.5 – 15.5 โดยปริมาตร ใช้ในการทำไวน์แดง เช่น ชีราส คาเบอร์เนต์โซวิยอง เมอร์โล และพิโนต์นัสร์ สำหรับไวน์ขาว เช่น จากองุ่นพันธุ์ชาร์ดอนเนย์ โซวิยองบลองซ์ (Sauvignon Blanc) เซมิยอง (Semillon) และริสลิง ให้กลิ่นของผลไม้ระดับที่เป็นกลาง เช่น แบคเบอร์รี พลัม และลูกเกด |

**ที่มา** : [8]

2.1.2 การกลั่นสุรา [5]

การกลั่นสุรา หมายถึง การแยกเอทานอลออกจากน้ำหมัก โดยอาศัยจุดเดือด (Boiling Point) และความดันไอน้ำ (Vapor Pressure) ของแอลกอฮอล์ กับสารระเหยที่ต่างกัน แอลกอฮอล์ที่ได้จะมีความบริสุทธิ์มากน้อยเพียงใดจะขึ้นกับปัจจัยหลัก ๆ คือ ชนิดของหม้อกลั่น โดยการกลั่นจะสามารถแยกสารบางชนิดที่ไม่ต้องการออกได้ ซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก เช่น เอสเทอร์ (Esters) แอลดีไฮด์ (Aldehydes) ฟลูเซลออยด์ (Fusel Oils) และสารระเหยต่าง ๆ แต่อาจมีสารระเหยบางอย่างเช่น เอสเทอร์อาจหลงเหลืออยู่บ้าง ซึ่งจะมีกลิ่นเฉพาะในแต่ละชนิดของน้ำหมักซึ่งจะเป็นเอกลักษณ์ของสุราแต่ละชนิดที่ผลิต ระบบการกลั่นแบ่งออกเป็น 2 ระบบ คือการกลั่นแบบเป็นครั้งใน

Pot Still และการกลั่นต่อเนื่องแบบลำดับส่วน จุดประสงค์การกลั่น คือ ต้องการแยกแอลกอฮอล์และสารให้กลิ่นที่ระเหยได้ออกจากน้ำหมักให้ได้ความเข้มข้นมากที่สุด เครื่องกลั่นสุราสามารถแยกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ได้ดังนี้

2.1.2.1 เครื่องกลั่นสุราแบบดั้งเดิม หมายถึง เครื่องกลั่นสุราที่ใช้กันมาแต่โบราณ ส่วนประกอบของเครื่องกลั่นจะเป็นหม้อที่ทำจากดินใช้ใส่น้ำหมักระหว่างต้ม เหนือหม้อต้มขึ้นไปจะเป็นไหที่รองก้นด้วยผ้าชุบน้ำ ซึ่งตัวไหจะออกแบบเป็นพิเศษ โดยการเจาะตรงกลางใส่ท่อสำหรับน้ำสุราไหลออกมา ปลายท่อด้านในจะทำเป็นลักษณะคล้ายช้อนขนาดใหญ่ เพื่อให้น้ำสุราที่ควบแน่นจากก้นกระทะไหลลงที่ช้อนนี้ซึ่งจะไหลออกมาตามท่อสู่ภาชนะที่ใช้บรรจุสุรา ส่วนข้างบนไหจะมีกระทะวางทับซึ่งภายในกระทะจะเติมน้ำเปล่าไว้ซึ่งน้ำนี้ต้องเป็นน้ำเย็น

วิธีการกลั่น และการทำงานของเครื่องกลั่น เริ่มจากการใส่น้ำหมักลงในหม้อต้ม ให้ผ้าชุบพันรอบปากหม้อแล้ววางไหลงบนผ้า จัดปลายช้อนสำหรับน้ำสุราให้อยู่ตรงกลางไหวางกระทะลงบนปากไห เติมน้ำเย็นลงบนกระทะทำการต้ม เมื่อความร้อนถึงระดับหนึ่งจะมีไอระเหยเกิดขึ้น เมื่อไอน้ำนี้ลอยขึ้นไปกระทบก้นกระทะที่มีความเย็น จึงเกิดการควบแน่นกลายเป็นหยดน้ำที่ก้นกระทะและตกลงบนช้อน แล้วไหลออกมาตามท่อสู่ภาชนะรองรับน้ำสุราที่อยู่ภายนอก

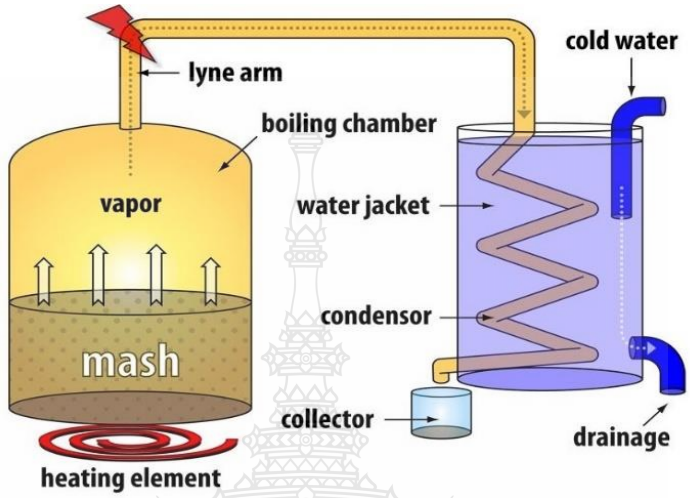
2.1.2.2 เครื่องกลั่นสมัยใหม่ ได้รับการพัฒนาขึ้นจากเครื่องกลั่นแบบโบราณ โดยเครื่องกลั่นชนิดนี้แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ เครื่องกลั่นแบบธรรมดา (Pot Still) เครื่องกลั่นแบบไหลย้อนกลับ (Reflux Still) และเครื่องกลั่นแบบแยกลำดับส่วน (Fractionating Column)

1) เครื่องกลั่นธรรมดา (Pot Still) เป็นหม้อกลั่นที่ไอแอลกอฮอล์และไอน้ำจะไหลขึ้นมากระทบกับความเย็นโดยตรง การแยกไอแอลกอฮอล์และไอน้ำออกจากกันได้ไม่มากนัก การควบแน่นมักนำท่อบาง ๆ มาขดในน้ำดังแสดงในรูปที่ 2.2 โดยทั่วไปจะได้แรงแอลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 40 – 60 หากต้องการการเพิ่มดีกรีจำเป็นต้องกลั่นครั้งที่สอง ซึ่งมักจะได้แรงแอลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 70 – 85 นอกจากนี้ความสามารถในการแยกสารระเหยต่าง ๆ จะไม่ได้ดีเท่ากับอีกสองชนิด

2) เครื่องกลั่นแบบไหลย้อนกลับ (Reflux Still) ไอแอลกอฮอล์และไอน้ำจะไหลเข้าสู่ท่อระหว่างปากหม้อกับจุดควบแน่น ภายในท่อนี้ถูกออกแบบให้ไอไหลไปกระทบความเย็นก่อนถึงจุดควบแน่นทำให้แอลกอฮอล์กลั่นไหลลง โดยทั่วไปสามารถได้แรงแอลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 75 – 85 ขึ้นอยู่กับท่อระบบหม้อนี้ยังสามารถกำจัดกลิ่นของสารปนเปื้อนในสุราได้ดีกว่าแบบแรก นิยมใช้กับการทำวอดก้า

3) เครื่องกลั่นแบบแยกลำดับส่วน (Fractionating Column) เป็นหม้อกลั่นที่ให้ความบริสุทธิ์มากที่สุด โดยวัสดุดูดซับ (Scrubbers) หรือทำเป็นตะแกรงหรือถ้วยคว่ำขนาดเล็กวาง

เป็นชั้น ๆ เพื่อทำให้ไอแอลกอฮอล์และไอน้ำไหลวกวนไปมาเสมือนเดินทางระยะไกล ๆ ประมาณ 9 ใน 10 ส่วน จะไหลย้อนกลับลงมาโดยทั่วไปท่อจะมีความสูงหลายเมตรสุรากลั่นที่ได้จะมีความบริสุทธิ์สูงมากถึงร้อยละ 95 นิยมใช้ในการทำวิสกี้ และเหล้ารัมชนิดต่าง ๆ




**รูปที่ 2.2** ลักษณะเครื่องกลั่นแบบธรรมดา (Pot Still)
**ที่มา** : [9]

2.1.2.3 เทคนิคการกลั่นสุรา การกลั่นสุราใช้หลักการแยกสารที่ผสมกันอยู่ โดยอาศัยความแตกต่างของจุดเดือด การต้มน้ำส่าจนถึงจุดเดือดของแอลกอฮอล์ คือ 78.30 องศาเซลเซียส แอลกอฮอล์จะระเหยออกมา ไปกระทบกับความเย็นจากชุดควบแน่นก็จะควบแน่นกลายเป็นหยดของเหลวได้แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น นอกจากจะได้แอลกอฮอล์ที่กินได้แล้วในการกลั่นสุราจะมีเมทิลแอลกอฮอล์ (Methyl Alcohol) ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ที่เป็นพิษระเหยออกมาด้วย แต่จะมีจุดเดือดต่ำกว่าแอลกอฮอล์จึงระเหยออกมาก่อนที่อุณหภูมิ 60 – 77 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถแยกสวนนี้ออกไปได้เรียกว่า “สวนหัว” เมื่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 78 – 90 องศาเซลเซียส ให้เก็บสวนนี้ไว้ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์บริสุทธิ์เมื่อทำการกลั่นไปจนกระทั่งอุณหภูมิสูงเกิน 90 องศาเซลเซียส แอลกอฮอล์สวนนี้เรียกว่า “สวนหาง” มีสารพิษที่เมื่อดื่มแล้วจะทำให้มีอาการปวดหัว ตาแฉะและยังทำให้สุราที่ได้มีกลิ่นฉุน โดยสารพวกนี้จะเปน Fusel Oils และเฟอรฟูรัล (Furfural) ดังนั้นไม่ควรกลั่นเกิน 90 องศาเซลเซียส และต้องมีการควบคุมให้เฉพาะแอลกอฮอล์ออกมาโดยมีการปนเปื้อนของสารประกอบหัวและหางให้น้อยที่สุด ไม่ควรเร่งอุณหภูมิให้น้ำออกมามาก นอกจากปฏิกิริยาการเกิดสาร Furfural ที่มีกลิ่นไหมแลวยังเกิดการควบแน่นของไอน้ำทำให้ได้สุราที่เจือน้ำ [10] ดังแสดงในตารางที่ 2.3

**ตารางที่ 2.3** สารเคมีปนเปื้อน จุดเดือดและความเป็นพิษในสุรากลั่น

| ชื่อสาร | จุดเดือด (องศาเซลเซียส) | ความเป็นพิษ |
|---|---|---|
| Acetone | 56.5 | ผิวหนัง ระบบประสาทส่วนกลาง และประสารทตา ตับ ไต |
| Methyl Alcohol | 64.5 | ผิวหนัง ระบบประสาทส่วนกลาง และประสารทตา ตับ ไต |
| Ethyl Acetate | 77.2 | ระบบประสาทส่วนกลาง และระบบหายใจ ตับ ไต |
| Ethyl Alcohol | 78.0 | แอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นน้ำสุรา |
| *n*-propyl alcohol (l-propanol) | 97.0 | ผิวหนัง ระบบประสาทส่วนกลาง และระบบหายใจ ระบบทางเดินอาหาร |
| Water (น้ำ) | 100.0 | |
| Butanol | 116.0 | ผิวหนัง ระบบประสาทส่วนกลาง และระบบหายใจ ไต |
| Butyl Aacetate | 126.0 | ผิวหนัง ระบบประสาทส่วนกลาง และระบบหายใจ ไต เยื่อบุตา ระบบทางเดินอาหาร |
| Fusel Oil (isoamyl alcohol) | 130.0 | ผิวหนัง ระบบประสาทส่วนกลาง และระบบหายใจ ไต |
| Fusel Oil (*n*-amyl alcohol) | 134.0 – 138.0 | ผิวหนัง ระบบประสาทส่วนกลาง และระบบหายใจ ไต |
| Furfural | 161.0 | ระบบทางเดินอาหาร มะเร็งตับ |
| Ethyl Carbamate (Urethane) | 182.0 – 184.0 | ตา ระบบทางเดินอาหาร มะเร็งตับ |

**ที่มา** : [11]

## 2.2 ความหมายของการหมัก [2]

คำว่า “การหมัก” มีรากศัพท์เดิมจากภาษาลาตินว่า “Fervere” หมายถึง “การเดือด” ซึ่งเป็นลักษณะของการที่มีก๊าซผุดขึ้นมาที่ผิวหน้าอาหารในถังหมักระหว่างการหมักอยู่ตลอดเวลา จึงมองเห็นเหมือนการเดือด นอกจากนี้ยังรวมความหมายไปถึงปฏิกิริยาออกซิเดชั่น – รีดักชั่น (Oxidation – Reduction) ระหว่างการใช้สารประกอบอินทรีย์เพื่อแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์จากการหมักซึ่งสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

หลักการพื้นฐานของกระบวนการหมัก คือ ต้องมีวัตถุดิบ สับสเตรท และจุลินทรีย์ รวมทั้งสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม กระบวนการหมักอาศัยความสามารถของจุลินทรีย์เจริญโดยทำปฏิกิริยากับสับสเตรทภายใต้สภาวะที่ควบคุมในช่วงที่กำหนดได้เป็นผลิตภัณฑ์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจุลินทรีย์จะผลิตสารต่าง ๆ ออกมา ซึ่งสารเหล่านี้บางชนิดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น เป็นอาหาร เป็นยารักษาโรค หรือบางชนิดใช้เป็นสารตั้งต้น (Precursor) ในการผลิตผลิตภัณฑ์อื่น ๆ จุลินทรีย์จึงมีความสามารถที่จะเปลี่ยนวัตถุดิบที่ราคาถูกไปเป็นสารใหม่ที่มีประโยชน์และมีราคาแพง ซึ่งปฏิกิริยาเช่นนี้สามารถนำมาขยายขนาดอุตสาหกรรมได้ เช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลหรือกรดกลูตามิกที่มีการนำวัตถุดิบ คือ กากน้ำตาลของจากโรงงานน้ำตาลมาผลิตเพื่อประโยชน์ในทางการค้าและอุตสาหกรรมอาหารเป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ของวัตถุดิบหรือสารตั้งต้นที่จุลินทรีย์ใช้เพื่อได้ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งเขียนเป็นปฏิกิริยาทั่วไปได้ดังแสดงในสมการที่ 2.1

วัตถุดิบ + จุลินทรีย์ ⟶ ผลิตภัณฑ์ใหม่ (2.1)
(Raw material/Substrate + Microorganism) (New product)

### 2.2.1 ประเภทของการหมัก

การหมักอาจจำแนกออกได้หลายประเภทขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ใช้ในการจำแนกโดยสามารถแบ่งได้ดังนี้

2.2.1.1 การหมักจำแนกตามผลิตภัณฑ์ที่ได้ แบ่งได้ 3 ประเภทดังนี้

1) การหมักทำให้เกิดแอลกอฮอล์ (Alcoholic Fermentation) เป็นการหมักที่อาศัยยีสต์นากรเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นพร้อม ๆ กับแอลกอฮอล์ด้วย ดังแสดงในสมการที่ 2.2

$C_6H_{12}O_6$ + *Saccharomyces* sp. $\longrightarrow$ $2C_2H_5OH$ + $2CO_2$ (2.2)

น้ำตาลกลูโคส ยีสต์ แอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์

ผลผลิตจากรูปแบบการหมักแบบนี้ เช่น ไวน์ เบียร์ สุรากลั่น

2) การหมักทำให้เกิดกรดอะซิติก (Acetic Acid Fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่ต่อเนื่องมาจากการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งเมื่อแอลกอฮอล์ได้ออกซิเจนจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก โดยแบคทีเรียซึ่งมักเกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ แต่การที่จะทำให้ผลผลิตกรดที่ดีนั้นจะต้องใช้แบคทีเรียบริสุทธิ์มาเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น (Starter) ลงไปในการหมัก แบคทีเรียที่ดีที่สุดที่ใช้ คือ *Acetobacter aceti* ซึ่งจะเกิดกระบวนการหมัก ดังแสดงในสมการที่ 2.3

$C_2H_5OH$ + $O_2$ + *Acetobacter acetic* $\longrightarrow$ $CH_3COOH$ + $H_2O$ (2.3)

แอลกอฮอล์ ออกซิเจน แบคทีเรีย กรดอะซิติก น้ำ

ผลผลิตจากรูปแบบการหมักแบบนี้ ได้แก่ น้ำส้มสายชู

3) การหมักที่ทำให้เกิดกรดแลคติก (Lactic Acid Fermentation) เป็นกระบวนการหมักกับอาหารส่วนใหญ่ซึ่งจะเกิดรสชาติเปรี้ยวในอาหาร เนื่องจากการกระทำของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) และ รา บางชนิด ซึ่งสามารถป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และยีสต์ชนิดอื่น

2.2.1.2 การหมักจำแนกตามวัตถุประสงค์การใช้งาน สามารถจำแนกได้หลายลักษณะ ดังนี้

1) ความต้องการใช้อากาศ แบ่งออกเป็น 2 ประเภทดังนี้

(1) การหมักที่จำเป็นที่ต้องใช้อากาศ (Aerobic Fermentation) การหมักที่จำเป็นต้องใช้อากาศหรือออกซิเจน เช่น การผลิตกรดซิตริก

(2) การหมักที่ไม่จำเป็นต้องใช้อากาศ (Anaerobic Fermentation) การหมักที่ไม่จำเป็นต้องการใช้อากาศหรือออกซิเจน เช่น หมักก๊าซชีวภาพ (Biogas) อะซีโตน (Acetone) และบิวทานอล (Butanol)

2) สภาพการควบคุมการปนเปื้อน แบ่งได้ 3 ประเภท ดังนี้

(1) การหมักในสภาวะปิด (Septic Fermentation) เป็นการหมักในสภาวะเปิดไม่ได้ควบคุมจุลินทรีย์ภายนอก ที่สามารถปนเปื้อนกับวัตถุดิบที่ใช้ในระหว่างการผลิต เนื่องจากอาศัยการปรับสภาพให้เหมาะสมเฉพาะจุลินทรีย์ธรรมชาติที่ต้องการเท่านั้น เช่น มีการเติมเกลือให้มีความเข้มข้นร้อยละประมาณ 10 – 20 หรือเติมเครื่องเทศบางชนิดที่มีผลยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่ต้องการ ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ แหนม ซีอิ๊ว และน้ำปลา

(2) การหมักในสภาวะกึ่งปิดกึ่งเปิด (Semi – Septic Fermentation) เป็นการหมักกึ่งควบคุมการปนเปื้อนจุลินทรีย์จากภายนอก ป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ภายนอก แต่ไม่จำเป็นต้องฆ่าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบที่ใช้ แต่มีการปรับสภาวะให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก ซึ่งไม่เหมาะกับจุลินทรีย์อื่นหรือยับยั้งจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ เช่น การหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล โดยกากน้ำตาลที่ใช้ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อและน้ำที่ใช้ในการเจือจางก็ได้มาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่น แม่น้ำ ทำให้จุลินทรีย์ปนเปื้อนในถังหมักอย่างมากแต่การหมักดำเนินต่อไปได้เนื่องจากมีการปรับ pH เท่ากับ 3.5 ซึ่งสภาพกรดเข้มข้นจึงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิดได้ประกอบกับการใช้เชื้อยีสต์ที่แข็งแรงและมีปริมาณสูงสุดทำให้การหมักเป็นไปได้ดี

(3) การหมักในสภาวะปิด (Aseptic Fermentation) เป็นการหมักที่จำเป็นต้องให้ปราศจากเชื้อปนเปื้อนในทุกขั้นตอนการผลิต มิฉะนั้นจะก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อขบวนการหมักจึงเหมาะกับการผลิตที่ต้องการความบริสุทธิ์สูง เช่น การผลิตยาปฏิชีวนะ

3) ปริมาณน้ำหรือของเหลวที่เติม แบ่งได้ 3 ประเภท ดังนี้

(1) การหมักแบบอาหารแข็ง (Solid State Fermentation) เป็นการหมักในอาหารแข็งแบะมีสภาวะที่ต้องการน้ำเพื่อปรับให้มีความชื้นพอเหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์เท่านั้น เช่น การหมักอาหารที่ผลิตจากถั่วเหลือง และการหมักอาหารจากธัญพืช

(2) การหมักแบบอาหารกึ่งเหลว (Semi Solid Fermentation) เป็นการหมักในสภาพที่กึ่งเหลว เช่น อาหารที่ผลิตจากนมบางชนิด

(3) การหมักแบบอาหารเหลว (Submerged State fermentation) การหมักในอาหารเหลว เช่น การผลิตแอลกอฮอล์ การผลิตกรดอะซิติก

4) ขบวนการที่ใช้ แบ่งได้ 3 ประเภท ดังนี้

(1) การหมักแบบครั้งคราว (Batch Fermentation) เป็นขบวนการหมักโดยอาศัยการเติมวัตถุดิบสารอาหารและหัวเชื้อลงไปเพียงครั้งเดียวตลอดการหมัก เช่น การหมักแอลกอฮอล์

(2) การหมักแบบกึ่งครั้งคราว (Fed Batch Fermentation) เป็นขบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารลงไปมากกว่า 1 ครั้ง โดยมีการแยกเอาผลิตภัณฑ์ออกในระหว่างการหมักเพื่อให้จุลินทรีย์สามารถใช้วัตถุและสารอาหารได้เต็มที่และผลิตภัณฑ์มากยิ่งขึ้น

(3) การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous Fermentation) เป็นขบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารเข้าไปในถังหมักตลอดเวลา ขณะเดียวกันก็แยกเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกมาตลอดเวลา เช่น การหมักแบบนี้จำเป็นต้องอาศัยสภาพปราศจากเชื้ออย่างมากหรือใช้ในการหมักตามภูมิปัญญาพื้นบ้าน เช่น ซีอิ๊ว โซยุ และเนย เป็นต้น การหมักแบบนี้ทำกันมากในประเทศจีน ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย ไทย และประเทศแถบยุโรปบางประเทศ

2.2.2 การเจริญของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

ในระบบการหมักที่มีการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบบปิด หรือแบบครั้งคราว (Batch Fermentation) มีการเติมวัตถุดิบ สารอาหาร และเชื้อจุลินทรีย์ลงไปเพียงครั้งเดียวตลอดเวลาการหมัก ซึ่งอัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะลดลงเป็นศูนย์เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อหมดลง หรือเมื่อมีการสะสมของของเสียที่เป็นพิษเกิดขึ้นหรือทั้งสองสาเหตุ ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักจะมีขั้นตอนการเจริญแตกต่างกัน สามารถแบ่งออกเป็นระยะ ๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.2.2.1 ระยะพัก (Lag Phase) ระยะนี้เริ่มตั้งแต่การถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารเลี้ยงเชื้อหนึ่งลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกชนิดหนึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ช่วงนี้เซลล์จะมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้นและสังเคราะห์โพรโตพลาสซึมใหม่ แบคทีเรียจะมีการสังเคราะห์เอนไซม์หรือโคเอนไซม์เพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม เชื้อราถ้าใส่เชื้อลงไปในรูปของสปอร์จะต้องใช้เวลาเพื่อให้สปอร์งอกเป็นใยรา ถ้าใส่เชื้อราในรูปของก้อนเส้นใย (Pellet) จะต้องใช้เวลาให้ Pellet แตกออกและแพร่ไปทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งช่วงนี้เซลล์จุลินทรีย์จะยังไม่มีการแบ่งตัวไม่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์แต่น้ำหนักของเซลล์อาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ แต่ในกรณีที่นำเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งอยู่ในช่วงการเจริญของ Lag Phase มาถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่จุลินทรีย์อาจเจริญได้ทันทีโดยไม่ต้องผ่านช่วงของ Lag Phase การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และการถ่ายเชื้อในระยะเวลาที่ถูกต้องจะช่วยให้จุลินทรีย์มีการผลิตภัณฑ์แบบปฐมภูมิและแบบทุติยภูมิได้ดี

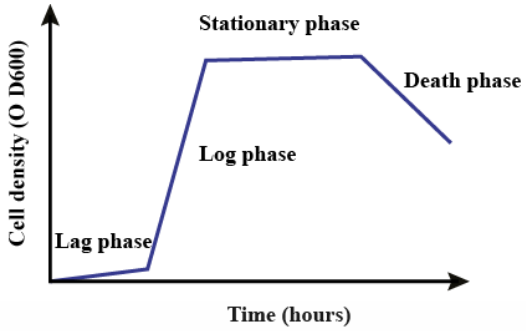
2.2.2.2 ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (Log Phase) ระยะนี้เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่เซลล์จะมีองค์ประกอบทางเคมีกระบวนการเมแทบอลิซึมและสรีรวิทยาอื่น ๆ ที่เหมือนกันเป็นระยะที่เซลล์มีประสิทธิภาพสูงสุดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของสารอาหารและสิ่งแวดล้อม เช่น

1) อุณหภูมิ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เชื้อราส่วนใหญ่ไม่เจริญและถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส ยกเว้นเชื้อราบางชนิดที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส ในขณะที่แบคทีเรียสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง -7 ถึง 90 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียแต่ละชนิด

2) ความเป็นกรด – ด่าง (pH) โดยทั่วไปไม่สามารถทนต่อ pH สูงหรือต่ำเกินไปได้ดีเท่าเชื้อรายกเว้นแบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญได้ที่ pH ต่ำ เช่น *Lactobacillus* sp., *Acetobacter* sp. และ *Thaiobacillus thaioxidans* เชื้อราส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ที่ pH ต่ำระหว่าง 1.5 – 2.0 การเพิ่มปริมาณของเซลล์จะสัมพันธ์กับค่า Specific Growth Rate (μ) และความเข้มข้นของเซลล์ (x) ที่มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร (g/L) ในขณะเดียวกันการเพิ่มจำนวนเซลล์จะสัมพันธ์กับค่า μ

2.2.2.3 ระยะคงจำนวนเซลล์ (Stationary Phase) ในช่วงถูกใช้สารอาหารไปจนหมด หรือมีการสะสมของสารพิษจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ การเจริญของจุลินทรีย์จะช้าลงหรือสิ้นสุดลงจะเข้าสู่ระยะของ Stationary Phase อัตราการเจริญจะเท่ากับศูนย์จุลินทรีย์ ยังคงมีชีวิตอยู่โดยอาศัยกระบวนการเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ในแบคทีเรียแกรมบวก และยูคาร์ริโอต (Eukaryote) หลายชนิด จะสร้างสปอร์ขึ้นในระยะนี้ เซลล์จะมีการสร้างสารหลายชนิดซึ่งมีประโยชน์ทางอุตสาหกรรม และทางเทคโนโลยีชีวภาพ

2.2.2.4 ระยะเซลล์ตาย (Death Phase) เกิดขึ้นหลังจากระยะ Stationary Phase โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะใช้เวลาต่างกันในการเข้าสู่ระยะนี้เป็นระยะที่จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มลดลงเนื่องจากการตายของเซลล์และการย่อยตัวอย่าง (Autolysis) โดยเอนไซม์ภายในเซลล์ อัตราการตายของเซลล์จุลินทรีย์จะใช้เวลาต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ เซลล์บางชนิดจะตายอย่างรวดเร็ว เช่น แบคทีเรียแกลมลบรูปกลม แต่บางชนิดจะตายช้าสามารถอยู่ได้เป็นเวลานาน ๆ ในกระบวนการผลิตอุตสาหกรรมกระบวนการหมักของจุลินทรีย์จะถูกยับยั้งเมื่อเซลล์เข้าสู่ปลายระยะ Log Phase หรือก่อนที่ระยะ Death Phase จะเริ่มขึ้น




**รูปที่ 2.3** กราฟแสดงช่วงการเจริญของจุลินทรีย์
**ที่มา :** [12]

2.2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก

กระบวนการหมักมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ดังต่อไปนี้

2.2.3.1 วัตถุดิบ การเลือกพิจารณาเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ไปการหมักจะพิจารณา ดังนี้

1) ราคาวัตถุดิบ เป็นสิ่งที่ต้องพิจารณาลำดับต้น ๆ แต่ในระดับห้องปฏิบัติการก็อาจใช้วัตถุดิบที่มีราคาสูงได้ โดยวัตถุดิบที่นำมาเป็นสารตั้งต้นในการหมัก ได้แก่ กากน้ำตาล (Cane Molasses) กากน้ำจากหัวบีท (Beet Molasses) เมล็ดธัญพืช กลูโคส ซูโครส และแล็กโทส ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon Sources) ส่วนแหล่งไนโตรเจน (Nitrogen Sources) ได้จาก เกลือแอมโมเนีย ยูเรีย ไนเทรต น้ำแช่ข้าวโพด (Con Steep Liquor) กากถั่วเหลือง (Soya Bean Meal) โดยวัตถุดิบดังกล่าวมีราคาไม่สูงจึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่นิยมใช้

2) มาตรฐานของวัตถุดิบ ควรมีความสม่ำเสมอเพราะเป็นส่วนสำคัญมากในการให้ผลผลิตที่มีคุณภาพ โดยต้องตรวจสอบอย่างดีตั้งแต่ในขั้นตอนการวิจัย ขั้นตอนการพัฒนา และขั้นตอนการผลิตในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ นอกจากนี้ควรคำนึงถึงความปลอดเชื้อของวัตถุดิบและสิ่งต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการทำวัตถุดิบ โดยวิธีการปลอดเชื้อต้องใช้สารที่ทำให้ส่วนประกอบของอาหารเสียน้อยที่สุด

3) ปริมาณของวัตถุดิบ ควรมีปริมาณมากสม่ำเสมอตลอดปี

4) ความสะดวกในการเก็บรักษา เป็นปัจจัยที่ต้องควบคุมสภาวะให้ไม่มีผลต่อคุณภาพของวัตถุดิบตั้งแต่ขั้นตอนการขนส่ง และถ้าเป็นวัตถุดิบที่ไม่สามารถผลิตได้ตลอดทั้งปีต้องสามารถเก็บรักษาได้รับการรักษาได้ง่าย สะดวก และเสียค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาต่ำหรือไม่เสียหาย

2.2.3.2 เชื้อจุลินทรีย์หรือหัวเชื้อ ในรูปแบบการหมักแบบดั้งเดิมจะมีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ลงไปในวัตถุดิบซึ่งจะมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่มากเพียงพอในวัตถุดิบอยู่แล้ว เช่น การทำปลาส้ม การทำไวน์องุ่น แต่ในปัจจุบันมีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในรูปของหัวเชื้อหรือกล้าเชื้อ โดยเริ่มต้นจากการนำจุลินทรีย์ที่ได้รับการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์ที่ดีนำมาผลิตเป็นกล้าเชื้อในปริมาณมาก ๆ คุณสมบัติที่ดีโดยทั่วไปของจุลินทรีย์ที่จะนำมาผลิตเป็นกล้าเชื้อ ดังนี้

1) เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงมากในการหมัก หมายถึงมีความสามารถให้ผลิตภัณฑ์ได้ในปริมาณมาก หรือทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ได้รวดเร็วกว่าสายพันธุ์อื่น

2) ทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่น รส และเนื้อสัมผัสเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

3) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ปนเปื้อนและเชื้อโรคได้ดี

4) สามารถเจริญเติบโตและดำเนินกิจกรรมการหมักได้ดีในช่วงอุณหภูมิกว้าง

5) สามารถเจริญเติบโตและดำเนินกิจกรรมการหมักการหมักได้ดีในช่วง pH กว้าง ซึ่งเป็นประโยชน์การหมักในระดับ pH สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้

6) ทนต่อการเข้าทำลายของฝาจก์ (Phage) ซึ่งการแก้ปัญหาเรื่องนี้ บางครั้งจำเป็นต้องคัดเลือกจุลินทรีย์นั้น ๆ ไว้มากกว่าหนึ่งสายพันธุ์และนำไปใช้ในรูปแบบของเชื้อผสม เนื่องจากฝาจก์แต่ละชนิดมีความเฉพาะเจาะจงต่อการเข้าทำลายจุลินทรีย์

7) เป็นสายพันธุ์ที่มีความถาวรของพันธุ์กรรม ดังนั้นในขั้นตอนการผลิตกล้าเชื้อ จำเป็นต้องตรวจสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์อย่างสม่ำเสมอ

8) ก่อนที่จะนำจุลินทรีย์ สายพันธุ์ใดมาใช้ประโยชน์ก็ตาม ควรตรวจสอบให้แน่ใจว่าสายพันธุ์ นั้นไม่ก่อให้เกิดโรคและไม่สร้างสารพิษ

9) เป็นสายพันธุ์ที่มีอายุการอยู่รอดยาวนาน (Longevity) หรือมีโครงสร้างที่ทดต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี

2.2.3.3 สารอาหาร จำเป็นต้องใช้สารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีต้องมีธาตุอาหารที่เหมาะสม มีความเข้มข้นพอเหมาะ มีความเป็นกรดเบสที่พอเหมาะ ปราศจากสารพิษและจุลินทรีย์ปนเปื้อน และราคาถูกโดยสารอาหารเหล่านี้ต้องมีแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน วิตามิน และสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตต่าง ๆ

2.2.3.4 น้ำ มีบทบาทที่สำคัญในการหมัก เช่น ใช้ความร้อน (Heating) การทำความเย็น (Cooling) การทำความสะอาด (Cleaning) นอกจากนี้น้ำที่นำมาใช้ผลิตยังมีบทบาทต่อคุณภาพ

ของผลิตภัณฑ์ เช่น ปริมาณของแร่น้ำเป็นแหล่งที่สำคัญในการผลิตเบียร์ โดยเฉพาะในขั้นตอนการผสม (Mashing) ซึ่งพบว่าน้ำกระด้างที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมซัลเฟล ($CaSO_4$) สูงจะมีผลต่อการผลิตเบียร์ขม ในขณะที่น้ำที่มีคาร์บอเนตสูงจะมีผลต่อการผลิตเบียร์ดำ

2.2.3.5 การปลอดเชื้อ (Sterilization) เป็นสิ่งที่มีความจำเป็น และสำคัญอย่างยิ่งขั้นตอนต่าง ๆ ของกระบวนการหมัก เช่น การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ การเตรียมวัตถุดิบ และการป้องกันการปนเปื้อนในระหว่างการหมัก ถึงแม้ว่าการหมักเป็นแบบไม่ปลอดเชื้อ แบบกึ่งปลอดเชื้อ และแบบปลอดเชื้อ ซึ่งในกระบวนการต่าง ๆ เหล่านี้ต้องคำนึงปริมาณของหัวเชื้อที่มีปริมาณมากเพียงพอ ความสะอาดและการควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทั้งการหมักในห้องปฏิบัติและโรงงานอุตสาหกรรม

2.2.3.6 การให้อากาศ และการกวน

1) การให้อากาศ มีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ ดังนั้นการเลือกใช้ระบบการให้อากาศในถังหมักแต่ละชนิดจะขึ้นกับลักษณะเฉพาะของกระบวนการหมัก ในกระบวนการหมักที่ใช้ของเหลวความหนืดต่ำ และมีปริมาณของแข็งทั้งหมดน้อยจะใช้ระบบให้อากาศเป็นฟองเล็ก ๆ (Fine Bubble Aerator) โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องกวนซึ่งมีข้อดีคือใช้อุปกรณ์น้อยกว่าและประหยัดพลังงาน โดยปกตินิยมใช้กับถังหมักที่มีอัตราส่วนความสูงต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง (H/D ratio) 5:1 เพราะการให้อากาศเพียงอย่างเดียวก็ทำให้เกิดแรงหมุนวนของน้ำมากพอที่จะเกิดการกวนผสมได้ แต่ในถังหมักที่มีลักษณะเป็นคอลัมน์ทรงสูงต้องใช้พลังงานสูงมากในการอัดอากาศจึงไม่นิยมใช้ระบบให้อากาศโดยไม่มีเครื่องกวน นอกจากนี้ในกระบวนการหมักที่ใช้เชื้อราและแอคติโนมัยสีท (Actinomyces) ซึ่งมีการเจริญเป็นเส้นใยจำเป็นต้องใช้เครื่องกวนช่วยเพราะเส้นใยจะทำให้อาหารมีความหนืดสูง

2) การกวน มีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์และสารอาหารภายในถังหมักกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ เครื่องกวน (Stirrer) ประกอบด้วยใบพัด (Impeller or Agitator) ที่ติดอยู่บนแกนหมุนกลางถังและมีมอเตอร์หมุนใบพัดซึ่งใช้พลังงานไฟฟ้า โดยใบพัดมีหน้าที่หลัก 2 ประการ คือ ลดขนาดของฟองอากาศทำให้พื้นผิวในการส่งออกซิเจนเพิ่มขึ้นและลดระยะทางในการแพร่ลง และรักษาสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ในถังให้มีความสม่ำเสมอ

2.2.3.7 การขยายขนาดหมัก (Scale Up) กระบวนการหมักที่ผ่านการพัฒนาในห้องปฏิบัติการ และได้ประสบความสำเร็จในทางการค้ามีการขยายกระบวนการหมักเป็นระยะ ๆ

จากขั้นตอนระดับโรงงานต้นแบบจนถึงระดับอุตสาหกรรม การขยายการหมักต้องเหมาะสมและยังสามารถดัดแปลงเอาถังหมักทดลองเลี้ยงมาใช้เป็นถังหมักอุตสาหกรรมได้โดยตรง

