การคัดแยกเชื้อยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด

Isolation of Yeasts and Acetic Acid Bacteria from Vinegar of Palmyra Palm Fruit Pulp (*Borassus flabellifer*) for Salad Dressing Product

ศิริพร อาจณรงค์

Siriporn Artnarong

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Food Science and Nutrition

Prince of Songkla University

2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกเชื้อยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุกเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด
ผู้เขียน	นางสาวศิริพร อาจณรงค์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จารุวรรณ มณีศรี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พายัพ มาศนิยม)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ดร.สมรักษ์ พันธ์ผล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จารุวรรณ มณีศรี)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พายัพ มาศนิยม)

.....กรรมการ

(ดร.ยุทธนา พงษ์พิริยะเดชะ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จารุวรรณ มณีศรี)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....
(นางสาวศิริพร อาจณรงค์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญา ในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวศิริพร อาจณรงค์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดแยกเชื้อยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุกเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด

ผู้เขียน นางสาวศิริพร อาจณรงค์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ

ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

ตาลโตนดเป็นพืชในตระกูลปาล์ม ผลตาลโตนดสุกเปลือกด้านนอกจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ส่วนเยื่อใยด้านในมีลักษณะเป็นเส้นใยสีเหลืองอมส้ม เมื่อนำมาเตรียมโดยใช้ส่วนเส้นใยผลตาลโตนดสุกต่อน้ำ 1:2 (w/v) พบว่า น้ำที่คั้นได้จากส่วนเส้นใยผลตาลโตนดสุกมีค่าพีเอชประมาณ 4.47-5.1 และมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 5.01±0.15 องศาบริกซ์ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำผลตาลโตนดสุกเป็นวัตถุดิบสำหรับหมักน้ำส้มสายชู เมื่อทำการคัดแยกเชื้อยีสต์จากผลตาลโตนดสุกเลือกจำนวนโคโลนี 81 โคโลนี และเซลล์ที่มีขนาดใหญ่จำนวน 20 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 (w/v) และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 6 และ 8 (v/v) ในอาหาร yeast extract peptone dextrose broth (YEPD broth) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 มีความสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 โดยมีปริมาณเซลล์ยีสต์เท่ากับ $3.9x10^{8}$ และ $1.7x10^{8}$ CFU/ml ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบความสามารถทนต่อเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 6 และ 8 (v/v) พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นจะมีผลให้ความสามารถในการเจริญเติบโตลดลง โดยจะมีปริมาณเซลล์ยีสต์เท่ากับ $1.5x10^{7}$ และ $4.4x10^{3}$ CFU/ml ตามลำดับ เชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 มีความสามารถในการผลิตเอทานอลที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 เท่ากับร้อยละ 5.06±0.25 และ 7.40±0.17 ที่ระยะเวลาการหมัก 2 และ 4 วัน ตามลำดับ การศึกษาปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณ 300, 500 และ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำผลตาลโตนดสุกปริมาตร 600 มิลลิลิตร พบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 5.75±0.09 ที่ระยะเวลาการหมัก 7 วัน และนำมาใช้ในการหมักในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ ปริมาตร 6 ลิตร สามารถผลิตได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 3.92±0.15 ที่ระยะเวลาการหมัก 14 วัน

เมื่อนำมาจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีชีวโมเลกุล พบว่า เชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์สายพันธุ์ *Candida stellimalicola*

การคัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติกจากผลตาลโตนดสุกโดยหมักในอาหารเหลว glucose ethanol yeast extract และเลือกโคโลนีที่เกิดวงใสจากอาหารแข็ง glucose yeast extract calcium carbonate จำนวน 250 ไอโซเลท มาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยาชีวเคมี คัดเลือกแบคทีเรียกรดอะซิติกที่มีลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ แท่งสั้น ให้ผลแคตาเลสเป็นบวก ออกซิเดสเป็นลบ ไม่สร้างเซลลูโลส และไม่เกิดปฏิกิริยา overoxidation จำนวน 20 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract broth (GYE broth) ที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 (v/v) พบว่า แบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลท A10 มีความสามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE broth ที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 (v/v) โดยมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ $5.0x10^5$ และ $9.6x10^3$ CFU/ml ตามลำดับ มีความสามารถผลิตกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE broth ที่มีเอทานอลร้อยละ 6 ได้สูงสุดเท่ากับ 5.64±0.18 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 55 วัน แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE broth ที่มีเอทานอลร้อยละ 8 พบว่า แบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลท A10 ผลิตกรดอะซิติกลดลงมีปริมาณ 5.10±0.27 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 60 วัน เมื่อนำมาจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีชีวโมเลกุล พบว่า แบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลท A10 มีความคล้ายคลึงแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acetobacter ghanensis* จึงนำไปใช้ผลิตกรดอะซิติกในไวน์ผลตาลโตนดสุก พบว่า แบคทีเรีย *A. ghanensis* สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงสุดเท่ากับ 4.14±0.10 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 60 วัน น้ำส้มสายชูที่ได้มีลักษณะสีเหลือง ขุ่น มีปริมาณกรดอะซิติก ปริมาณเอทานอลตกค้าง และแร่ธาตุต่างๆ เป็นไปตามมาตรฐานน้ำส้มสายชูหมัก เมื่อนำไปประยุกต์ใช้เพื่อหาความเป็นไปได้ใช้ในน้ำสลัด พบว่า ผู้ทดสอบชิมให้คะแนนความชอบโดยรวมที่ระดับคะแนน 4.22±0.71 (ชอบเล็กน้อย) เนื่องจากน้ำสลัดที่ได้มีความหนืดค่อนข้างต่ำ ซึ่งสามารถนำผลการทดสอบชิมมาปรับปรุงสูตรน้ำสลัดเพื่อให้เป็นที่ยอมรับต่อไป

คำสำคัญ : ผลตาลโตนดสุก การคัดแยกเชื้อยีสต์ แบคทีเรียกรดอะซิติก น้ำส้มสายชูหมัก

Thesis Title	Isolation of Yeasts and Acetic Acid Bacteria from Vinegar of Palmyra Palm Fruit Pulp (*Borassus flabellifer*) for Salad Dressing Product
Author	Miss Siriporn Artnarong
Major Program	Food Science and Nutrition
Acedemic Year	2014

ABSTRACT

Palmyra palm or toddy palm (*Borassus flabellifer*) is a kind of palm. The mature or ripen palmyra pulp is dark color and its pulp with meat is yellow-orange. To prepare the palmyra palm fruit by water : palmyra palm fruit pulp on 1:2. There is proximate pH 4.47-5.1 and total soluble solid 5.01±0.15 ^{o}Brix. It is possible to using as mterial for vinegar fermentation. Yeast were isolated from palmyra pulp fruit totally 81 colonies. Twenty yeast isolates were selected for glucose (10 and 15% (v/v)) and ethanol (6% and 8% (v/v)) tolerance in yeast extract peptone dextrose broth (YEPD broth) for 72 hours. The isolate Y15 showed the high tolerant ability to 10% and 15% (w/v) glucose, the cell viability were $3.9x10^{8}$ CFU/ml and $1.7x10^{8}$ CFU/ml, respectively. To screening for ethanol tolerance with 6% and 8% (v/v) ethanol, the cell viability was obtained at 6% (v/v) ethanol higher than 8% (v/v) ethanol at $1.5x10^{7}$ CFU/ml and $4.4x10^{3}$ CFU/ml, respectively. The isolate Y15 produced the highest ethanol content about 5.06±0.25% and 7.4±0.25% at 10% and 15% (w/v) glucose within 2 and 4 days, respectively. The effects of ammonium sulphate concentrations at 300, 500 and 700 mg/L as the nitrogen source on ethanol fermentation were studied. The supplementation of 500 mg/L ammonium sulfate obtained the highest ethanol content at 5.75±0.09% within 7 days. The fermentation of 6 liters palmyra palm fruit juice with 10 ^{o}Brix glucose was investigated. The yeast isolate Y15 produced ethanol content about 3.92±0.15% after 14 days. This isolate was identified as *Candida stellimalicola*.

The isolates of acetic acid bacteria from palmyra palm fruit pulp were fermented in the glucose ethanol yeast extract broth. The total 250 isolates showed clear zone on glucose yeast extract calcium carbonate solid reaction. The isolates of acetic acid bacteria from palmyra palm fruit pulp were studied by the biochemistry test. The catalase test showed positive and oxidase test as negative. Microscopic examinations confirmed the strains were gram negative rod to coccobacilli. All of strains showed negative overoxidation and cellulose. Twenty acetic acid bacteria isolates were selected for ethanol tolerance in yeast extract peptone dextrose broth (YEPD broth) with 6% and 8% (v/v) ethanol. The isolate A10 showed the high tolerant ability to 6% (v/v) and 8% (v/v) ethanol, the cell viability was $5.0x10^5$ CFU/ml and $9.6x10^3$ CFU/ml, respectively. The isolate A10 produced the highest acetic acid content in (GYE broth) with 6% (v/v) ethanol about 5.64±0.18% and within 55 and 5.10±0.27% within 60 days at 8% (v/v) ethanol. This isolate was *Acetobacter ghanensis*, which produced acetic acid from palmyra palm wine at 4.14±0.10% within 60 days. The vinegar has yellow-color and contains mineral; the residual alcohol and acetic acid content suitable for vinegar standard. Consumer testing for premixed salad dressing product indicated overall liking scores at 4.22±0.71 (like slightly). The salad dressing product showed the low viscosity. This result will improve in salad dressing formula for consumer accept.

Keywords : palmyra palm fruit ripe, isolation, yeast, acetic acid bacteria, vinegar

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จารุวรรณ มณีศรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พายัพ มาศนิยม ที่คอยให้คำแนะนำปรึกษา ข้อเสนอแนะต่างๆตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย และได้ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ ขอขอบคุณประธานกรรมการสอบ ดร.สมรักษ์ พันธ์ผล และกรรมการสอบ ดร.ยุทธนา พงษ์พิริยะเดชะ ที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2556 จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ตลอดจนบุคลากรภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการทุกท่านที่คอยสนับสนุนช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณครอบครัวที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนตลอดมา สุดท้ายนี้ขอขอบคุณน้องๆสาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ และเพื่อนๆทุกท่านที่คอยช่วยเหลือทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ศิริพร อาจณรงค์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ..... (5)
ABSTRACT..... (7)
กิตติกรรมประกาศ..... (9)
สารบัญ..... (10)
รายการตาราง..... (14)
รายการตารางภาคผนวก..... (15)
รายการรูป..... (17)
รายการรูปภาคผนวก..... (20)
บทที่ 1 บทนำ
บทนำต้นเรื่อง..... 1
วัตถุประสงค์..... 2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย..... 2
ขอบเขตการวิจัย..... 3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2.1 ตาลโตนด..... 4
2.2 น้ำส้มสายชูหมัก..... 6
2.2.1 เทคโนโลยีการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก 7
2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก
2.3.1 ยีสต์..... 8
2.3.1.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล..... 10
2.3.1.2 กระบวนการหมักเอทานอล..... 11
2.3.2 แบคทีเรียกรดอะซิติก..... 13
2.3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเกิดปฏิกิริยา..... 18
overoxidation และคุณสมบัติทางชีวเคมี
2.3.2.2 ความสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีเอทานอล..... 19
2.3.2.3 ความสามารถในการทนกรดอะซิติก..... 21

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.2.4 ความสามารถในการผลิตกรดอะซิติก..... 22
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ
3.1 วัตถุดิบ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี..... 24
3.2 เครื่องมือ..... 26
3.3 วิธีการทดลอง
3.3.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำผลตาลโตนดสุก..... 26
3.3.2 คัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของเชื้อยีสต์จากส่วนเส้นใย
ของผลตาลโตนดสุก.....27
3.3.3 ศึกษาการใช้เชื้อยีสต์เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์เพื่อหมักเอทานอล
ในน้ำผลตาลโตนดสุก.....31
3.3.4 การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก
จากผลตาลโตนดสุก.....34
3.3.5 ศึกษาการใช้แบคทีเรียกรดอะซิติก *Acetobacter ghanensis*
เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์.....36
3.3.6 ศึกษาคุณภาพของน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลตาลโตนดสุก
เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์นำสลัด..... 37
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล
4.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำผลตาลโตนดสุก..... 39
4.2 ผลการคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของเชื้อยีสต์จากผลตาลโตนดสุก..... 42
4.2.1 การคัดแยกเชื้อยีสต์..... 42
4.2.2 ผลของความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์
ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาล 44
4.2.3 ผลของความสามารถในการทนต่อเอทานอล..... 46
4.2.4 ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการผลิตเอทานอล.....48