## 2.3 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมัก [13]

จุลินทรีย์สำคัญที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตอาหารหมักโดยทั่วไปมี 3 ประเภท ได้แก่ แบคทีเรีย (Bacteria) เชื้อรา (Mold) และ ยีสต์ (Yeast) การใช้จุลินทรีย์ในการผลิตอาหารหมักบางชนิดเกิดขึ้นโดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ชนิดเดียว และบางชนิดที่ต้องอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์หลายชนิด เป็นต้น ส่วนผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการทำงานของจุลินทรีย์หลายชนิดร่วมกัน เช่น ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว สาเก เป็นต้น โดยแบคทีเรียมีความสำคัญในการผลิตอาหารคือ แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก และแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติก ยีสต์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้ในการผลิตอาหารประเภทขนมปังและเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทต่าง ๆ [2] ดังแสดงในตารางที่ 2.4

**ตารางที่ 2.4** จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทต่าง ๆ

| จุลินทรีย์ | ประเภทจุลินทรีย์ | ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก |
|---|---|---|
| *Lactobacillus casei* | แบคทีเรีย | เนยแข็ง และผลิตภัณฑ์นมหมัก |
| *Lactobacillus sakei* | แบคทีเรีย | ไส้กรอก ผักและผลไม้ดอง |
| *Lactobacillus plantaram* | แบคทีเรีย | ไส้กรอก |
| *Leuconosto clactis* | แบคทีเรีย | เนยแข็ง และผลิตภัณฑ์นมหมัก ผักและผลไม้ดอง เนยแข็ง |
| *Leuconosto mesenteroides* | แบคทีเรีย | ผลิตภัณฑ์นมหมัก |
| *Oenococcus oeni* | แบคทีเรีย | ไวน์ |
| *Pediococcus acidilactici* | แบคทีเรีย | ไส้กรอก ผักและผลไม้ดอง |
| *Pediococcus halophilus* | แบคทีเรีย | ซีอิ๊ว |
| *Pediococcus pentosaceus* | แบคทีเรีย | ไส้กรอก |
| *Aspergillus oryzae* | เชื้อรา | มิโสะ ซีอิ๊ว |
| *Penicillium camemberti* | เชื้อรา | ไส้กรอก |
| *Rhizopus microsporus* | เชื้อรา | เทมเป้ |
| *Actinomucor elegans* | เชื้อรา | เต้าหู้ยี้ |

**ตารางที่ 2.4** จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทต่าง ๆ (ต่อ)

| จุลินทรีย์ | ประเภทจุลินทรีย์ | ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก |
|---|---|---|
| *Monascus purpureus* | เชื้อรา | ข้าวแดงหรืออักคัก |
| *Saccharomyces cerevisiae* | ยีสต์ | ขนมปัง Ale Beer ไวน์ |
| *Saccharomyces pastorianus* | ยีสต์ | Lager Beer |

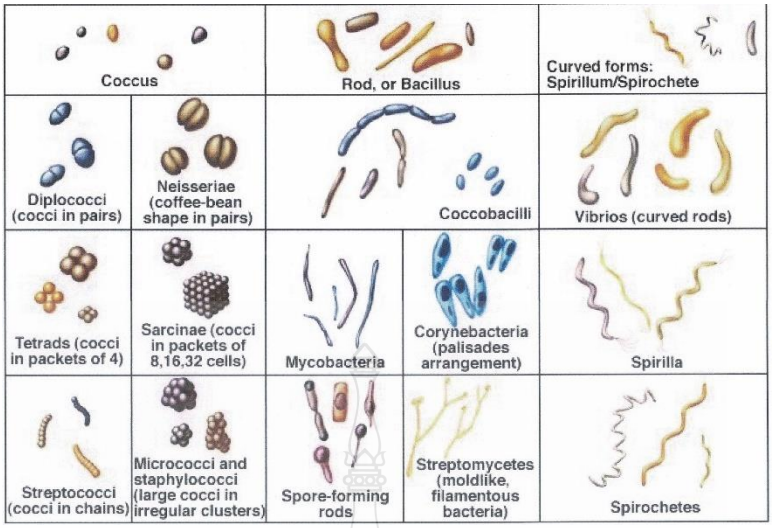
**ที่มา** : [2]

2.3.1 แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรียถือเป็นจุลินทรีย์มีความสำคัญต่อการศึกษาทางจุลชีววิทยามากที่สุดกลุ่มหนึ่ง เพราะเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ แบคทีเรียมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ทั้งที่เป็นโทษและมีประโยชน์ แบคทีเรียหลายชนิดเป็นเชื้อก่อโรค สามารถก่อให้เกิดภาวะติดเชื้อรุนแรงในมนุษย์หรือสัตว์ ในขณะที่แบคทีเรียอีกหลายชนิดมีสมบัติที่เป็นประโยชน์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ จึงมีความสำคัญ

2.3.1.1 สัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์เซลล์เดียว มีขนาดเล็กมาก มีรูปร่างหลายแบบ รูปท่อน (Rods) รูปกลม (Cocci) แท่งกลมปลายมน (Rounded End) แท่งกลมสั้นคล้ายไข่ (Coccoid) แท่งไม่ตรง (Irregular Rod) รูปทรงกระบอกขนาดหัวท้ายไม่เท่ากัน (Club Shaped) รูปแท่งยาวปลายเรียวคล้ายกระสวย (Fusiform) แท่งโค้ง (Curved Rod) เกลียวสว่าน (Spirochete) และเกลียว (Spiral) มีขนาดแตกต่างกัน ตั้งแต่เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.15 – 2.0 ไมครอน มีความยาว 2 – 10 ไมครอน

2.3.1.2 การจัดเรียงตัว เซลล์ของแบคทีเรียมีการเรียงตัวที่แตกต่างกัน เซลล์ที่รูปร่างกลมมีการเรียงตัวได้หลายแบบ เช่น ลองเซลล์เรียงต่อกัน เรียกว่า ดิโพลค็อกไค (Diplococci) สี่เซลล์เรียงกัน เรียกว่า เทเทรด (Tetrad) แปดเซลล์เรียงกันเป็นลูกบาศก์ เรียกว่า ซาลินา (Sacina) หลายเซลล์เรียงเป็นกลุ่มคล้ายพ่วงองุ่น เรียกว่า สแตปฟิโลค็อกไค (Staphylococci) หลายเซลล์เรียงต่อกันเป็นสายยาว เรียกว่า สเตรปโตคอคคัส (Streptococci) ดังแสดงในรูป 2.4




**รูปที่ 2.4** การจัดเรียงตัวของแบคทีเรีย

**ที่มา** : [14]

2.3.1.3 กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอาหารหมัก [2] เชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารหมักส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram Positive) ไม่เคลื่อนที่ (Non - Motile) ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส (Catalase Negative) ไม่สร้างสปอร์ (Non - Forming) ลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่ามีทั้งรูปร่างแท่งและกลม ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติก โดยแลคติกแบคทีเรียมีหลายสกุลโดยมีจำนวน 7 สกุล ที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ได้แก่

1) *Lactococcus* แบ่งได้เป็น 5 ชนิด (Species) ตามความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรม คือ *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garviae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus splantarum* และ *Lactococcus raffinolactis* เป็นแบคทีเรียที่ไม่เคลื่อนที่และมีการหมักเป็นแบบให้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ (Homofermentative) เป็นแฟคัลเททีฟ แอนแอโรบ (Facultative Anaerobe) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 30 องศาเซลเซียส และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีรูปแบบกลม (Cocci) ที่ต่อกันเป็นสายสั้น ๆ หรือเป็นคู่

2) *Streptococcus* มีหลายชนิดอาศัยอยู่ในหลาย ๆ แหล่ง บางชนิดก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ *Streptococcus thermophilus* มีกระบวนการหมักแบบ Homofermentative

และเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีอากาศ (Facultative Anaerobe) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 40 – 42 องศาเซลเซียส สามารถทนอุณหภูมิสูงได้มากกว่า 60 องศาเซลเซียส

3) *Leuconostoc* เป็นแบคทีเรียในวงศ์ *Leuconostocaceae* เจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 18 – 25 องศาเซลเซียส บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส มีรูปร่างกลมหรือมีลักษณะคล้ายรูปแบบแท่ง (Rod – Like) การจัดเรียงตัวมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์อยู่เป็นสายหรือโซ่ขนาดสั้นถึงปานกลาง ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์ Catalase Negative ไม่เคลื่อนที่และสร้างสปอร์ เชื้อสามารถผลิตกรดแลคติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์

4) *Oenococcus* สกุลนี้มีเพียงชนิดเดียวคือ *Oenococcus oeni* อยู่ในสายของ Leuconostocaceae เป็น Homofermentative และชอบการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิปานกลาง สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH ต่ำกว่า 5.0 เป็นแลคติกแบคทีเรียที่ทนต่อแอลกอฮอล์ได้ถึงร้อยละ 10 ใช้ประโยชน์ในการทำไวน์โดยสามารถขจัดกรดในไวน์ ผ่านกระบวนการหมักมาโลแลคติก (Malolactic Fermentation) ซึ่งกรดมาลิก (Malic Acid) จะถูกปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลต (Decarboxylated) ไปเป็นกรดแลคติก

5) *Pediococcus* เป็นแบคทีเรียที่มีเซลล์รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36 – 1.43 ไมโครเมตร แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทาง บนระนาบเดียวกันทำให้เกิดลักษณะเซลล์ 4 เซลล์ติดกัน (Tetrad Formation) เป็นแบคทีเรียที่มีวิธีการหมักแบบฮอโมเฟอร์เมนทีฟ (Obligate Homofermentative) เจริญได้ทั้งสองแบบ (Facultative Anaerobe) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 25 – 40 องศาเซลเซียส สามารถทนต่อสภาพที่มีกรดสูง (pH 4.2) ทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีเกลือสูง (โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5)

6) *Tetragenococcus* เป็นแบคทีเรียประเภท Homofermentative มีการเรียงตัวของเซลล์แบบเกาะกัน 4 เซลล์ และเป็นพวก Facultative Anaerobe แบคทีเรียสกุลนี้มีเพียง 3 ชนิด คือ *Tetragenococcus halophilus*, *Tetragenococcus muriaticus* และ *Tetragenococcus solitarius*

7) *Lactobacillus* แบคทีเรียในสกุลนี้มีมากกว่า 80 ชนิด ลักษณะโดยทั่วไปเป็นแบคทีเรียรูปท่อนไม่สร้างสปอร์ (Non-Sporingrods) แบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacillus มีการแบ่งย่อยได้เป็น 2กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Obligate Homofermentative เช่น *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* และ *Lactobacillus helveticus*

และแบคทีเรียกลุ่ม Facultative Homofermentative ได้แก่ เชื้อ *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei* และ *Latilactobacillus sakei*

2.3.2 เชื้อรา (Molds)

ราเมื่อเจริญเติบโตในอาหารจะมีลักษณะคล้ายปุยฝ้าย บางชนิดมีสี ทำให้อาหารมีลักษณะไม่น่ารับประทาน รามีทั้งชนิดที่ทำให้อาหารเกิดการเสื่อมเสีย และมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ใช้ทำซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว ราที่ใช้เป็นอาหารโดยตรวจ คือ เห็ดชนิดต่าง ๆ หรือนำราไปใช้ในการผลิตอาหาร เช่น เอนไซม์อะไมเลสใช้ในการผลิตขนมปัง การใช้กรดซิตริก ในการผลิตเครื่องดื่ม แต่ราบางชนิดสร้างสารพิษขณะเจริญเติบโตในอาหาร อาทิ การสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) ของ *Aspergilus flavus* พบในถั่วชนิดต่าง ๆ และเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวโพด

2.3.2.1 ลักษณะรูปร่างของรา โดยโครงสร้างราที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า และเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์จัดจำแนกชนิดของรา ไฮฟีและไมซีเลียม (Hyphase and Mycelium) ราประกอบด้วย เส้นใยแตกแขนงเป็นเส้นสาย แทรกอยู่ในอาหาร หรือขึ้นชูไปในอากาศ เรียกว่า (Hyphae) กลุ่มของไฮฟีทั้งหมด เรียกว่าเส้นใยหรือไมซีเลียม (Mycelium) ไฮฟี แบ่งได้ 2 ชนิด ตามหน้าที่การทำงาน คือ

1) Vegetative Hyphae ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตบนอาหาร

2) Fertile Hyphae ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสืบพันธุ์ จะเจริญเติบโตชูขึ้นไปในอากาศ มีเพียงส่วนน้อยที่แทรกอยู่ในอาหาร การศึกษาไฮฟีของราด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นประโยชน์อย่างมากในการจัดจำแนก แยกสกุลรา โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

(1) Septate Hyphae ไฮฟีจะมีผนังกั้นตามขวางทำให้เห็นเป็นเซลล์แต่ละเซลล์

(2) Non-Septeta Hyphae ไฮฟีจะมีลักษณะเป็นท่อยาวไม่มีผนังกั้นตามขวาง มีนิวเคลียสหลายอัน กระจายตามแผนยาวของเส้นไฮฟี

2.3.2.2 โครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ ราเจริญเติบโตได้จากชิ้นส่วนของไมซีเลียมที่ขาดออกไปได้ ซึ่งโอกาสจะเกิดน้อยมากเมื่อเทียบกับการเจริญเติบโตจากสปอร์ชนิดไม่ใช้เพศ (Asexual Spores) และสปอร์ชนิดใช้เพศ (Sexual Spores) ดังแสดงในรูปที่ 2.5 ราแบ่งได้ 2 พวก คือ

1) ราชนิดที่สมบูรณ์ (Perfect Fungi) เป็นราที่มีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศได้สปอร์ชนิดใช้เพศ ไฮฟีไม่มีผนังกั้น ได้แก่ Oomycetes หรือ Zygomycetes พวกไฮฟีที่มีผนังกั้น คือ

Ascomycetes หรือ Basidiomycetes การจัดจำแนกชนิดของราที่สร้างสปอร์แบบใช้เพศ จัดจำแนกตามลักษณะการเกิด และชนิดของสปอร์ที่สร้างขึ้น แบ่งได้ 4 พวก คือ

(1) โอไอไมซิทิส (Oomycetes) เป็นพวก Non-Septate สร้างโอไมสปอร์ เป็นราที่พบอยู่ในน้ำไม่ค่อยพบเจริญเติบโตในอาหารต่าง ๆ

(2) ไซโกโมซิทิส (Zygomycetes) เป็นพวก Non-Septate สร้างไซโกสปอร์ (Zygospores) ทั้งโอโอสปอร์ และไซโกสปอร์ มีผนังหุ้มรอบ ๆ ทำให้มีความทนทานต่อความแห้งได้เป็นเวลานาน ๆ

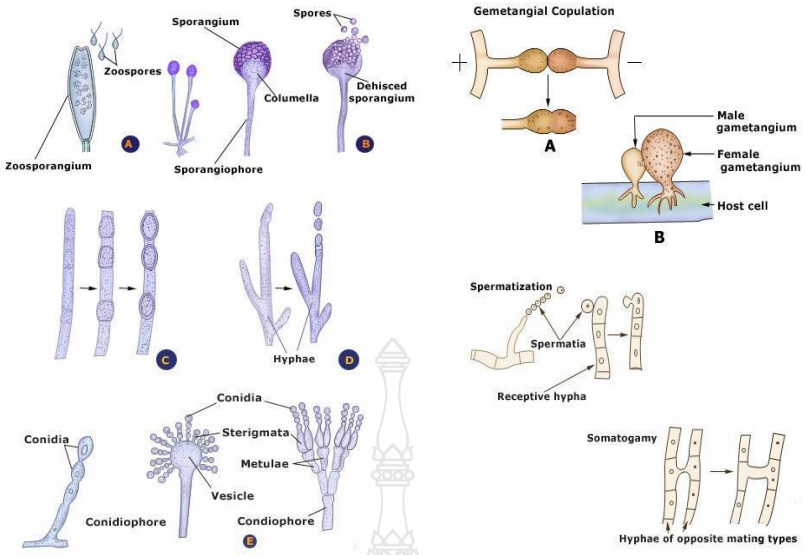
(3) แอสโคไมซิส (Ascomycetes) เป็นพวก Septate สร้างแอสโคสปอร์

(4) เบสิดิโอไมซิทิส (Basidiomycetes) เป็นพวกที่ประกอบด้วยเห็นต่าง ๆ รสสนิมเหล็ก (Rusts) สมัต (Smuts) และอื่น ๆ

2) ราชนิดไม่สมบูรณ์ (Imperfect Fungi) มีการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศอย่างเดียว ได้แก่ Fungi Imperfecti มีสปอร์ชนิดไม่ใช้เพศ ซึ่งมีขนาดเล็ก เบา ทมต่อความแห้งแล้งได้ดี มีตำนวนมาก แพร่กระจายในอากาศ เจริญเติบโตเป็นไมซีเลียม เมื่อไปตกในอาหารที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะงอกเจริญเติบโตต่อไป แบ่งออกเป็น 4 ชนิด คือ โคนิเดียม (Conidia) อาร์โทรสปอร์ (Arthrospores) หรือ ออยเดีย (Oidia) สปอร์แรงจิโอสปอร์ (Sporangiospore) และคลาไมโดสปอร์ (Chlamydospore)

โคนีเดียจะแยกหรือแตกต่างหน่อหลุดออกไปจากเฟอร์ไทล์ไฮฟีพิเศษเรียกว่า โคนิดิโอเฟอร์ (Conidiophores) โคนิเดียจะไม่มีโครงสร้างหุ้ม แตกต่างจากสปอร์แรงจิโอสปอร์ซึ่งจะอยู่ในสปอร์แรงเจียม (Sporangium) หรือในถุงที่อยู่ปลายสุดของเฟอร์ไทล์ไฮฟาที่เรียกว่าสปอร์แรงจิโอเฟอร์ (Sporangiophore)

ลักษณะรูปร่างของสปอร์ชนิดไม่ใช้เพศจะช่วยในการวิเคราะห์จัดจำแนกแยกราออกเป็นสกุล ชนิดต่าง ๆ สปอร์แรงจิโอฟอร์มีความแตกต่างกันในด้านขนาด รูปร่าง สี ผิว และจำนวนเซลล์ในหนึ่งโคนิเดีย




(ก) (ข)

**รูปที่ 2.5** (ก) สปอร์สืบพันธุ์ของราแบบไม่อาศัยเพศ และ (ข) สปอร์สืบพันธุ์ของราแบบอาศัยเพศ
**ที่มา** : [15]

2.3.2.3 กลุ่มเชื้อราที่มีความสำคัญในอาหารหมัก ซึ่งเชื้อราที่นิยมใช้ในการผลิตอาหารหมัก ได้แก่สกุล *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Rhizopus* โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) *Aspergillus* เป็นเชื้อราที่เส้นใยผนังตามขวาง ส่วนใหญ่ไม่มีสี มีฟุตเซลล์ (Foot cell) ตั้งตรงตามฐานของเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ เรียกว่า คอนิดิโอฟอร์ ตรงปลายคอนิดิโอฟอร์ขยายใหญ่ เรียกว่า เวสิเคิล (Vesicel) มีโคนิดิโอเฟอร์ (Conidiophores) ที่มีขนาดเล็กเรียงต่อกันเป็นสายยาวมักมีสีเขียว สีน้ำตาลและสีดำ บทบาทของเชื้อที่มีต่อการการหมักอาหาร เช่น เชื้อ *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus sojae* ที่นำมาใช้ในการผลิตโคจิ (Koji) ซีอิ๊ว สาเก เต้าเจียว และสามารถนำมาผลิตเอนไซม์หลายชนิดที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารตลอดจนการนำเชื้อรามาใช้ผลิตกรดซิตริกที่เจริญเติบโตบนส่วนผสมของข้าวสาลีและถั่วเหลือง

2) *Penicillium* เป็นเชื้อราที่เส้นใยผนังตามขวางและเกาะกันแน่น มีสปอร์ที่เรียกว่าคอนิเดีย (Conidia) ที่สร้างปริเวณปลาย Conidiophores เชื้อรา *Penicillium* ถูกนำไปใช้ในอาหารหมักหลายชนิด เช่น เชื้อรา *Penicillium roqueforti* ที่ทำให้ชีส มีลักษณะสี รสชาติ และกลิ่นสีเฉพาะผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อที่ใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลิน (Penicillin)

3) *Rhizopus* เป็นเชื้อราที่เส้นใยไม่มีผนังกั้นตามขวาง มีสปอร์แรงจิโอฟอร์ชูตรง โคโลนีของเชื้อรา *Rhizopus* มีลักษณะฟูและเติบโตลามแผ่ได้อย่างรวดเร็ว บทบาทของเชื้อที่มีต่อการหมักอาหาร เช่น *Rhizopus oligosporus* ในการหมักถั่วเหลืองให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า เทมเป้ ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของประเทศอินโดนีเซียและประเทศอื่น ๆ ในภูมิภาคอาเซียน เป็นต้น

2.3.3 ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์เป็นฟังไจ (Fungi) รูปร่างเซลล์เดี่ยว มีหลายแบบ สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ มีทั้งที่เป็นประโยชน์และโทษ นิยมใช้ยีสต์ในการผลิตอาหาร เช่น ขนมปัง เบียร์ ไวน์ เนยแข็ง น้ำส้มสายชู และยีสต์ที่ทำให้กะหล่ำปลี น้ำตาล ไซรัป น้ำผึ้ง เยลลี่ น้ำผลไม้ เนื้อ เบียร์ และไวน์ เกิดการเน่าเสียได้

2.3.3.1 ลักษณะทั่วไปของยีสต์ สามารถจำแนกออกตามคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติในการเจริญเติบโต และคุณสมบัติทางสรีรวิทยาได้ดังนี้

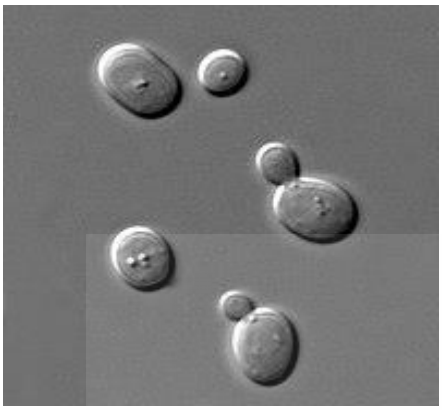
1) ขนาดและรูปร่าง รูปร่างกลม รี คล้ายผลมะนาว ทรงกระบอก ลูกแพร์ สามเหลี่ยม เรียงกันเป็นสาย ขนาดเล็ก กลาง จนถึงขนาดใหญ่ มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 ไมครอน โครงสร้างที่มองเห็นได้ เช่น ผนังเซลล์ (Cell Wall) ไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) แวคิวโอล (Vacuole) และแกรนูล (Granules) ดังแสดงในรูปที่ 2.6

2) การสืบพันธุ์ ยีสต์ส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ (Budding) ยีสต์บางชนิดสืบพันธุ์โดยวิธีฟิสชัน (Fission) คือ การแบ่งตัว เช่น *Schizosaccharomyces* spp. การสืบพันธุ์แบบใช้เพศของยีสต์แท้ (True Yeast) จะมีการสร้างแอสโคสปอร์ (Ascospore) ส่วนยีสต์เทียม (False Yeast) จะสร้างคลาไมโดสปอร์ (Chlamydospore)

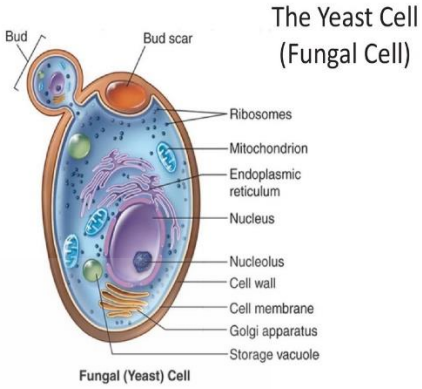
2.3.3.2 ลักษณะการเจริญเติบโตของยีสต์ จะเจริญเติบโตอยู่เฉพาะผิวหน้าของอาหารเหลว เรียกว่า ฟิล์มยีสต์ จัดเป็นพวกออกซิเดทีฟยีสต์ (Oxidative Yeast) ถ้าเจริญเติบโตทุกส่วนของอาหารเหลวจะเป็นพวกเฟอร์เมนเททีฟยีสต์ (Fermentative Yeast) ยีสต์ส่วนใหญ่จะมีโคโลนีครีม น้ำตาล หรือเทา ยีสต์บางชนิดมีสีเหลือง ชมพู แดง หรือเขียว

2.3.3.3 ลักษณะทางสรีรวิทยา สามารถจำแนกยีสต์ได้เป็น 2 พวก ตามความต้องการความชื้นของยีสต์ คือ

1) ยีสต์ทั่วไป ต้องการความชื้นสูง เจริญเติบโตในอาหารที่มีค่า $a_w$ 0.88 – 0.94 เช่น ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์ ต้องการ $a_w$ 0.94 ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตนมข้นหวานต้องการ $a_w$ 0.90 ยีสต์ที่ใช้ในการทำขนมอบต้องการ $a_w$ 0.91



(ก)




(ข)

**รูปที่ 2.6** (ก) ลักษณะของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และ (ข) ลักษณะภายในของเซลล์ยีสต์
**ที่มา** : [16], [17]

2) ออสโมฟิลิกยีสต์ (Osmophilic Yeast) เจริญเติบโตอย่างช้า ๆ ในน้ำเชื่อม เจริญเติบโตอาหารที่มีค่า $a_w$ 0.62 – 0.65 ค่า $a_w$ ที่ยีสต์เจริญเติบโตอาจเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม เช่น pH ชนิดอาหาร อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน และสารยับยั้งการเจริญเติบโต ยีสต์เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25 – 35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญเติบโตได้ 35 – 47 องศาเซลเซียส เจริญเติบโตได้ดีที่ pH 4.0 – 4.5 เจริญเติบโตไม่ดีในอาหารที่เป็นด่าง เจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจน ส่วนพวกเฟอร์เมนเททีฟ (Fermentative) จะเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานที่ดีที่สุดของยีสต์ โดยยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้ขนมปังขึ้นฟู และนุ่ม สำหรับยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเบียร์ ไวน์ จะทำให้กลิ่นรสดีขึ้น

2.3.3.4 กลุ่มยีสต์ที่มีความสำคัญในอาหารหมัก บทบาทของยีสต์ต่ออาหารหมักที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม เช่น ไวน์ เบียร์ ไซเดอร์ (Cider) สุรากลั่น ขนมปัง เป็นต้น ซึ่งยีสต์ที่ใช้ผลิตแอลกอฮอล์ เรียกว่า Brewer’s yeast ส่วนชนิดของยีสต์ที่ผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซค์ เรียกว่า Baker’s yeast ซึ่งสายพันธุ์ยีสต์ที่มีความสำคัญในอาหารหมักประกอบด้วย *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* และ *Schizosaccharomyces* [2] โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) *Saccharomyces* มีลักษณะเซลล์รูปทรงกลม ทรงรี ทรงกระกอบ หรือยาว สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดนการแตกหน่อรอบเซลล์ สร้างแอสโคสปอร์รูปกลมหรือรูปไข่ ส่วนใหญ่ผนังสปอร์เป็นแบบเรียบ โดยปกติมีจำนว 1 – 4 สปอร์แอสคัส ทุกชนิดหมักรวดเร็ว *Saccharomyces* สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส และสารอื่น ๆ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรตจากพืช เช่น ซูโครส มอลโตส และราฟฟิโนส ยีสต์สายพันธุ์นี้ยังแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามลักษณะการหมัก คือ

(1) ยีสต์ลอย (Top Yeast) เป็นเฟอร์เมนเทอร์ (Fermenter) ที่เจริญได้ดีมากและเจริญได้รวดเร็วที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์ และปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซค์ออกมาอย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์ลอยขึ้นไปอยู่บนผิวหน้าของน้ำหมัก เป็นยีสต์ที่หมักแอลกอฮอล์ได้ดี

(2) ยีสต์จม (Bottom Yeast) เป็นพวกที่มีกิจกรรมการหมักที่อุณหภูมิต่ำ อยู่ในช่วง 10 – 15 องศาเซลเซียส ไม่มีการรวมกลุ่มของเซลล์ และการเจริญเป็นไปอย่างช้า ๆ ทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซค์น้อย เซลล์จึงค่อย ๆ ตกตะกอนที่ก้นภาชนะ

2) *Kluyveromyces* เป็นยีสต์ที่มีการสืบพันธุ์ 2 แบบ คือ ไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อและอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ รูปร่างคล้ายหมวกรูปดาวเสาร์ (Hat Shape) ตัวอย่างเชื้อที่มีในอาหารหมัก เช่นเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมให้เป็นน้ำตาลกาแลกโตส และโยเกิร์ต หรือนมหมักอื่น ๆ เช่น Viil, Koumiss และ Kifir เป็นต้น

3) *Schizosaccharomyces* เป็นเชื้อที่แตกต่างจากยีสต์ชนิดอื่น ๆ ตรงที่ไม่มีการแตกหน่อ แต่มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวน (Fission) บางชนิดสร้างไมซีเลียมและแตกหักเป็นอาร์โทสปอร์ สร้างแอสโคสปอร์ที่มีลักษณะเป็นรูปกลม รูปไข่ และรูปไต ตัวอย่างของเชื้อที่มีต่ออาหารหมัก เช่น *Schizosaccharomyces pombe* และ *Schizosaccharomyces japonicas* ใช้ในการผลิตอาหารหมักพื้นเมืองหลายชนิด เป็นต้น

## 2.4 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

ในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ที่ดีเพื่อผลิตภัณฑ์คุณภาพสูงตามต้องการ นอกเหนือจากต้องใช้วัตถุดิบที่ดีแล้ว การเลือกสายพันธุ์ยีสต์และการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ให้เหมาะสมเพื่อใช้ในกระบวนการหมัก นับว่าเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างหนึ่ง โดยก่อนเตรียมกล้าเชื้อยีสต์จำเป็นต้องคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมเพื่อใช้ในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ที่ต้องการ จากนั้นต้องทราบขั้นตอนหรือวิธีการที่ถูกต้องในการเตรียมกล้าเชื้อเพื่อให้ยีสต์แข็งแรงและมีจำนวนเพียงพอแก่ปริมาณวัตถุดิบต่าง ๆ ในการหมัก ซึ่งต้องอาศัยความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกราฟการเจริญ (Growth Curve) ของยีสต์ด้วย

2.4.1 ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

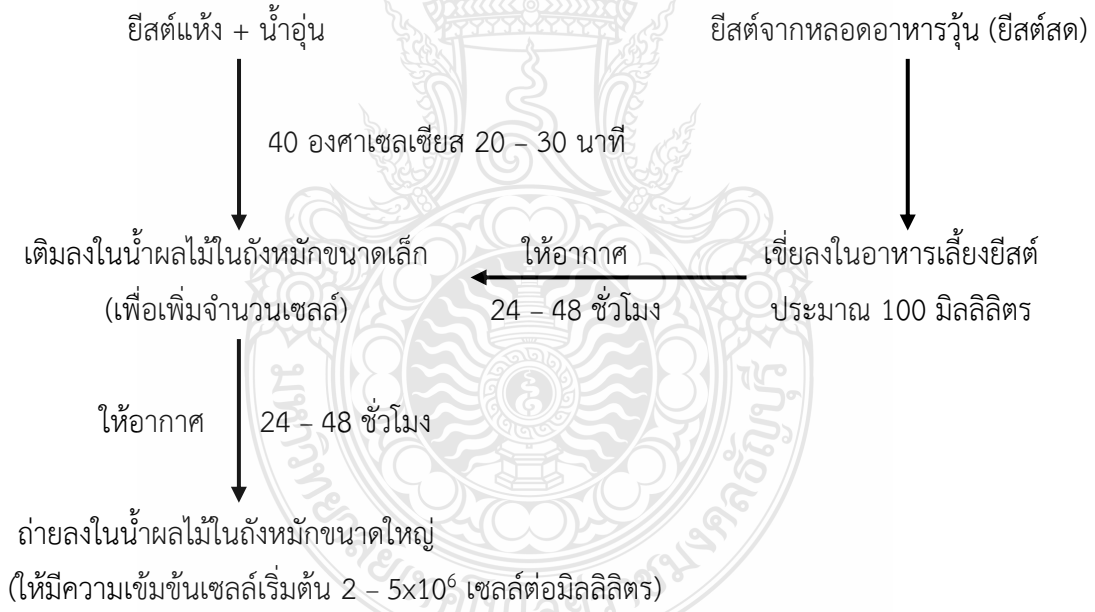
เมื่อได้ยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกแล้วว่าเหมาะสมต่อการหมัก ขั้นตอนต่อไปคือการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์หรือหัวเชื้อยีสต์ ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์ที่จะใช้ในการหมักให้มากขึ้น เพื่อให้เหมาะสมกับปริมาณวัตถุดิบต่าง ๆ เช่น น้ำผลไม้ที่จะใช้ในการหมักไวน์ เป็นต้น และเพื่อให้ยีสต์ปรับตัวให้พร้อมในการหมัก

2.4.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อจากยีสต์แห้ง ในการใช้ยีสต์แห้งเพื่อใช้ในการหมัก จะต้องนำยีสต์แห้งมาทำให้เป็นของเหลวก่อนโดยนำมารวมกับน้ำอุ่นอีกครั้ง เรียกว่า การรีไฮเดรชั่น (Rehydration) โดยควรทำที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส การ Rehydration ในน้ำอุ่น (ต้มสุก) หรือในน้ำผลไม้พร้อมหมักที่อุ่นจะทำให้มีการกระจายตัวของยีสต์มากกว่าเมื่อใช้น้ำเย็นหรือน้ำผลไม้ที่เย็น การใช้น้ำผลไม้ที่เย็นจะทำให้ยีสต์จับกันเป็นก้อนกลมเล็ก ๆ (Pellet) และจับเป็นกลุ่มก้อนไม่ละลายหรือไม่กระจายตัว เป็นผลให้สารอาหารและออกซิเจนแพร่เข้าไปได้น้อยลง นอกจากนี้การ Rehydration ที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้จำนวนยีสต์ที่มีชีวิตลดลง มีรายงานว่าการ Rehydration ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จะทำให้ยีสต์ตายร้อยละ 50 – 60 ในขณะที่ถ้ารีไฮเดนชั่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ยีสต์จะมีการสร้างผนังเมมเบรนใหม่อย่างรวดเร็วก่อนที่องค์ประกอบในไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ที่ละลายน้ำได้จะหายหรือละลายน้ำไป อย่างไรก็ตามไม่ควรทำรีไฮเดรชั่นนานเกิน 30 นาที หรือควรปฏิบัติตามข้อปฏิบัติตามข้อแนะนำที่เขียนบอกไว้ที่ซองหรือฉลากยีสต์แห้งอย่างเคร่งครัด การใช้เวลาในการ Rehydration นานเกินไปจะทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลง

หลังการทำ Rehydration ยีสต์แห้งแล้ว จำเป็นต้องเพิ่มจำนวนยีสต์นั้นในถังหมัก หรือขวดรูปชมพู่ขนาดเล็ก ก่อนถ่ายลงสู่น้ำผลไม้ที่ใช้หมักในถังหมักขนาดใหญ่ (สัดส่วนของยีสต์แห้งที่ใช้ต่อน้ำผลไม้ที่ใช้หมักจะบอกไว้ที่ฉลาก เช่น 2 กรัมต่อ 10 ลิตร หรือ 5 กรัมต่อ 20 ลิตร หรือ

20 – 40 กรัมต่อ 100 ลิตร เป็นต้น) โดยให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Viable Cell Number) สุดท้ายหลังเติมลงในน้ำผลไม้ที่ใช้หมัก อยู่ในช่วง 2 – 5 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยจะใช้เชื้อเริ่มต้นประมาณร้อยละ 1 – 3 โดยปริมาตร ของปริมาตรน้ำผลไม้ที่ใช้หมัก

2.4.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อจากยีสต์บนอาหารวุ้น การเตรียมกล้าเชื้อจากยีสต์หรือจากหลอดอาหารวุ้น (Agar slant) ทำโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) เขี่ยเชื้อยีสต์ให้เต็มลูป 2 – 3 ลูป จากอาหารวุ้น โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นถ่ายยีสต์ลงในขวดที่มีอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ปลอดเชื้อประมาณ 100 มิลลิลิตร เช่น อาหารเหลว Yeast Extract Broth, Malt Extract Broth (YM broth) ที่มี pH ประมาณ 4 หรือในน้ำสับปะรดที่ต้มฆ่าเชื้อแล้ว หรือน้ำผลไม้ที่จะใช้หมักที่มีองค์ประกอบและสารอาหารที่เหมาะสมและปลอดเชื้อ เพื่อเลี้ยงให้ได้เซลล์ยีสต์ที่แข็งขัน โดยนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าหรือให้มีการกวนเพื่อให้อากาศ เป็นเวลาประมาณ 24 – 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงถ่ายลงในถังหมักขนาดเล็กเพื่อเพิ่มจำนวนยีสต์ จากนั้นทำเช่นเดียวกับการเตรียมกล้าเชื้อจากการใช้ยีสต์แห้ง ดังแสดงในรูปที่ 2.7




**รูปที่ 2.7** ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อจากการใช้ยีสต์แห้งและยีสต์สด
**ที่มา** : [18]

2.4.2 สิ่งที่ควรคำนึงและควรปฏิบัติในการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