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.5 ผลของความสามารถในการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์
ในน้ำผลตาลโตนดสุก.....50
4.2.6 ผลของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตเอทานอล 51
4.2.7 ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ 55
4.3 ผลของการใช้เชื้อยีสต์ *Candida stellimalicola* เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์
เพื่อหมักเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุก..... 61
4.3.1 ผลการเจริญเติบโตของยีสต์ *C. stellimalicola*..... 61
4.3.2 ผลการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *C. stellimalicola*
ในน้ำผลตาลโตนดสุก.....64
4.4 ผลการคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก
จากผลตาลโตนดสุก..... 75
4.4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติก..... 75
4.4.2 ผลของความสามารถในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดอะซิติก
ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอล.....78
4.4.3 ผลของความสามารถในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดอะซิติก
ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกรดอะซิติกแตกต่างกัน.....81
4.4.4 ผลของความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ
ที่มีปริมาณเอทานอลต่างๆ.....82
4.4.5 ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดอะซิติก..... 84

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5 ผลการใช้ *Acetobacter ghanensis* เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์
เพื่อหมักกรดอะซิติกในไวน์น้ำผลตาลโตนดสุก....86
4.5.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของ *A. ghanensis* 86
4.5.2 ผลการหมักน้ำส้มสายชูด้วยเชื้อ *A. ghanensis*
ในไวน์น้ำผลตาลโตนดสุก....89
4.6 ผลการศึกษาคุณภาพของน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก
เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์นำสลัด....91
4.6.1 ผลการศึกษาคุณภาพทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมัก
จากผลตาลโตนดสุก....91
4.6.2 ผลการศึกษาคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยรวมของ
น้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก.... 93
4.6.3 ผลการใช้น้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก
ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด....95
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ
5.1 สรุปผลการทดลอง.... 98
5.2 ข้อเสนอแนะ.... 100
เอกสารอ้างอิง....101
ภาคผนวก.... 110
ประวัติผู้เขียน....151

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดอะซิติก จีนัส และสายพันธุ์ต่างๆ 14
2. องค์ประกอบทางเคมีของน้ำผลตาลโตนดสุก 41
3. การกำหนดรหัสของยีสต์ที่คัดแยกได้จากผลตาลโตนดสุก..... 43
4. ผลการใช้น้ำตาลและอินทรีย์สารชนิดต่างๆของเชื้อยีสต์ *C. stellimalicola*..... 57
5. การเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก
ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสและกลูโคส 15 องศาบริกซ์..... 63
6. การกำหนดรหัสของแบคทีเรียกรดอะซิติกที่คัดแยกจากผลตาลโตนดสุก..... 77
7. การเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *A. ghanensis* ในไวน์
น้ำผลตาลโตนดสุกที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6..... 88
8. ผลการทดสอบคุณภาพทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก 92

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ **หน้า**

1. ความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 131
2. ความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ไอโซเลทต่างๆในอาหาร YEPD
ที่มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 132
3. ความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ไอโซเลทต่างๆในอาหารเหลว YEPD
ที่มีความเข้มข้นกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 133
4. การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วย
น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส 10 และ 15 องศาบริกซ์ 135
5. การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วย
น้ำตาลกลูโคส 15 องศาบริกซ์ ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]
ระดับต่างๆ 136
6. การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับ
ด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส 10 และ 15 องศา บริกซ์ ที่ความเข้มข้นของ
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] 500 มิลลิกรัมต่อลิตร 137
7. การผลิตเอทานอลของยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก 6 ลิตร
ที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 และ 15 องศาบริกซ์ 138
8. การผลิตเอทานอลของยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก 6 ลิตรที่ปรับ
ด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ ใสถังหมักขนาด 10 ลิตร 139
9. การผลิตเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก
600 มิลลิลิตรปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ ที่สภาวะการหมักต่างๆ 140
10. การผลิตเอทานอลของยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก 6 ลิตร
ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที
ในถังหมักขนาด 10 ลิตร 142
11. ความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลทต่างๆ
ในอาหารGYE broth ที่มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 143

รายการตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ **หน้า**

12. ความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลทต่างๆ ในอาหารเหลว GYE ที่มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 144
13. การผลิตกรดอะซิติกด้วยเชื้อ *A. ghanensis* ในไวน์ผลตาลโตนดสุก 6 ลิตร ในถังหมักขนาด 10 ลิตร หมักที่อุณหภูมิห้อง 146
14. ส่วนผสมของน้ำสลัดสูตรต่างๆ 147
15. ผลการทดสอบคุณภาพทางเคมีของน้ำสลัดสูตรต่างๆ 147
16. ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดสูตรต่างๆ 148
17. ส่วนประกอบของน้ำสลัดสูตรน้ำส้มสายชูหมักที่อัตราส่วนต่างๆ 149
18. ผลการทดสอบคุณภาพทางเคมีของน้ำสลัดสูตรที่ใช้น้ำส้มสายชู ร้อยละ 20, 30, 40 และ50 149
19. ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดสูตรผลตาลโตนดสุก ที่ระดับน้ำส้มสายชูร้อยละ 20, 30, 40 และ 50 150

รายการรูป

รูปที่ **หน้า**

1. ส่วนประกอบของผลตาลโตนดสุก 4
2. กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู 7
3. กระบวนการใช้น้ำตาลของยีสต์ในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน 12
4. กระบวนการผลิตเอทานอลของยีสต์ 12
5. กลไกการต้านทานต่อกรดอะซิติกของแบคทีเรีย *Acetobacter* และ *Gluconacetobacter* 22
6. การออกซิไดซ์เอทานอลโดยเชื้อ *Acetobacter* 23
7. ปริมาณค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) (A) และปริมาณเซลล์ยีสต์ (log CFU/ml) (B) ของเชื้อยีสต์ไอโซเลทต่างๆในอาหารเหลว YEPD ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 10 และ 15 45
8. ปริมาณค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) (A) และปริมาณเซลล์ยีสต์ (log CFU/ml) (B) ของเชื้อยีสต์ ไอโซเลทต่างๆ ในอาหาร YEPD ที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 47
9. การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลทต่างๆในอาหารเหลว YEPD ที่มีปริมาณ น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 (A) และน้ำตาลกลูโคสร้อยละ15 (B) 49
10. การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15ในน้ำลูกตาลโตนดสุกที่ปรับด้วย น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส 10 และ 15 องศาบริกซ์ 52
11. การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 ในน้ำลูกตาลโตนดสุกที่ปรับด้วย น้ำตาลกลูโคส 15 องศาบริกซ์ ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ระดับต่างๆ 52
12. การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 ในน้ำลูกตาลโตนดสุกที่ปรับด้วย น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส 10 และ 15 องศาบริกซ์ ที่ความเข้มข้นของ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] 500 มิลลิกรัมต่อลิตร 54
13. ลักษณะโคโลนีของเชื้อยีสต์ *C. stellimalicola* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sabouraud agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 60
14. ลักษณะรูปร่างเซลล์ของยีสต์ *C. stellimalicola* ที่เวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า 60