1) การเตรียมกล้าเชื้อจากยีสต์มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์ ดังนั้นจึงควรทราบสภาวะที่จะทำให้ยีสต์เพิ่มจำนวนได้ดี ในสภาวะที่มีอากาศและอาหารสมบูรณ์ยีสต์จะเจริญหรือเพิ่มจำนวนได้ดี ภายใต้สภาวะกึ่งไม่มีอากาศ ยีสต์จะใช้เวลานานขึ้นในการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้ปริมาณตามต้องการ ซึ่งทำให้ยีสต์มีการเจริญยาวนานขึ้นส่งผลให้ปริมาณของเออร์โกสเตอรอยล์ (Ergosteroll) และกรดไขมันบริเวณเซลล์เมมเบรนลดลง ซึ่งมีผลทำให้ยีสต์ไวต่อแอลกอฮอล์มากขึ้นหรือทนต่อแอลกอฮอล์ได้น้อยลง เนื่องจากการสังเคราะห์องค์ประกอบในเซลล์เมมเบรนของยีสต์ (คือกรดไขมันและสเตอรอยด์ ต้องการโมเลกุลของออกซิเจน)

2) เมื่อได้กล้าเชื้อยีสต์ที่แข็งขันแล้วไม่ควรถ่าย หรือย้ายยีสต์ที่แข็งขันลงไปยังน้ำผลไม้ที่แช่เย็นไว้ทันที เพราะการกระทบกับความเย็นทันทีเป็นสาเหตุให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงถึงร้อยละ 60 ผลที่ตามมาคือยีสต์จะเจริญได้ช้าลง (เนื่องจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นลดลง) ซึ่งเป็นการเพิ่มปัญหาในการหมัก ยิ่งไปกว่านั้นการลดอุณหภูมิอย่างทันทีทันใดอาจทำให้เกิดแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟต์ได้ ในกรณีที่ต้องการหมักที่อุณหภูมิต่ำ ควรเลี้ยงยีสต์ที่อุณหภูมินั้นในการเตรียมกล้าเชื้อเพื่อให้ยีสต์ปรับตัวก่อนเติมกล้าเชื้อลงในน้ำผลไม้ที่ต้องการหมัก

3) หลังจาก Rehydration และถ่ายยีสต์ลงในถังกล้าเชื้อ ยีสต์จะเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้ในระดับที่ต้องการโดยใช้เวลาประมาณ 24 – 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติมลงในน้ำผลไม้ที่พร้อมหมัก หากมีการเจริญของยีสต์จะสังเกตได้จากการหมักจะขุ่น อย่างไรก็ตามในระหว่างการเจริญควรติดตามการมีชีวิตของเซลล์และร้อยละของเซลล์ที่กำลังแตกหน่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์ที่มีชีวิตสามารถติดตามได้โดยใช้สีย้อม เช่น เมททิลลีนบูล (Methylene Blue) เป็นต้น ในกรณีที่เป็นกล้าเชื้อที่กำลังเจริญอย่างแข็งขันในน้ำผลไม้ ควรมีจำนวนเซลล์ที่กำลังแตกหน่อที่ประมาณร้อยละ 60 – 80 ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด

4) เมื่อจำนวนเซลล์ยีสต์ในกล้าเชื้อเพิ่มขึ้นถึงระดับที่ต้องการแล้ว ควรถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ลงในน้ำผลไม้ที่พร้อมหมักก่อนที่ระดับน้ำตาลในกล้าเชื้อยีสต์จะหมดอย่างสมบูรณ์ การขาดสารอาหารจะทำให้ยีสต์ที่จะเข้าสู่ระยะพักตัวหรือระยะปรับตัวอีกครั้ง ซึ่งจะมีผลทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลง และกิจกรรมของเซลล์ช้าลง

5) การเก็บกล้าเชื้อยีสต์ที่แข็งขันไว้ร้อยละ 5 – 10 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อของการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ในน้ำผลไม้ปลอดเชื้อในครั้งต่อไป แม้ว่าจะเป็นวิธีการที่สะดวก แต่อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการปนเปื้อนจากยีสต์หรือแบคทีเรียอื่นได้ ยิ่งไปกว่านั้นการใช้เทคนิคนี้โดยเก็บกล้าเชื้อยีสต์ดังกล่าวไว้

นานขึ้นจะทำให้องค์ประกอบของเซลล์ยีสต์เปลี่ยนไปจนถึงจุดวิกฤต ตัวอย่างเช่น ทำให้ระดับของสเตอรอยด์ในเซลล์เมมเบรนของยีสต์ลดลงเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ใกล้จะไม่มีอากาศ ซึ่งจะทำให้เกิดปัญหาในการหมักเมื่อนำกล้าเชื้อยีสต์นั้นไปใช้ กิจกรรมดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุทำให้มีการสร้างเอทิลคาร์บาเมต (Ethyl Carbamate) ซึ่งเป็นสารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งเพิ่มขึ้นด้วย

6) ในการสั่งซื้อยีสต์แห้งที่แอคทีฟเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ ควรสั่งซื้อแค่พอใช้หรือพอแก่ความต้องการในฤดูนั้นเท่านั้น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์แห้งหรือยีสต์ผงจะลดลง แม้ว่าจะเก็บไว้ที่สภาวะที่เหมาะสมหรือดีเพียงใดก็ตาม ตัวอย่างเช่น การเก็บยีสต์แห้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส กิจกรรมของยีสต์จะลดลงประมาณร้อยละ 5 ต่อปี ในขณะที่เมื่อเก็บไว้ที่ 20 องศาเซลเซียส กิจกรรมของยีสต์จะลดลงประมาณร้อยละ 20 ต่อปี [18]

## 2.5 น้ำตาลมะพร้าว

การทำน้ำตาลมะพร้าวเป็นอาชีพที่ต้องใช้ทักษะ และความชำนาญ จากการสะสมประสบการณ์ที่ได้จากการสังเกต และการลงมือปฏิบัติ พร้อมกับการแก้ไขปรับปรุงให้สอดคล้องกับธรรมชาติของต้นมะพร้าว และคุณภาพของเครื่องมือที่ใช้ในการทำงาน ตั้งแต่มีดปาดตาลจนถึงน้ำร้อนที่ใช้ลวกกระบอกรองน้ำตาลใส ซึ่งขั้นตอนในการทำน้ำตามะพร้าวที่สำคัญมีดังต่อไปนี้

2.5.1 การเก็บน้ำตาลใส [19]

การเก็บน้ำตาลใสให้ได้ปริมาณมากขึ้นอยู่กับพันธุ์ของมะพร้าว และการพัฒนาจั่นมะพร้าวให้เป็นงวงตาล ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1) การเลือกจั่นมะพร้าว โดยสังเกตอายุของจั่นที่จะใช้เป็นงวงตาล นับจากวันปลูกประมาณ 5 – 8 ปี เป็นอายุที่ไม่แก่ หรืออ่อนจนเกินไป ทำความสะอาดสิ่งรกรุงรังบริเวณรอบ ๆ ส่วนคอมะพร้าว

2) การปาดจั่น เมื่อได้จั่นมะพร้าวที่จะทำงวงตาล จะใช้มีดปาดตาลปาดส่วนปลายของจั่นและดอกอ่อนทิ้ง ดังแสดงในรูปที่ 2.8 ความยาวที่ตัดขึ้นอยู่กับรูปร่างของจั่น ถ้าจั่นมีรูปร่างอ้วนป้อม ปลายจั่นจะแหลมเรียว แห้งลีบ ต้องปาดทิ้งมาก และถ้าจั่นมีลักษณะอ้วนผอมแต่สมบูรณ์เป็นทรงกระบอกเรียวแหลมจะปาดทิ้งน้อย การปาดปลายจั่นเพื่อเป็นการให้ก้านดอก และดอกอ่อนภายในจั่นเริ่มมีน้ำหวานซึมอยู่ที่หน้างวงตาล โดยจะต้องปาดจั่นวันละ 2 ครั้ง คือ เช้าและเย็น [20]

**รูปที่ 2.8** วิธีการปาดปลายจั่นมะพร้าว

**ที่มา** : [21]

3) การโน้มจั่นหรืองวง หลังจากทำการปาดจั่นประมาณ 2 – 3 วัน จึงเริ่มเหนี่ยวงวงตาลให้โน้มมาเพียงเล็กน้อย เพื่อเป็นการกระตุ้นงวงตาลให้เคยชินกับการขับน้ำหวานออกมาเป็นน้ำตาลใส ชาวสวนจะใช้มีดถลกหน้าทางมะพร้าวทำเป็นเชือก หรือใช้เชือกฟาง ผูกโยงงวงตาลไว้กับทางมะพร้าว ดังแสดงในรูปที่ 2.9 จากนั้นอีก 2 – 3 วัน จะเริ่มโน้มงวงลงวันละน้อย ๆ เพื่อป้องกันไม่ให้จั่นหักหรือเดาะ และเปิดเปลือกจั่นที่โคนงวงตาล เป็นงานช่วยพยุงการโน้มตัวของงวงตาล

**รูปที่ 2.9** การโน้มงวงตาล

**ที่มา** : [22]

4) การตัดเปลือกจั่นหรือการปอกกาบเปี้ยว (กาบเปี้ยวคือเครื่องหุ้มห่อจั่นเมื่อปอกออกแล้วจะเหลือแต่ภายในจั่นเรียกว่า งวงมะพร้าว) ช่วงที่เปลือกจั่นแตก งวงตาลจะถูกเหนี่ยวโน้มลงมา

เกือบได้ที่ น้ำตาลใสจะไหลหยดลงพื้นดินอย่างเห็นได้ชัด ว่ามีปริมาณมากพอที่จะเก็บน้ำตาลใสได้ เมื่อกาบเปี้ยวเริ่มแห้งจึงจะตัดกาบเปี้ยวออก แล้วมัดงวงตาลคล้ายกับการมัดข้าวต้มมัด ดึงงวงตาลให้โน้มได้ที่ และนำกระบอกตาลไปสวมโดยการผูกเชือกหูกระบอกยึดไว้กับงวงตาลเพื่อจะรองรับน้ำตาลใส

5) การนวดตาล จั่นหรืองวงที่ทำการปอกกาบเปี้ยวออกแล้ว ก่อนเริ่มรองน้ำตาลใสต้องทำการนวดคั้นที่งวงตาลก่อน โดยใช้มือกำงวงตาลหรือแล้วขยำตั้งแต่โคนงวงจนถึงปลายงวง (ทำทุกวันนับตั้งแต่เริ่มปอกกาบเปี้ยวออกแล้ว) ทำเช่นนี้จนกว่างวงตาลนิ่มไม่แข็งกระด่าง การนวดเป็นการทำให้น้ำตาลใสออกดี และออกจนกระทั้งหมดงวง ดังแสดงในรูปที่ 2.10

**รูปที่ 2.10** การซึมไหลของน้ำตาลใสจากจั่นมะพร้าว
**ที่มา** : [23]

6) การรูดดอก ช่วงเก็บน้ำตาลใสคือวันละ 2 ครั้ง ชาวสวนจะแต่งงวงตาล โดยการรูดดอกแก่ทิ้ง และทำความสะอาดบริเวณที่มีหนอน หรือเน่าเสีย จากนั้นแก้มัดงวงตาล เพื่อจัดระเบียบก้านดอกแล้วมัดงวงตาลใหม่ เพื่อทำให้น้ำตาลใสไหลมากและสม่ำเสมอ ถ้าไม่แต่งงวงตาลจะทำให้งวงตาลแข็งกระด้าง กลายเป็นงวงตาย คือมีน้ำตาลใสไหลน้อย และตัดก้านนิ้วที่ไม่นุ่ม หรือนิ้วที่มีปัญหาทิ้งด้วย

7) การรองน้ำตาล ปัจจุบันนิยมใช้กระบอกพลาสติกแทนกระบอกไม้ไผ่ ดังแสดงในรูปที่ 2.11 เวลาขึ้นรองน้ำตาลคือตอนประมาณบ่ายสามหรือสี่โมงเย็น ก่อนทำการรองน้ำตาลจะใช้มีดปาดหน้างวงตาลทิ้งหนาประมาณ ½ ของความยาวดอกมะพร้าวต้นนั้น สามารถเก็บน้ำตาลใสจากงวงตาลต้นนั้นได้นานกว่า 1 เดือน และสามารถใช้งวงตาลได้ไม่น้อยกว่า 3 งวง ใน 1 ต้น และเก็บน้ำตาลสดได้ประมาณ 9 ลิตร ต่อ 1 วัน ขึ้นอยู่กับความชำนาญของชาวสวนมะพร้าว ที่สำคัญการทำลิ้นที่โคนก้านช่วยไม่ให้น้ำตาลใสไหล ลงคอมะพร้าว เพราะถ้าปล่อยให้ไหลลงไปจำทำให้เกิดบูดเน่า และเป็นที่เกิดของแมลงด้วงไฟเข้าเจาะยอดมะพร้าวเพื่อวางไข่ ทำให้มะพร้าวตายได้

**รูปที่ 2.11** การรองน้ำตาลใสด้วยกระบอกพลาสติก
**ที่มา** : [24]

8) การเตรียมและการดูแลรักษากระบอกรองน้ำตาล ก่อนที่จะนำกระบอกไปรองน้ำตาล และหลังรองน้ำตาล ต้องนำไปลวกด้วยน้ำร้อนหรือควันก่อน เพื่อป้องกันไม่ให้แมลงหรือมดเข้าไปติดอยู่ในภาชนะระหว่างรองน้ำตาลได้ การดูแลรักษากระบอกตาลเป็นสิ่งจำเป็น เพราะจะทำให้มีอายุการใช้งานได้นานขึ้น

9) การใส่เปลือกไม้เพื่อป้องกันรสเปรี้ยว เมื่อทำการเตรียมกระบอกรองน้ำตาลเรียบร้อยแล้ว นำเปลือกไม้ไปสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ วางไว้ที่ก้นกระบอกประมาณหยิบมือหนึ่ง ซึ่งเปลือกไม้ที่ใส่จะทำให้น้ำตาลสดมีรสฝาด เพื่อป้องกันการบูดเปรี้ยว เปลือกไม้ที่นิยมใช้ได้แก่ ไม้พะยอมไม้ตะเคียนทอง และไม้เคี่ยม [20]

2.5.2 การเคี่ยวน้ำตาล [19]

เมื่อชาวสวนมะพร้าวเปลี่ยนกระบอกรองน้ำตาลใสแล้ว จากนั้นตรวจคุณภาพของน้ำตาลใสในกระบอกตาลว่าบูด หรือเป็นมูกเพื่อแยกทิ้ง นำน้ำตาลใสที่ได้คุณภาพเทผ่านกระชอน หรือตะกร้าที่ปูด้วยผ้าขาวบางสำหรับกรองลงกระทะ ดังแสดงในรูปที่ 2.12 แล้วจึงจุดไฟเคี่ยวน้ำตาล การเคี่ยวตาลต้องใช้ความร้อนในการเคี่ยวสูง และความร้อนจะต้องสม่ำเสมอ จึงจะได้น้ำตาลข้นแห้งที่มีคุณภาพดี

**รูปที่ 2.12** การกรองเอาเศษเปลือกไม้ออกจากน้ำตาลใส
**ที่มา** : [25]

เมื่อเริ่มเคี่ยวน้ำตาลได้สักพัก น้ำตาลจะเริ่มตั้งฟองและเริ่มจะล้นออกมานอกกระทะ ชาวสวนจะนำโคมาครอบไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง (โค คือภาชนะสานด้วยไม้ไผ่สำหรับครอบที่ปากกระทะ) ดังแสดงในรูปที่ 2.13 ฟองที่น้ำตาลล้นโคออกมาจะเข้มข้นขึ้นมีลักษณะเป็นฟองเล็ก ๆ เมื่อน้ำในน้ำตาลระเหยออกไปหมดแล้วพอฟองเริ่มยุบจะนำโคที่ครอบไว้ออก

**รูปที่ 2.13** โคครอบปากกระทะ
**ที่มา** : [25]

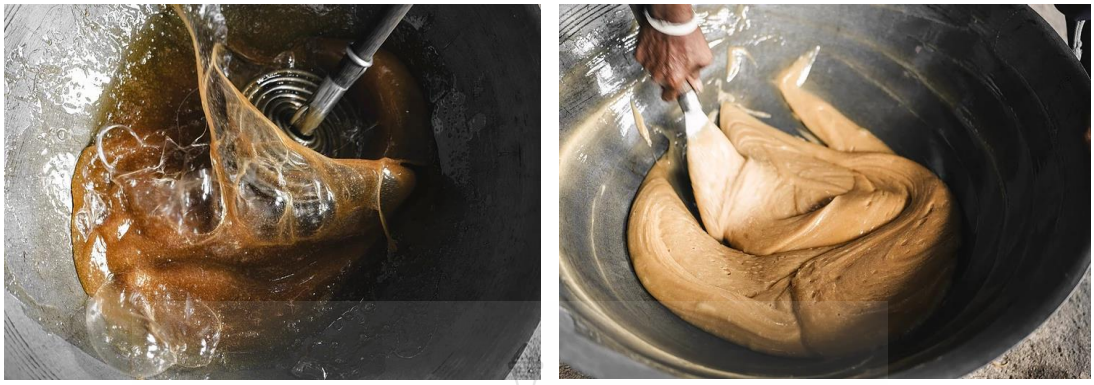
ในช่วงนี้ให้ลดความร้อนของเตาลง ให้ความร้อนพอเหมาะกับการเดือดของน้ำตาล จากนั้นผู้เคี่ยวจะต้องเตรียมผ้าสำหรับจับขอบกระทะ เพื่อคอยหมุนกระทะให้ด้านข้างกระทะได้รับความร้อนจากตรงกลางอย่างสม่ำเสมอ ดังแสดงในรูปที่ 2.14

**รูปที่ 2.14** การหมุนกระทะให้ด้านข้างกระทะได้รับความร้อน
**ที่มา** : [25]

สังเกตลักษณะการปุดของน้ำตาลในกระทะเมื่อได้ที่พอเหมาะ สี ของน้ำตาลจะเข้ม กำลังดีแล้วจึงยกกระทะลงจากเตา ถ้ายกลงเร็วเกินไปจะได้น้ำตาลอ่อน คือเนื้อน้ำตาลข้นแห้งจะไม่แข็งพอดี และถ้ายกลงช้าเกินไปจะได้น้ำตาลแก่ คือน้ำตาลข้นแห้งจะแห้งแข็งเกินไป

2.5.3 การทำให้น้ำตาลข้นแห้ง

หลังจากยกกระทะน้ำตาลลงจากเตาตาลแล้ว ฟองที่ปุดจะยุบตัวลงเป็นเนื้อน้ำตาลเหนียวข้น และมีความร้องสูง เรียกว่า น้ำตาลงุ่น หรือน้ำตาบตะหงุ่น ก่อนกวนให้น้ำตาลงุ่นเป็นเนื้อข้นแห้ง จะขอดน้ำตาลที่ติดข้างกระทะออกก่อน แล้วใช้เหล็กกระทุ้งเพื่อกวนให้น้ำตาลข้น ดังแสดงในรูปที่ 2.15 (ก) เป็นการยกขึ้นสะบัดกึ่งการปั่น หมุนจากซ้ายไปขวาประมาณ 2 – 3 ครั้ง จะได้น้ำตาลสีนวลสวย ดังแสดงในรูปที่ 2.15 (ข)



(ก) (ข)

**รูปที่ 2.15** (ก) การใช้เหล็กกระทุ้งเพื่อกวนให้น้ำตาลข้น และ (ข) ลักษณะน้ำตาลข้นหลังใช้เหล็กกระทุ้ง
**ที่มา** : [25]

โดยการผลิตน้ำตาลมะพร้าวเพื่อจำหน่าย นิยมทำเป็น 2 ลักษณะ คือ น้ำตาลปึก มีลักษณะเป็นก้อน ๆ หรือเป็นไปตามภาชนะที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ แต่ละก้อนจะมีน้ำหนักตามที่ตกลงกับผู้ซื้อ ดังแสดงในรูปที่ 2.16 (ก) และน้ำตาลปี๊บ เป็นการบรรจุน้ำตาลลงปีปให้เต็ม จะมีน้ำหนักประมาณ 30 กิโลกรัม แล้วประทับตราสัญลักษณ์โรงเคี่ยวตาลไว้ที่ผิวหน้าของน้ำตาล ดังแสดงในรูปที่ 2.16 (ข)

(ก) (ข)

**รูปที่ 2.16** (ก) น้ำตาลปึก และ (ข) น้ำตาลปี๊บ
**ที่มา :** [26]

2.5.4 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของน้ำตาลมะพร้าว

1) กระบอกรองน้ำตาลใสที่สะอาด และเกล็ดไม้ที่ใส่ในกระบอกรองตาลก่อนนำไปรองน้ำตาลใส ต้องใส่ปริมาณที่พอเหมาะกับปริมาณน้ำตาลใสในกระบอกที่ได้จากงวงตาลของแต่ละงวง

2) เวลาที่เหมาะแก่การเก็บน้ำตาลใส คือ ในช่วงอากาศที่ยังไม่ร้อนจัด จึงจะได้คุณภาพน้ำตาลใสที่ดีที่สุด น้ำตาลใสที่เก็บในช่วงเวลาเช้าและเวลาเย็น โดยเฉพาะช่วงฤดูหนาวจะได้คุณภาพดียิ่งขึ้น

3) ควรนำน้ำตาลใสไปต้มให้เดือดโดยเร็วที่สุด เพื่อจะได้น้ำตาลข้นแห้งที่มีคุณภาพ ซึ่งลดการเริ่มมีกลิ่นบูดเปรี้ยวในน้ำตาลใสก่อนนำมาเคี่ยว

4) การเคี่ยวน้ำตาลใสด้วยความร้อนที่สม่ำเสมอ การลดความร้อนให้พอเหมาะแต่ละช่วงน้ำตาลใสเดือด การหมุนกระทะ และช่วงยกกระทะลงจากเตา จะทำให้ได้คุณภาพน้ำตาลข้นแห้งที่มีคุณภาพที่ดี

5) เทคนิคหรือความชำนาญในการกวนน้ำตาลอุ่น หรือน้ำตาลตะหุ่นให้ข้นแห้ง

2.5.5 องค์ประกอบของน้ำตาลมะพร้าวเคี่ยว [27]

เมื่อนำน้ำตาลใสมาต้มจนน้ำระเหยออกจะได้น้ำตาลมะพร้าวเคี่ยว ซึ่งมีรายงานการวิเคราะห์องค์ประกอบ คุณสมบัติ คุณคาทางโภชนาการของน้ำตาลมะพร้าวเคี่ยว ดังแสดงในตารางที่ 2.5 – 2.7

**ตารางที่ 2.5** คุณสมบัติและองค์ประกอบของน้ำตาลมะพร้าวเคี่ยว

| สมบัติและองค์ประกอบ | ค่าที่วิเคราะห์ได้ | หน่วยบริโภค |
|---|---|---|
| พลังงาน | 321.60 | แคลอรี่ 100 กรัม |
| ความชื้น | 11.40 | กรัมต่อ 100 กรัม |
| น้ำตาล | 72.04 | กรัมต่อ 100 กรัม |
| น้ำตาลรีดิวซ์ | 7.79 | กรัมต่อ 100 กรัม |
| เพกตินและกัม | 7.09 | กรัมต่อ 100 กรัม |
| โปรตีน | 0.55 | กรัมต่อ 100 กรัม |
| เถ้า | 1.13 | กรัมต่อ 100 กรัม |

**ที่มา** : [28]

**ตารางที่ 2.6** องค์ประกอบของน้ำตาลมะพร้าวเคี่ยว

| องค์ประกอบ | ค่าที่วิเคราะห์ได้ | หน่วยบริโภค |
|---|---|---|
| ความชื้น | 10.92 | กรัมต่อ 100 กรัม |
| ซูโครส | 68.35 | กรัมต่อ 100 กรัม |
| น้ำตาลรีดิวซิง | 6.58 | กรัมต่อ 100 กรัม |
| เพกตินและกัม | 8.72 | กรัมต่อ 100 กรัม |
| เถ้า | 2.19 | กรัมต่อ 100 กรัม |

**ที่มา** : [29]

**ตารางที่ 2.7** คุณคาทางโภชนาการของน้ำตาลมะพร้าวเคี่ยว

| คุณคาทางโภชนาการ | ค่าที่วิเคราะห์ได้ | หน่วยบริโภค |
|---|---|---|
| พลังงาน | 383.0 | กิโลแคลอรี่ |
| โปรตีน | 0.40 | กรัมต่อ 100 กรัม |
| ไขมัน | 0.10 | กรัมต่อ 100 กรัม |
| คาร์โบไฮเดรต | 95.00 | กรัมต่อ 100 กรัม |
| แคลเซียม | 80.00 | มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม |
| ฟอสฟอรัส | 43.00 | มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม |
| เหล็ก | 11.40 | มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม |
| วิตามิน เอ | 280.00 | IU ต่อ 100 กรัม |
| วิตามิน บี 3 | 1.00 | มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม |

**ที่มา** : [30]

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 บุษกร กิจโป้ [31] ได้เก็บข้อมูลเกี่ยวกับกระบวนการผลิตสุรากลั่นชุมชนจากข้าวเหนียวในจังหวัดลพบุรี ซึ่งมีกระบวนการผลิตโดยนำข้าวเหนียวมาแช่ในน้ำสะอาด แล้วนำมานึ่งจนสุก จากนั้นนำข้าวมาแช่ลงในน้ำปูนใส แล้วมาผสมกับลูกแป้ง คลุกผสมให้เข้ากัน นำใส่ลงในถังหมักหมักทิ้งไว้เป็นเวลา 3 – 5 วัน จากนั้นจะมีน้ำเชื่อมออกมา เรียกว่า “น้ำต้อย”จากนั้นเติมน้ำสะอาดลงไปเรียกว่า “การผ่าน้ำ” ปล่อยหมักทิ้งไว้อีกเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ได้แรงแอลกอฮอล์ตามที่ต้องการ นำส่วนที่ได้จากการหมัก และนำมากลั่นเพื่อให้ได้น้ำสุราตามที่ต้องการ

2.6.2 อภิชญา เตชะวสัญญู [32] ได้ศึกษาการแยก จำแนก และลักษณะสมบัติของยีสต์และราในลูกแป้งสุรา เพื่อการผลิตสาโท ที่ได้เก็บตัวอย่างลูกแป้งจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทยทั้งหมด 114 ตัวอย่าง พบว่า สามารถแยกเชื้อราได้ 52 ไอโซเลท โดยมีลักษณะของสปอร์ ขนาดของก้าน Rhizoids การมีคลามัยสปอร์ การมีโปรเจคชั่น ขนาดของสปอร์แรงเจียม เมื่อนำไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS พบว่า ร้อยละของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกับ *Mucor racemosus*, *Mucor indicus*, *Rhizopus microsporus* และ *Rhizopus oryzae* ในฐานข้อมูล GenBank และ ยีสต์ที่แยก ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Candida glabrata*

2.6.3 อรอง จันทร์ประสาทสุข [33] ได้ศึกษาการคัดแยกและจำแนกจุลินทรีย์จากลูกแป้งจากตลาดศรีราชา และตลาดหนองมน พบว่า เชื้อราที่แยกได้มีลักษณะโคโลนี กลม ขอบโคโลนี มีสีขาว เส้นใยมีสีขาว และสร้างสปอร์สีเขียวอมเหลือง มีลักษณะสัณฐานก้านชูสปอร์เป็นแบบไม่มีผนังกั้น ปลายก้านชูสปอร์โป่งออกคล้ายถุง มี Sterigma ยื่นออกมาทำหน้าที่สร้าง conidia ซึ่งต่อกันเป็นโซ่ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับราในสกุล *Aspergillus* โดย *Aspergillus* sp. ที่มีเส้นใยแตกแขนงและมีผนังกั้น เส้นใยของเชื้อราไม่มีสีแต่ละส่วนที่กั้นมีนิวเคลียสหลายอัน ก้านชูสปอร์อาจมีผนังกั้นหรือไม่มีก็ได้ที่ส่วนปลายของก้านชูสปอร์จะโป่งออกเป็น Vesicle และมีส่วนที่ยื่นออกมาเป็น Sterigma ซึ่งอาจมีชั้นเดียวหรือสองชั้นก็ได้ Conidia ถูกสร้างขึ้นภายใน Sterigma ซึ่ง Conidia ที่สร้างขึ้นภายหลังจะดัน Conidia อันแรก ๆ ออกมา และยังติดต่อกันอยู่ จึงเกิดเป็นสายของ Conidia

2.6.4 เจริญ เจริญชัย [34] ได้ศึกษาบทบาทของยีสต์และราจากลูกแป้งในการหมักข้าว โดยนำราที่แยกได้จากลูกแป้งมากับหมักข้าวเหนียวนึ่งเป็นระยะเวลา 4 วัน พบว่า แนวโน้มการเจริญของเชื้อราและยีสต์จะค่อย ๆ เจริญในระยะแรกของการหมัก และมีจำนวนรามากที่สุดหลังการหมักข้าวเป็นเวลา 2 – 3 วัน โดยมีจำนวนราเท่ากับ 4.00 – 5.00 Log CFU/g หลังจากนั้นค่อย ๆ ลดลง

2.6.5 กนกวรรณ วรวัฒนานนท์ และคณะ [35] ศึกษาการแยกและคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์จากผลไม้ โดยเก็บตัวอย่างผลไม้ 71 ตัวอย่าง และแยกเชื้อยีสต์ได้ 71 ไอโซเลท นำไปทดสอบ หาปริมาณการผลิตแอลกอฮอล์โดยใช้น้ำตาลมะพร้าว และน้ำอ้อย ที่ปรับปริมาณความหวานที่ 24 องศาบริกซ์ ค่า pH 4 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า มียีสต์จำนวน 5 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 2.25 2.29 1.9 1.85 และ 5.3 โดยปริมาตร ตามลำดับ ค่า pH ที่ 2.9 2.9 3 2.65 และ 3 ตามลำดับ เมื่อนำมาหมักกับน้ำอ้อย สามารถ

ผลิตแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 4.5 8.7 7.4 8.9 และ 9.1 ตามลำดับ ค่า pH ที่ 2.8 2.6 2.8 2.8 และ 2.8 ตามลำดับ

2.6.6 วีระสิทธิ์ กัลป์ยากฤต และคณะ [36] ศึกษาการใช้จุลินทรีย์หัวเชื้อผสมเพื่อการผลิตลูกแป้งสาโท โดยใช้เชื้อรา Amylomyces sp., Aspergillus sp. และ Rhizopus sp. เตรียมเพาะเลี้ยงทาเนโคจิราบริสุทธิ์ และยีสต์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* SYL16, SYL18, SYL 20 และ SYL 24 นำเชื้อที่คัดเลือกมาปั้นลูกแป้งในอัตราส่วนระหว่างเชื้อรา และยีสต์ เท่ากับ 3:1 มาทดสอบคุณสมบัติทางเคมีโดยการหมักสาโท ในโหลแก้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำปลอดเชื้อพร้อมปิดฝาและบ่มต่อไปอีก 14 วัน โดยเก็บตัวอย่างทกุ 48 ชั่วโมง พบว่า ผลการเปลี่ยนแปลงของกรดตลอดระยะเวลาในการหมัก 0 ถึง 14 วัน ทุก Treatment มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น นอกจากนั้น พบว่า Treatment ที่ 6 มีอัตราการเพิ่มขึ้นของกรดสูงที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับทุก Treatment โดยมีค่าปริมาณกรดวันที่ 14 ร้อยละ 1.21 และ Treatment อื่น ๆ มีปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.55 – 0.87 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

2.6.7 มณชัย เดชสังกรานนท์ และคณะ [37] ได้ศึกษาการผลิตไวน์จากส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งด้วยกระบวนการปลอดสารเคมี โดยการเตรียมน้ำจากส้มโอพันธุขาวน้ำผึ้ง มาปรับค่า pH 3.5 – 3.7 ด้วยน้ำมะนาวพันธุแป้นคั้นสด ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้นที่ 22 องศาบริกซ์ ด้วยน้ำผึ้ง นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที แบ่งน้ำส้มโอที่ได้ปริมาตรละ 2 ลิตร เติมลูกเกดแห้งร้อยละ 2 ต่อน้ำส้มโอ้ และเติมกล้าเชื้อยีสต์ร้อยละ 2 ต่อปริมาตรน้ำส้มโอ ได้แก่ ยีสต์สายพันธุ V 1116, Burgundy (Bu), EC-1118 (Champagne, Ch) และ Montrachet (Mn) หมักในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่า ยีสต์ทุกสายพันธุ์เมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่าไวนส้มโอมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้เหลือ 7 องศาบริกซเทากันทุกสายพันธุ มีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ เทากับ 11.15 11.23 11.08 และ 11.15 โดยปริมาตร ตามลำดับ มีคา pH เทากับ 3.19 3.19 2.91 และ 3.28 ตามลำดับ ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติกร้อยละ 1.02 0.92 0.92 และ 0.93 ตามลำดับ และการเจริญของยีสตทุกสายพันธุใหลักษณะการเจริญเป็นในทิศทางเดียวกัน โดยจำนวนเซลล์เริ่มตนในแต่ละการทดลองมีคาประมาณ 7 Log CFU/ml เมื่อสิ้นสุดการหมักในน้ำส้มโอยีสตแต่ละสายพันธุจะมีจำนวนเซลล์ใกลเคียงกันคือประมาณ 9 Log CFU/ml

2.6.8 นุจรี สอนสะอาด และคณะ [38] ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักไวน์ลำดวนโดยใช้กล้าเชื้อแบบตรึงเซลล์ โดยนำผลลำดวนสุกจาก จังหวัดสุรินทร์ คัดเลือกเฉพาะผลสุกมีสีดำ เนื้อไม่

เละ เอาใบและก้านออก ล้างให้สะอาด จากนั้นนำน้ำลำดวนที่มีอัตราส่วนการเจือจางน้ำ 1 : 2 (ลำดวน: น้ำสะอาด) จำนวน 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้น 20 องศาบริกซ์ ปรับค่า pH เริ่มต้น 3.0 - 3.5 และเติมสารโพรแทสเซี่ยมเมตาไบซ์ซัลลไฟด์ (Potassium Metabisulphite, KMS) 150 ppm เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำลำดวน จากนั้นเติมกล้าเชื้อตรึงเซลล์ กล้าเชื้อสด และกล้าเชื้อแบบแห้ง มาหมักที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าการใช้กล้าเชื้อทุกแบบ มีผลทำให้แนวโน้มปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในไวน์ลำดวนลดลงอย่างต่อเนื่อง มีปริมาณแอลกอฮอล์ของการใช้กล้าเชื้อทั้ง 3 แบบ ได้สูงสุดร้อยละ 9.43 โดยปริมาตร มีปริมาณยีสต์ในระหว่างการหมัก 4 - 5 Log CFU/ml ค่า pH อยู่ในช่วง 3.30 - 3.37 และปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.19 - 0.26

2.6.9 Ilaria Benucci *et al*. [39] ได้ศึกษาการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของยีสต์ไวน์ที่เตรียมกล้าเชื้อยีสต์แบบ Pied de Cuve สำหรับการผลิตสปาร์กลิงไวน์ ในการผลิตสปาร์กลิงไวน์ด้วยวิธีดั้งแบบ Prize de Mousse นำมาหมักในน้ำองุ่น 2 ชนิด ได้แก่ องุ่นพันธุ์ Bombino Bianco และ Chardonnay โดยใช้ยีสต์ผงสายพันธุ์ทางการค้าที่แตกต่างกัน 4 ชนิด พบว่า ยีสต์ทั้ง 4 ชนิด มีการเจริญที่แตกต่างกัน แต่มีปริมาณยีสต์ที่ใกล้เคียงกันที่ 7.91 – 8.11 Log CFU/ml คิดเป็นร้อยละ 70 – 84 ของจำนวนประชากรในการหมัก อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายได้รวดเร็วตั้งแต่ช่วงแรกของการหมัก จากนั้นค่อย ๆ ช้าในน้ำองุ่นที่มีแอลกอฮอล์ (ระยะที่ II) และช้าลงในระหว่างการใส่กล้าเชื้อยีสต์ (ระยะที่ III) และในช่วงทั้งสองระยะนี้ *Saccharomyces cerevisiae bayanus* Vitilevure DV10 มีอัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ ในระหว่างการหมัก และ *S. cerevisiae bayanus Lalvin* EC-1118 เกิดแรงดันสูงสุด

2.6.10 ชุลีพร คำแหง [11] ได้ศึกษาผลของเอนไซม์ พันธุ์ข้าวเหนียว และเชื้อยีสต์ต่อคุณภาพของสุรากลั่นชุมชน โดยใช้เอนไซมทางการค้า 2 ชนิด คือ Termamyl SC และ SAN Super 360 L ย่อยข้าวเหนียว 3 สายพันธุ คือ กข 6, กข 10 และสันป่าตอง 1 และใช้ยีสต *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุทางการค้า 4 สายพันธุ ได้แก่ Lalvin K1-V1116, Lalvin EC-1118, Enoferm BDX และ FermivinPDM พบวา ข้าวเหนียวสายพันธุกข 6 เหมาะสมในการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสุรากลั่น โดยใช้เอนไซม Termamyl SC ในปริมาณร้อยละ 0.04 และ เอนไซม SAN Super 360 L ในปริมาณร้อยละ 0.10 ต่อน้ำหนักข้าวสาร และเมื่อเติมยีสต Fermivin PDM เพื่อหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 9 วัน เมื่อสิ้นสุดการหมัก พบวา น้ำส่าที่ได้มีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 13.73 ± 0.12 โดยปริมาตร เมื่อนำไปกลั่น พบวา ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำส

า ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้เมื่อเทียบกับปริมาณแปง และประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์เมื่อเทียบกับทางทฤษฎี คือ ร้อยละ 75.93 ± 0.28, 53.92 ± 0.65 และ 94.90 ±1.14 ตามลำดับ หลังจากการปรับสุรากลั่นที่มีแรงแอลกอฮอล์ที่ร้อยละ 40 โดยปริมาตร แล้วนำไปวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี พบว่า มีปริมาณสารที่สำคัญอยู่ในเกณฑมาตรฐานของมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมสุรากลั่น มีคุณภาพดีเป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบชิม และมีต้นทุนการผลิต 44 บาท ตอลิตร

2.6.11 สุดธนู มะนีโซด [5] ได้ศึกษาการผลิตสาโทและสุรากลั่นที่ทำจากลูกเดือย โดยนำลูกเดือยพันธุ์ข้าวเหนียวเปลือกขาว (Coix Lachrymal-Jobi L.) มาต้มให้สุก จากนั้นนำมาหมักกับลูกแป้งจากแหล่งที่แตกต่างกันจำนวน 6 ชนิด ในอัตราส่วนร้อยละ 0.2 ต่อน้ำหนักลูกเดือยสุก พบว่า ณ วันที่ 10 ของการหมัก มีปริมาณแอลกอฮอล์ในช่วงร้อยละ 8.75 - 10.10 โดยปริมาตร เมื่อนำสาโทลูกเดือยที่ได้มากลั่น พบว่า สุรากลั่นจากลูกเดือยที่หมักกับลูกแป้งประเทศเวียดนาม (VTH) ได้รับการยอมรับจากผู้ทดสอบชิมสูงสุด เมื่อศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของลูกแป้ง VTN ต่อการผลิตสาโทลูกเดือย พบว่า อัตราส่วนของลูกแป้งร้อยละ 0.4 ต่อน้ำหนักลูกเดือยสุก ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดร้อยละ 10.90 ± 0.20 และเมื่อนำสาโทลูกเดือยที่ได้ไปกลั่นเป็นสุรากลั่น ลูกเดือยจะให้ปริมาณผลผลิตแอลกอฮอล์ที่ได้เทียบกับปริมาณลูกเดือยเท่ากับร้อยละ 25.12 ± 0.54 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

2.6.12 สมพร สินธารา [40] ได้ศึกษาการแยก การจัดจำแนก ยีสต์และราที่แยกได้จากลูกแป้ง ในลูกแป้งสุรา 19 ตัวอย่าง พบว่า มียีสต์ 49 ไอโซเลท และรา 35 ไอโซเลท เมื่อนำยีสต์ทั้งหมดมาทำการจัดจำแนก ยีสต์จากลูกแป้งเหล้าส่วนใหญ่เป็น *S. fibuligera* โดยมีจำนวนถึง 17 ไอโซเลท ที่เหลือเป็น *C. glabrata* (3), *C. rhagii* (2), *I. orientalis* (3), *P. anomala* (6), *P. burtonii* (2), *P. fabianii* (2), *P. heimii* (1), P. mexicana (2), *Saccharomyces cerevisiae* (1), *T. globosa* (1) และ *Trichosporon asahii* (1) สำหรับราที่พบในลูกแป้งสุราเป็น *Rhizopus* (15), *Amylomyces* (12), *Actinomucor* (5), *Aspergillus niger* group (2) และ *Mucor* (1)

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 วัตถุดิบ

1) น้ำตาลมะพร้าว (น้ำตาลปี๊บ) ห้างหุ้นส่วนจำกัด ไพศาลนันทน์ จังหวัดราชบุรี
2) ยีสต์ผงสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ทางการค้า Lalvin EC-1118

## 3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2.1 อุปกรณ์ในการชั่งปริมาณวัตถุดิบสำหรับผลิตสุรากลั่นชุมชน

3.2.1.1 เครื่องชั่งดิจิตอล ขนาด 30 กิโลกรัม ยี่ห้อ Dahongying รุ่น EC-202

3.2.1.2 เครื่องชั่งดิจิตอล ขนาด 5 กิโลกรัม ยี่ห้อ Sunford รุ่น FEH5000

3.2.1.3 ถังน้ำพลาสติก ขนาด 20 ลิตร

3.2.2 อุปกรณ์ในการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้ายีสต์ผง

3.2.2.1 เครื่องผสมแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic Stirrer) ยี่ห้อ INTLLAB รุ่น MS-500

3.2.2.2 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 2,000 และ 500 มิลลิลิตร

3.2.2.3 เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ AND รุ่น FX-2000i

3.2.3 อุปกรณ์การในวิเคราะห์

3.2.3.1 อุปกรณ์ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ Autoclave ยี่ห้อ ALP รุ่น KT-30
2) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ Water bath ยี่ห้อ HYSC LAB รุ่น WD-23B
3) ตู้ปลอดเชื้อ Laminar flow ยี่ห้อ Haier รุ่น HR1200-IIA2-D
4) จานเพาะเชื้อ (Plastic Petri dish)

3.2.3.2 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

1) กล้องจุลทรรศน์ Microscope ยี่ห้อ Motic รุ่น BA200
2) เครื่องผสมสารละลาย Vortex mixer ยี่ห้อ VELP รุ่น ZX-4
3) เครื่องตีบดผสมตัวอย่าง Stomacher ยี้ห้อ Seward รุ่น Stomacher

400 Circulator Circulator

4) ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น 5,000µl 1,000µl 200µl

5) อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น บีเกอร์ แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ ห่วงเขี่ยเชื้อ ปิเปต ขวดปรับปริมาตร (Duran) หลอดทดลอง และตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.3.3 อุปกรณ์ในการตรวจวิเคราะห์ทางเคมี

1) เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดด้วย Hand Refractometer ยี่ห้อ Atago รุ่น N-1E

2) เครื่องวัดกรด-ด่าง pH Meter ยี่ห้อ Eutech รุ่น pH 700

3) ชุดไทเทรตหาปริมาณร้อยละของกรดทั้งหมด

4) เครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี - แมสสเปคสเปคโทรมิเตอร์ Gas Chromatography - Mass Spectrometer (GCMS) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GCMS-TQ8050

5) หลอด Centrifuge ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

6) Syringe Filter 0.45 micron ขนาด 25 มิลลิเมตร

7) Syringe 20 มิลลิลิตร ยี่ห้อ NIPRO

3.2.3.4 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์คุณภาพประสาทสัมผัส

1) อุปกรณ์ในการทดสอบ

2) แบบทดสอบ

## 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.3.1 อาหารเลี้ยง

3.3.1.1 Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC Agar) ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมัน

3.3.1.2 Malt Extract Agar (MEA) ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมัน

3.3.1.3 Plate Count Agar (PCA) ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมัน

3.3.2 สารเคมี

3.3.2.1 สารละลาย Peptone ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมัน

3.3.2.2 สาร Cycloheximide ยี่ห้อ Gold Biotechnology ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.2.3 สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein) ความเข้มข้นร้อยละ 1

3.3.2.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

3.3.2.5 กรดซิตริกโมโนไฮเดรต (Citric Acid Monohydrate)

3.3.2.6 สารไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Diammonium Phosphate, DAP)

## 3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 ศึกษากระบวนการผลิตและต้นทุนในการผลิตสุรากลั่นของผู้ประกอบการ อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี ที่เป็นกรณีศึกษา

ศึกษากระบวนการผลิตและต้นทุนในการผลิตสุรากลั่น โดยสัมภาษณ์ผู้ประกอบการ ณ สถานที่ในการผลิตสุรากลั่น นำข้อมูลที่ได้มาเขียนขั้นตอนในกระบวนการผลิต และคำนวณต้นทุนในการผลิต

3.4.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ระหว่างการหมักกล้าเชื้อข้าวกล้อง

เก็บตัวอย่างกล้าเชื้อข้าวกล้องที่ใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตสุรากลั่นเป็นเวลา 3 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC Agar) (ภาคผนวก ก) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย [41] เพื่อนับจำนวนยีสต์และราทั้งหมด โดยนับจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดแยกกัน จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะต่างกัน ได้แก่ ลักษณะของโคโลนี สี ขนาด ความมันวาว และลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Streak Plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนได้เชื้อบริสุทธิ์ (Pure Culture) นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาต่อไป [42]

3.4.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และทางเคมีระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวในสถานประกอบการ

เก็บตัวอย่างน้ำส่าจากกระบวนหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อข้าวกล้อง จากโอ่งที่แช่น้ำอยู่ในอ่างซีเมนต์ ณ สถานประกอบการที่เป็นกรณีศึกษา จำนวน 4 โอ่ง ตลอดระยะเวลาการหมัก 4 วัน โดยเก็บตัวอย่างในรอบที่ 1 รอบที่ 9 และรอบที่ 40 ของการใช้กล้าเชื้อข้าวกล้อง เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างการหมัก โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC Agar เพื่อนับจำนวนยีสต์ และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ที่เติมสารละลาย Cycloheximide ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 (ภาคผนวก ก) เพื่อยับยั้งการเจริญของยีสต์ [43] เพื่อนับจำนวนแบคทีเรีย จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะต่างกัน ได้แก่ ลักษณะของโคโลนี สี ขนาด ความมันวาว และลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC Agar และอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Streak Plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA

บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนได้เชื้อบริสุทธิ์ (Pure Culture) นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาต่อไป [42]

และนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่

1) วิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Soluble Soild; TSS) (ตามมาตรฐาน AOAC, 2000)

ใช้ดรอปเปอร์ (Dropper) ดูดตัวอย่าง หยดลงบนแผ่นกระจกเครื่อง Hand Refractometer แล้วส่องดูกับแสง จากนั้นบันทึกค่าที่อ่านได้เป็นหน่วยองศาบริกซ์ (°Brix) และปรับเทียบมาตราฐาน (Standardize) ด้วยน้ำกลั่น [44]

2) การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acidity) โดยวิธีการไทเทรท (ตามมาตรฐาน AOAC, 2000)

ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 45 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาลีน 2 – 3 หยด เขย่าให้เข้ากัน ทำการไทเทรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นอร์มอล ลงในขวดรูปชมพู่จนสีของสารละลาย เปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน (โดยให้คงที่เป็นเวลา 30 วินาที) บันทึกปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ไปการคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก ดังแสดงในสมการที่ 3.1

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{N \times V(NaOH) \times 90.08 \times 100}{1{,}000 \times V(\text{Sample})} \qquad (3.1)$$

เมื่อ N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

V (NaOH) = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรต

V (Sample) = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก = 90.08

3) วิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง (pH) (AOAC, 2000)

นำตัวอย่างไปวัดค่า pH โดยใช้เครื่อง pH 700-Eutech ซึ่งได้ มีการปรับค่ามาตรฐานด้วยสารละลายมาตรฐานที่มีค่า pH เท่ากับ 4.01 7.01 และ 10.1 ตามลำดับ แล้วทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างใส่บีกเกอร์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใช้ Glass Electrode pH Meter จุ่มลงในบีกเกอร์ที่ใส่ตัวอย่าง อ่านค่าและบันทึกผลเป็นทศนิยม 2 ตำแหน่ง

4) วิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตรมิเตอร์ (Gas chromatography–mass spectrometer)

มีขั้นตอนการปฏิบัติงานรายละเอียดดังต่อไปนี้

(1) เตรียมความพร้อมและตั้งค่าการใช้งานเครื่อง ในการวิเคราะห์ทุกครั้งจะต้องตั้งค่าสภาวะที่เหมาะสมก่อนใช้งาน ดังแสดงในตารางที่ 3.1

**ตารางที่ 3.1** สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีเฟลมไอออไนเซชัน

| พารามิเตอร์ | สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ |
|---|---|
| แก๊สพา | $N_2$ |
| อัตราการไหล (ml/min) | 72 |
| อุณหภูมิ (°C) | 60 |
| อุณหภูมิของช่องฉีด (°C) | 150 |
| อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ (°C) | 200 |
| ปริมาตรที่ฉีด (µl) | 0.2 |

(2) เตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยปิเปตสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 5 10 15 และ 20 ตามลำดับ ใส่ขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย n-propanol ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3.2

**ตารางที่ 3.2** ปริมาณสารละลาย Ethanol และ n-propanol ในการเตรียมสารละลายมาตฐาน

| Standard preparation | ร้อยละ 1 (v/v) ของ EtOH (มิลลิลิตร) | ร้อยละ 1.5 (v/v) ของ n-propanol (มิลลิลิตร) | ใน ปริมาตร (มิลลิลิตร) | ความเข้มที่ได้ | | อัตราส่วน EtOH / n-propanol |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | EtOH | n-propanol | |
| S1 | 5 | 50 | 100 | 0.05 | 0.75 | 0.07 |
| S2 | 10 | 50 | 100 | 0.1 | 0.75 | 0.13 |
| S3 | 15 | 50 | 100 | 0.15 | 0.75 | 0.20 |
| S4 | 20 | 50 | 100 | 0.2 | 0.75 | 0.27 |

(3) เตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ ใช้ Syringe ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่าง กรองจุลินทรีย์ออกด้วยแผ่นกรอง Syringe Filter ขนาด 0.45 ไมครอน นำตัวอย่างที่กรองแล้ว มาปิเปตปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปิเปตตัวอย่างที่ปรับปริมาตรแล้ว ใส่ขวดตัวอย่าง (Vial) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

(4) การวิเคราะห์ ทดสอบโดยการเปรียบเทียบระหว่างสารละลายตัวอย่าง และตัวอย่าง (Sample) ในความเข้มข้นละ 3 ครั้ง เพื่อหาช่วงของพื้นที่ใต้พีคที่ใช้ได้ พื้นที่ใต้พีคที่ได้สามารถนำมาคำนวณเอทานอลได้อย่างถูกต้อง โดยพื้นที่จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นเอทานอล เมื่อวาดกราฟจะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงของเอทานอล จากการฉีดสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นแตกต่างกันก็จะได้ผลเป็นกราฟมาตรฐาน

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการหมักในรอบที่ 1 9 และ 40 ของการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้อง โดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test [47]

3.4.4 ระบุชนิดจุลินทรีย์ที่พบระหว่างการหมักด้วยวิธีการทางโมเลกุล (Molecular Techniques)

การระบุชนิดของจุลินทรีย์จากการศึกษาในข้อที่ 3.4.2 และ 3.4.3.1 นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกจนบริสุทธิ์ (Pure Culture) ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน ได้แก่ สี ขนาด ความมันวาว การสร้างสปอร์ และลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำโคโลนีที่คัดเลือกได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล ที่สามารถระบุชนิดของจุลินทรีย์ได้ถึงระดับสปีชีส์ ได้แก่ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 26S rRNA gene เพื่อระบุชนิดของยีสต์ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS rRNA region เพื่อระบุชนิดของรา และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene เพื่อระบุชนิดแบคทีเรีย ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ศึกษาความคล้ายคลึงระหว่างกลุ่มของสายดีเอ็นเอตั้งแต่สองสายขึ้นไป (Multiple Sequence Alignment) และสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic Tree) ด้วยวิธี Neighbor-joining Method [48] ด้วยโปรแกรม MEGA 11 โดยมีค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ

3.4.5 การปรับปรุงกระบวนการหมักโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์

การศึกษาปรับปรุงกระบวนการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า Lalvin EC-1118 มาทำกล้าเชื้อเหลวด้วยน้ำตาลมะพร้าวในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวก ช) นำกล้าเชื้อเหลวที่ได้ไปทดลองการหมัก ณ สถานที่การผลิตของผู้ประกอบการที่เป็นกรณีศึกษา และนำน้ำตาลมะพร้าวที่หมักได้ไปผลิตสุรากลั่น เพื่อนำมาเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคกับสุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าวแบบดั้งเดิม มีรายละเอียดดังนี้

3.4.5.1 ศึกษาการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์

นำน้ำตาลมะพร้าว (น้ำตาลปี๊บ) มาผสมน้ำจากร่องสวนให้ได้ปริมาตร 100 ลิตร ที่ปรับปริมาณของแข็งละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้น 16 องศาบริกซ์ ค่า pH ที่ 3.5 โดยเติมกรดซิตริกโมโนไฮเดรต (Citric Acid Monohydrate) เพื่อยับยั้งการปนเปื้อนของแบคทีเรีย และเติมสารไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (Diammonium Phosphate, DAP) เพื่อเป็นอาหารสำหรับเชื้อยีสต์ อัตราส่วนร้อยละ 0.1 [5] วิเคราะห์หาการเปลี่ยนทางจุลินทรีย์และเคมี เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3

3.4.5.2 เปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคต่อสุรากลั่นที่ผลิตได้

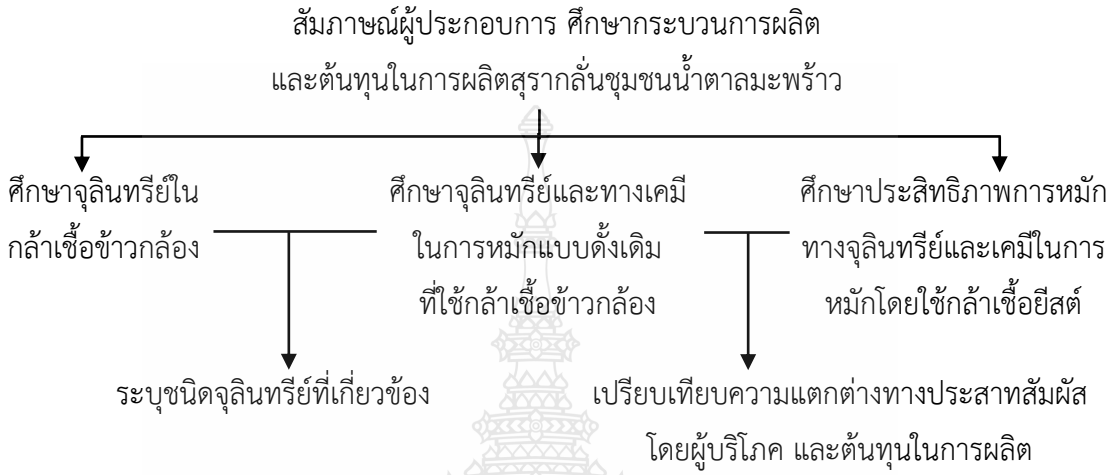
การวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัสเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์สุรากลั่นจากการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ กับสุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าวแบบดั้งเดิม ด้วยการประเมินคุณภาพทางความแตกต่าง (Difference Test) ในด้านลักษณะปรากฏ กลิ่นสุรา รสชาติสุรา ความรู้สึกหลังกลืน และความชอบโดยรวม โดยใช้ผู้บริโภคจำนวน 100 คน ด้วยวิธี Central Location Test (CLT) ณ ร้านอาหารที่จำหน่ายเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยใช้แบบประเมินคุณภาพโดยการทดสอบความชอบ (Paired Preference Test) (ภาคผนวก ฉ) โดยการเสริฟ 2 ตัวอย่างเปรียบเทียบกัน วิเคราะห์ผลโดยใช้ Binomial Distribution โดยการเปิดตาราง Critical Number of Correct Responses in a Duo–Trio or One-Sided Directional Difference Test ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อศึกษาความแตกต่างของสุรากลั่นจากน้ำตาลมะพร้าวหมักโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์และสุรากลั่นจากน้ำตาลมะพร้าวแบบดั้งเดิม [42]

3.4.6 ศึกษาต้นทุนในการผลิตสุรากลั่นโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์

จากการศึกษาในข้อที่ 3.4.2 นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาต้นทุน เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างการผลิตสุรากลั่นจากน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อข้าวกล้องของผู้ประกอบการ กับสุรากลั่นจากน้ำตาลหมักพร้าวที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์

## 3.5 ระยะเวลาและแผนปฏิบัติในการทดลอง

แผนปฏิบัติในการทดลองงานวิจัยนี้ ได้เริ่มตั้งแต่ เดือนมกราคม พ.ศ. 2562 ซึ่งได้สรุปเป็นแผนภูมิปฏิบัติ ดังแสดงในรูปที่ 3.1




**รูปที่ 3.1** แผนภูมิปฏิบัติในการทดลองงานวิจัย

## 3.6 สถานที่ทำการวิจัย

3.6.1 ห้องปฏิบัติการ สาขาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ศูนย์รังสิต

3.6.2 ห้างหุ้นส่วนจำกัด ไพศาลนันทน์ อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี

# บทที่ 4
# ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

จากการศึกษาการผลิตสุรากลั่นชุมชนของผู้ประกอบการ อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุง กระบวนการผลิตด้วยการใช้กล้าเชื้อยีสต์ ได้ผลการศึกษาดังต่อไปนี้

## 4.1 การศึกษากระบวนการผลิตและต้นทุนในการผลิตสุรากลั่นของผู้ประกอบการ อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี ที่เป็นกรณีศึกษา

จากการสัมภาษณ์ คุณวัลภา ไพศาลนันทน์ ซึ่งเป็นผู้ประกอบการผลิตสุรากลั่นชุมชน ตราไก่เก้า จัดจำหน่ายในแถบจังหวัดราชบุรี สมุทรสาคร และสมุทรสงคราม ได้ประกอบกิจการมานานกว่า 20 ปี โดยมีการผลิตสุรากลั่นชุมชน (สุราขาว) จากน้ำตาลมะพร้าว ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น ราคาถูก มีปริมาณมาก และวัตถุดิบอื่น ๆ ได้แก่ ข้าวกล้อง ลูกแป้งเหล้า แป้งข้าวเจ้า และผงสมุนไพรจีน ที่เป็นสูตรลับประจำครอบครัว โดยวัตถุดิบที่ใช้ผลิตของผู้ประกอบการแตกต่างจากการผลิตสุรากลั่นชุมชนทั่วไป ที่นิยมใช้ ได้แก่ ข้าวเหนียว กากน้ำตาล น้ำอ้อย น้ำตาลทราย น้ำตาลสด ลูกแป้งสำหรับทำสาโท ข้าวหมาก หรือสุรา และยีสต์ผง เป็นต้น [4]

### 4.1.1 กระบวนการผลิตสุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าว

ขั้นตอนกระบวนการผลิตสุรากลั่นชุมชนของผู้ประกอบการ เริ่มจากการผลิตกล้าเชื้อข้าวกล้องเพื่อใช้ในการหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ มีปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยจะผลิตกล้าเชื้อข้าวกล้องครั้งละ 4 กระสอบ เพื่อใช้หมักกับน้ำตาลมะพร้าวจำนวน 4 โอ่ง และใช้น้ำส่าจากการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้อง ครั้งละ 4 โอ่ง ต่อการกลั่นสุรา 1 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำตาลมะพร้าวเพื่อเริ่มกระบวนการหมักใหม่อีกครั้ง โดยสามารถใช้ตะกอนข้าวกล้องที่เหลือได้อย่างน้อย 40 รอบ (คือ การหมักน้ำตาลมะพร้าวเป็นเวลา 4 วัน แล้วนำน้ำหมักไปกลั่น) ขึ้นอยู่กับลักษณะของกล้าเชื้อข้าวกล้องว่ายังสมบูรณ์เป็นเมล็ดหรือไม่ ซึ่งขั้นตอนกระบวนการผลิตสุรากลั่นชุมชนของผู้ประกอบการ มีรายละเอียดที่สำคัญ ดังต่อไปนี้

**ตารางที่ 4.1** ปริมาณวัตถุดิบในการผลิตสุรากลั่นชุมชน

| วัตถุดิบ | น้ำหนัก/สูตร (กิโลกรัม) | หน่วย | ต้นทุน (บาท) | ต้นทุนต่อการผลิต (บาท) |
|---|---|---|---|---|
| ผลิตกล้าเชื้อข้าวกล้อง | | | | |
| ข้าวกล้อง | 48 | กิโลกรัม | 17 | 816 |
| ลูกแป้งเหล้า | 40 | ลูก | 5 | 200 |
| ผงสมุนไพรจีน | 4 | ถุง | 437.5 | 1,750 |
| แป้งข้าวเจ้า | 4 | กิโลกรัม | 34 | 136 |
| รวม | | | | 2,902 |
| การหมักน้ำตาลมะพร้าว | | | | |
| น้ำตาลมะพร้าว | 80 | กิโลกรัม | 30 | 2,400 |
| รวม | | | | 2,400 |

**หมายเหตุ** : ลูกแป้งเหล้า 1 ลูก หนัก 2.5 กรัม, ผงสมุนไพรจีน 1 ถุง หนัก 300 กรัม

1) การผลิตกล้าเชื้อข้าวกล้อง มีขั้นตอนการผลิตดังแสดงในรูปที่ 4.1 นำข้าวสารกล้องมาหุงบนกระทะตั้งไฟบนเตาแก๊ส (ก) ในอัตราส่วนข้าวสารกล้องต่อน้ำ 1 : 1 โดยใช้ปี๊บที่บรรจุน้ำตาลมะพร้าวในการตวงปริมาณข้าวและน้ำ หุงประมาณ 15 – 20 นาที จนน้ำเริ่มแห้ง จากนั้นพักให้พอหายร้อน 10 นาที (ข) นำลูกแป้งบดให้ละเอียด ผสมกับแป้งข้าวเจ้า และผงสมุนไพรจีนจนเข้ากัน (ค) จากนั้นคลุกกับข้าวกล้องที่พักไว้ผสมทั้งหมดให้เข้ากัน (ง) จึงนำบรรจุลงกระสอบป่าน ดังแสดงในรูปที่ 4.1 (จ) จากนั้นนำไปเก็บไว้ในห้องที่ปูพื้นด้วยผ้าใบ (ฉ) แล้วหมักไว้เป็นเวลา 3 วัน จึงได้กล้าเชื้อข้าวกล้อง

2) การหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อข้าวกล้อง มีขั้นตอนการผลิตดังแสดงในรูปที่ 4.2 เริ่มจากนำน้ำตาลมะพร้าว 20 กิโลกรัม/โอ่ง มาละลายน้ำด้วยเครื่องผสมปูนแบบมือจับ (ก) จากนั้นนำกล้าเชื้อข้าวกล้องแ (ข) และน้ำตาลมะพร้าวที่ละลายน้ำแล้ว (ค) ตามลำดับ เติมน้ำที่สูบจากร่องสวนปริมาณสามส่วนสี่ของปริมาตรโอ่ง (ง) นำผ้าใบมัดปากโอ่งด้วยยางในมอเตอร์ไซค์ปิดปากโอ่งให้สนิท แล้วปล่อยให้เกิดการหมักต่อไปอีกเป็นเวลา 4 วัน (จ)

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

(จ)

(ฉ)

**รูปที่ 4.1** (ก) การหุงข้าวกล้องบนกระทะใบบัวบนเตาแก๊ส (ข) การพักข้าวกล้องที่หุงให้เย็นด้วยเครื่องเป่าลม (ค) ส่วนผสมลูกแป้งบดละเอียด แป้งข้าวเจ้า และผงสมุนไพรจีน (ง) การคลุกข้าวกล้องกับลูกแป้ง แป้งข้าวเจ้า และผงสมุนไพรจีน (จ) กระสอบป่านบรรจุข้าว และ (ฉ) กล้าเชื้อข้าวกล้องที่หมักครบ 3 วัน

(ก) (ข)

(ค) (ง)

(จ)

**รูปที่ 4.2** (ก) การละลายน้ำตาลปี๊บด้วนเครื่องผสมปูน (ข) กล้าเชื้อข้าวกล้องและเกลือเมล็ดในโอ่ง (ค) การเทน้ำตาลปี๊ปที่ละลายน้ำลงในโอ่ง (ง) การเติมน้ำจากร่องสวนลงโอ่ง และ (จ) น้ำตาลมะพร้าวที่หมักด้วยกล้าวเชื้อข้าวกล้องในโอ่งมังกรที่แช่ในอ่างซีแมนต์

3) การผลิตสุรากลั่น มีขั้นตอนการผลิตดังแสดงใน รูปที่ 4.3 เมื่อได้น้ำส่าที่ได้จากการหมักน้ำตาลมะพร้าวที่หมักด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องเป็นระยะเวลา 4 วัน จึงสูบในส่วนเฉพาะน้ำส่า (ก) ประมาณร้อยละ 80 ของปริมาณโอ่งที่หมัก ซึ่งจะเหลือน้ำและตะกอนที่เป็นเมล็ดข้าว (ข) นำน้ำส่าที่ได้เข้าหม้อกลั่น (Pot Still) (ค) เมื่อถึงจุดเดือด โดยน้ำบริสุทธิ์มีจุดเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส และแอลกอฮอล์มีจุดเดือดที่ 78.3 องศาเซลเซียส [10] ซึ่งไอน้ำจากเครื่องกลั่นจะผ่านเข้าทางท่อทองเหลือง

ที่แช่อยู่ในบ่อน้ำมีหน้าที่เป็นเครื่องควบแน่น (Condenser) เพื่อควบแน่นไอน้ำให้เป็นน้ำสุราไหลออกมา (ง) ในขั้นตอนนี้ต้องใช้ความชำนาญของผู้ปฏิบัติ ซึ่งน้ำสุราที่กลั่นได้ทั้งหมด (ไม่ตัดส่วนใดทิ้ง) จะนำมาผสมรวมกัน จนมีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 30 โดยปริมาตร บรรจุลงถังขนาด 30 ลิตร เพื่อนำไปบรรจุลงขวดนำไปจำหน่ายต่อไป (จ)

(ก) (ข)

(ค) (ง)

(จ)

**รูปที่ 4.3** (ก) การดูดส่วนที่เป็นน้ำส่าเพื่อนำไปกลั่น (ข) ส่วนตะกอนเมล็ดข้าวและที่เหลือก้นโอ่ง (ค) เครื่องกลั่นสุราที่มีอ่างน้ำเป็น Condenser (ง) ลักษณะน้ำสุราที่กลั่นได้ และ (จ) ถังบรรจุสุรากลั่น

4) การหมักน้ำตาลมะพร้าวในรอบถัด ๆ ไป เมื่อสูบในส่วนเฉพาะน้ำส่าเพื่อนำไปกลั่น จะเหลือเมล็ดข้าวกล้อง และน้ำตะกอนบางส่วนที่อยู่ก้นโอ่ง ผู้ประกอบการจะเติมน้ำตาลมะพร้าวละลายน้ำ และน้ำจากร่องสวนอีกครั้ง เพื่อทำการหมักใหม่ เช่นเดียวกับหมักครั้งแรก โดยสามารถใช้กล้าเชื้อ

ข้าวกล้องเดิมในการหมักได้อย่างน้อย 40 ครั้ง (ทุก ๆ การหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องครบ 4 วัน ของการหมัก นับเป็น 1 ครั้ง) โดยสังเกตลักษณะของกล้าเชื้อข้าวกล้อง ถ้ากล้าเชื้อยังมีลักษณะเป็นเมล็ด ดังแสดงในรูปที่ 4.4 (ก) ผู้ประกอบการจะเติมน้ำตาลมะพร้าวหมักต่อไปเรื่อย ๆ หรือจนกว่าลักษณะของกล้าเชื้อเละ ดังแสดงในรูปที่ 4.4 (ข) จึงผลิตกล้าเชื้อข้าวกล้องใหม่

(ก) (ข)

**รูปที่ 4.4** (ก) ตะกอนเมล็ดข้าวที่สมบูรณ์ และ (ข) ตะกอนเมล็ดข้าวที่ไม่สามารถนำกลับมาใช้ได้

กระบวนการผลิตของผู้ประกอบการมีความแตกต่างจากการศึกษาของ บุษกร กิจโป้ [31] ที่ศึกษากระบวนการผลิตสุรากลั่นชุมชนจากข้าวเหนียวในจังหวัดลพบุรี โดยนำข้าวเหนียวมานึ่งจนสุก จากนั้นนำข้าวมาแช่ลงในน้ำปูนใส แล้วมาผสมกับลูกแป้ง คลุกผสมให้เข้ากัน นำใส่ลงในถังหมัก หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 3 – 5 วัน จะมีน้ำเชื่อมออกมาแล้วเติมน้ำสะอาด และปล่อยหมักทิ้งไว้อีกเป็นเวลา 7 วัน นำส่วนที่เป็นน้ำจากการหมักมากลั่น

อนึ่งยังไม่มีงานวิจัยอื่นที่ศึกษาการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้อง เช่นเดียวกับการหมักของผู้ประกอบการรายนี้ แม้ว่าจะมีผู้ประกอบการอีกหลายรายในพื้นที่สวนมะพร้าวในเขตใกล้เคียง ได้แก่ จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงคราม และเพชรบุรี

4.1.2 ต้นทุนการผลิตสุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าว

ค่าวัตถุดิบ = (กล้าเชื้อข้าวกล้อง/จำนวนครั้งที่สามารถใช้) + การหมักน้ำตาลมะพร้าว

= [(2,902)/40] + 2,400)

= 72.55 + 2,400

= 2,472.55 บาท

ค่าโสหุ้ย = ร้อยละ 30 ของค่าวัตถุดิบ

= (2,472.55 x 30)/100

= 741.76 บาท

ค่าแรงงาน = 12,000 บาทต่อเดือน หรือ 400 บาทต่อวัน

= 400 x 2

= 800 บาท

ต้นทุนผลิตภัณฑ์ = ค่าวัตถุดิบ + ค่าโสหุ้ย + ค่าแรงงาน

= 2,472.55 + 741.76 + 800

= 4,014.31 บาท

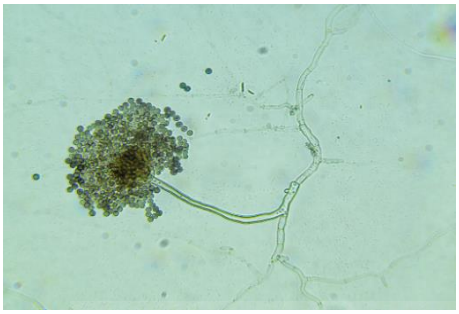
ต้นทุนในการผลิตสุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าว 1 ขวด โดยปริมาณสุรากลั่นที่กลั่นได้ขั้นต่ำ คือ 75 ลิตร เมื่อนำมาบรรจุขวด ขนาด 625 มิลลิลิตร เท่ากับสามารถผลิตสุรากลั่นได้ประมาณ 120 ขวด ต่อการกลั่น 1 ครั้ง

ดังนั้น ต้นทุนของสุรากลั่นชุมชน คือ 4,014.31 บาท / 120 ขวด เท่ากับ 33.45 บาท / ขวด

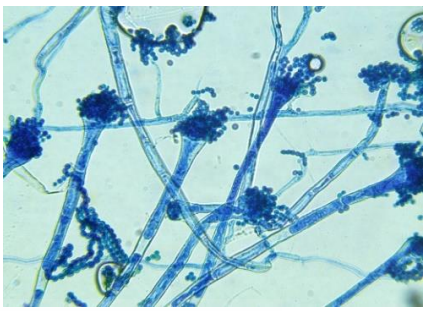
## 4.2 ผลการศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกล้าเชื้อข้าวกล้อง

จากการเก็บตัวอย่างกล้าเชื้อข้าวกล้อง โดยนับจุลินทรีย์ยีสต์และราที่พบบนอาหารเลี้ยง Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC Agar) พบว่า โคโลนีที่พบมีลักษณะคล้ายสปอร์รา 2 ไอโซเลท ได้แก่ สปอร์ขนาดเล็กมีเส้นใยสีขาว ส่วนปลายมีสปอร์สีดำ และสปอร์ขนาดกว้าง เส้นใยสีเขียว และโคโลนีคล้ายยีสต์ 1 ไอโซเลท ที่มีลักษณะกลมนูนมีขนสีขาวปกคลุม ดังแสดงในรูปที่ 4.5 เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายที่ 40 เท่า และย้อมสี Methylene Blue พบว่า ลักษณะสัณฐานวิทยาของรา RB201 มีลักษณะเป็นเส้นใยไม่มีผนังกั้นตามขวาง มีสโตลอน (Stolons) และไรซอยด์ (Rhizoids) มีแรงจิโอฟอร์ชูตรง ซึ่งมีลักษณะคล้ายราในสกุล *Rhizopus* sp. ดังแสดงในรูปที่ 4.6 (ก) และรา RB202 มีลักษณะเส้นใยมีผนังกั้นตามขวาง ไม่มีสี มีฟุตเซลล์ (Foot Cell) สร้าง Conidia ต่อกันเป็นลูกโซ่ในโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายถุง เป็นที่เกิดของแอสโคสปอร์ มีลักษณะคล้ายราในสกุล *Aspergillus* sp. [13] ดังแสดงในรูปที่ 4.6 (ข) และลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ RB108 มีลักษณะกลมรีเกาะกันเป็นกลุ่มมีเส้นใยเป็นแกน คล้ายพวงองุ่น มีลักษณะคล้ายยีสต์ในสกุล *Saccharomycopsis* sp. ดังแสดงในรูปที่ 4.6 (ค)

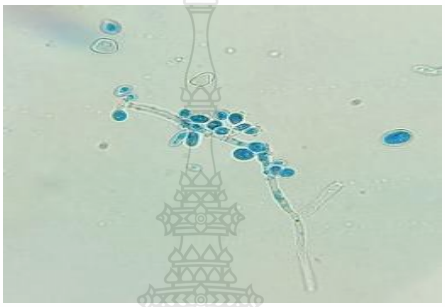
**รูปที่ 4.5** ลักษณะของจุลินทรีย์ที่พบในกล้าเชื้อข้าวกล้อง บนอาหารเลี้ยง DRBC Agar



(ก)



(ข)