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

15. การเจริญเติบโตปริมาณเซลล์ยีสต์ (CFU/ml) ของยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลน้ำผลตาลโตนดสุกที่มีน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส 15 องศาบริกซ์ 62
16. ผลการผลิตเอทานอล การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (A) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (B) ปริมาณเซลล์ และกรดอะซิติก (C) ของการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก 6 ลิตร ในถังหมักขนาด 10 ลิตร 65
17. ผลการผลิตเอทานอล (A) การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช กรดอะซิติก ปริมาณเซลล์ยีสต์ (B) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (C) ของเชื้อยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก 6 ลิตร ที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร และหมักที่อุณหภูมิห้อง 67
18. ผลของสภาวะการหมักไวน์น้ำผลตาลโตนดสุกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลของยีสต์ *C. stellimalicola* ที่สภาวะการหมักต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 69
19. ผลเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช (A) และปริมาณกรดอะซิติก (B) ของยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก ที่สภาวะการหมักต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 70
20. การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (log CFU/ml) (A) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/100 ml) (B) ของยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก ที่สภาวะการหมักต่างๆ 71
21. ผลการผลิตเอทานอล (A) ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (log CFU/ml) ปริมาณกรด พีเอช (B) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/100 ml) (C) ของเชื้อยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก 6 ลิตร ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ กวนด้วยแท่งแม่เหล็กความเร็ว 300 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาด 10 ลิตร 74
22. การเจริญเติบโต ปริมาณค่าการดูดกลืนแสง(OD_{600}) (A) และปริมาณเซลล์ (log CFU/ml) (B) ของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลทต่างๆในอาหารเหลว GYE ที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 80

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

23. การผลิตกรดอะซิติกของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลทต่างๆในอาหารเหลว GYE ที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 83
24. การเจริญเติบโตปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) ของแบคทีเรีย *A. ghanensis* ในไวน์น้ำผลตาลโตนดสุกที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 87
25. การผลิตกรดอะซิติก (A) การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล ค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (B) จากการหมักน้ำส้มสายชูจากเชื้อ *A. ghanensis* ในไวน์ผลตาลโตนดสุก 6 ลิตร 90
26. น้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก 94
27. ผลการประเมินคุณภาพ สี กลิ่น รสชาติ ของน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก 94
28. การทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดสูตรใช้น้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุกที่ระดับต่างๆ 97

รายการรูปภาคผนวก

รูปที่ **หน้า**

1. กราฟมาตรฐานปริมาณน้ำตาลกลูโคส 116
2. กราฟมาตรฐานปริมาณน้ำตาลกลูโคส 118
3. การหมักส่วนเยื่อใยผลตาลโตนดสุกเพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติก 124
4. ลักษณะอาหาร GYC agar ที่เติม $CaCO_3$ 2% (w/v) และการเจริญของแบคทีเรีย กรดอะซิติก 124
5. ลักษณะรูปร่าง และการติดสีแกรมของแบคทีเรียกรดอะซิติก *Acetobacter ghanensis* 125
6. การทดสอบการเกิดปฏิกิริยา overoxidation ของแบคทีเรียกรดอะซิติก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Carr medium 125
7. การทดสอบการสร้างเซลลูโลสของแบคทีเรียกรดอะซิติก 126
8. การหมักน้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุก 126
9. ผลิตภัณฑ์น้ำสลัดที่ใช้น้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุกเป็นส่วนผสม 127
10. ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดสูตรใช้น้ำส้มสายชูหมักผสมกับน้ำส้มสายชูกลั่นทั้ง 4 สูตร 127
11. ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดสูตรน้ำส้มสายชูหมักที่อัตราส่วนต่างๆ 128

บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ตาลโตนดเป็นพืชตระกูลปาล์มชนิดหนึ่งที่พบในหลายๆพื้นที่ในประเทศไทยเกือบทุกภาคโดยเฉพาะในแถบจังหวัดเพชรบุรี สุพรรณบุรี และภาคใต้ เช่น จังหวัดสงขลา จังหวัดปัตตานี และจังหวัดนราธิวาส ก็มีจำนวนต้นตาลโตนดอยู่มาก ซึ่งต้นตาลโตนดมีประโยชน์แทบทุกส่วน เช่น ใบใช้ทำเครื่องจักรสาน ลำต้นเมื่อแก่จัดเป็นไม้ที่มีคุณภาพดี ผลตาลโตนดใช้เป็นอาหาร ส่วนที่นิยมนำมารับประทานมากที่สุดคือ เนื้อผลตาล เพราะมีลักษณะอ่อนนุ่มสีขาว รสชาติอร่อย ไม่หวานมากนัก สามารถรับประทานสดหรือแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ลูกตาลลอยแก้ว ลูกตาลเชื่อมหรือแปรรูปเป็นลูกตาลบรรจุกระป๋อง แต่ก็มีผลตาลโตนดอีกจำนวนมากที่ไม่ได้เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่สามารถรับประทานสดได้ทำให้มีผลตาลโตนดสุกอีกจำนวนมาก เนื้อตาลจากส่วนเส้นใยผลตาลโตนดสุกมีสีเหลืองอมส้มมีกลิ่นหอม ประกอบด้วยแป้งและน้ำตาลเป็นจำนวนมากมีแคโรทีนอยด์ซึ่งให้สีเหลืองในปริมาณที่สูง จึงสามารถใช้เป็นส่วนผสมพร้อมกับได้สีและกลิ่นรสหรือใช้เป็นวัตถุดิบในการประกอบอาหาร ซึ่งมักจะใช้แต่งสีขนมต่างๆ เช่น ขนมตาล วุ้นลูกตาล ขนมเค้ก ขนมขี้หนู และไอศกรีม ผลตาลโตนดสุกนำมายีกับน้ำทำเป็นขนมตาลซึ่งเป็นขนมพื้นบ้านของไทย (มนัสนันท์, 2544) หรือสามารถให้เป็นอาหารสัตว์และส่วนหนึ่งเกษตรกรจะปล่อยทิ้งไว้เพื่อเพาะต้นตาลโตนดหรือเพาะเป็นจาวตาล ส่วนเนื้อตาลสุกที่ยีแล้วไม่สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน เนื่องจากมีความชื้นและมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนในปริมาณมาก ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียคุณภาพ ทำให้การใช้ประโยชน์จากเนื้อผลตาลโตนดสุกไม่แพร่หลายมากนัก จึงมีผลตาลโตนดสุกอีกมากที่ไม่ได้เก็บมาใช้ประโยชน์