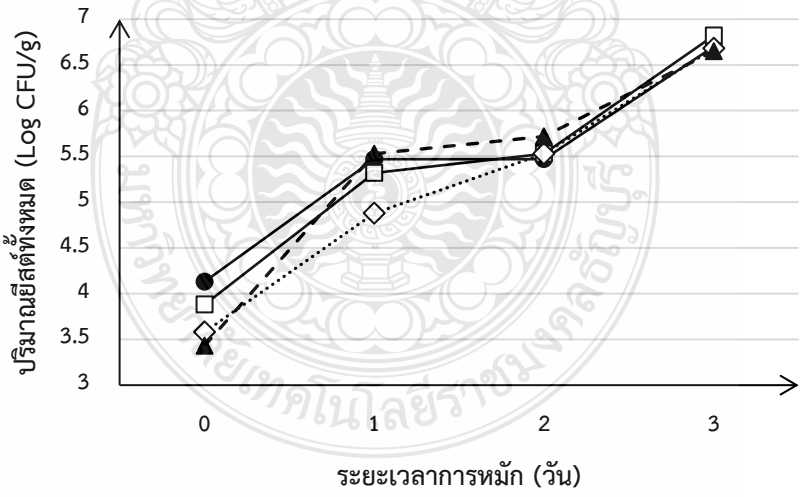
(ค)

**รูปที่ 4.6** (ก) ลักษณะสัณฐานวิทยาของรา RB201, (ข) ลักษณะสัณฐานวิทยาของรา RB202 และ (ค) ลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ RB108

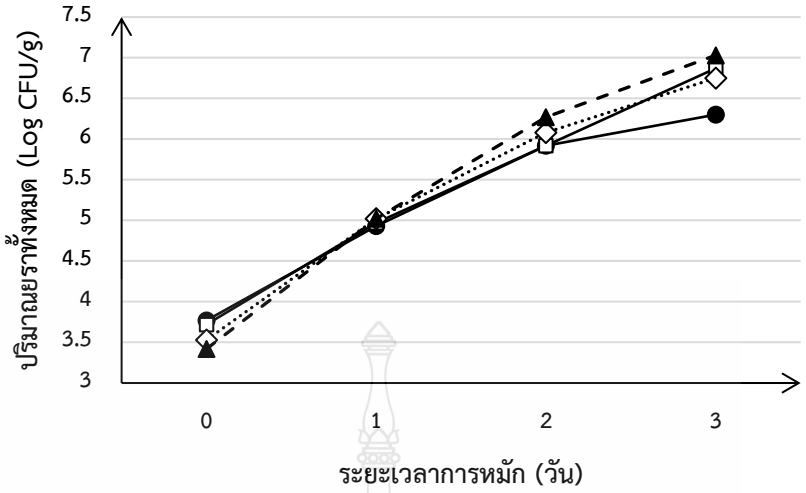
จากการศึกษาจุลินทรีย์ยีสต์และเชื้อราที่เกี่ยวข้องในกล้าเชื้อข้าวกล้อง พบว่า ลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ทั้งสอง คล้ายกับราในสกุล Rhizopus sp. และ Aspergillus sp. และยีสต์ในสกุล Saccharomycopsis sp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากในลูกแป้งสุรา เป็นต้น มีหน้าที่เปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล เรียกว่า Saccharification เป็นกระบวนการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ แอลฟา-บีตา และกลูโคอะไมเลส (α-,β- และ glucoamylase) โดยจะย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกลุเดี่ยวและคู่ สำหรับการย่อยแป้งโดยเชื้อราเป็นการหมักบนอาหารแข็งที่ เรียกว่า Solid State Fermentation [2] สอดคล้องกับงานวิจัยของอภิชญา เตชะวสัญญู [32] พบว่า ยีสต์และราที่แยกได้จากลูกแป้งสุรา จำนวน 114 ตัวอย่าง มีลักษณะคล้ายกับ *Mucor racemosus*, *Mucor indicus*, *Rhizopus microsporus* และ *Rhizopus oryzae* และยีสต์ที่แยก ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Candida glabrata* และงานวิจัยของอรอง จันทร์ประสาทสุข [33] พบว่า เชื้อราที่แยกได้มีลักษณะโคโลนี กลม ขอบโคโลนี มีสีขาว เส้นใยมีสีขาว และ

สร้างสปอร์สีเขียวอมเหลือง มี Sterigma ยื่นออกมาทำหน้าที่สร้าง Conidia ซึ่งต่อกันเป็นโซ่ ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับราในสกุล Aspergillus โดย Aspergillus sp. ที่มีเส้นใยแตกแขนงและมีผนังกั้น

เมื่อแยกลักษณะความแตกต่างของโคโลนีจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์ นำมานับโคโลนี พบว่า ลักษณะการเจริญของยีสต์และราทั้งหมดมีแนวโน้มการเจริญอย่างต่อเนื่องทั้ง 4 กระสอบ โดยมีจำนวนยีสต์เริ่มต้นในวันที่ 0 ของการหมัก 3.43 ± 0.03 – 4.13 ± 0.15 Log CFU/g จากนั้นมีจำนวนที่คงที่ในวันที่ 1 และ 2 ของการหมัก และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นน 6.65 ± 0.05 – 6.82 ± 0.08 Log CFU/g ในวันที่ 3 ของการหมัก ดังแสดงในรูป 4.7 (ก) และจำนวนราเริ่มต้นในวันที่ 0 ของการหมัก 3.42 ± 0.08 – 3.77 ± 0.08 Log CFU/g และเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเป็น 6.3 ± 0.41 – 7.03 ± 0.48 Log CFU/g ในวันที่ 3 ของการหมัก ดังแสดงในรูปที่ 4.7 (ข) แตกต่างจากการศึกษาของ เจริญ เจริญชัย [34] พบว่า แนวโน้มการเจริญของเชื้อราและยีสต์ จากลูกแป้งในการหมักข้าวเป็นระยะเวลา 4 วัน จะค่อย ๆ เจริญในระยะแรกของการหมัก และมีจำนวนรามากที่สุดหลังการหมักข้าวเป็นเวลา 2 – 3 วัน โดยมีจำนวนราเท่ากับ 4.00 – 5.00 Log CFU/g หลังจากนั้นค่อย ๆ ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากการหมักกล้าเชื้อในการศึกษานี้เป็นการหมักเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อรา และสภาพการหมักมีความชื้นน้อยกว่าการหมักข้าวเหนียวเพื่อผลิตสาโทของงานวิจัยอื่น ๆ




(ก)




(ข)

**รูปที่ 4.7** การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์และรา Log CFU/g ระหว่างกระบวนการหมักกล้าเชื้อข้าวกล้องเป็นระยะเวลา 3 วัน ณ สถานประกอบการ
(ก) ปริมาณยีสต์ และ (ข) ปริมาณเชื้อรา
(–●–) กระสอบที่ 1, (–□–) กระสอบที่ 2, (···◇···) กระสอบที่ 3, (-▲-) กระสอบที่ 4

ลักษณะการเจริญของยีสต์และราในกล้าเชื้อข้าวกล้องจะแตกต่างจากการหมักข้าวเหนียวด้วยลูกแป้ง การทำข้าวหมาก โดยพบว่าในเวลาประมาณ 10 – 12 ชั่วโมง จะมีเส้นใยสีขาวเจริญปกคลุมเมล็ดข้าว และต่อมาเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 24 – 48 ชั่วโมง เมล็ดข้าวมีความนิ่มกองเมล็ดข้าวยุบตัวลง มีน้ำซึมออกมาซึ่งเรียกว่า น้ำต้อย [6] แต่ลักษณะการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักในกล้าเชื้อข้าวกล้อง พบว่า จะมีเส้นใยสีขาวเจริญปกคลุมด้านบนกระสอบที่บรรจุกล้าเชื้อ และเมล็ดข้าวยุบตัวลงเล็กน้อย แต่ไม่มีน้ำต้อยไหลออกมา เนื่องจากองค์ประกอบของสตาร์ช (Starch) ของข้าวกล้องและข้าวเหนียวแตกต่างกัน โดยข้าวกล้องคือข้าวเจ้าที่ไม่ผ่านกระบวนการขัดสี ที่ประกอบด้วย อะไมโลส (Amylose) ร้อยละ 17 และอะไมโลเพกทิน (Amylopectin) ร้อยละ 83 แต่ในข้าวเหนียวมีอะไมโลเพกทินเป็นส่วนใหญ่ ร้อยละ 100 [45] เมื่อนำมาผ่านการทำให้สุกจะทำให้สตาร์ชในเมล็ดข้าวเกิดการเจลติไนเซชัน (Gelatinization) ทำให้ข้าวมีความนุ่มและเหนียว [2] และถูกย่อยด้วยเอนไซม์ของราจนเกิดน้ำต้อยซึมออกมา

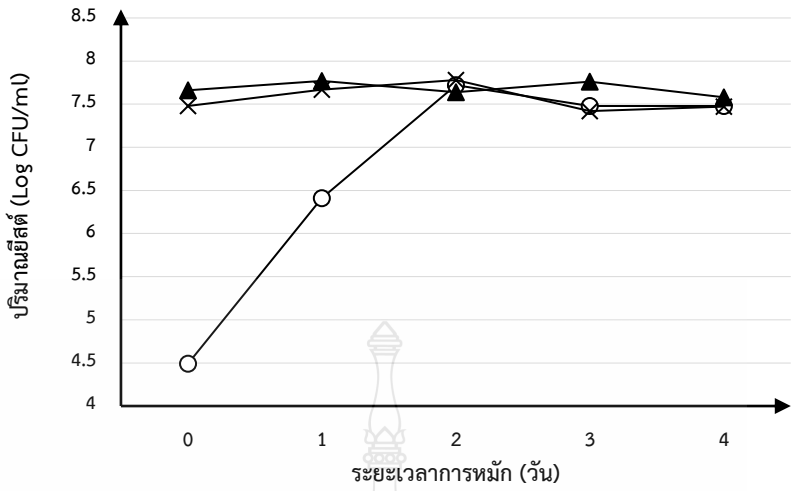
## 4.3 ผลศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และเคมีระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อข้าวกล้อง

จากการเก็บตัวอย่างน้ำส่าจากการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องทั้งหมด โดยสุ่มเก็บตัวอย่างในรอบที่ 1, 9 และ 40 ของการใช้กล้าเชื้อข้าวกล้อง ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

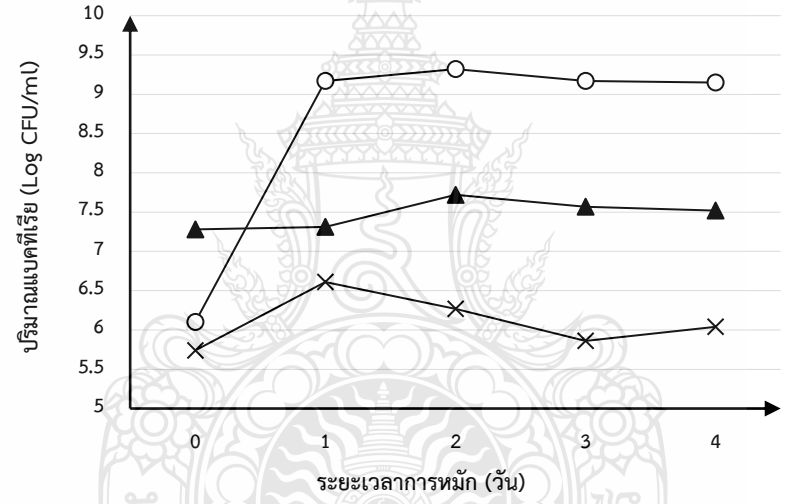
4.3.1 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก

การวิเคราะห์ด้วยวิธี Spread Plate โดยการนับเชื้อยีสต์ทั้งหมดที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC Agar พบว่า ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของปริมาณยีสต์ทั้ง 3 รอบของการใช้กล้าเชื้อข้าวกล้องใกล้เคียงกัน โดยในรอบที่ 1 ของการใช้กล้าเชื้อข้าวกล้องมีปริมาณยีสต์เริ่มต้น 4.49 ± 0.14 Log CFU/ml จากนั้นเพิ่มเป็น 6.41 ± 0.18 Log CFU/ml ในวันที่ 1 ของการหมัก และเพิ่มขึ้นเป็น 7.72 ± 0.20 Log CFU/ml ในวันที่ 2 ของการหมัก มีปริมาณยีสต์ที่คงที่ในวันที่ 3 และ 4 ที่ 7.48 ± 0.28 และ 7.47 ± 0.13 Log CFU/ml ตามลำดับ แต่เมื่อหมักน้ำตาลมะพร้าวอีกด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องเดิมถึงรอบที่ 9 และ 40 พบว่า มีปริมาณยีสต์เริ่มต้นที่สูงถึง 7.66 ± 0.13 และ 7.48 ± 0.30 Log CFU/ml ตามลำดับ ในวันที่ 1 ของการหมัก และทั้งสองรอบมีปริมาณยีสต์ที่คงที่ในวันที่ 1 ถึง 4 ของการหมักอยู่ในช่วง 7.77 ± 0.12 – 7.57 ± 012 Log CFU/ml และ 7.67 ± 0.21 – 7.47 ± 0.27 Log CFU/ml ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.8 (ก)

และการนับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่เติมสารละลาย Cycloheximide ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 พบว่า ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียทั้ง 3 รอบของการใช้กล้าเชื้อข้าวกล้องแตกต่างกัน โดยในรอบที่ 1 ของการใช้กล้าเชื้อข้าวกล้องมีปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นที่ 6.01 ± 0.10 CFU/ml จากนั้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ 9.17 ± 0.13 Log CFU/ml ในวันที่ 1 ของการหมัก และมีปริมาณที่คงที่ในวันที่ 2 ถึง 4 ของการหมัก อยู่ในช่วง 9.32 ± 0.13 – 9.18 ± 0.21 Log CFU/ml เมื่อหมักน้ำตาลมะพร้าวอีกด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องเดิมในรอบที่ 9 พบว่า มีปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นน้อยกว่าในรอบที่ 1 ที่ 7.28 ± 0.29 Log CFU/ml จากนั้นมีปริมาณคงที่ในวันที่ 1 ถึง 4 ของการหมัก อยู่ในช่วง 7.31 ± 0.28 – 7.52 ± 0.11 Log CFU/ml และเมื่อหมักในรอบที่ 40 พบว่า ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นน้อยกว่าในรอบที่ 1 และ 9 ที่ 5.74 ± 0.39 Log CFU/ml เพิ่มขึ้นเป็น 6.61 ± 0.37 Log CFU/ml ในวันที่ 1 ของการหมัก จากนั้นค่อย ๆ ลดลงและมีปริมาณที่คงที่ในวันที่ 2 ถึง 4 ของการหมัก อยู่ในช่วง 6.27 ± 0.18 – 6.04 ± 0.33 Log CFU/ml ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.8 (ข)




(ก)




(ข)

**รูปที่ 4.8** การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ (Log CFU/ml) ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อข้าวกล้องเป็นระยะเวลา 4 วัน (ก) ปริมาณยีสต์ และ (ข) ปริมาณแบคทีเรีย (-○-) รอบที่ 1, (-▲-) รอบที่ 9, (-×-) รอบที่ 40

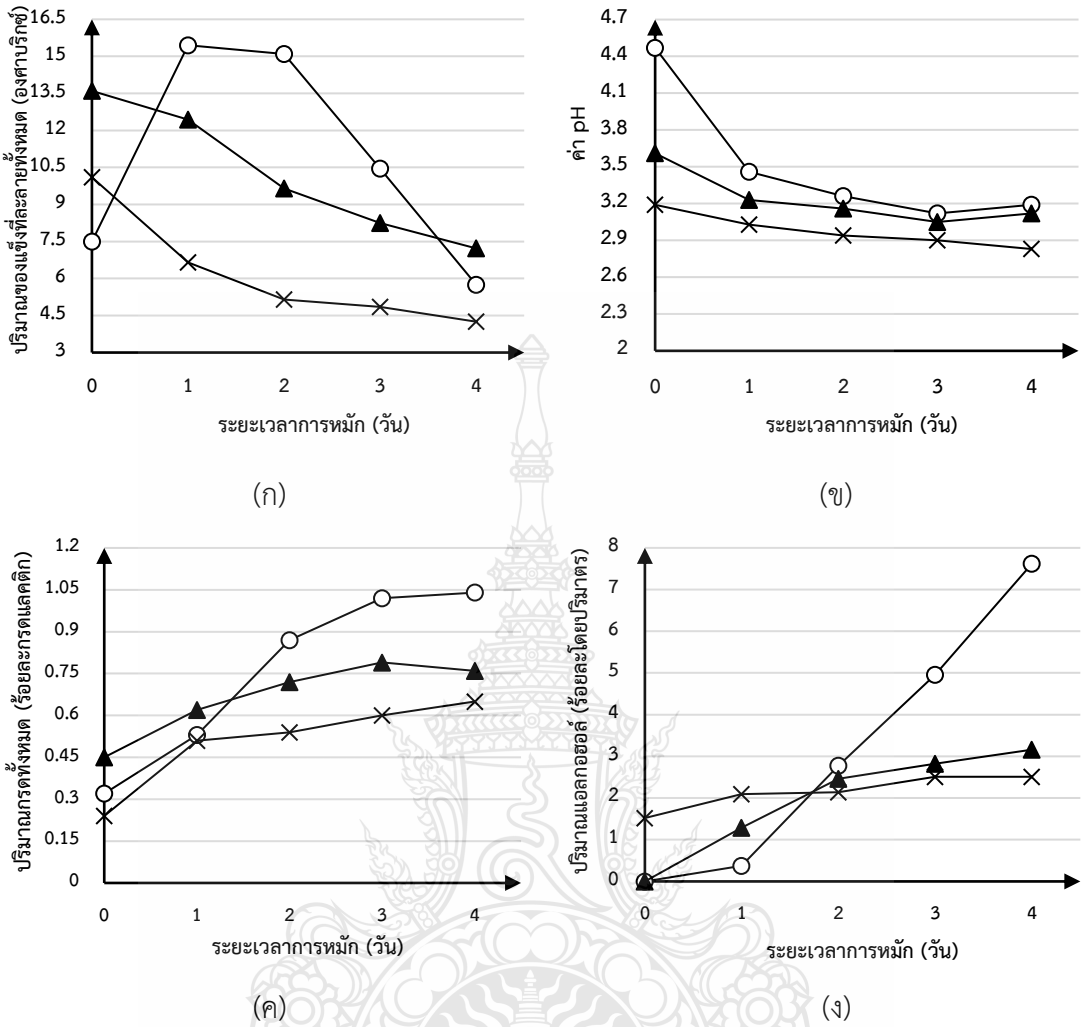
4.3.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างการหมัก

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เริ่มต้นในการหมักของทั้ง 3 รอบการใช้กล้าเชื้อข้าวกล้องไม่เท่ากัน โดยรอบที่ 1 มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้นที่ 7.5 ± 1.22 องศาบริกซ์ จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 15.45 ± 1.71 องศาบริกซ์ และเริ่มลดลงตั้งแต่วันที่ 2 ของการหมักที่ 15.10 ± 6.48 องศาบริกซ์ เมื่อครบกำหนดการหมัก พบว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเหลือ 5.75 ± 0.73 องศาบริกซ์ ซึ่งต่างจากรอบที่ 9 และรอบที่ 40 มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้นที่ 13.42 ± 4.24 และ 10.1 ± 0.67 องศาบริกซ์ ตามลำดับ และเริ่มลดลงตั้งแต่วันที่ 1 ของการหมัก จนเหลือปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 7.22 ± 3.73 และ 4.3 ± 0.61 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ในวันที่ 4 ของการหมัก ดังแสดงในรูปที่ 4.9 (ก)

ค่า pH ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อข้าวกล้องของทั้ง 3 รอบ มีความแตกต่างกัน โดยในรอบที่ 1 มีค่า pH 4.47 ± 0.10 จากนั้นลดลงอยู่ในช่วง 3.19 ± 0.06 – 3.46±0.03 ในรอบที่ 9 มีค่า pH เริ่มต้น 3.61 ± 0.04 และลดลงอยู่ในช่วง 3.23 ± 0.07 – 3.12 ± 0.07 และในรอบที่ 40 มีค่า pH เริ่มต้น 3.19 ± 0.04 จากนั้นลดลงอยู่ในช่วง 3.03 ± 0.02 – 2.84 ± 0.01 ดังแสดงในรูปที่ 4.9 (ข)

ปริมาณร้อยละของกรดทั้งหมดในรูปแบบกรดแลคติกระหว่างการหมักทั้ง 3 รอบ มีความแตกต่างกัน โดยในรอบที่ 1 มีปริมาณกรดเริ่มต้นที่ร้อยละ 0.32 ± 0.08 จากนั้นเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งวันที่ 1 ถึง 4 ของการหมัก ร้อยละ 0.53 ± 0.10 0.87 ± 0.11 1.02 ± 0.11 และ 1.04 ± 0.08 ตามลำดับ ในรอบที่ 9 มีปริมาณกรดเริ่มต้นที่ร้อยละ 0.45±0.07 จากนั้นค่อย ๆ เพิ่มขึ้น 0.62 ± 0.08 0.72 ± 0.06 0.79 ± 0.04 และ 0.76 ± 0.07 ตามลำดับ และรอบที่ 40 มีปริมาณกรดเริ่มต้นที่ร้อยละ 0.24 ± 0.02 จากนั้นค่อย ๆ เพิ่มขึ้น 0.51 ± 0.03 0.54 ± 0.03 0.60 ± 0.04 และ 0.56 ± 0.05 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.9 (ค)

ปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักทั้ง 3 รอบ มีความแตกต่างกัน โดยในรอบที่ 1 และ 9 มีปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นในวันที่ 1 ของการหมัก ร้อยละ 0.37 ± 0.27 และ 1.29 ± 0.37 โดยปริมาตร ตามลำดับ เพิ่มเป็นร้อยละ 2.78 ± 2.03 และ 2.46 ± 0.69 ตามลำดับ ในวันที่ 2 ของการหมัก เมื่อครบ 4 วัน พบว่า มีปริมารแอลกอฮอล์ที่หมักกได้ร้อยละ 7.62 ± 2.04 และ 3.16 ± 0.77 ตามลำดับ โดยในรอบที่ 40 ปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นในวันที่ 0 ร้อยละ 1.52 ± 0.33 เพิ่มเป็นร้อยละ 2.09 ± 0.23 ในวันที่ 2 ของการหมัก เมื่อครบ 4 วัน พบว่า มีปริมารแอลกอฮอล์ที่หมักกได้ร้อยละ 2.51 ± 0.42 ดังแสดงในรูปที่ 4.9 (ง)




**รูปที่ 4.9** การเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อข้าวกล้องเป็นระยะเวลา 4 วัน (ก) ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์), (ข) ค่า pH, (ค) ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละแลคติก) และ (ง) ปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละโดยปริมาตร)

(-○-) รอบที่ 1, (-▲-) รอบที่ 9, (-×-) รอบที่ 40

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และเคมีระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อข้าวกล้อง เป็นไปตามทฤษฎีการเจริญของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก [13] โดยการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และเคมีมีความสอดคล้องกัน โดยปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในรอบที่ 1 มีปริมาณเริ่มต้นที่ 7.5 ± 1.22 องศาบริกซ์ จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 15.45 ± 1.71 องศาบริกซ์ ทั้งที่เนื่องจากในการหมักครั้งที่ 1 ผู้ประกอบการไม่ได้กวนผสมน้ำตาลให้ละลายเข้ากันกับน้ำที่เติมลงไป

ทำให้ค่าวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดได้น้อย และเมื่อเวลาผ่านไปน้ำตาลละลายทำให้วัดค่าได้สูงขึ้น จากนั้นจึงมีค่าลดลง ตั้งแต่วันที่สองของการหมัก เนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลไปผลิตแอลกอฮอล์ สอดคล้องกับปริมาณยีสต์ในรอบที่ 1 มีปริมาณ 4 Log CFU/ml ซึ่งเป็นปริมาณยีสต์ที่น้อย ทำให้กระบวนการหมักช้าหรือไม่สามารถหมักได้ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ในกระบวนการหมักไวน์มะม่วง โดยในวันที่ 0 ของการหมัก มีปริมาณยีสต์ 6.30 Log CFU/ml [18] ซึ่งแตกต่างจากรอบที่ 9 และ 40 ผู้ประกอบการจะกวนส่วนผสมภายในโอ่งทั้งหมด ที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้นสูงในรอบที่ 1 และตะกอนยีสต์ที่เหลือจากการหมักครั้งก่อน ทำให้ปริมาณยีสต์ในวันเริ่มต้นการหมักรอบที่ 9 และ 40 สูงถึง 7 Log CFU/ml และมีค่า pH อยู่ในช่วง 2.8 – 3.5 ที่มีความเป็นกรดสูง เป็นปริมาณที่เหมาะต่อการเจริญของยีสต์ งานวิจัยของ กนกวรรณ วรวัฒนานนท์ และคณะ [35] ศึกษาเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์จากผลไม้ โดยใช้น้ำตาลมะพร้าว และน้ำองุ่นในการหมัก พบว่าระหว่างการหมัก 7 วัน มีค่า pH อยู่ที่ 2.65 – 3.00

ปริมาณแบคทีเรียที่พบในรอบที่ 1 สูงถึง 9 Log CFU/ml มาจากการปนเปื้อนจากน้ำร่องสวนมะพร้าวที่ใช้ในการหมัก ที่ไม่มีการปรับคุณภาพก่อนนำมาหมัก สอดคล้องกับค่า pH เริ่มต้นที่ 4.47±0.10 จึงทำให้แบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญได้ โดยแบคทีเรียสามารถเจริญในค่า pH ที่ต่ำสุด 4 – 4.5 สูงที่สุด 8.0 – 9.0 และเจริญได้ดีใน pH ประมาณ 6.8 – 7.2 แต่ยังมีแบคทีเรียทนกรดบางชนิด เช่น Lactobacillus spp. สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ pH ต่ำกว่า 3.8 – 4.7 [46] แต่เมื่อหมักในรอบที่ 9 และ 40 มีปริมาณแบคทีเรียที่ลดลง 7 และ 5 Log CFU/ml ตามลำดับ และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก มีปริมาณเริ่มต้นที่สูงถึงร้อยละ 1.04±0.08 จากนั้นลดลงเหลือ 0.76±0.07 และ 0.56±0.05 ตามลำดับ เนื่องจากในระหว่างการหมักและการเจริญของยีสต์ในธรรมชาติ จะมีการสร้างกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ออกมาจำนวนมากซึ่งเป็นปฏิกิริยาโดยตรงของยีสต์ในการใช้น้ำตาล [4] เช่นงานวิจัยของ วีระสิทธิ์ กัลป์ยากฤต และคณะ [36] ศึกษาการใช้จุลินทรีย์หัวเชื้อผสมเพื่อการผลิตลูกแป้งสาโท พบว่า ในระหว่างการหมักมีปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.55 – 0.87

สาเหตุที่ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นในรอบที่ 9 และ 40 มีปริมาณลดลง อาจเป็นเพราะเมื่อสูบน้ำไปกลั่นโดยเหลือน้ำและตะกอนก้นโอ่ง ประมาณหนึ่งในสี่ของปริมาณโอ่ง ในส่วนที่เหลือภายในโอ่งจะมีแอลกอฮอล์ และ ค่า pH 2.8 – 3.2 เมื่อเติมน้ำตาลมะพร้าวเพื่อหมักในครั้งถัดไป ทำให้ปริมาณแบคทีเรียลดลง และปริมาณแอลกอฮอล์ที่หมักได้ทั้ง 3 รอบ คือ ร้อยละ 7.62 ± 2.04 3.16 ± 0.77 และ 2.51 ± 0.42 โดยปริมาตร ซึ่งเป็นปริมาณแอลกอฮอล์ที่ต่ำกว่าปริมาณที่ควรได้จากการหมักน้ำตาล 13 – 20 องศาบริกซ์ ทั้งที่เนื่องจากสภาวะการหมักที่ไม่เหมาะสม ได้แก่ การปนเปื้อนแบคทีเรีย

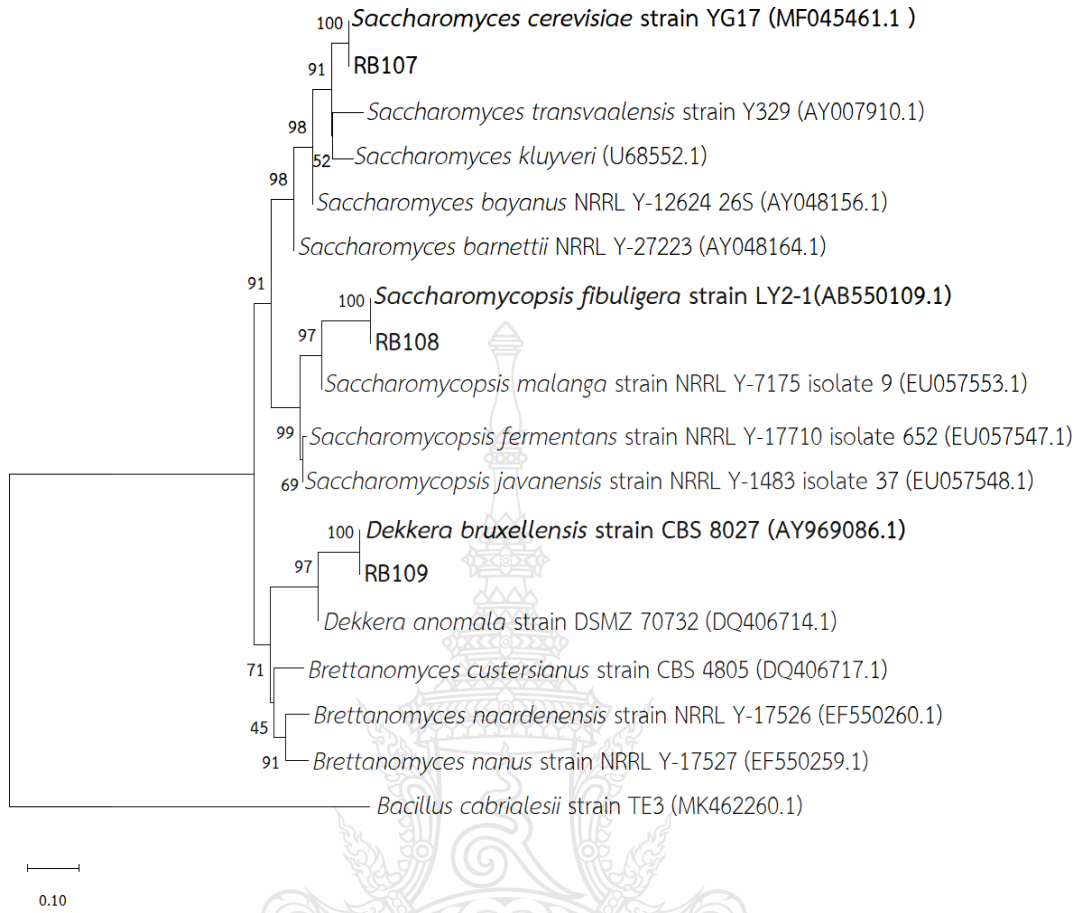
อุณหภูมิที่สูง และเวลาในการหมักสั้น โดยปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมต่อการนำมากลั่นต้องมีมากกว่าร้อยละ 7 โดยปริมาตร ขึ้นไป [4] สอดลคล้องกับงานวิชัยของ ชุลีพร คำแหง [11] ที่ศึกษาผลของเอนไซม์ย่อยข้าวเหนียว ต่อคุณภาพของสุรากลั่นชุมชน พบวา เมื่อหมักครบ 9 วัน น้ำส่าที่ได้มีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 13.73 ± 0.12 โดยปริมาตร และสุดธนู มะนีโซด [5] ที่ศึกษาการผลิตสาโทและสุรากลั่นที่ทำจากลูกเดือย พบว่า ณ วันที่ 10 ของการหมัก มีปริมาณแอลกอฮอล์ในช่วงร้อยละ 8.75 – 10.10 โดยปริมาตร ก่อนนำไปกลั่น

## 4.4 การระบุสปีชีส์ของจุลินทรีย์ที่พบในกระบวนการผลิต

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากการแยกสัณฐานวิทยาด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายที่ 40 เท่า และ 100 เท่า โดยการย้อมสี Methylene Blue และย้อมสีแกรม (Gram Staining) ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ได้แก่ ยีสต์ 3 ไอโซเลท รา 2 ไอโซเลท และแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท (ภาคผนวก ง) มาระบุสปีชีส์จัดจำแนกด้วยวิธีชีวโมเลกุลโดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain of 26S rRNA gene เพื่อระบุชนิดของยีสต์ พบว่า สปีชีส์ของยีสต์ที่คัดเลือก ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ YG17 *Saccharomycopsis fibuligera* ที่มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ LY2-1 และ *Dekkera bruxellensis* ที่มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ CBS 8027 ดังแสดงในตารางที่ 4.2 เมื่อนำไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic Tree) พบว่า RB107 คือ *Saccharomyces cerevisiae* RB108 คือ *Saccharomycopsis fibuligera* และ RB109 คือ *Dekkera bruxellensis* ดังแสดงในรูปที่ 4.10

**ตารางที่ 4.2** ผลการระบุสายพันธุ์ยีสต์ที่พบในกระบวนการผลิตโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information)

| ไอโซเลท | สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงมากที่สุด | Query cover | E value | % Identities |
|---|---|---|---|---|
| RB107 | *Saccharomyces cerevisiae* strain YG17 (MF045461.1) | 100% | 0.0 | 100% |
| RB108 | *Saccharomycopsis fibuligera* strain LY1-2 (AB550105.1) | 98% | 0.0 | 100% |
| RB109 | *Dekkera bruxellensis* strain CBS 8027 (AY969086.1) | 100% | 0.0 | 100% |

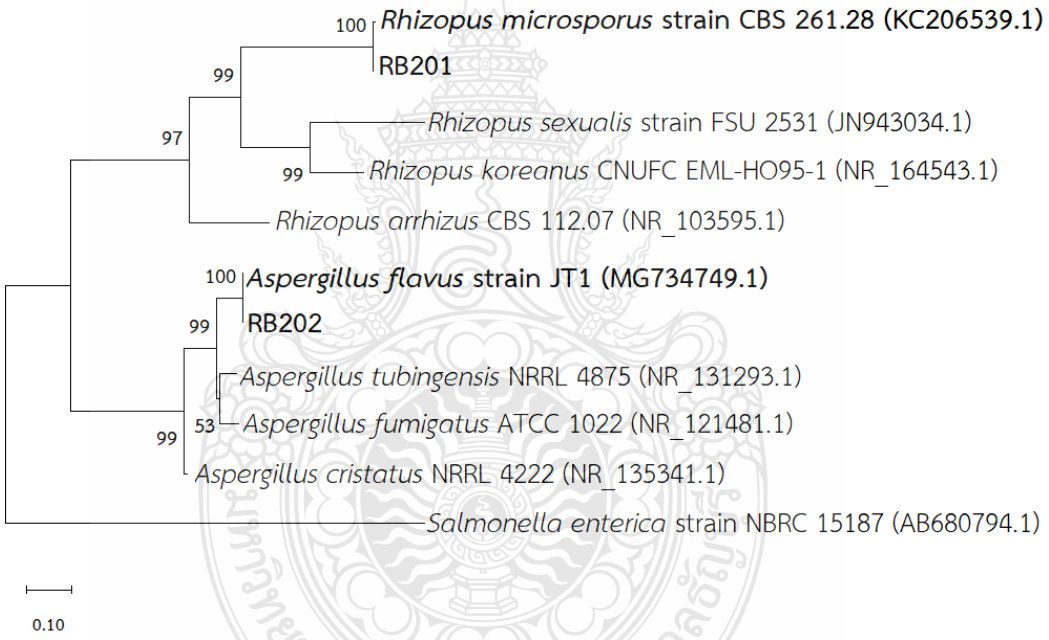



**รูปที่ 4.10** แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน D1/D2 domain of 26S rRNA gene ของยีสต์ ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยโปรแกรม MEGA 11

หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA เพื่อระบุชนิดของรา พบว่า สปีชีส์ของราที่พบ ได้แก่ *Rhizopus microsporus* ที่มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ CBS 261.28 มีความเหมือนอยู่ร้อยละ 99.00 และ *Aspergillus flavus* ที่มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ JT1 มีความเหมือนอยู่ร้อยละ 99.83 ดังแสดงในตารางที่ 4.3 เมื่อนำไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic Tree) พบว่า RB201 จัดอยู่ในกลุ่ม *Rhizopus microsporus* และ RB202 จัดอยู่ในกลุ่ม *Aspergillus flavus* ดังแสดงในรูปที่ 4.11

**ตารางที่ 4.3** ผลการระบุสายพันธุ์ราที่พบในกระบวนการผลิตโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information)

| ไอโซเลท | สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงมากที่สุด | Query cover | E value | % Identities |
|---|---|---|---|---|
| RB201 | *Rhizopus microspores* strain CBS 261.28 (MH855006.1) | 99% | 0.0 | 100% |
| RB202 | *Aspergillus flavus* strain JT1 (MG734749.1) | 100% | 0.0 | 99.83% |

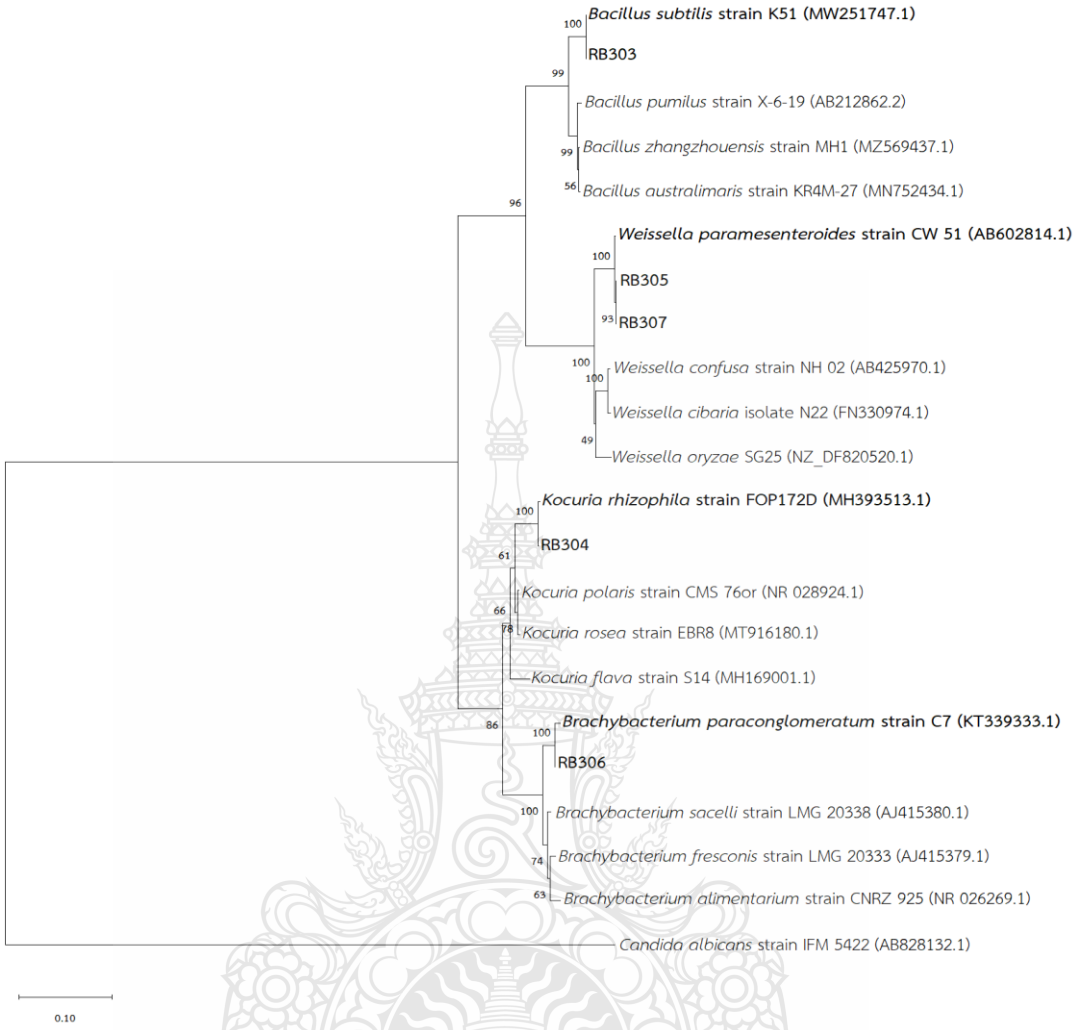



**รูปที่ 4.11** แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน ITS rDNA ของเชื้อรา ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยโปรแกรม MEGA 11

และหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรีย พบว่า สปีชีส์ของแบคทีเรียที่พบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ที่มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ K51 มีความเหมือนอยู่ร้อยละ 99.93 *Kocuria rhizophila* ที่มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ FOP172D มีความเหมือนอยู่ร้อยละ 99.46 *Weissella paramesenteroides* ที่มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ CW 51 มีความเหมือนอยู่ระหว่างร้อยละ 99.00 – 99.46 และ *Brachybacterium paraconglomeratum* ที่มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ C7 มีความเหมือนอยู่ระหว่างร้อยละ 99.00 – 99.65 ดังแสดงในตารางที่ 4.4 เมื่อนำไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic Tree) RB303 คือ *Bacillus subtilis* RB304 คือ *Kocuria rhizophila* RB305 และ RB307 คือ *Weissella paramesenteroides* RB306 คือ *Brachybacterium paraconglomeratum* ดังแสดงในรูปที่ 4.12 รายละเอียดลำดับเบสทั้ง 10 ไอโซเลท แสดงในภาคผนวก จ ซึ่งโดยทั่วไปความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละส่วนต้องมากกว่าร้อยละ 97 ขึ้นไปจึงจะจัดว่าเชื้อนั้นอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน [12]

**ตารางที่ 4.4** ผลการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียที่พบในกระบวนการผลิตโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information)

| ไอโซเลท | สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงมากที่สุด | Query cover | E value | % Identities |
|---|---|---|---|---|
| RB303 | *Bacillus subtilis* strain K51 (MW251747.1) | 100% | 0.0 | 99.93% |
| RB304 | *Kocuria rhizophila* strain FOP172D (MH393513.1) | 100% | 0.0 | 99.46% |
| RB305 | *Weissella paramesenteroides* strain CW 51 (AB602814.1) | 99% | 0.0 | 99.40% |
| RB306 | *Brachybacterium paraconglomeratum* strain C7 (KT339333.1) | 99% | 0.0 | 99.65% |
| RB307 | *Weissella paramesenteroides* strain CW 51 (AB602814.1) | 100% | 0.0 | 99.46% |




**รูปที่ 4.12** แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยโปรแกรม MEGA 11

จากการระบุสปีชีส์จุลินทรีย์ที่พบในกระบวนการผลิต พบว่า จุลินทรียที่สำคัญต่อการหมัก ได้แก่ ยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* และรา *Rhizopus microsporus* มีหน้าที่เปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล (Saccharification) [2] โดยจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด พบในระหว่างการหมักกล้าเชื้อข้าวกล้องและเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตสาร Aflatoxin ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง [13] และงานวิจัยของสมพร สินธารา [40] ที่ศึกษาการแยกและจัดจำแนกในลูกแป้งสุรา พบว่า สามารถแยกยีสต์ได้ 49 ไอโซเลท และรา 35 ไอโซเลท เมื่อนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์ พบว่า ยีสต์ที่พบส่วนใหญ่เป็น

*S. fibuligera* โดยมีจำนวนถึง 17 ไอโซเลท และเชื้อรา ได้แก่ *Rhizopus*, *Amylomyces*, *Actinomucor*, *Aspergillus niger* group และ *Mucor* และในระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อข้าวกล้อง พบยีสต์ *Dekkera bruxellensis* เป็น Anamorph ของ *Brettanomyces bruxellensis* ที่ผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลกลูโคสในสภาพที่มีอากาศ ทำให้อาหารหลายชนิดเสื่อมเสีย เช่น เบียร์ ไวน์ และแตงกวาดอง และแบคทีเรียจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* อยู่ในวงศ์ Bacillaceae เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการเน่าเสียโดยการผลิตกรด แลคติกจากน้ำตาล [13] และพบแบคทีเรีย *Kocuria rhizophila* อยู่ในวงศ์ Micrococcineae ในไฟลัม Actinobacteria จำพวก Aerobic Bacteria เจริญเติบโตใน NaCl ได้ถึงร้อยละ 10 สามารถย่อยน้ำตาลให้เป็นกรด [49] *Weissella paramesenteroides* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติก เดิมจำแนกอยู่ในกลุ่ม *Leuconostoc paramesenteroides* [50] และ *Brachybacterium paraconglomeratum* เป็นแบคทีเรียวงศ์ Dermabacteraceae ในไฟลัม Actinobacteria [51] ซึ่งแบคทีเรียที่พบทั้ง 4 ชนิด คาดว่ามาจากการปนเปื้อนจากดินที่มาจากการเติมน้ำในร่องสวนมะพร้าวระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าว ที่มีความสามารถคล้ายกัน คือ สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติก ทำให้มีผลกระทบต่อกระบวนการหมักในการผลิตแอลกอฮอล์ ทำให้ผลิตแอลกอฮอล์ได้น้อย หรือไม่ได้เลย

## 4.5 ผลการปรับปรุงกระบวนการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์

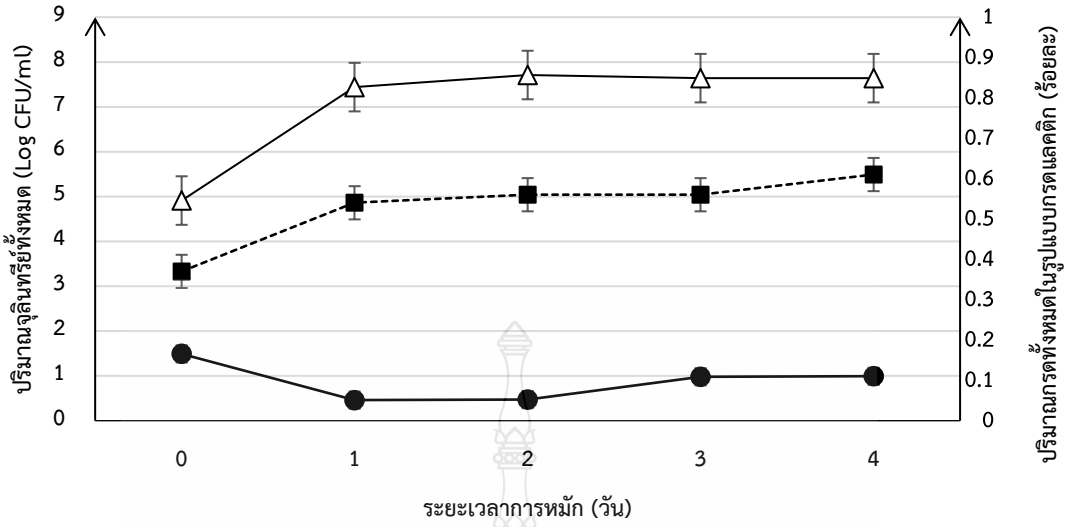
4.5.1 การเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์

จากการทดลองหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อยีสต์ โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า Lalvin EC-1118 มาทำกล้าเชื้อเหลวด้วยน้ำตาลมะพร้าว (ภาคผนวก ช) แล้วนำไปหมักในอัตราส่วนกล้าเชื้อเหลวที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ต่อปริมาตรน้ำหมัก ที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้น 16 องศาบริกซ์ ปรับค่า pH 3.5 และเติมสาร Diammonium Phosphate (DAP) ร้อยละ 1 เป็น ในน้ำหมักปริมาตร 100 ลิตร ทำการทดลอง 4 ซ้ำ หมักระยะเวลา 4 วัน ณ สถานที่ผลิตของผู้ประกอบการที่เป็นกรณีศึกษา

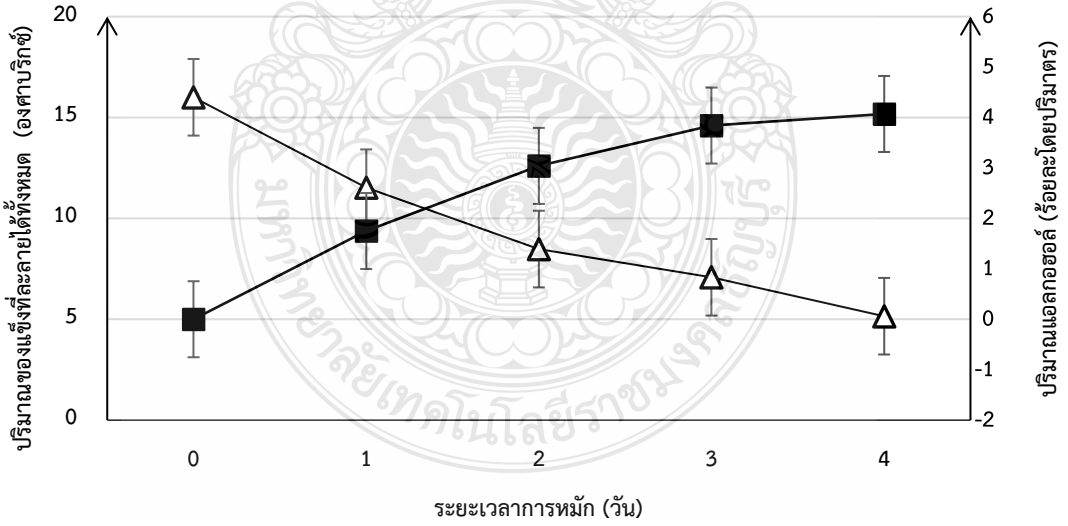
พบว่า กล้าเชื้อเหลวที่เตรียมได้มีปริมาณยีสต์ 7.89 ± 0.11 Log CFU/ml หลังเติมลงในน้ำหมักปริมาตร 100 ลิตร มีปริมาณยีสต์เริ่มต้นที่ 4.91 ± 0.07 Log CFU/ml และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 7.74 ± 0.37 Log CFU/ml ในวันที่ 1 ของการหมัก จากนั้นมีปริมาณที่คงที่ตั้งแต่วันที่ 2 – 4 ของการหมัก อยู่ในช่วง 7.64 ± 0.07 – 7.71 ± 0.13 Log CFU/ml มีปริมาณแบคทีเรียที่ต่ำอยู่ในช่วง 0.46 ± 0.62 – 1.49 ± 0.15 Log CFU/ml และมีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปแบบกรดแลคติกอยู่

ในช่วงร้อยละ 0.37 ± 0.02 – 0.61 ± 0.07 ดังแสดงในรูปที่ 4.13 และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดลดลงต่อเนื่อง ตั้งแต่วันที่ 1 ของการหมัก จนครบกำหนดการหมักมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเหลือ 5.15 ± 0.19 องศาบริกซ์ และมีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 4.07 ± 0.24 โดยปริมาตร ดังแสดงในรูปที่ 4.14

การควบคุมสภาพน้ำหมักก่อนการหมัก โดยปรับค่า pH 3.5 ที่เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ และยังสามารถควบคุมแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถเจริญในน้ำหมักที่ความเป็นกรดสูง และการใช้กล้าเชื้อยีสต์จากสายพันธุ์ทางการค้า Lalvin EC-1118 เป็นยีสต์ไวน์ที่สามารถหมักได้ดีในวัตถุดิบที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้สูง ทนแอลกอฮอล์สูง และยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียแลคติกได้ [8] สอดคล้องกับงานวิจัยต่าง ๆ ที่ได้ปรับค่า pH 3.5 ก่อนการหมัก เช่น งานวิจัยของมณชัย เดชสังกรานนท์ และคณะ [37] ที่ศึกษาการผลิตไวน์จากส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง โดยเตรียมน้ำจากส้มโอที่ปรับค่า pH 3.5 – 3.7 ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้นที่ 22 องศาบริกซ์ พบว่าในระหว่างการหมัก 10 วัน มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติกร้อยละ 0.92 – 1.02 มีปริมาณยีสต์อยู่ในช่วง 7 – 9 Log CFU/ml งานวิจัยของ นุจรี สอนสะอาด และคณะ [38] ที่ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักไวน์ลำดวนโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ต่าง ๆ โดยปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้น 20 องศาบริกซ์ ค่า pH เริ่มต้น 3.0 - 3.5 พบว่า การใช้กล้าเชื้อทุกแบบมีปริมาณยีสต์ในระหว่างการหมัก 4 – 5 Log CFU/ml ค่า pH อยู่ในช่วง 3.30 – 3.37 และปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 0.19 – 0.26 และงานวิจัยของ Ilaria Benucci *et al*. [39] ศึกษาการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของยีสต์ไวน์ที่เตรียมกล้าเชื้อยีสต์แบบ Pied de Cuve สำหรับการผลิตสปาร์กลิงไวน์ (Sprinkles Wine) พบว่ากล้าเชื้อยีสต์จากยีสต์ผงทางการค้า 4 ชนิด มีปริมาณยีสต์ในกล้าเชื้อยีสต์เริ่มต้นที่ใกล้เคียงกันที่ 7.91 – 8.11 Log CFU/ml




**รูปที่ 4.13** การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ (Log CFU/ml) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปแบบกรดแลคติก (ร้อยละ) ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อยีสต์ เป็นระยะเวลา 4 วัน (-△-) ยีสต์, (-●-) แบคทีเรีย และ (···■···) ปริมาณกรดแลคติก




**รูปที่ 4.14** การเปลี่ยนแปลงระหว่างปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) และปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละโดยปริมาตร) ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อยีสต์ เป็นระยะเวลา 4 วัน

(-△-) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และ (-■-) ปริมาณแอลกอฮอล์

4.5.2 ผลการเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคต่อสุรากลั่นที่ผลิตได้

การเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสระหว่างผลิตภัณฑ์สุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าวดั้งเดิมกับสุรากลั่นที่ผลิตได้ แล้วให้ผู้บริโภคเป้าหมายทดสอบชิม ด้วยการทดสอบผลิตภัณฑ์สุรากลั่นชุมชน และตอบแบบสอบถามโดยใช้วิธี Central Location Test (CLT) ณ ร้านอาหารที่จำหน่ายเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ จำนวน 100 คน รวบรวมแบบสอบถามทั้งหมด แล้วทำการประมวลผลค่าเฉลี่ยทางสถิติดังนี้

การเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสระหว่างผลิตภัณฑ์สุรากลั่นชุมชนที่ผลิตได้จากผู้บริโภคกลุ่มเป้าหมาย จำนวน 100 คน พบว่า ผู้บริโภคเพศหญิงมีมากกว่าเพศชาย คือ เพศหญิงร้อยละ 63 และเพศชายร้อยละ 33 อายุส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 20 – 29 ปี คิดเป็น ร้อยละ 64 รองลงมาอยู่ในช่วง 40 – 49 ปี คิดเป็นร้อยละ 13 ระดับการศึกษาอยู่ในระดับปริญญาตรี คิดเป็นร้อยละ 79 อาชีพส่วนใหญ่เป็นนิสิตนักศึกษา คิดเป็นร้อยละ 48 รองลงมาธุรกิจส่วนตัว / ค้าขาย คิดเป็นร้อยละ 19 และมีรายได้ต่อเดือนอยู่ในช่วงน้อยกว่า 10,000 บาท คิดเป็นร้อยละ 53 รองลงมา 20,000 – 29,999 บาท คิดเป็นร้อยละ 20 และมากกว่า 40,000 บาท คิดเป็นร้อยละ 16 ดังแสดงในตารางที่ 4.5

**ตารางที่ 4.5** ผลการสำรวจข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถามจำนวน 100 คน

| ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม | ความถี่ | ร้อยละ |
|---|---|---|
| 1. เพศ | | |
| ชาย | 34 | 34.00 |
| หญิง | 66 | 66.00 |
| รวม | 100 | 100.00 |
| 2. อายุ | | |
| 20 – 29 ปี | 64 | 64.00 |
| 30 – 39 ปี | 9 | 9.00 |
| 40 – 49 ปี | 13 | 13.00 |
| 50 – 59 ปี | 12 | 12.00 |
| มากกว่า 60 ปี | 2 | 2.00 |
| รวม | 100 | 100.00 |

**ตารางที่ 4.5** ผลการสำรวจข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถามจำนวน 100 คน (ต่อ)

| ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม | ความถี่ | ร้อยละ |
|---|---|---|
| 3. ระดับการศึกษา | | |
| ต่ำกว่ามัธยมศึกษา | 6 | 6.00 |
| มัธยมศึกษาตอนต้น | 1 | 1.00 |
| มัธยมศึกษาตอนปลาย / ปวช. | 1 | 1.00 |
| อนุปริญญา / ปวส. | 5 | 5.00 |
| ปริญญาตรี | 79 | 79.00 |
| สูงกว่าปริญญาตรี | 8 | 8.00 |
| รวม | 100 | 100.00 |
| 4. อาชีพ | | |
| นิสิตนักศึกษา | 48 | 48.00 |
| ข้าราชการ / พนักงานรัฐวิสากิจ | 8 | 8.00 |
| พนักงานบริษัท | 11 | 11.00 |
| ธุรกิจส่วนตัว / ค้าขาย | 19 | 19.00 |
| อาชีพอิสระ | 10 | 10.00 |
| อื่น ๆ (แม่บ้าน, ว่างงาน) | 4 | 4.00 |
| รวม | 100 | 100.00 |
| 5. รายได้เฉลี่ยต่อเดือน | | |
| น้อยกว่า 10,000 บาท | 53 | 53.00 |
| 10,000 – 19,999 บาท | 20 | 20.00 |
| 20,000 – 29,999 บาท | 5 | 5.00 |
| 30,000 – 39,999 บาท | 6 | 6.00 |
| มากกว่า 40,000 บาท | 16 | 16.00 |
| รวม | 100 | 100.00 |

จากตารางที่ 4.4 ผลการศึกษาข้อมูลทางประชากรศาสตร์ของผู้บริโภค พบว่า ส่วนใหญ่เป็นเพศหญิง ร้อยละ 66.00 โดยส่วนใหญ่มีอายุในช่วง 20 – 29 ปี มากที่สุด การศึกษาส่วนใหญ่อยู่ในระดับปริญญาตรี ร้อยละ 79.00 ส่วนใหญ่เป็นนิสิตนักศึกษา ร้อยละ 48.00 และผู้บริโภคส่วนใหญ่มีรายได้เฉลี่ยต่อเดือน น้อยกว่า 10,000 บาท ร้อยละ 53.00 มากที่สุด รองลงมา คือ 10,000 – 19,999 บาท ร้อยละ 20.00 ตามลำดับ

ในด้านข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ พบว่า ส่วนใหญ่ดื่มน้อยกว่า 1 – 2 ครั้ง/สัปดาห์ คิดเป็นร้อยละ 52.00 และรองลงมา อื่น ๆ ได้แก่ ไม่เคยดื่ม, นาน ๆ ครั้ง, แล้วแต่โอกาสสำคัญ คิดเป็นร้อยละ 29.00 สถานที่ที่สะดวกเลือกซื้อเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ส่วนใหญ่ ส่วนใหญ่ซื้อจากร้านขายของชำ คิดเป็นร้อยละ 43.00 รองลงมาซื้อตามร้านสะดวกซื้อ คิดเป็นร้อยละ 37.00 และในด้านทัศนคติต่อเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดสุรากลั่นชุมชน พบว่า ผู้บริโภคส่วนใหญ่คิดเป็นร้อยละ 70.00 เคยดื่ม และความรู้สึก เฉย ๆ กับสุรากลั่นชุมชน คิดเป็นร้อยละ 56.00 ดังแสดงในตารางที่ 4.6

**ตารางที่ 4.6** ผลข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมและทัศนคติของผู้ตอบแบบสอบถาม

| ข้อมูลเชิงพฤติกรรมของผู้ตอบแบบสอบถาม | ความถี่ | ร้อยละ |
|---|---|---|
| 1. ท่านดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ บ่อยแค่ไหน | | |
| ทุกวัน | 8 | 8.00 |
| 5 – 6 ครั้ง/สัปดาห์ | 0 | 0.00 |
| 3 – 4 ครั้ง/สัปดาห์ | 5 | 5.00 |
| 1 – 2 ครั้ง/สัปดาห์ | 6 | 6.00 |
| น้อยกว่า 1 – 2 ครั้ง/สัปดาห์ | 52 | 52.00 |
| อื่น ๆ (นาน ๆ ครั้ง และ แล้วแต่โอกาสสำคัญ) | 29 | 29.00 |
| รวม | 100 | 100.00 |
| 2. สถานที่ที่ท่านสะดวกเลือกซื้อเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ | | |
| ร้านสะดวกซื้อ | 37 | 37.00 |
| ห้างสพรรพสินค้า | 11 | 11.00 |
| ร้านขายของชำ | 43 | 43.00 |
| อื่น ๆ (ซื้อกับผู้ประกอบการโดยตรง) | 9 | 9.00 |
| รวม | 100 | 100.00 |

**ตารางที่ 4.6** ผลข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมและทัศนคติของผู้ตอบแบบสอบถาม (ต่อ)

| ข้อมูลเชิงพฤติกรรมของผู้ตอบแบบสอบถาม | ความถี่ | ร้อยละ |
|---|---|---|
| 3. ท่านเคยดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ชนิดสุรากลั่นชุมชน หรือไม่ | | |
| เคย | 70 | 70.00 |
| ไม่เคย | 30 | 30.00 |
| รวม | 100 | 100.00 |
| 4. ท่านรู้สึกอย่างไรกับเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ชนิดสุรากลั่นชุมชน | | |
| ชอบ | 21 | 21.00 |
| เฉย ๆ | 56 | 56.00 |
| ไม่ชอบ | 23 | 23.00 |
| รวม | 100 | 100.00 |

การทดสอบทางประสาทสัมผัสเพื่อศึกษาความแตกต่างที่ผลิตแบบดั้งเดิม และสุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าวที่ผลิตโดยเติมกล้าเชื้อยีสต์ โดยทดสอบความแตกต่างอย่างง่าย ในด้านลักษณะปรากฏ กลิ่นสุรา รสชาติสุรา ความรู้สึกหลังกลืน และความชอบโดยรวม พบว่า ในด้านลักษณะปรากฏของสุรากลั่นทั้ง 2 สิ่งทดลองไม่แตกต่างกัน จำนวน 77 คน แสดงว่าด้านลักษณะปรากฏไม่มีความแตกต่างในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ส่วนในด้านกลิ่นสุรา รสชาติสุรา ความรู้สึกหลังกลืน และความชอบโดยรวม ของสุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลทั้ง 2 สิ่งทดลอง แตกต่างกัน จำนวน 80, 86, 72 และ 61 คน ตามลำดับ แสดงว่า กลิ่นสุรา รสชาติสุรา ความรู้สึกหลังกลืน และความชอบโดยรวม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.00 ดังแสดงในตารางที่ 4.7

**ตารางที่ 4.7** ผลการทดสอบความแตกต่าง ระหว่างผลิตภัณฑ์สุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อยีสต์และสุรากลั่นสูตรดั้งเดิม

| คุณลักษณะ | จำนวนผู้ทดสอบ (คน) | |
|---|---|---|
| | แตกต่าง | ไม่แตกต่าง |
| ลักษณะปรากฏ* | 23 | 77 |
| กลิ่นสุรา* | 80 | 20 |
| รสชาติสุรา* | 86 | 14 |
| ความรู้สึกหลังกลืน* | 72 | 28 |
| ความชอบโดยรวม* | 61 | 39 |

**หมายเหตุ :** * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากนั้นนำสุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าวไปทดสอบในปัจจัยคุณภาพทั้ง 4 ด้าน คือ กลิ่นสุรา รสชาติสุรา ความรู้สึกหลังกลืน และความชอบโดยรวม โดยวิธีการทดสอบความชอบ Paired Preference Test เพื่อวิเคราะห์ว่าสุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าวผลิตแบบดั้งเดิม และสุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าวที่ผลิตโดยเติมกล้าเชื้อยีสต์ ผู้บริโภคมีความชอบสิ่งทดลองใดมากกว่า ซึ่งผลดังแสดงตารางที่ 4.8 พบว่า ในด้านกลิ่นสุรา รสชาติสุรา ความรู้สึกหลังกลืน และความชอบโดยรวม โดยผู้บริโภคชอบสุรากลั่นที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อยีสต์มากกว่าสุรากลั่นชุมชนที่ผลิตแบบดั้งเดิม จำนวน 51 51 54 และ 53 คน ตามลำดับ ซึ่งไม่มีลักษณะทางประสาทสัมผัสใดที่สามารถระบุความชอบผู้บริโภคว่าชอบผลิตภัณฑ์สุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลทั้ง 2 แบบมากกว่ากัน ที่ระดับความระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.00 ได้

**ตารางที่ 4.8** ผลการทดสอบระหว่างสุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อยีสต์ และแบบดั้งเดิมชอบตัวอย่างใดมากกว่า

| คุณลักษณะ | จำนวนผู้ทดสอบ (คน) | |
|---|---|---|
| | สุรากลั่นน้ำตาลมะพร้าวสูตรดังเดิม | สุรากลั่นน้ำตาลมะพร้าวกล้าเชื้อยีสต์ |
| กลิ่น$^{ns}$ | 49 | 51 |
| รสชาติ$^{ns}$ | 49 | 51 |
| ความรู้สึกหลังกลืน$^{ns}$ | 46 | 54 |
| ความชอบโดยรวม$^{ns}$ | 47 | 53 |

**หมายเหตุ :** $^{ns}$ หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 4.8 พบว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างความชอบในด้านกลิ่นสุรา รสชาติสุรา และความรู้สึกหลังกลืน ระหว่างสุรากลั่นชุมชนที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อยีสต์และแบบดั้งเดิม เนื่องจากในกระบวนการหมักยีสต์มีบทบาทสำคัญ นอกจากมีหน้าที่ในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์แล้ว ยังสามารถผลิตสารหอมระเหยที่มีกลิ่นและรสชาติที่เฉพาะ เช่น ทำให้ไวน์ที่ได้มีรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะ โดยไวน์ประเภทเดียวกันที่ผลิตจากบริษัทที่ต่างกัน อาจมีรสชาติที่ไม่เหมือนกัน เนื่องจากใช้ยีสต์สายพันธุ์ยีสต์ที่แตกต่างกัน [52] และการกลั่นสุรา คือ การแยกเอทิลแอลกอฮอล์ออกจากน้ำหมัก โดยการกลั่นสามารถแยกสารที่ไม่ต้องการออกได้ แต่ก็มีสารระเหยบางอย่าง เช่น เอสเทอร์ ที่ทำให้มีกลิ่นเฉพาะในน้ำหมัก ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของสุรากลั่นแต่ละชนิดที่ผลิตได้ [5] อาจกล่าวได้ว่าผู้ว่าผู้บริโภคไม่ได้มีความชอบสุรากลั่นชนิดใดชนิดหนึ่งมากกว่ากัน หรืออีกนัยหนึ่งสุรากลั่นที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อยีสต์แม้จะมีรสชาติแตกต่างจากสุรากลั่นที่ผลิตแบบดั้งเดิม แต่ผู้บริโภคก็ยังมีความชอบสุรากลั่นทั้งสองชนิดใกล้เคียงกัน จึงสามารถใช้เทคโนโลยีนี้ในการพัฒนาการผลิตสุรากลั่นจากน้ำตาลมะพร้าวต่อไป

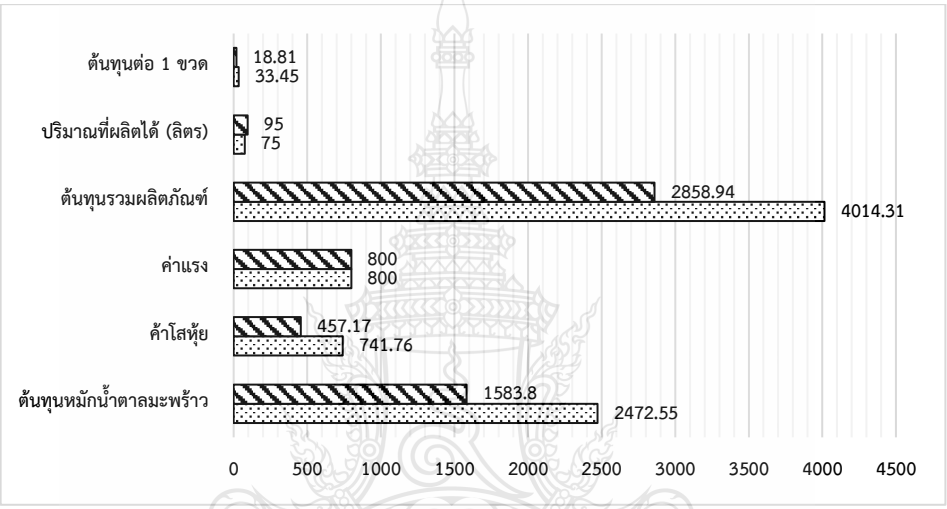
## 4.6 ต้นทุนในการผลิตสุรากลั่นโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์

จากการทดลองการผลิตสุรากลั่นโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ ณ สถานประกอบการ หจก. ไพศาลนันทน์ ซึ่งได้ผลการหมักที่ใกล้เคียงกับการผลิตสุรากลั่นชุมชนแบบดั้งเดิม หลังจากนั้นนำมาคำนวณต้นทุนการผลิต พบว่า ต้นทุนในการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ ในอัตราส่วนร้อยละ 2 ต่อปริมาตรน้ำหมัก เท่ากับ 76 บาท เมื่อนำมาหมักน้ำตาลมะพร้าวในโอ่งปริมาณ 100 ลิตร ที่ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 16 องศาบริกซ์ ปรับค่า pH 3.5 ด้วยกรดซิตริก และเติมสาร DAP ร้อยละ 0.1 มีต้นทุนวัตถุดิบในการหมัก เท่ากับ 1,507.8 บาท ดังแสดงในตารางที่ 4.9

**ตารางที่ 4.9** ปริมาณวัตถุดิบและต้นทุนผลิตสุรากลั่นโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์

| วัตถุดิบ | น้ำหนัก/สูตร | หน่วย | ต้นทุน (บาท) | หน่วย | ต้นทุนต่อการผลิต (บาท) |
|---|---|---|---|---|---|
| วัตถุดิบผลิต Starter | | | | | |
| น้ำตาลมะพร้าว | 1.8 | กิโลกรัม | 30 | กิโลกรัม | 54 |
| ยีสต์ผงสายพันธุ์ทางการค้า Lalvin EC-1118 | 2 | กรัม | 55 | ซอง | 22 |
| รวม | | | | | 76 |
| วัตถุดิบในการหมักน้ำตาลมะพร้าว | | | | | |
| น้ำตาลมะพร้าว | 48 | กิโลกรัม | 30 | กิโลกรัม | 1,440 |
| ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP) | 400 | กรัม | 150 | กิโลกรัม | 60 |
| กรดซิตริก (Citric Acid) | 200 | กรัม | 39 | กิโลกรัม | 7.8 |
| รวม | | | | | 1,507.8 |
| รวมเป็นเงินทั้งหมด | | | | 1,583.8 | |

จากกราฟแสดงต้นทุนการผลิตระหว่างสุรากลั่นชุมชนน้ำตาลมะพร้าวที่หมักด้วยกล้าเชื้อยีสต์และแบบดั้งเดิม พบว่า ต้นทุนในการผลิตสุรากลั่นด้วยกล้าเชื้อยีสต์ถูกว่าสุรากลั่นแบบดั้งเดิม โดยสามารถลดต้นทุนวัตถุดิบ คิดเป็นเงิน 888.75 บาท ค่าโสหุ้ย 284.59 บาท ต้นทุนรวมผลิตภัณฑ์ 1,155.37 บาท และต้นทุนต่อขวด 14.61 บาท สามารถผลิตสุรากลั่นได้ 95 ลิตร และนำมาบรรจุขวดขนาด 625 มิลลิลิตร สามรถบรรจุได้ 152 ขวด ซึ่งสามารถผลิตสุรากลั่นได้จำนวนที่มากกว่า และลดต้นทุนการผลิตได้มากกว่าการผลิตสุรากลั่นชุมชนแบบดั้งเดิม ดังแสดงในรูปที่ 4.15




**รูปที่ 4.15** ต้นทุนการผลิตสุรากลั่นชุมชนน้ำตาลมะพร้าวระหว่างสุรากลั่นแบบดั้งเดิมและสุรากลั่นที่เติมกล้าเชื้อยีสต์

▨ : สุรากลั่นชุมชนด้วยกล้าเชื้อยีสต์ ▨ : สุรากลั่นชุมชนแบบดั้งเดิม

# บทที่ 5
# สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การวิจัยเรื่อง การปรับปรุงกระบวนการหมักน้ำตาลมะพร้าวเพื่อผลิตสุรากลั่นชุมชน มีแนวทางเพื่อศึกษากระบวนการผลิตและต้นทุนผลิตสุรากลั่นของผู้ประกอบการเป็นกรณีศึกษา และนำข้อมูลที่ได้ปรับปรุงกระบวนการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ผง ผู้วิจัยได้สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ ดังสาระสำคัญดังต่อไปนี้

## 5.1 สรุปผลการศึกษากระบวนการผลิตและต้นทุนผลิตสุรากลั่นของผู้ประกอบการที่กรณีศึกษา

กระบวนการผลิตสุรากลั่นชุมชนของผู้ประกอบการที่เป็นกรณีศึกษา มีขั้นตอนที่สำคัญ โดยเริ่มจากการผลิตกล้าเชื้อข้าวกล้อง มีส่วนผสมวัตถุดิบ ได้แก่ ข้าวกล้อง ลูกแป้งเหล้า แป้งข้าวเจ้า และผงสมุนไพรจีน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งใช้ระยะเวลาผลิต 3 วัน โดยมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณยีสต์และราระหว่างการบ่มมีจำนวน 6.71 ± 0.15 และ 6.74 ± 0.44 Log CFU/g ตามลำดับ และพบจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Saccharomycopsis fibuligera Rhizopus microsporus* และ *Aspergillus flavus* เป็นจุลินทรีย์ที่พบมากในลูกแป้ง จากนั้นนำไปหมักกับน้ำตาลมะพร้าว (น้ำตาลปี๊บ) ในโอ่งมังกรที่เติมน้ำในร่องสวนมะพร้าวที่อยู่ข้างโรงงาน แล้วปล่อยให้เกิดการหมักอีก 4 วัน จึงสามารถนำส่วนที่เป็นน้ำส่ามาผลิตสุรากลั่นได้ ซึ่งเป็นกระบวนหมักที่เร็วกว่าการผลิตสุรากลั่นชุมชนทั่วไป และสามารถเติมน้ำตาลปี๊บลงในโอ่งมังกรเดิมที่เหลือตะกอนเมล็ดข้าวกล้องจากการนำไปกลั่นได้อีก 40 ครั้ง หรือจนกว่าเมล็ดข้าวกล้องไม่สมบูรณ์ โดยมีการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และเคมีระหว่างการหมักในระยะเวลาของการใช้กล้าเชื้อข้าวกล้องเดิม ซึ่งมีปริมาณยีสต์ที่เพียงพอต่อการหมักแอลกอฮอล์อยู่ในช่วง 7.42 ± 0.20 – 7.72 ± 0.21 Log CFU/ml ตลอดระยะเวลาการหมัก โดยสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 7.62 ± 2.04 3.16 ± 0.77 และ 2.51 ± 0.42 โดยปริมาตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณแอลกอฮอล์ที่ต่ำแต่ยังสามารถนำไปกลั่นได้ สอดคล้องกับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้นที่ไม่แน่นอน เกิดจากปริมาณของน้ำตาลมะพร้าวที่ใส่ในแต่ละครั้งไม่เท่ากัน ยีสต์ที่พบในกระบวนการหมัก ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ และ *Dekkera bruxellensis* ที่ผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลกลูโคสในสภาพที่มีอากาศ ทำให้อาหารหลายชนิดเสื่อมเสีย

เช่น เบียร์ ไวน์ และมีแตงกวาดอง และปริมาณแบคทีเรียที่สูงในช่วงแรก 9.18 ± 0.21 Log CFU/ml

## 5.2 สรุปผลการทดลองปรับปรุงกระบวนการหมักน้ำตาลมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์

การหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า Lalvin EC-1118 ที่เตรียมเป็นกล้าเชื้อเหลวอัตราส่วนร้อยละ 2 ที่ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดเริ่มต้น 16 องศาบริกซ์ ค่า pH เริ่มต้นที่ 3.5 และเติมสาร Diammonium Phosphate (DAP) ร้อยละ 0.1 พบว่า มีปริมาณยีสต์ระหว่างการหมัก 7.64 ± 0.07 – 7.71±0.13 Log CFU/ml และปริมาณแบคทีเรีย 0.70 – 1.65 Log CFU/ml มีปริมาณร้อยละกรดแลคติกอยู่ในช่วง 0.37 ± 0.01 – 0.56 ± 0.08 และสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 4.07±0.69 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปกลั่น ซึ่งสามารถผลิตสุรากลั่นได้ 95 ลิตร มีต้นทุนในผลิตสุรากลั่น 1 ครั้ง คือ 2,854.94 บาท นำมาบรรจุขวดแก้วขนาด 625 มิลลิลิตร ดังนั้นต้นทุนในการผลิตสุรากลั่น 1 ขวด เท่ากับ 18.81 บาท เมื่อนำมาเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสกับผลิตภัณฑ์สุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าวแบบดั้งเดิมของผู้ประกอบการ โดยผู้บริโภคกลุ่มเป้าหมาย ณ ร้านอาหารที่จำหน่ายเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (Central Location Test: CLT) จำนวน 100 คน พบว่า ในด้านลักษณะปรากฏ ของสุรากลั่นชุมชนทั้ง 2 สิ่งทดลองไม่แตกต่างกัน แต่ในด้านกลิ่นสุรา รสชาติสุรา ความรู้สึกหลังกลืน และความชอบโดยรวม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จึงนำปัจจัยคุณภาพทั้ง 4 ด้าน ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญไปทดสอบโดยวิธีการทดสอบความชอบ Paired Preference Test เพื่อวิเคราะห์ว่าผู้บริโภคมีความชอบสิ่งทดลองใดมากกว่า พบว่า ไม่มีลักษณะทางประสาทสัมผัสใดที่สามารถระบุความชอบผู้บริโภคว่าชอบผลิตภัณฑ์สุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลทั้ง 2 แบบมากกว่ากัน ที่ระดับความระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.00

## 5.3 ข้อเสนอแนะ

การผลิตสุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าว จังหวัดราชบุรี ที่ใช้น้ำตาลมะพร้าว ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น จึงควรเปลี่ยนจากการใช้กล้าเชื้อจากข้าวกล้องเป็นการใช้ยีสต์ผงทางการค้า เพื่อทำให้เกิดความสะดวกต่อการใช้งานที่มีต้นทุนในการผลิตที่ถูกกว่า และควรมีการควบคุมปริมาณแบคทีเรีย โดยใช้น้ำที่ผ่านระบบการกรองน้ำ R.O. (Reverse Osmosis) หรือเติมสารเคมีบางชนิดเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อนการหมัก เช่น เติมสาร Potassium Metabisulphite (KMS) ที่ให้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในการควบคุมจุลินทรีย์ปนเปื้อน หรือใช้กรดซิตริก (Citric Acid) เพื่อปรับค่า pH

ให้อยู่ในช่วง 3.5 เพื่อควบคุมการปนเปื้อนของแบคทีเรียและเหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ และควรใช้การวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Soluble Solid) ด้วย Hand Refractometer ของน้ำตาลมะพร้าวก่อนการหมักเริ่มต้นที่ 15 – 20 องศาบริกซ์ เพื่อให้ในการหมักสามารถผลิตปริมาณแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 7 โดยปริมาตร ซึ่งเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการนำมากลั่น และควรเพิ่มระยะเวลาการหมักเป็น 5 – 7 วัน เพื่อให้ยีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

# บรรณานุกรม


[1] สุมณฑา วัฒนสินธุ์, *ตำราจุลชีววิทยาทางอาหาร*, กรุงเทพมหานคร : จามจุรี โปรดักท์, 2549.