ปัจจุบันจึงมีผู้ประกอบการคิดค้นการใช้ประโยชน์จากเนื้อผลตาลโตนดสุกเพิ่มขึ้น โดยนำเนื้อผลตาลโตนดสุกมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ คือ นำผลตาลโตนดสุกมาคั้นกับน้ำได้น้ำและเนื้อผลตาลโตนดสุก แล้วจึงนำมาหมักเป็นน้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุก ใช้ส่วนน้ำส้มสายชูและเนื้อผลตาลที่ผ่านการหมักมาจำหน่าย แต่การหมักดังกล่าวเป็นการหมักโดยวิธีทางธรรมชาติ

อาศัยเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับผลตาลโตนดสุกทำให้ใช้ระยะเวลาในการหมักนานประมาณ 6 เดือน จึงได้น้ำส้มสายชูหมักแต่ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้ไม่แน่นอนและยังต่ำกว่าค่ามาตรฐานของน้ำส้มสายชูหมัก ซึ่งอาจเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในอาหาร และอาจเกิดความล้มเหลวของการหมักโดยเฉพาะช่วงแรกของการหมักจะมีความเสี่ยงสูงสุด ฉะนั้นเพื่อให้การหมักมีประสิทธิภาพ สะดวกและทำได้ง่าย การเลือกมาพิจารณาใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์จึงเป็นสิ่งแรกที่สำคัญในการพัฒนาและนำมาใช้ในการขยายขนาดการหมักระดับใหญ่ขึ้น (จารุวรรณ, 2551)

ดังนั้นการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการหมักน้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุกคือ เชื้อยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยพัฒนากระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุกโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกที่มีประสิทธิภาพในการหมักน้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุกเพื่อลดระยะเวลาหมัก อีกทั้งเป็นการควบคุมคุณภาพเพื่อให้ได้น้ำส้มสายชูที่มีปริมาณกรดอะซิติกเป็นไปตามมาตรฐาน มีสี กลิ่น และรสชาติที่ดี

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสมบัติทางเคมีของน้ำที่คั้นได้จากส่วนเส้นใยผลตาลโตนดสุก
2. เพื่อคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกจากผลตาลโตนดสุก
3. เพื่อศึกษาสมบัติของยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกที่คัดแยกได้
4. เพื่อประยุกต์ใช้ยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกเป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักน้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุก
5. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้น้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุกในการทำน้ำสลัด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ทราบสมบัติทางเคมีของน้ำที่คั้นได้จากส่วนเส้นใยผลตาลโตนดสุก
2. ทราบสายพันธุ์ของยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกที่คัดแยกจากผลตาลโตนดสุก
3. ทราบประสิทธิภาพการหมักของยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกที่คัดแยกได้
4. สามารถนำกล้าเชื้อยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกซึ่งเป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ไปประยุกต์ใช้หมักน้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุก
5. สามารถประยุกต์ใช้น้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุกในการทำน้ำสลัด

ขอบเขตงานวิจัย

1. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำที่คั้นได้จากส่วนเส้นใยผลตาลโตนดสุก
2. ศึกษาการแยกและคุณสมบัติของยีสต์ ได้แก่ ความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาล ความสามารถในการทนเอทานอล ความสามารถในการผลิตเอทานอล และคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดอะซิติก ได้แก่ ความสามารถในการเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีเอทานอล ความสามารถในการทนกรดอะซิติก และความสามารถในการผลิตกรดอะซิติก
3. ศึกษาการใช้เชื้อยีสต์ และแบคทีเรียกรดอะซิติกเป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักน้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุก
4. ศึกษาคุณภาพของน้ำส้มสายชูผลตาลโตนดสุก เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ตาลโตนด

ตาลโตนดจัดเป็นพืชตระกูลปาล์มชนิดหนึ่งจัดอยู่ในสกุล Borassus มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Borassus flabellifer* ชื่อสามัญ palmyra palm, sugar palm หรือ toddy palm นักชีววิทยาเชื่อว่ามีถิ่นกำเนิดในเอเชียตอนใต้แถบฝั่งตะวันออกของอินเดีย และกระจายตัวทั่วภูมิภาคเอเชีย ได้แก่ อินเดีย ศรีลังกา พม่า กัมพูชา มาเลเซีย อินโดนีเซีย และไทย (ปิฎฐะ, 2535) การเรียกชื่อตาลโตนดแต่ละภาคแตกต่างกัน เช่น ภาคกลางเรียก ต้นตาล ภาคใต้เรียก ต้นตาลโตนด พันธุ์ตาลโตนดที่นิยมปลูกมี 3 พันธุ์ คือ

1. ตาลหม้อ เป็นตาลที่ให้ผลใหญ่ผิวดำมัน เมื่อผลตาลแก่จัดจะมีรอยขีดตามแนวยาวของผล เมล็ดหนา 1 ผลจะมี 2-4 เมล็ดเป็นตาลที่พบมากที่สุด

2. ตาลไข่ เป็นตาลที่ให้ขนาดผลเล็กกว่าตาลหม้อ ผิวมีลักษณะเรียบสีค่อนข้างเหลือง 1 ผลจะมี 2-4 เมล็ด

3. ตาลพันธุ์ลูกผสม ขนาดของผลค่อนข้างใหญ่เกือบเท่าตาลหม้อผิวเรียบมีสีดำผสมน้ำตาลหรือมีรอยขีดสีเหลืองตามแนวยาวของผล 1 ผลจะมี 2-3 เมล็ด

ส่วนประกอบของผลตาลแบ่งออกเป็น 5 ส่วน คือ เปลือกชั้นนอก (exocarp) ส่วนที่เป็นเส้นใย (mesocarp) ส่วนที่เป็นกะลาแข็งหุ้มเมล็ด (endocarp) ส่วนเนื้อในเมล็ด (endosperm) และส่วนของเมล็ด (embryo) (รูปที่ 1) (มารวย และ ชวลิต, 2541)

รูปที่ 1 ส่วนประกอบของผลตาลโตนดสุก

นฤมล (2533) ศึกษาการผลิตและการใช้เนื้อผลตาลสุกผงในขนมไทย พบว่า เนื้อตาลสุกมีความชื้นร้อยละ 89 มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ 7.5 องศาบริกซ์ เมื่อนำผลตาลสุกมาสกัดด้วยน้ำ 3 เท่าแขวนให้สะเด็ดน้ำ พบว่า เนื้อตาลสุกมีความชื้นร้อยละ 86-90 มีความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5-6 มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ 3.5 องศาบริกซ์ และมีเบต้าแคโรทีน 6,075 หน่วยสากลต่อเนื้อตาลสุก 100 กรัม การฆ่าเชื้อเนื้อตาลสุกโดยต้มในอ่างน้ำเดือดอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที เป็นวิธีที่ให้ผลดี แล้วจึงนำไปทำแห้งโดยผสมกับแป้งข้าวเจ้าดิบร้อยละ 5 ใช้โซเดียมไฮโดรเจนพาทาเลท ($KHC_8H_4O_4$) ร้อยละ 0.1 เก็บในถุงอลูมิเนียมที่เคลือบด้วยพลาสติกโพลีเอทีลีนหรือกระป๋องโลหะในภาวะสูญญากาศจะเก็บได้นานกว่า 3 เดือน แต่เนื้อตาลสุกผงที่ได้มีกลิ่นลดลงมากและสีเหลืองซีดลง การใช้เนื้อตาลสุกผงโดยผสมกับน้ำ 7 เท่า และใช้เนื้อตาลสุกผงคืนรูปร้อยละ 30 สำหรับขนมตาลและร้อยละ 20 สำหรับขนมบัวลอย มนัสนันท์ และคณะ (2544) ศึกษาคุณภาพเนื้อตาลสุก พบว่า เนื้อตาลสุกมีสีเหลืองอมส้ม เมื่อยีแล้วมีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า ใยอาหาร และคาร์โบไฮเดรตประมาณร้อยละ 93.00, 0.14, 0.32, 0.38, 2.73 และ 3.43 ตามลำดับ มีค่าความเป็นกรดด่าง 3.56 มีปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 0.59 มีวิตามินซี 41.84 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม มีแคลเซียมและฟอสฟอรัส 1.4 และ 11.20 มิลลิกรัมต่อเนื้อตาลสุกที่ยีแล้ว 100 กรัม ตามลำดับ มีปริมาณธาตุเหล็กน้อยมาก และมีเบต้าแคโรทีน 615 ไมโครกรัมต่อเนื้อตาลสุกที่ยีแล้ว 100 กรัม มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด $3.74x10^7$ โคโลนีต่อกรัม ปริมาณยีสต์และราประมาณ $1.65x10^7$ โคโลนีต่อกรัม เมื่อพาสเจอไรซ์เนื้อตาลสุกในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 22 นาที สามารถทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดยีสต์และราลดลงน้อยกว่า 250 โคโลนีต่อกรัม

Ariyasena *et al.* (2001) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเนื้อตาลสุกในประเทศศรีลังกา โดยเก็บตัวอย่างผลตาลจาก 19 แหล่ง พบว่า ผลตาลมี 4 สายพันธุ์ได้แก่ 1.) ผลตาลมีขนาดค่อนข้างใหญ่ ผลมีสีดำและมีรอยขีดตามแนวยาวของผลซึ่งเป็นผลตาลที่พบมากที่สุด 2.) ผลตาลขนาดปานกลาง สีดำผิวเรียบไม่มีรอยขีดตามแนวยาวของผล 3.) ผลตาลขนาดใหญ่ มีสีดำปนเหลือง ผิวเรียบมีสีส้มขีดตามแนวยาวของผล 4.) ผลตาลขนาดเล็ก ผิวเรียบมีสีเหลือง และเมื่อนำเนื้อตาลทั้ง 4 สายพันธุ์มาสกัดกับน้ำอัตราส่วน 1:1 พบว่า เนื้อตาลมีปริมาณแคโรทีนอยด์ 15.9-2525.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนใหญ่มีรสชาติขมถึงขมเล็กน้อยซึ่งสามารถนำมาหมักเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ส่วนสายพันธุ์ที่มีรสหวานสามารถนำมาทำแยมได้

Nilugin and Mahendran (2010) ศึกษาการเตรียมเครื่องดื่มจากเนื้อตาลสุก โดยสกัดเนื้อตาลกับน้ำอัตราส่วน 1:1 และเตรียมน้ำผลตาลสุกให้มีความเข้มข้นร้อยละ 8, 10, 12, 14, และ 16 ปรับให้มีปริมาณน้ำตาลร้อยละ 15 ปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 0.3 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30

องศาเซลเซียส เพื่อหาอายุการเก็บ พบว่า น้ำผลตาลสุกมีปริมาณกรดร้อยละ 0.28-0.32 วิตามินซี 17.1-20.8 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ความเป็นกรด-ด่าง 3.17 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเนื้อตาล เมื่อทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่า เครื่องดื่มน้ำผลตาลสุกที่ความเข้มข้นร้อยละ 12 ได้รับการยอมรับมากที่สุด และเครื่องดื่มน้ำผลตาลสุกสามารถเก็บได้อย่างน้อย 6 เดือนโดยไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