[2] วัฒนา อัจฉริยะโพธา, *วิทยาศาสตร์ชีวภาพ (อาหารหมักที่ผลิตจากจุลินทรีย์)*, พระนครศรีอยุธยา: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์, 2558.

[3] สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.), มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.32/2546), กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพมหานคร, 2546.

[4] เจริญ เจริญชัย, *การผลิตสุรากลั่นชุมชน, (ออนไลน์)*, 2554, สืบค้นจาก: https://surathai.word wordpress.com/2011/05/15/thaidistill, (25 พฤศจิกายน 2564).

[5] สุดธนู มะนีโชด, "การผลิตสาโทและสุรากลั่นที่ทำจากลูกเดือย," วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 2556.

[6] ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และ สุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, *กระบวนการและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตอาหารหมัก*, กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2560.

[7] นภา โล่ทอง, *กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต*, พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร : ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง, 2537.

[8] วันเพ็ญ จิตรเจริญ, *คู่มือไวน์เมกเกอร์-เชียงใหม่*, พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่ : เชียงใหม่พริ้นท์ติ้ง, 2556.

[9] *Distilled Sunshine, (ออนไลน์)*, 2560, สืบค้นจาก: https://distilledsunshine.wordpress com/2017/08/18/distillation-of-rum/, (22 ธันวาคม 2565).

[10] พูลเศรษฐ์ พรโสภณ, "การปรับปรุงกลิ่นของสุรากลั่นจากสายน้ำผึ้ง," วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 2553.

[11] ชุลีพร คำแหง, "ผลของเอนไซม์ พันธุ์ข้าวเหนียว และเชื้อยีสต์ต่อคุณภาพของสุรากลั่นชุมชน," วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 2548.

[12] *การเจริญของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก, (ออนไลน์)*, (ม.ม.ป), สืบค้นจาก: https://www.topp r.com/ask/question/in-which-of-the-following-phase-the-measured-optical-density-is-highest/, (25 พฤศจิกายน 2564)

# บรรณานุกรม (ต่อ)


[13] ชมพู่ ยิ้มโต, *จุลชีววิทยาทางอาหาร*, พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : ทริปเพิ้ล เอ็ดดูเคชั่น, 2558.

[14] ปิยะนุช เนียมทรัพย์, *สัณฐานวทยาของแบคทีเรีย, (ออนไลน์)*, (ม.ม.ป), สืบค้นจาก: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://www.biotech.mju.ac.th/UploadDocument/973_BI330_bacterial%20structure_1.61.pdf, (16 พฤศจิกายน 2564).

[15] *Reproduction of fungi (ออนไลน์)*, 2551, สืบค้นจาก: https://mb0804mycology.wordpress.com/2008/07/29/reproduction-of-fungi/, (16 พฤศจิกายน 2564).

[16] *ยีสต์, (ออนไลน์)*, (2565) สืบค้นได้จาก: https://th.wikipedia.org/wiki/ยีสต์, (16 พฤศจิกายน 2565).

[17] *ลักษณะทั่วไปของยีสต์, (ออนไลน์)*, (ม.ป.ป), สืบค้นได้จาก: https://quizlet.com/372823872/the-yeast-cell-fungal-cell-diagram/, (16 พฤศจิกายน 2564).

[18] ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย, พัฒนา เหล่าไพบูลย์, คณิต วิชิตพันธุ์, ลักขณา เหล่าไพบูลย์ และ สุกานดา วิชิตพันธุ์, *ไวน์ผลไม้และสาโท : ผลิตด้วยความมั่นใจได้อย่างไร*, ขอนแก่น : ศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2549.

[19] วีระ เทพกรณ์, *น้ำตาลมะพร้าว ความหวานจากภูมิปัญญาไทย*, พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพมหานคร : บริษัทไทนร่มเกล้า จำกัด, 2553.

[20] ปิยรัตน์ พูลพันธ์, “การศึกษาแนวทางในการพัฒนาคุณภาพน้ำตาลสด,” วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาการจัดการเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร, 2557.

[21] *การปาดน้ำตาลมะพร้าว (ออนไลน์)*, 2560, สืบค้นจาก: https://www.technologychaoban.com/marketing/article_22919 (24 ตุลาคม 2563).

[22] อรุณวตรี รัตนธารี, *การโน้มงวงตาล (ออนไลน์)*, 2560, สืบค้นจาก: https://www.greenery.org/articles/pleanyodtarn/, (24 ตุลาคม 2563).

[23] ฉัตรชนก ชัยวงค์, *การซึมไหลของน้ำตาลใสจากจั่นมะพร้าว (ออนไลน์)*, 2562, สืบค้นจาก: https://readthecloud.co/chiwadi/, (24 ตุลาคม 2563).

# บรรณานุกรม (ต่อ)


[24] *การรองน้ำตาลใสด้วยกระบอกพลาสติก (ออนไลน์)*, (ม.ม.ป), สืบค้นจาก: https://www.saranukromthai.or.th/sub/book/book.php?book=38&chap=5&page=t38-5-infodetail05.html, (24 ตุลาคม 2563).

[25] Suwapat Poolsap, *PLEANYODTARN: The Making of Organic Coconut Sugar (Traditional Method) (ออนไลน์)*, 2562, สืบค้นจาก: https:// alittlevacay.wixsite.com /blog/post/pleanyodtarn-the-making-of-organic-coconut-sugar-traditional-method (24 ตุลาคม 2563).

[26] *น้ำตาลปี๊บ น้ำตาลปึก (ออนไลน์)*, 2564 สืบค้นจาก: https://www.oho4sale.com/44854/, (24 ตุลาคม 2565).

[27] วรัญญา ศรีสุทัศน์กุล, “การใช้เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและการปลอมปนของน้ำตาลมะพร้าว”, วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2556.

[28] กล้าณรงค์ ศรีรอด, *เทคโนโลยีของน้ำตาล : คุณสมบัติและเทคโนโลยี*, กรุงเทพมหานคร : คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2532.

[29] Thampan P.K., *The coconut Palm and Its Products*. India : Green Villa Publishing, 1975.

[30] ณัฐธู์จิรัชยา อุตราภรณ์, “ผลของปัจจัยในการผลิตและการเก็บรักษาต่อคุณสมบัติของน้ำตาลมะพร้าว”, วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2549.

[31] บุษกร กิจโป้, “การวิเคราะห์ต้นทุนและผลตอบแทนจากการผลิตสุรากลั่นชุมชนในจังหวัดลพบุรี”, วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาเศรษฐศาสตร์เกษตร ภาควิชาเศรษฐศาสตร์เกษตรและทรัพยากร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2553.

[32] อภิชญา เตชะวสัญญู, “การแยก จำแนก และลักษณะสมบัติของยีสต์และราในลูกแป้งสุรา เพื่อการผลิตสาโท”, วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550.

# บรรณานุกรม (ต่อ)


[33] อรอง จันทร์ประสาทสุข, “การคัดแยกและจำแนกจุลินทรีย์จากลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวหมัก”, รายงานวิจัย, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, 2562.

[34] เจริญ เจริญชัย, “บทบาทของยีสต์และราจากลูกแป้งในการหมักข้าว”, รายงานวิจัย, คณะวิศวกรรมและเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, 2548.

[35] กนกวรรณ วรวัฒนานนท์, น้ำฝน บุญวิลัย และพรรษา ทองสุข, “การแยกและคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์จากผลไม้”, รายงานวิจัย, สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม, 2546.

[36] วีระสิทธิ์ กัลยากฤต, วรศักดิ์ ช่างภา, มังกร โรจน์ประภากร และปราโมทย์ ศิริโรจน์, “การศึกษาการใช้จุลินทรีย์หัวเชื้อผสมเพื่อการผลิตลูกแป้งสาโท”, *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49*, กรุงเทพมหานคร, 2554, นน. 523-531.

[37] มณชัย เดชสังกรานนท์, อมรรัตน์ สีสุกอง และสุวรรณา พิชัยยงค์วงศ์ดี, “การผลิตไวน์จากส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งด้วยกระบวนการปลอดสารเคมี”, รายงานวิจัย, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต, 2549.

[38] นุจรี สอนสะอาด, สุภาพร รผักชี และวิลาวัลย์ เกสร, “สภาวะที่เหมาะสมในการหมักไวน์ลำดวนโดยใช้กล้าเชื้อแบบตรึงเซลล์”, *วารสารเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี*, ปีที่ 1, น. 49-61 มกราคม - เมษายน 2563.

[39] I. Benucci, K. Liburdi, M. Cerreti and M. Esti, “Characterization of Active Dry Wine Yeast During Starter Culture (Pied de Cuve) Preparation for Sparkling Wine Production”, *Journal of Food Science*, vol 81, No. 8, pp. M2015-M2020, July 2016.

[40] สมพร สินธารา, “การแยก การจัดจำแนก และการเก็บรักษายีสต์และราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้าในประเทศไทย”, วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2544.

# บรรณานุกรม (ต่อ)


[41] A.D. Jr. King, A. D. Hocking and J. I. Pitt, “Dichloran-Rose Bengal medium for enumeration of moulds from foods”, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 37, pp. 959-64, June 1979.

[42] อรวรรณ พึ่งคำ, “การประยุกต์เทคโนโลยีกล้าเชื้อยีสต์สำหรับผู้ผลิตขนมตาล”, วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, 2554.

[43] อารี แก้วกนกวิจิตร, “ผลของไม้พะยอมและไม้มะเกลือที่มีต่อจุลินทรีย์ในน้ำตาลสดและน้ำตาลเมา”, วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, 2546.

[44] A.O.A.C., Official Methods of AOAC International., The Association of Official Analytical Chemists Inc. 17th ed, Verginia, 2000.

[45] รสิตา โอสถานนท์ เทคโนโลยีของธัญาหาร, กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยรามคำแหง, 2544.

[46] นฤมล มาแทน, *ปัจจัยที่สงผลต่อการเจริญของ เชื้อจุลินทรีย์ (ออนไลน์)*, 2562, สืบค้นจาก: https://essentialoil.wu.ac.th/wp-content/uploads/2019/02/ปัจจัยที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโต.pdf, (15 เมษายน 2566).

[47] ไพโรจน์ วิริยจารี, *การประเมินทางประสาทสัมผัส (Sensory Evaluation)*, เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2561.

[48] N. Saitou and M. Nei, “The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees.” *Molecular Biology and Evolution*., Vol. 4, pp. 406-425, 1987.

[49] H. Takarada, M. Sekine, H. Kosugi, Y. Matsuo, T. Fujisawa, S. Omata, E. Kishi, A. Shimizu, N. Tsukatani, S. Tanikawa, N. Fujita, S. Harayama, “Complete Genome Sequence of the Soil Actinomycete Kocuria rhizophila”. *Journal Of Bacteriology*, Vol. 190, pp. 4139–4146, 2008.

[50] E. Stackebrandt, “The Family Dermabacteraceae”, *The Prokaryotes*, pp. 289-299, 2014.

# บรรณานุกรม (ต่อ)

[51] V. Fusco, G.M. Quero, G.S. Cho, J. Kabisch, D. Meske, H. Neve, W. Bockelmann, C.M.A.P. Franz, “The genus Weissella: taxonomy, ecology and biotechnological potential”, *Frontiers in Microbiology*, Vol. 6, pp. 155, 2015.

[52] ศุภสิทธิ์ ดีรักษา, “การเปรียบเทียบคุณภาพไวน์มังคุดที่ได้จากการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ธรรมชาติและเชื้อยีสต์บริสุทธิ์”, วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, 2548.

[53] Meilgaard M., Civille G.V. and Carr, B.T., *Sensory Evaluation Techniques*. 3nded Florida : CRC Press LLC. 1999.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก
# การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

## ก.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1. อาหาร Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC AGAR)

| | | |
|---|---|---|
| Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol | 31.6 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายผงอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำกลั่นจนสารละลายหมด บรรจุในขวดปรับปริมาตร (Duran) ปิดฝาให้สนิท นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังการฆ่าเชื้อปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เทใสจานเพาะเชื้อ ๆ ละ 15-20 มิลลิลิตร ปล่อยให้วุ้นแข็งตัว

1.2 อาหาร Plate Count Agar + สารละลาย Cycloheximide ความเข้มข้นร้อยละ 0.01

| | | |
|---|---|---|
| Plate Count Agar | 22.5 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายผงอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำกลั่นจนสารละลายหมด บรรจุในขวดปรับปริมาตร (Duran) ปิดฝาให้สนิท นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังการฆ่าเชื้อปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลาย Cycloheximide ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทใสจานเพาะเชื้อ ๆ ละ 15-20 มิลลิลิตร ปล่อยให้วุ้นแข็งตัว

1.3 สารละลาย Cycloheximide ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

| | | |
|---|---|---|
| Cycloheximide | 1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

ละลายสาร Cycloheximide 1 กรัม ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร กรองส่วนผสมผ่าน Syringe Filter ขนาดช่อง 0.45 µm จะได้สารละลาย cycloheximide ความเข้มข้น 1 g/100 ml หรือ 1,000 mg/100 ml (ร้อยละ 0.1)

1.4 สารละลาย Peptone Water ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

| | | |
|---|---|---|
| Peptone water | 1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายผง Peptone Water ในน้ำกลั่นจนสารละลายหมด แบ่งบรรจุใสหลอดทดลองและขวดปรับปริมาตร (Duran) ขนาด 500 มิลลิลิตร ละ 9 และ 225 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปิดฝาใหสนิท นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

**ก-2. การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์**

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อยีสต์และรา (AOAC, 2000)

1) นำตัวอย่างกล้าเชื้อข้าวกล้อง 25 กรัม ใส่ลงในสารละลาย Peptone Water ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 225 มิลลิลิตร จากนั้น Homogenized ด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 60 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง

2) ทำ Serial dilution โดยใช้ Micropipette ขนาด 1,000 µl ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Peptone Water ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixer (ได้ความเจือจางที่ $10^{-1}$)

3) ใช้ Micropipette ปิเปตตัวอย่างในระดับความเจือจาง $10^{-1}$ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลาย Peptone ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ถัดไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixer ได้สารละลายที่มีระดับความเจือจาง $10^{-2}$ เจือจางตัวอย่างให้ได้ระดับความเจือจางถึง $10^{-5}$

4) ใช้ Micropipette ขนาด 200 µl ปิเปตสารละลาย ทีระดับความเจือจาง $10^{-1}$ ถึง $10^{-5}$ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol ที่เตรียมไว้ในข้อที่ 1.1 จำนวน 2 จาน (Duplicate) ใช้แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader) เกลี่ยเชื้อให้ทั่วจาน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง

5) ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ระหวาง 30 – 300 โคโลนี นำไปคำนวณหาจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในตัวอย่างรายงานผลเป็น CFU/g

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ (AOAC, 2000)

1) นำตัวอย่างน้ำส่าจากการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้อง โดยใช้ Micropipette ขนาด 1,000 µl ปิเปตน้ำส่า 1 มิลลิลิตร ทำ Serial Dilution ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลาย Peptone ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex จะได้ความเจือจางที่ $10^{-1}$ เจือจางตัวอย่างให้ได้ระดับความเจือจางถึง $10^{-7}$

2) ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว ในระดับ $10^{-3}$ ถึง $10^{-7}$ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้ Micropipette ขนาด 200 µl ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อที่ 1.1 เพื่อหาเชื้อยีสต์ และบนอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อที่ 1.2 เพื่อหาเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 2 จาน (Duplicate) ใช้แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader) เกลี่ยเชื้อให้ทั่วจาน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง

3) ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ระหว่าง 30 – 300 โคโลนี นำไปคำนวณหาจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในตัวอย่างรายงานผลเป็น CFU/ml

# ภาคผนวก ข

# ตารางข้อมูลวิเคราะห์ทางสถิติ

**ตารางที่ ข.1** การเปลี่ยนแปลงปริมาณรา Log CFU/g ในกล้าเชื้อข้าวกล้องระหว่างการหมัก 3 วัน

| ตัวอย่าง | ปริมาณรา Log CFU/g | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ระยะเวลาการหมัก (วัน) | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 |
| กระสอบที่ 1 | $3.77\pm0.08^{c,A}$ | $4.93\pm0.03^{a,B}$ | $5.92\pm0.10^{a,C}$ | $6.3\pm0.41^{a,C}$ |
| กระสอบที่ 2 | $3.72\pm0.08^{bc,A}$ | $4.97\pm0.15^{a,B}$ | $5.92\pm0.08^{a,C}$ | $6.87\pm0.10^{a,D}$ |
| กระสอบที่ 3 | $3.53\pm0.08^{ab,A}$ | $5.02\pm0.10^{a,B}$ | $6.08\pm0.10^{ab,C}$ | $6.75\pm0.78^{a,C}$ |
| กระสอบที่ 4 | $3.42\pm0.08^{a,A}$ | $5.02\pm0.06^{a,B}$ | $6.27\pm0.12^{b,C}$ | $7.03\pm0.48^{a,D}$ |

**หมายเหตุ :** $^{abc}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

$^{ABC}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

**ตารางที่ ข.2** การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์ Log CFU/g ในกล้าเชื้อข้าวกล้องระหว่างการหมัก 3 วัน

| ตัวอย่าง | ปริมาณยีสต์ Log CFU/g | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ระยะเวลาการหมัก (วัน) | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 |
| กระสอบที่ 1 | $4.13\pm0.15^{c,A}$ | $5.47\pm0.64^{a,B}$ | $5.47\pm0.10^{a,B}$ | $6.70\pm0.26^{a,C}$ |
| กระสอบที่ 2 | $3.88\pm0.18^{bc,A}$ | $5.32\pm0.29^{a,B}$ | $5.33\pm0.14^{ab,B}$ | $6.82\pm0.08^{a,C}$ |
| กระสอบที่ 3 | $3.58\pm0.25^{ba,A}$ | $4.88\pm1.08^{a,B}$ | $5.53\pm0.13^{ab,B}$ | $6.68\pm0.19^{a,C}$ |
| กระสอบที่ 4 | $3.43\pm0.03^{a,A}$ | $4.43\pm0.38^{a,B}$ | $5.72\pm0.08^{b,C}$ | $6.65\pm0.05^{a,D}$ |

**หมายเหตุ :** $^{abc}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

$^{ABC}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

**ตารางที่ ข.3** การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์ Log CFU/ml ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องทั้ง 3 รอบ ตลอดการหมัก 4 วัน

| รอบการหมัก | ปริมาณยีสต์ Log CFU/ml | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ระยะเวลาการหมัก (วัน) | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| รอบที่ 1 | $4.49\pm0.14^{a,A}$ | $6.41\pm0.13^{a,B}$ | $7.72\pm0.21^{a,C}$ | $7.48\pm0.23^{ab,C}$ | $7.47\pm0.13^{a,C}$ |
| รอบที่ 9 | $7.66\pm0.14^{b,A}$ | $7.62\pm0.08^{b,A}$ | $7.64\pm0.26^{a,A}$ | $7.66\pm0.17^{a,A}$ | $7.58\pm0.09^{a,A}$ |
| รอบที่ 40 | $7.48\pm0.44^{b,A}$ | $7.67\pm0.21^{b,A}$ | $7.61\pm0.29^{a,A}$ | $7.42\pm0.20^{a,A}$ | $7.47\pm0.30^{a,A}$ |

**หมายเหตุ :** $^{abc}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

$^{ABC}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

**ตารางที่ ข.4** การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรีย Log CFU/ml ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องทั้ง 3 รอบ ตลอดการหมัก 4 วัน

| รอบการหมัก | ปริมาณแบคทีเรีย Log CFU/ml | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ระยะเวลาการหมัก (วัน) | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| รอบที่ 1 | $6.1\pm0.14^{a,A}$ | $9.17\pm0.14^{c,B}$ | $9.32\pm0.15^{c,B}$ | $9.17\pm0.09^{c,B}$ | $9.18\pm0.21^{c,B}$ |
| รอบที่ 9 | $7.28\pm0.22^{b,A}$ | $7.31\pm0.14^{b,AB}$ | $7.72\pm0.17^{b,C}$ | $7.57\pm0.19^{b,BC}$ | $7.52\pm0.11^{b,ABC}$ |
| รอบที่ 40 | $5.74\pm0.40^{a,A}$ | $6.61\pm0.12^{a,C}$ | $6.27\pm0.17^{a,BC}$ | $5.86\pm0.06^{a,A}$ | $6.04\pm0.33^{a,AB}$ |

**หมายเหตุ :** $^{abc}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

$^{ABC}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

**ตารางที่ ข.5** การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องทั้ง 3 รอบ ตลอดการหมัก 4 วัน

| รอบการหมัก | ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ระยะเวลาการหมัก (วัน) | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| รอบที่ 1 | $7.5\pm1.35^{a,A}$ | $15.15\pm1.85^{c,B}$ | $15.10\pm6.48^{c,B}$ | $10.40\pm5.49^{b,AB}$ | $5.75\pm0.81^{ab,A}$ |
| รอบที่ 9 | $13.42\pm4.65^{c,C}$ | $12.43\pm4.55^{b,BC}$ | $9.62\pm4.05^{b,AB}$ | $8.25\pm4.27^{b,A}$ | $7.23\pm4.11^{b,A}$ |
| รอบที่ 40 | $10.10\pm0.74^{b,D}$ | $6.65\pm0.93^{a,C}$ | $5.15\pm0.93^{a,B}$ | $4.88\pm0.65^{a,B}$ | $4.33\pm0.67^{a,A}$ |

**หมายเหตุ :** $^{abc}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

$^{ABC}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

**ตารางที่ ข.6** การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด – ด่าง (pH) ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องทั้ง 3 รอบ ตลอดการหมัก 4 วัน

| รอบการหมัก | ความเป็นกรด-ด่าง (pH) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ระยะเวลาการหมัก (วัน) | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| รอบที่ 1 | $4.47\pm0.10^{c,E}$ | $3.46\pm0.03^{c,D}$ | $3.26\pm0.05^{c,C}$ | $3.12\pm0.07^{c,A}$ | $3.19\pm0.06^{c,B}$ |
| รอบที่ 9 | $3.61\pm0.04^{b,D}$ | $3.23\pm0.07^{b,C}$ | $3.16\pm0.08^{b,B}$ | $3.05\pm0.08^{b,A}$ | $3.12\pm0.07^{b,B}$ |
| รอบที่ 40 | $3.19\pm0.04^{a,E}$ | $3.03\pm0.02^{a,D}$ | $2.94\pm0.02^{a,C}$ | $2.91\pm0.01^{a,B}$ | $2.84\pm0.01^{a,A}$ |

**หมายเหตุ :** $^{abc}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

$^{ABC}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

**ตารางที่ ข.7** การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละโดยปริมาตร) ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องทั้ง 3 รอบ ตลอดการหมัก 4 วัน

| รอบการหมัก | ปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละโดยปริมาตร) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ระยะเวลาการหมัก (วัน) | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| รอบที่ 1 | $0.00\pm0.00^{a,A}$ | $0.37\pm0.27^{a,A}$ | $2.73\pm2.03^{a,B}$ | $4.96\pm3.43^{b,C}$ | $7.62\pm2.04^{b,D}$ |
| รอบที่ 9 | $0.00\pm0.00^{a,A}$ | $1.29\pm0.37^{b,B}$ | $2.46\pm0.69^{a,C}$ | $2.82\pm0.65^{a,CD}$ | $3.16\pm0.77^{a,D}$ |
| รอบที่ 40 | $1.52\pm0.33^{b,A}$ | $2.09\pm0.23^{c,B}$ | $2.14\pm0.26^{a,B}$ | $2.30\pm0.34^{a,BC}$ | $2.51\pm0.42^{a,C}$ |

**หมายเหตุ :** $^{abc}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

$^{ABC}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

**ตารางที่ ข.8** การเปลี่ยนแปลงปริมาณของกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดแลคติก) ระหว่างการหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อข้าวกล้องทั้ง 3 รอบ ตลอดการหมัก 4 วัน

| รอบการหมัก | ปริมาณของกรดแลคติกทั้งหมด (ร้อยละ) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ระยะเวลาการหมัก (วัน) | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| รอบที่ 1 | $3.20\pm0.74^{b,A}$ | $5.14\pm0.93^{b,B}$ | $8.67\pm1.02^{c,C}$ | $10.10\pm0.92^{c,D}$ | $10.34\pm0.76^{c,D}$ |
| รอบที่ 9 | $4.49\pm0.68^{c,A}$ | $6.06\pm0.69^{c,B}$ | $7.11\pm0.54^{b,C}$ | $7.37\pm0.62^{b,C}$ | $7.53\pm0.62^{b,C}$ |
| รอบที่ 40 | $2.32\pm0.25^{a,A}$ | $4.21\pm0.21^{a,B}$ | $5.24\pm0.35^{a,C}$ | $5.94\pm0.38^{a,D}$ | $6.47\pm0.44^{a,E}$ |

**หมายเหตุ :** $^{abc}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

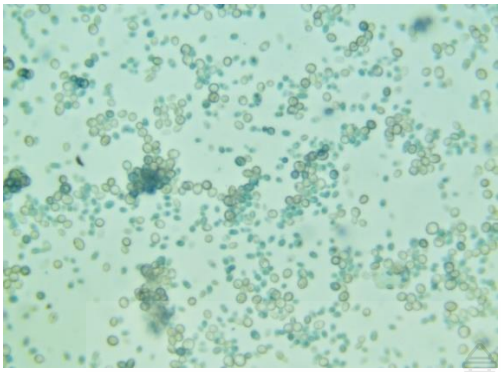
$^{ABC}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p\leq0.05$)

**ตารางที่ ข.9** การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และเคมีระหว่างหมักน้ำตาลมะพร้าวด้วยกล้าเชื้อยีสต์

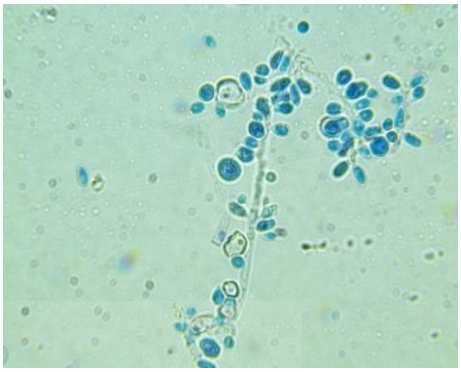
| คุณภาพ | ระยะเวลาการหมัก (วัน) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| ปริมาณยีสต์ (Log CFU/ml) | 6.91±0.07$^{A}$ | 7.44±0.37$^{B}$ | 7.71±0.13$^{B}$ | 7.64±0.07$^{B}$ | 7.64±0.13$^{B}$ |
| ปริมาณแบคทีเรีย (Log CFU/ml) | 1.49±0.15$^{B}$ | 0.46±0.62$^{A}$ | 0.47±0.57$^{A}$ | 0.98±0.71$^{AB}$ | 0.99±0.67$^{ApB}$ |
| ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) | 16.00±0.00$^{E}$ | 11.52±0.79$^{D}$ | 8.48±0.94$^{C}$ | 7.08±0.75$^{B}$ | 5.15±0.19$^{A}$ |
| ปริมาณของกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดแลคติก) | 0.37±0.01$^{A}$ | 0.54±0.10$^{B}$ | 0.56±0.10$^{B}$ | 0.60±0.08$^{B}$ | 0.56±0.08$^{B}$ |
| ปริมาณแอลกอฮอล์ (โดยปริมาตร) | 0.00±0.00$^{A}$ | 1.76±0.49$^{B}$ | 3.04±0.34$^{C}$ | 3.84±0.21$^{D}$ | 4.07±0.24$^{D}$ |

**หมายเหตุ :** $^{ABC}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

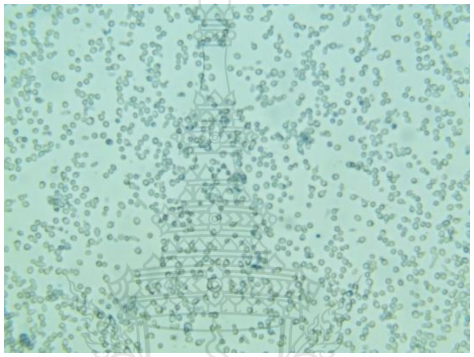
# ภาคผนวก ค
# ผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์



**ยีสต์ ไอโซเลต RB107**

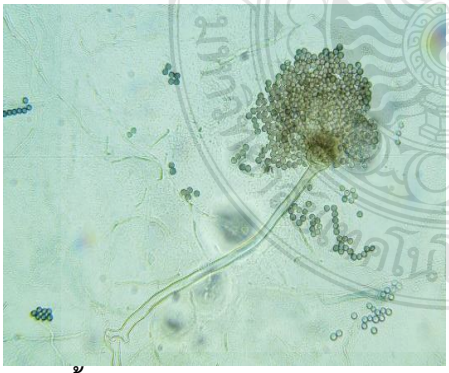


**ยีสต์ ไอโซเลต RB108**

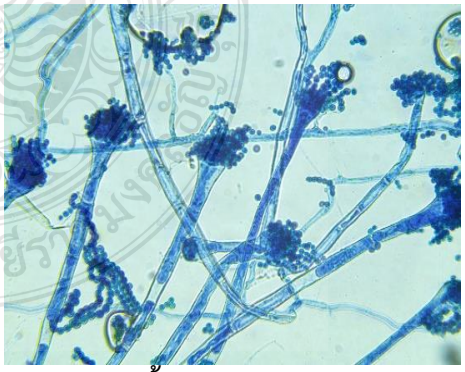


**ยีสต์ ไอโซเลต RB109**

**รูปที่ ค.1** ลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายที่ 40 เท่า โดยการย้อมสี Methylene Blue

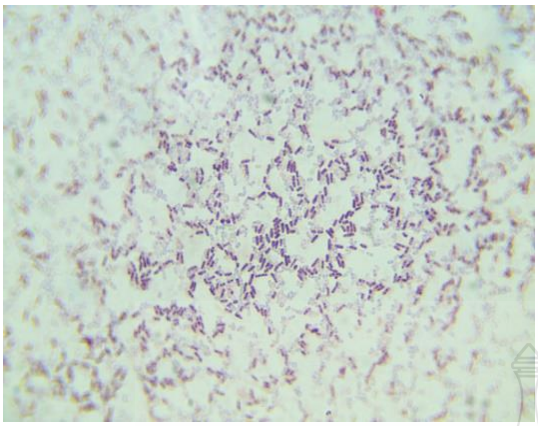


**เชื้อรา ไอโซเลต RB201**

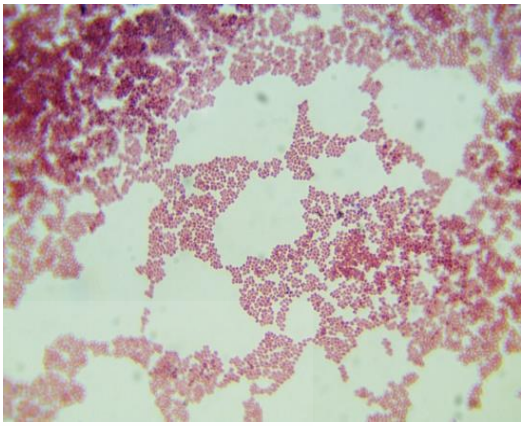


**เชื้อรา ไอโซเลต RB201**

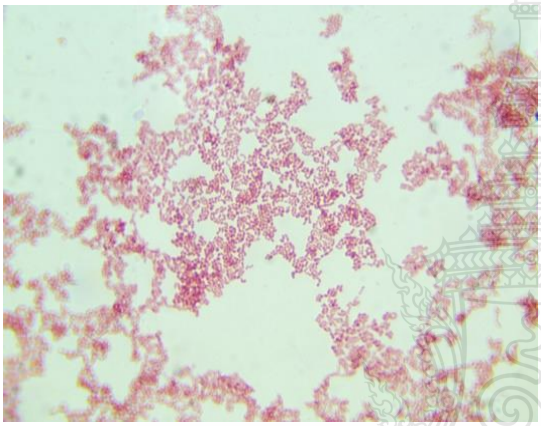
**รูปที่ ค.2** ลักษณะสัณฐานวิทยาของราที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายที่ 40 เท่า โดยการย้อมสี Methylene Blue



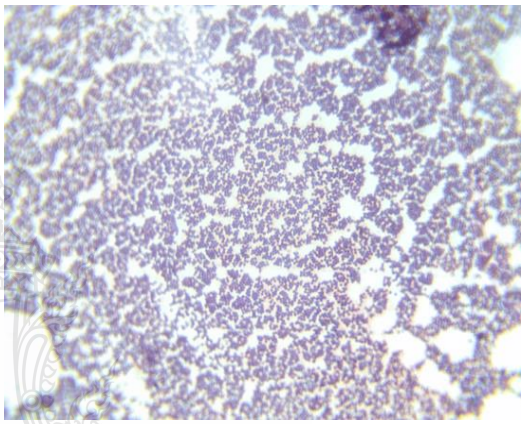
**แบคทีเรีย ไอโซเลต RB303**



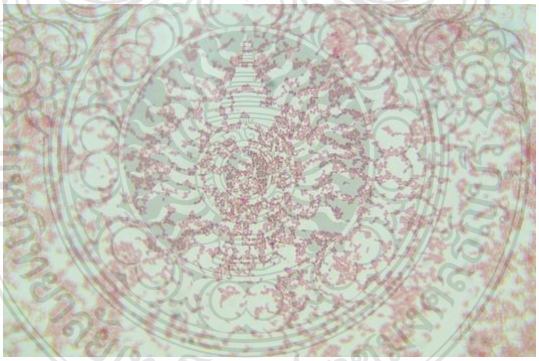
**แบคทีเรีย ไอโซเลต RB304**



**แบคทีเรีย ไอโซเลต RB305**



**แบคทีเรีย ไอโซเลต RB306**



**แบคทีเรีย ไอโซเลต RB307**

**รูปที่ ค.3** ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดยการย้อมแกรม (Gram Staining)

# ภาคผนวก ง

# รายงานผลการวิเคราะห์

ThailandBioresourceResearchCenter (TBRC)
NationalCenter for Genetic Engineering and Biotechnology
Innovation Cluster 2 (Tower B, 8th Floor, Room 817)
143 Thailand Science Park, Phahonyothin Road
KhlongNueng, KhlongLuang, PathumThani12120, Thailand
Tel: +66-2-1178000-1, Fax: +66-2-1178003

BIOTEC
a member of NSTDA

# รายงานผลการจำแนกจุลินทรีย์ / IDENTIFICATION'S REPORT

| | | | |
|---|---|---|---|
| **ชื่อผู้ขอรับบริการ / Customer's name:** | Asst. Prof. Dr. Charoen Charoenchai | **เลขที่ / No. :** | 2020ID0629-113 |
| **หน่วยงานและที่อยู่ / Institute and address:** | Rajamangala University of Technology Thanyaburi<br>2 Paholyothin 87 Phahonyothin Prachathipat Thanyaburi<br>Pathum Thani Thailand 12130 | **วันที่ได้รับตัวอย่าง / Sample receive date :** | 29 June 2020 |
| | | **วันที่รายงานผล/ Report date:** | 16 July 2020 |

☐ ผู้ขอรับบริการส่งตัวอย่างเป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อจำแนกชนิด/**The customer sent pure isolate for identification**

☑ 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 | RB107 | D1/D2 region sequencing | *Saccharomyces cerevisiae* | 100.00% (580/580 nt.) | The sequence of D1/D2 region of strain RB107 had 100.00% similarity with *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171$^{T}$ (NG_042623). Based on the sequence of D1/D2 region, strain RB107 was identified as *Saccharomyces cerevisiae*. |
| 2 | RB108 | D1/D2 region sequencing | *Saccharomycopsis fibuligera* | 100.00% (574/574 nt.) | The sequence of D1/D2 region of strain RB108 had 100.00% similarity with *Saccharomycopsis fibuligera* NRRL Y-2388$^{T}$ (NG_055362). Based on the sequence of D1/D2 region, strain RB108 was identified as *Saccharomycopsis fibuligera*. |
| 3 | RB109 | D1/D2 region sequencing | *Dekkera bruxellensis* Anamorph = *Brettanomyces bruxellensis* | 99.30% (579/585 nt. and 2 gaps) | The sequence of D1/D2 region of strain RB109 had 99.30%, but 4 nucleotides substitution and 2 gaps, similarity with *Dekkera bruxellensis* NRRL Y-12961$^{T}$ (NG_055124). Based on the sequence of D1/D2 region, strain RB109 was identified as *Dekkera bruxellensis* (Anamorph = *Brettanomyces bruxellensis*). |

**เอกสารแนบ / Attachment:**

☑ (1) วิธีการวิเคราะห์ / Analytical method

☑ (2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ / Nucleotide sequence (s)

☑ (3) ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ / Sequence similarity

☑ (4) Referent paper Kurtzman & Robnett (1998)

ผู้จัดทำรายงาน
Report by:.....
(.....Miss Somjit Am-In.....)

ผู้ตรวจรายงาน
Approve by:.....
(...Dr. Sasitorn Jindamorakot....)



Disclaimer:
ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับมาเท่านั้น ไม่สามารถใช้ตัดสินว่าสินค้าที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้ตัดสินเนื่องจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯไม่ใช่หน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆเว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน
The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. NationalCenter for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

Thailand Bioresource Research Center (TBRC)
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
Innovation Cluster 2 (Tower B, 8th Floor, Room 817)
143 Thailand Science Park, Phahonyothin Road
KhlongNueng, KhlongLuang, PathumThani 12120, Thailand
Tel. +66-2-1178000-1, Fax. +66-2-1178003

BIOTEC
a member of NSTDA

# รายงานผลการจำแนกจุลินทรีย์ / IDENTIFICATION REPORT

| | | | |
|---|---|---|---|
| **ชื่อผู้ขอรับบริการ / Customer's name:** | Asst. Prof. Dr. Charoen Charoenchai | **เลขที่ / No. :** | 2020ID0629-113 |
| **หน่วยงานและที่อยู่ / Institute and address:** | Rajamangala University of Technology Thanyaburi<br>2 Paholyothin 87 Phahonyothin Prachathipat Thanyaburi<br>Pathum Thani Thailand 12130 | **วันที่ได้รับตัวอย่าง / Sample receive date :**<br>**วันที่รายงานผล/ Report date:** | 29 Jun 2020<br>16 Jul 2020 |

☑ผู้ขอรับบริการส่งตัวอย่างเป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อจำแนกชนิด/The customer sent pure isolate for identification

☐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 | RB201 | Molecular method | *Rhizopus microsporus* | 100% | |
| 2 | RB202 | Molecular method | *Aspergillus flavus* | 99.83% | |

**เอกสารแนบ / Attachment:**

☑(1) วิธีการวิเคราะห์ / Analytical method
☑(2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ / nucleotide sequence (s)
☑(3) ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ / Sequence similarity
☐(4) ภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ / Phylogenetic relationship
☐(5) เอกสารแนบอื่นๆ / other document

ผู้จัดทำรายงาน
Reported by:.....
(นางสาวจุรีรัตน์ เอื้อพัฒนากิจ)
(Ms.Jureerat Ueapattanakit)

ผู้ตรวจรายงาน
Approved by:.....
(นายวีระ ศรีอินทร์สุทธิ์)
(Mr.Veera Sri-Indrasutdhi)



**Disclaimer:**
ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้เงื่อนไขที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯไม่ใช่หน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆเว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน
The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

Thailand Bioresource Research Center (TBRC)
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
Innovation Cluster 2 (Tower B, 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:** | Asst. Prof. Dr. Charoen Charoenchai | **เลขที่ / No. :** | 2020ID0629-113 |
| **หน่วยงานและที่อยู่ / Institute and address:** | Rajamangala University of Technology Thanyaburi<br>2 Paholyothin 87 Phahonyothin<br>Prachathipat Thanyaburi Pathum Thani 12130 | **วันที่ได้รับตัวอย่าง / Sample receive date :** | 1 Jul 2020 |
| | | **วันที่รายงานผล/ Report date:** | 16 Jul 2020 |

☑ ผู้ขอรับบริการส่งตัวอย่างเป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อจำแนกชนิด/**The customer sent pure isolate for identification**

☐ ผู้ขอรับบริการส่งเป็นตัวอย่างเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ และได้คัดเลือกมาจำแนกชนิด/**The customer sent specimen for isolation and chose isolate(s) identification**

**Request No.** .....

| ลำดับที่ No. | รหัสตัวอย่าง Code | วิธีการจำแนกชนิด Method of identification | มีความใกล้เคียงกับ Closely related with | % ความเหมือน % similarity | หมายเหตุ Note |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | RB303 | Single strand 16S rDNA sequencing | *Bacillus* sp. | - | The BLAST search result of the 16S rDNA sequence against the database showed that the bacterial sample had the highest similarity with *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* and *Bacillus cabrialesii* 99.86% (attachment 3). In addition, the result of phylogenetic analysis of the 16S rDNA compared with closely related type strains could not be discriminated clearly from each other. So, the identification at the species level of this strain should be confirmed by additional identification methods. |

**เอกสารแนบ / Attachment:**

☑ (1) วิธีการวิเคราะห์ / Analytical method

☑ (2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ / nucleotide sequence (s)

☑ (3) ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ / Sequence similarity

☐ (4) ภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ / Phylogenetic relationship

☐ (5) เอกสารแนบอื่นๆ / other document

ผู้จัดทำรายงาน
Report by: .....
(Piyanat Charoenyingcharoen)

ผู้ตรวจรายงาน
Approve by: .....
(Pattaraporn Rattanawaree, Ph.D.)



Disclaimer:
ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้เงื่อนไขที่ระบุไว้เท่านั้น ไม่สามารถใช้ศาลชี้ขาดเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆ ที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และไปรสทราบว่าศูนย์ฯ ไม่ใช่หน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้น ตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆ เว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน
The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

Thailand Bioresource Research Center (TBRC)
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
Innovation Cluster 2 (Tower B, 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 (ศูนย์รังสิต) 2 พหลโยธิน 87 ต. ประชาธิปัตย์ อ. ธัญบุรี ปทุมธานี 12130 | **วันที่ได้รับตัวอย่าง / Sample receive date :** | 23 Aug 2021 |
| | | **วันที่รายงานผล/ Report date:** | 14 Sep 2021 |

☑ ผู้ขอรับบริการส่งตัวอย่างเป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อจำแนกชนิด/The customer sent pure isolate for identification

☐ ผู้ขอรับบริการส่งเป็นตัวอย่างเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ และได้คัดเลือกมาจำแนกชนิด/The customer sent specimen for isolation and chose isolate(s) identification

Request No. .....,

| ลำดับที่ No. | รหัสตัวอย่าง Code | วิธีการจำแนกชนิด Method of identification | มีความใกล้เคียงกับ Closely related with | % ความเหมือน % similarity | หมายเหตุ Note |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | RB304 | Single strand 16S rDNA sequencing | *Kocuria rhizophila* | 99.79 | |
| 2 | RB305 | Single strand 16S rDNA sequencing | *Weissella paramesenteroides* | 99.80 | |
| 3 | RB306 | Single strand 16S rDNA sequencing | *Brachybacterium paraconglomeratum* | 99.93 | |
| 4 | RB307 | Single strand 16S rDNA sequencing | *Weissella paramesenteroides* | 99.80 | |
| 5 | CN308 | Single strand 16S rDNA sequencing | *Pantoea anthophila* | 99.79 | |
| 6 | CN309 | Single strand 16S rDNA sequencing | *Leuconostoc mesenteroides* | 100.00 | |
| 7 | CN310 | Single strand 16S rDNA sequencing | Unidentified bacteria in *Enterobacteriaceae* | - | เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล พบว่าแบคทีเรียตัวอย่างมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Escherichia fergusonii* มากที่สุด 99.80% (เอกสารแนบ 3) แต่จากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เปรียบเทียบกับแบคทีเรียใกล้เคียงพบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแบคทีเรีย *Escherichia* และ *Shigella* ได้ชัดเจน จึงทำให้ไม่สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียตัวอย่างได้แน่ชัด จำเป็นต้องศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนอื่น หรือ whole genome sequencing เปรียบเทียบกับ Type strain เพิ่มเติมเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียตัวอย่าง |

**เอกสารแนบ / Attachment:**

☑ (1) วิธีการวิเคราะห์ / Analytical method

☑ (2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ / nucleotide sequence (s)

☑ (3) ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ / Sequence similarity

☐ (4) ภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ / Phylogenetic relationship

☐ (5) เอกสารแนบอื่นๆ / other document

ผู้จัดทำรายงาน
Report by: .....
(ปิยณัฐ เจริญยิ่งเจริญ)

ผู้ตรวจรายงาน
Approve by; .....
(ดร.ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล)



Disclaimer:
ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับมาเท่านั้น ไม่สามารถใช้ตัดสินเกินเลยเกินกว่านี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆ ที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดพราบว่าศูนย์ฯ ไม่ใช่หน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้น ตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ในการกล่าวอ้างใดๆ เว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน
The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

# ภาคผนวก จ
# การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

**ภาคผนวกที่ จ-1** ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain of 26S rDNA ของ Isolate RB107

**(NL1-NL4) 580 nucleotides**

AAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGT
ACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCTTGTCTATGTTCCTT
GGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCC
TTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAAT
ATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGA
GTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTC
TGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAA
ATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACT
GAGGACTGCGACGTAAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTG

**= Strain RB107 was identified as *Saccharomyces cerevisiae***

**ภาคผนวกที่ จ-2** ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain of 26S rDNA ของ Isolate RB107

**(NL1-NL4) 574 nucleotides**

AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAGCTAGC
ACCTTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAGTAGTCCTTTATCTATGTTCCTTG
GAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAACCCCGTATGATTTTGGATACTACTCTTTGTGGGATTCTAT
CGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATAT
TGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGT
GAAAAAGTACGTGAAATTGCTGAAAGGGAAGGGCTTGAGGTCAGACTTGGTGTTTAATGATTATCA
GTTCTTCTTGGACTGTGCACTCGTTTTTCACCGGGCCAATATCAGTTTTAGCGGTAGAGTACCCCT
TGAAATGTGGCTTCCTTCGGGGAGTGTTATAGTCTTGGGGAGATCTACTTGCTGGGACTGAGGAC
TGCGCTTCGGCAAGGATATTGGCGTAATGACCTTAAGCCGCCCGTCTTG

**= Strain RB108 was identified as *Saccharomycopsis fibuligera***

**ภาคผนวกที่ จ-3** ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain of 26S rDNA ของ Isolate RB109

**(NL1-NL4) 585 nucleotides**

AAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAATGGCGAATGAAGCGGCAAGAGCCCAAATTTGAAATCGGGC
AACCGAGTTGTAATTTGGAGACGGGACACTAGAGAGGAGGAAGGCGATTAAGTGCCTTGGAACAG
GCTGCCGTAGAGGGTGAGAGCCCCGTGAATCGCTGGAGACCGATCGATTAGTGCCCGCCGAAGAG
TCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGCGGGTGGTATATTCCATCTAAGGCTAAATATTAGCGAG
AGACCGATAGCAAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGGAAAGAGAGTGAAATAG
TACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTTGATCCGACATGGTGTTTAGCAGCGGCCCGTTCCT
CGTGGATGGGTGCACCTGGTTTACACTGGGCCAGCATCGGTTCTGGGAGCCATATACGGGGTTCG
TGAATGTGGCCCTTCGATTCTGTCGGAGGGTGTTATAGCGCGGGCATCTTGTGGCTAGCCGGGAC
CGGGGACTGCGGTGGCTTTTGTCACCAAGGATGCTGGCAGAACGAGCAAATACCACCCGTCTTG

**= Strain RB109 was identified as *Dekkera bruxellensis***

**ภาคผนวกที่ จ-4** ลำดับเบสบริเวณ ITS rDNA ของ Isolate RB201

**(NL1-NL4) 614 nucleotides**

CTAATGTATTGGCACTTTACTGGGATTTACTTCTCAGTATTGTTTGCTTCTATACTGTGAACCTCTG
GCGATGAAGGTCGTAACTGACCTTCGGGAGAGACTCAGGACATATAGGCTATAATGGGTAGGCCT
GTTCTGGGGTTTGATCGATGCCAATCAGGATTACCTTTCTTCCTTTGGGAAGGAAGGCGCCTGGTA
CCCTTTACCATATACCATGAATTCAGAATTGAAAGTATAATATAATAACAACTTTTAACAATGGAT
CTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCGT
GAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACTCTATGGATCTTCTATAGAGTACGCTTGCTTCAGT
ATCATAACCAACCCACACATAAAATTTATTTTATGTGGTGATGGACAAATTCGGTTAGATTTAATT
ATTATACCGATTGTCTAAAATACAGCCTCTTTGTAATTTTCATTAAATTACGAACTACCTAGCCATC
GTGCTTTTTTGGTCCAACCAAAAAACATTTAATCTAGGGGTTCTGCCAGCCAGCAGATATTTTAAT
GCTCTTTAACTATGATCTG

**= Strain RB201 was identified as *Rhizopus microsporus***

**ภาคผนวกที่ จ-5** ลำดับเบสบริเวณ ITS rDNA ของ Isolate RB202

**(NL1-NL4) 584 nucleotides**

CCGTAGGTGAACCTGCGGAAGAGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCA

CCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAG

CCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATT

GTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGC

GAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCG

CCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTG

TGTTGGGTCGTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCG

ATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAA

TCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAT

**= Strain RB202 was identified as *Aspergillus flavus***

**ภาคผนวกที่ จ-6** ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ Isolate RB303

**(NL1-NL4) 1,448 nucleotides**

CTGGCTCAGGACGAACGCGGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTT
GCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA
ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTG
GCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC
AAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAAT
AGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAG
TCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGA
AGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGC
TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGG
TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
GATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGA
ACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAG
TCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGA
GGTAACCTTTTAGGAGC

**= Strain RB303 was identified as *Bacillus sp.***

**ภาคผนวกที่ จ-7** ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ Isolate RB304

**(NL1-NL4) 1,479 nucleotides**

TTTGATTCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCTGAAGC
TTGGTGCTTGCACTGGGTGGATGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTGCCCTTGA
CTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACTGGATACGACATGTCACCGCATGGTGGTGTG
TGGAAAGGGTTCTACTGGTTTTGGATGGGCTCACGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCT
CACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGA
CGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCACGGAAGAAGCGAAAGTGA
CGGTACGTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCTGCTGTGAAAGCC
CGGGGCTTAACCCCGGGTGTGCAGTGGGTACGGGCAGACTTGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAAT
TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCCGAAGGCAGGTCTCTG
GGCTGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGAACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCA
TTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
ACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATAC
ACCGGACCGGGCCAGAGATGGTCTTTCCCCCTTGTGGGGCTGGTGTACAGGTGGTGCATGGTTGT
CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTATGTTG
CCAGCACGTGATGGTGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAATCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCAGTACAATGGGTT
GCGATGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAGCTGGTCTCAGTTCGGATCGTGGTCTGCAACTC
GACCACGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCT
TGTGGGGGGAGCCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACTAAGTCGTA

= Strain RB304 was identified as *Kocuria rhizophila*

**ภาคผนวกที่ จ-8** ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ Isolate RB305

**(NL1-NL4) 1,501 nucleotides**

AGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTTGTCTTTAACTGATATGAC
GAGCTTGCTCTGATGTGATTTTATCTGACAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
CTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGGAAACAAGTGCTAATACCGTATAATACCAACAACCGCAT
GGTTGTTGGTTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTG
GTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGG
GACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAG
CCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTATAAGAGAA
GAACGGCACTGAGAGTAACTGTTCAGTGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG
CGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATGGCTTTGGAAACT
GGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT
GGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGG
GTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAGTGCTAGATGTTCGAGG
GTTTCCGCCCTTGAGTGTCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGG
TTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA
ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTTGCTAATCCTAGAAATAGGACGTTCCCTTCGGG
GACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCTTATTATTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACG
TGCTACAATGGCATATACAACGAGTCGCCAACCCGCGAGGGTGCGCTAATCTCTTAAAGTATGTCT
CAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC
ACGCCGCGGTTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAA
CACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGT
GA

= Strain RB305 was identified as *Weissella paramesenteroides*

**ภาคผนวกที่ จ-9** ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ Isolate RB306

**(NL1-NL4) 1,445 nucleotides**

GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGACGGTGGTGCTTGCA
CCGCCTGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTCCACTTCGGGATAACC
TCGGGAAATCGTGGCTAATACCGGATATGAGCACTCATCGCATGGTGGGTGTTGGAAAGATTTAT
CGGTGGGGGATGGACTCGCGGCCTATCAGTTTGTTGGTGAGGTGATGGCTCACCAAGACGATGAC
GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGAT
GACGGCCTTCGGGTTGTAAACCCCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAG
AAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGTGGCTTGTCGCGTCTGCCGTGAAAACCCGAGGCTCAACCTCG
GGCGTGCGGTGGGTACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGACTGGAACTCCTGGTGTAGCGG
TGAAATGCGCAGATATCAGGAAGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCATTACTGACAC
TGAGAAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTG
GGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGC
ATGCTGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGCACTGGACGGCTGCA
GAGATGTGGCTTTCTTTGGACTGGTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAG
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGG
ACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCC
TTATGTCTTGGGCTTCAAGCATGCTACAATGGTCGGTACAATGGGTTGCGAAACTGTGAGGTGGA
GCGAATCCCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAG
TCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
GTCAAGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCCATCCTCGTGAGGGAGCTGTCTAAG
GTGGGATCGGTGATTGGG

= Strain RB306 was identified as *Brachybacterium paraconglomeratum*

**ภาคผนวกที่ จ-10** ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ Isolate RB307

**(NL1-NL4) 1,507 nucleotides**

CTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTTGTCTTTAACTGATATG
ACGAGCTTGCTCTGATGTGATTTTATCTGACAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGGAAACAAGTGCTAATACCGTATAATACCAACAACCGC
ATGGTTGTTGGTTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTT
GGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATG
GGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAA
GCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTATAAGAGA
AGAACGGCACTGAGAGTAACTGTTCAGTGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGA
GCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATGGCTTTGGAAAC
TGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA
TGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTG
GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAGTGCTAGATGTTCGAG
GGTTTCCGCCCTTGAGTGTCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAG
GTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC
AACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTTGCTAATCCTAGAAATAGGACGTTCCCTTCGG
GGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCTTATTATTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGT
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACAC
GTGCTACAATGGCATATACAACGAGTCGCCAACCCGCGAGGGTGCGCTAATCTCTTAAAGTATGT
CTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTA
ACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGG
TGAAGTC

= Strain RB307 was identified as *Weissella paramesenter*

# ภาคผนวก ฉ

# แบบสอบถามและตารางการวิเคราะห์

**แบบสอบถาม**

**การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค**

**เรียน** ผู้ตอบแบบสอบถาม

**เรื่อง** การปรับปรุงกระบวนการหมักน้ำตาลมะพร้าวเพื่อผลิตสุรากลั่นชุมชน

**คำชี้แจ้ง**

แบบสอบถามชุดนี้เป็นส่วนหนึ่งของการวิจัยเรื่อง “การปรับการปรับปรุงกระบวนการหมักน้ำตาลมะพร้าวเพื่อผลิตสุรากลั่นชุมชน” อันเป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์แห่งปริญญาคหกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ของ อัศม์เดช พลอาสา นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชา เทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี สร้างขึ้นเพื่อสอบถามการยอมรับสุรากลั่นจากน้ำตาลมะพร้าว และใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาสุรากลั่นชุมชนที่ได้มาตราฐานต่อไป ซึ่งแบบสอบถามประกอบด้วย 3 ส่วน ดังต่อไปนี้

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม

ส่วนที่ 2 ข้อมูลเชิงพฤติกรรมและทัศนคติของผู้ตอบแบบสอบถาม

ส่วนที่ 3 การประเมินทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภค

ข้อมูลทั้งหมดจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับงานวิจัย และจะถือเป็นความลับ โดยจะไม่มีผลใด ๆ ต่อผู้ตอบแบบสอบถาม

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่สละเวลาในการตอบแบบสอบถาม

นายอัศม์เดช พลอาสา

**คำแนะนำ** กรุณาใส่เครื่องหมาย ✓ ในช่องว่าง ( ) ที่เห็นว่าเหมาะสมและตรงกับความคิดเห็นของท่าน

**<u>ส่วนที่ 1</u>** : ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม

**1. เพศ** A

( ) ชาย ( ) หญิง

**2. อายุ** B

( ) 20 – 29 ปี ( ) 30 – 39 ปี ( ) 40 – 49 ปี

( ) 50 – 59 ปี ( ) มากกว่า 60 ปี

**3. ระดับการศึกษา** C

( ) ต่ำกว่ามัธยมศึกษา ( ) มัธยมศึกษาตอนต้น

( ) มัธยมศึกษาตอนปลาย / ปวช. ( ) อนุปริญญา / ปวส.

( ) ปริญญาตรี ( ) สูงกว่าปริญญาตรี

**4. อาชีพ** D

( ) นิสิตนักศึกษา ( ) ข้าราชการ / พนักงานรัฐวิสากิจ

( ) พนักงานบริษัท ( ) ธุรกิจส่วนตัว / ค้าขาย

( ) อาชีพอิสระ ( ) อื่น ๆ โปรดระบุ.....

**5. ร่ายได้ต่อเดือน** E

( ) น้อยกว่า 10,000 บาท ( ) 10,000 – 19,999 บาท ( ) 20,000 – 29,999 บาท

( ) 30,000 – 39,999 บาท ( ) มากกว่า 40,000 บาท

**<u>ส่วนที่ 2</u>** : ข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมและทัศนคติของผู้ตอบแบบสอบถาม

**6. ท่านดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์บ่อยแค่ไหน** F

( ) ทุกวัน ( ) 5 – 6 ครั้ง/สัปดาห์ ( ) 3 – 4 ครั้ง/สัปดาห์

( ) 1 – 2 ครั้ง/สัปดาห์ ( ) น้อยกว่า 1 – 2 ครั้ง/สัปดาห์ ( ) อื่น ๆ (ระบุ) .....

**7. สถานที่ที่ท่านสะดวกซื้อเครื่องดื่มแอลกอฮอล์** G

( ) ร้านสะดวกซื้อ ( ) ห้างสพรรพสินค้า

( ) ร้านขายของชำ ( ) อื่น ๆ (ระบุ) .....

**8. ท่านเคยดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ชนิดสุรากลั่นชุมชน หรือไม่** H

( ) เคย ( ) ไม่เคย

**9. ท่านรู้สึกอย่างไรกับเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ชนิดสุรากลั่นชุมชน** I

( ) ชอบ ( ) เฉย ๆ ( ) ไม่ชอบ

**ส่วนที่ 3** การประเมินทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภค

# แบบประเมินการยอมรับของผู้บริโภค

## ผลิตภัณฑ์สุรากลั่นจากน้ำตาลมะพร้าว

**ชื่อ-นามสกุล**..... **วันที่** ..... / ..... / .....

แบบประเมินความแตกต่างอย่างง่าย ของผลิตภัณฑ์สุรากลั่นชุมชนจากน้ำตาลมะพร้าว โดยชิมตัวอย่างสุรากลั่นทั้ง 2 ตัวอย่าง แล้วใส่เครื่องหมาย ✓ ลงในช่องว่างตามที่ท่านเห็นว่าเหมาะสม

| **คุณลักษณะ** | **คุณภาพ** | |
|---|---|---|
| | **แตกต่าง** | **ไม่แตกต่าง** |
| **ลักษณะปรากฏ** | ..... | ..... |
| **กลิ่นสุรา** | ..... | ..... |
| **รสชาติสุรา** | ..... | ..... |
| **ความรู้สึกหลังกลืน** | ..... | ..... |
| **ความชอบโดยรวม** | ..... | ..... |

**ข้อเสนอแนะ**

.....

.....

.....

.....

**ขอบคุณ ทุกท่านที่สละเวลา**

**ส่วนที่ 3** การประเมินทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภค

# แบบประเมินการยอมรับของผู้บริโภค

## ผลิตภัณฑ์สุรากลั่นจากน้ำตาลมะพร้าว

**ชื่อ-นามสกุล**..... **วันที่** ..... / ..... / .....

**คำชี้แจ้ง:** แบบประเมินความแตกต่างอย่างง่าย ของผลิตภัณฑ์สุรากลั่นจากน้ำตาลมะพร้าว โดยให้ผู้ทดสอบเติมรหัสตัวอย่างที่ได้ลงในช่องว่าง จากนั้นชิมทั้ง 2 ตัวอย่าง แล้วใส่เครื่องหมาย ✓ ลงในช่องของตัวอย่างที่ท่านชอบมากที่สุด ตามคุณลักษณะปัจจัยคุณภาพที่กำหนดไว้

| คุณลักษณะ | รหัสตัวอย่าง | | หมายเหตุ |
|---|---|---|---|
| | | | |
| กลิ่นสุรา | | | |
| รสชาติสุรา | | | |
| ความรู้สึกหลังกลืน | | | |
| ความชอบโดยรวม | | | |

**ข้อเสนอแนะ**

.....

.....

.....

.....

**ขอบคุณ ทุกท่านที่สละเวลา**

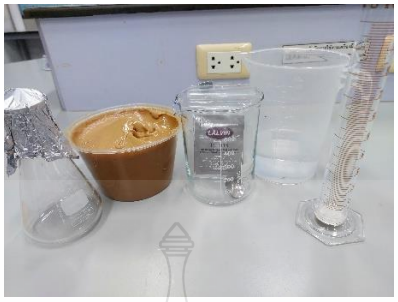
**ตารางที่ ฉ.1** Critical Number of Correct Responses in a Duo-Trio or One-Sided Directional Difference Test (Entries are $x_{a,n}$) [53]

| | α | | | | | | | | α | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *n* | *0.40* | *0.30* | *0.20* | *0.10* | *0.05* | *0.01* | *0.001* | *n* | *0.40* | *0.30* | *0.20* | *0.10* | *0.05* | *0.01* | *0.001* |
| | | | | | | | | *31* | *17* | *18* | *19* | *20* | *21* | *23* | *25* |
| *2* | *2* | *2* | *-* | *-* | *-* | *-* | *-* | *32* | *18* | *18* | *19* | *21* | *22* | *24* | *26* |
| *3* | *3* | *3* | *3* | *-* | *-* | *-* | *-* | *33* | *18* | *19* | *20* | *21* | *22* | *24* | *26* |
| *4* | *4* | *4* | *4* | *4* | *-* | *-* | *-* | *34* | *19* | *20* | *20* | *22* | *23* | *25* | *27* |
| *5* | *4* | *4* | *4* | *4* | *5* | *-* | *-* | *35* | *19* | *20* | *21* | *22* | *23* | *25* | *27* |
| *6* | *4* | *5* | *5* | *6* | *6* | *-* | *-* | *36* | *20* | *21* | *22* | *23* | *24* | *26* | *28* |
| *7* | *5* | *5* | *6* | *6* | *7* | *7* | *-* | *40* | *22* | *23* | *24* | *25* | *26* | *28* | *31* |
| *8* | *5* | *6* | *6* | *7* | *7* | *8* | *-* | *44* | *24* | *25* | *26* | *27* | *28* | *31* | *33* |
| *9* | *6* | *6* | *7* | *7* | *8* | *9* | *-* | *48* | *26* | *27* | *28* | *29* | *31* | *33* | *36* |
| *10* | *6* | *7* | *7* | *9* | *9* | *10* | *10* | *52* | *28* | *29* | *30* | *32* | *33* | *35* | *38* |
| *11* | *7* | *7* | *8* | *9* | *9* | *10* | *11* | *56* | *30* | *31* | *32* | *34* | *35* | *38* | *40* |
| *12* | *7* | *8* | *8* | *9* | *10* | *11* | *12* | *60* | *32* | *33* | *34* | *36* | *37* | *40* | *43* |
| *13* | *8* | *8* | *9* | *10* | *10* | *12* | *13* | *64* | *34* | *35* | *36* | *38* | *40* | *43* | *45* |
| *14* | *8* | *9* | *10* | *10* | *11* | *12* | *13* | *68* | *36* | *37* | *38* | *40* | *42* | *45* | *48* |
| *15* | *9* | *10* | *10* | *11* | *12* | *13* | *14* | *72* | *38* | *39* | *41* | *42* | *44* | *47* | *50* |
| *16* | *10* | *10* | *11* | *12* | *12* | *14* | *15* | *76* | *40* | *41* | *43* | *45* | *46* | *49* | *52* |
| *17* | *10* | *11* | *11* | *12* | *13* | *14* | *16* | *80* | *42* | *43* | *45* | *47* | *48* | *51* | *55* |
| *18* | *11* | *11* | *12* | *13* | *13* | *15* | *16* | *84* | *44* | *45* | *47* | *49* | *51* | *54* | *57* |
| *19* | *11* | *12* | *12* | *13* | *14* | *15* | *17* | *88* | *46* | *47* | *49* | *51* | *53* | *56* | *59* |
| *20* | *12* | *12* | *13* | *14* | *15* | *16* | *18* | *92* | *48* | *50* | *51* | *53* | *55* | *58* | *62* |
| *21* | *12* | *13* | *13* | *14* | *15* | *17* | *18* | *96* | *50* | *52* | *53* | *55* | *57* | *60* | *64* |
| *22* | *13* | *13* | *14* | *15* | *16* | *17* | *19* | *100* | *52* | *54* | *55* | *57* | *59* | *63* | *66* |
| *23* | *13* | *14* | *15* | *16* | *16* | *18* | *20* | *104* | *54* | *56* | *57* | *60* | *61* | *65* | *69* |
| *24* | *14* | *14* | *15* | *16* | *17* | *19* | *20* | *108* | *56* | *58* | *59* | *62* | *64* | *67* | *71* |
| *25* | *14* | *15* | *16* | *17* | *18* | *19* | *21* | *112* | *58* | *60* | *61* | *64* | *66* | *69* | *73* |
| *26* | *15* | *15* | *16* | *17* | *18* | *20* | *22* | *116* | *60* | *62* | *64* | *66* | *68* | *71* | *76* |
| *27* | *15* | *16* | *17* | *18* | *19* | *20* | *22* | *122* | *63* | *65* | *67* | *69* | *71* | *75* | *79* |
| *28* | *16* | *16* | *17* | *18* | *19* | *21* | *23* | *128* | *66* | *68* | *70* | *72* | *74* | *78* | *82* |
| *29* | *16* | *17* | *18* | *19* | *20* | *22* | *24* | *134* | *69* | *71* | *73* | *75* | *78* | *81* | *86* |
| *30* | *17* | *17* | *18* | *20* | *20* | *22* | *24* | *140* | *72* | *74* | *76* | *79* | *81* | *85* | *89* |

***Note:*** For values of *n* not in the table, compute, where *k* is the number of correct responses. *Compare the value of z* to the **α**-critical value of a standard normal variable, i.e., the values in the last row of Table T3 (z<= t<,∞).

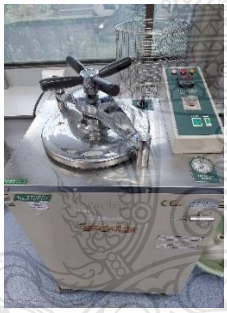
# ภาคผนวก ช
# ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

**ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์สำหรับหมักน้ำตาลมะพร้าว**



นำน้ำตาลมะพร้าวละลายน้ำโดยปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้เริ่มต้น 16 องศาบริกซ์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

↓



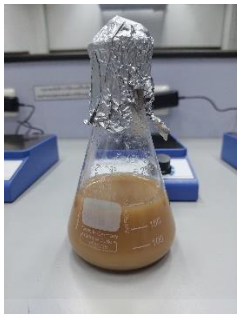
นำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งไอน้ำ (Autocave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้จนมีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

↓

เติมยีสต์ผงทางการค้า LALVIN EC-1118 ปริมาณ 0.5 กรัม

นำเข้าเครื่องกวนสารแม่เหล็กไฟฟ้า INTLLAB MS-500 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓



กล้าเชื้อยีสต์ผงปริมาณ 200 มิลลิลิตร

นำน้ำตาลมะพร้าวละลายน้ำโดยปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้เริ่มต้น 16 องศาบริกซ์ ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 2,000 มิลลิลิตร จำนวน 4 ใบ

นำไปฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งไอน้ำ (Autocave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้จนมีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

นำกล้าเชื้อยีสต์ผงปริมาณ 200 มิลลิลิตร ใส่ขวดขวดรูปชมพู่ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ ปริมาตรขวดละ 40 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องกวนสารแม่เหล็กไฟฟ้า INTLLAB MS-500 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จึงได้กล้าเชื้อยีสต์เหลวปริมาณ 2,000 มิลลิลิตร จำนวน 4 ตัวอย่าง เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

# ประวัติผู้เขียน


| | |
|---|---|
| **ชื่อ-นามสกุล** | นายอัศม์เดช พลอาสา |
| **วัน เดือน ปีเกิด** | 26 มีนาคม 2534 |
| **ที่อยู่** | บ้านเลขที่ 41/373 หมู่ 1 ตำบลคลองเจ็ด อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี รหัสไปรษณีย์ 12130 |
| **การศึกษา** | ระดับปริญญาตรีคณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ สาขาอาหารและโภชนาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี พ.ศ. 2552 – 2556 |
| **เบอร์โทรศัพท์** | 098-222-3532 |
| **อีเมล์** | assadej_p@mail.rmutt.ac.th |