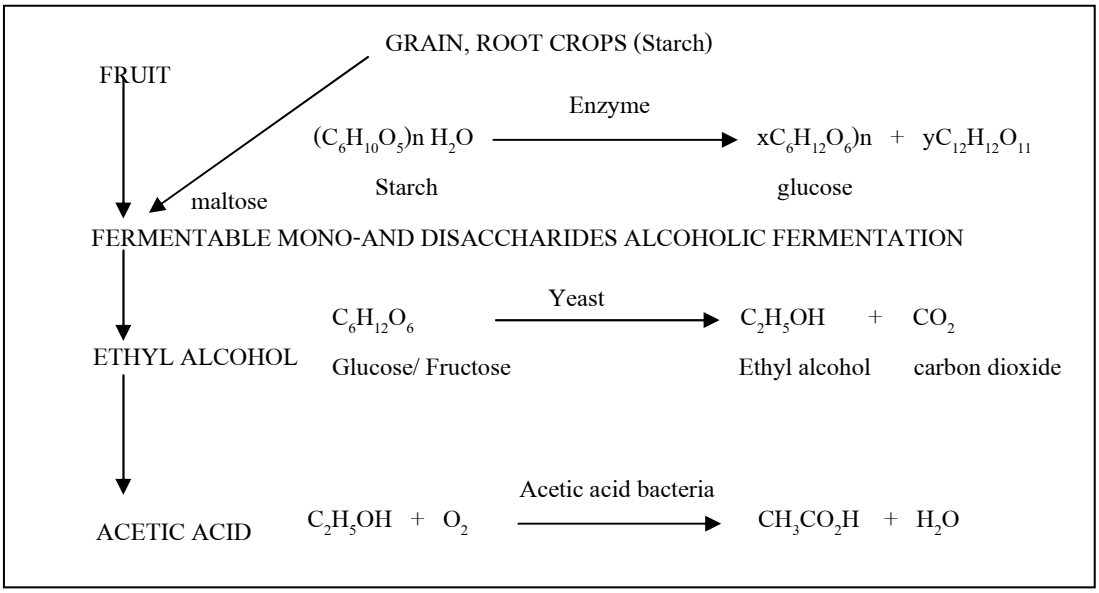
Chaurasiya *et al.* (2011) ศึกษาการเพิ่มการใช้ประโยชน์จากเนื้อผลตาลสุก พบว่า ผลตาลสุกส่วนเยื่อตาลจะมีสีส้มอมเหลือง คือส่วน mesocarp ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถรับประทานได้ อุดมไปด้วยวิตามินเอและวิตามินซี โดยได้นำเนื้อตาลสุกมาสกัดกับน้ำอัตราส่วน 1:1 ทำปาล์มสเปรด (palm spread) และลูกกวาดจากเนื้อผลตาลสุกพร้อมศึกษาสภาวะการเก็บ พบว่า ปาล์มสเปรด และลูกกวาดสามารถเก็บได้นาน 8 และ 9 เดือน ที่อุณหภูมิห้องและผลิตภัณฑ์นี้มีต้นทุนต่ำและได้กำไรสูง

2.2 น้ำส้มสายชูหมัก

น้ำส้มสายชูหมัก (vinegar) เกิดขึ้นเมื่อหลายพันปีมาแล้ว ซึ่งเกิดจากการเสียของไวน์อุ่นเนื่องจากมีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *Acetobacter* ทำให้ไวน์มีรสเปรี้ยวจึงคิดว่าเป็นไวน์เสียจึงทิ้งไปและต่อมาจึงมีการบริโภคน้ำส้มสายชูหมัก โดยเริ่มจากใช้เป็นสารกันเสียกับอาหารพวกเนื้อสัตว์และผัก น้ำส้มสายชูหมักหรือสารละลายกรดอะซิติก ได้จากกระบวนการหมัก 2 ขั้นตอน (two-stage fermentation) ขั้นตอนแรก จะเป็นการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอลโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และขั้นตอนที่สอง เอทานอลจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นกรดอะซิติกโดยแบคทีเรีย *Acetobacter* (รูปที่ 2) ซึ่งน้ำส้มสายชูหมักดังกล่าวจะต้องมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกอย่างน้อยร้อยละ 4 และมีเอทานอลเหลืออยู่น้อยกว่าร้อยละ 0.5 มีค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 2.0-3.5 การเรียกชื่อน้ำส้มสายชูหมักส่วนมากจะเรียกชื่อจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก ในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่จะใช้น้ำส้มสายชูเป็นเครื่องปรุงรสและใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารแปรรูปหลายประเภท เช่น น้ำสลัด มายองเนส มัสตาร์ด และซอสชนิดต่างๆ ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตขนมปัง ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ อาหารหมักดอง และอาหารกระป๋อง (Hutkins, 2006)

ปัจจุบันการผลิตน้ำส้มสายชูหมักสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบที่หลากหลาย เช่น ไวน์ เอทานอล ธัญพืช หรือผลไม้ต่างๆ น้ำส้มสายชูหมักสามารถเกิดขึ้นได้เองโดยธรรมชาติจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบซึ่งจะมีปัญหาเรื่องระยะเวลาในการหมักนานและคุณภาพของน้ำส้มสายชูไม่ได้มาตรฐาน เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการโดยเฉพาะหนอน

ในน้ำส้มสายชู (*Anguillula aceti*) ปัจจุบันจึงมีการคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักที่จำเพาะเพื่อให้ได้น้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพ กลิ่น สี และรสชาติที่ดีตรงกับความต้องการของผู้บริโภค



รูปที่ 2 กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู

ที่มา : Wood (1998)

2.2.1 เทคโนโลยีการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก

ปัจจุบันกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูมีหลากหลายวิธี ซึ่งล้วนมุ่งเน้นให้ได้ปริมาณกรดอะซิติกที่สูง ลดระยะเวลาการหมัก และได้น้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพ ซึ่งสามารถอธิบายวิธีการหมักน้ำส้มสายชูออกเป็น 3 วิธี (สุมณฑา, 2545; Adam, 1985; Hutkins, 2006) ดังนี้

1. เทคนิคการเติมกรดน้ำส้มบนผิวหน้าของสับสเตรท (surface culture technique หรือ slow process เป็นวิธีการหมักแบบดั้งเดิมที่เก่าแก่ที่สุด เป็นกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยเป็นการหมักในภาชนะ เช่น ถังไม้ โอ่ง และถาด ซึ่งแบคทีเรียจะสร้างแผ่นฟิล์ม และลอยอยู่บนผิวหน้าของภาชนะที่สัมผัสกับอากาศ การหมักวิธีนี้จะใช้ระยะหมักนาน เป็นเทคนิคง่ายๆทำในระดับพื้นบ้าน แต่มีการพัฒนาขึ้นเป็นระดับอุตสาหกรรม เรียกว่า กระบวนการออร์ลีน (Orleans process) โดยผลิตน้ำส้มสายชูในถังที่ออกแบบมีช่องทางเติมอากาศ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจะถ่ายน้ำส้มสายชูออก และเติมวัตถุดิบลงไปใหม่แบคทีเรียกรดอะซิติกก็จะเจริญและสร้างแผ่นฟิล์มขึ้นมาอีกครั้ง การหมักน้ำส้มสายชูด้วยวิธีนี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 14 วัน

2. เทคนิคการเติมกรดน้ำส้มโดยการเพาะเชื้อแบบเร่ง (quick process หรือ trickling generator process) ดัดแปลงมาจากวิธี surface culture เป็นกระบวนการหมักที่ใช้วัสดุต่างๆ เช่น ซังข้าวโพด แผ่นไม้ วางซ้อนกันในถังหมัก เพื่อให้แบคทีเรียกรดอะซิติกเจริญเติบโต และยึดเกาะ ทำให้สัมผัสกับอากาศเพิ่มขึ้น ด้านล่างของถังหมักจะเจาะรู กระบวนการหมักเริ่มจากปล่อยเอทานอลจากด้านบนของถังให้ไหลลงสู่ด้านล่างสัมผัสกับแบคทีเรียกรดอะซิติก ซึ่งจะออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติก จากนั้นก็จะถูกปั๊มขึ้นไปด้านบนปล่อยให้ไหลผ่านวัสดุที่มีแบคทีเรียกรดอะซิติกเกาะติดอยู่วนเวียนจนได้ปริมาณกรดอะซิติกเป็นไปตามมาตรฐาน นอกจากนี้อาจมีการถ่ายน้ำหมักจากถังที่ 1 ไปสู่ถังที่ 2, 3 และ 4 การหมักด้วยวิธีนี้จะใช้เวลาประมาณ 3 วัน ในการออกซิไดซ์เอทานอลร้อยละ 12 (v/v) ได้กรดอะซิติกเท่ากับร้อยละ 10-12 (v/v)

3. เทคนิคการเติมกรดน้ำส้มแบบใช้เชื้อแบคทีเรียจมอยู่ใต้ผิว (submerged acetification) หลักการ คือ ให้แบคทีเรียกรดอะซิติกเจริญเติบโตแช่อยู่ในสับสเตรท กระบวนการหมักเกิดขึ้นในถังหมักทรงสูงที่มีการควบคุมอุณหภูมิ มีระบบการให้อากาศโดยการกวนด้วยใบพัด การหมักด้วยวิธีนี้แบคทีเรียกรดอะซิติกสามารถสัมผัสและออกซิไดซ์เอทานอลได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้เวลาเพียง 24-48 ชั่วโมง ได้กรดอะซิติกเท่ากับร้อยละ 10-14 จากนั้นกรดอะซิติกจะถูกถ่ายออกนอกถังหมัก และเติมเอทานอลเพื่อเริ่มกระบวนการหมักอีกครั้ง วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ผลิตน้ำส้มสายชูในระดับอุตสาหกรรม

2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก

2.3.1 ยีสต์

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดี่ยวเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อ (budding) บางชนิดมีการแบ่งตัว (binary fission) รูปร่างกลม (spherical) หรือรี (ellipsoidal) หรือรูปไข่ (oval) ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เจริญได้ในอาหารที่มีพีเอชเป็นกรด ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกยีสต์คือ ขนาดและสีของโคโลนี การสืบพันธุ์ (บุษกร, 2550) ยีสต์มีอยู่หลากหลายสายพันธุ์แต่ก็มีไม่กี่สายพันธุ์เท่านั้นที่นำมาใช้หมักอาหาร เช่น *Candida* spp. และ *Saccharomyces cerevisiae* (สุมณฑา, 2545) ยีสต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น เบียร์ ไวน์ ขนมปัง ไซเดอร์ และเอทานอล ซึ่งการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้ผลิตเอทานอลเพื่อผลิตน้ำส้มสายชูหมักนั้นต้องคำนึงถึงความสามารถเจริญได้ในวัตถุดิบที่มีน้ำตาล และต้องสามารถผลิตเอทานอลได้สูงเป็นปัจจัยที่ต้องให้ความสำคัญเป็นอันดับแรก

นฤมล (2548) คัดแยกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนจากผลไม้ ใบไม้ ดิน และผลปาล์ม เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลได้ 70 ไอโซเลท และเมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล พบว่า ไอโซเลท MIY1 และ MIY57 ผลิตเอทานอลได้ดีที่สุดเมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 15 ยีสต์สกัดร้อยละ 1 พีเอชเริ่มต้น 4.5 เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที สามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 4.7 และ 5.0 ตามลำดับ เมื่อเทียบเคียงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และลักษณะทางอณูชีววิทยาบ่งชี้ว่าเป็น *Saccharomyces cerevisiae*

Tuntiwongwanich and Leenanon (2009) คัดแยกเชื้อยีสต์จากลูกตาลโตนดสุกที่มีคุณสมบัติช่วยให้ขนมตาลขึ้นฟูจากจังหวัดเพชรบุรี จังหวัดสมุทรปราการ จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดนครปฐม โดยใช้อาหาร Yeast malt agar ได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลท และเมื่อนำมาจำแนกโดยใช้ชุดทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี ID 32C BioMeieux พบว่า เป็นสายพันธุ์ *Kloeckera apicalata, Kloeckera japonica, Candida krusei, Candida valida* และ *Candida tropicalis*

Li *et al.* (2011) คัดแยกเชื้อยีสต์จากการหมักไวน์องุ่นจากเมืองยินยวน (Ningxia) ในประเทศจีนโดยใช้อาหาร Yeast extract peptone glucose agar (YEPD agar) ได้ 400 ไอโซเลท และเมื่อนำมาจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร Wallerstein laboratory (WL) nutrient agar และเทคนิค PCRจำแนกได้9 สายพันธุ์คือ *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora occidentalis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida zemplinina*, *Hanseniaspora vineae*, *Issatchenkia orientalis*, *Zzgosaccharomyces bailii*, *Pichia kluyveri* และ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในระยะกลางและระยะสิ้นสุดการหมัก ซึ่งมีปริมาณเอทานอลร้อยละ 4 และ 9 ตาม ลำดับ และสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีปริมาณเอทานอลสูงและที่มีค่าพีเอชต่ำ

Hidalgo *et al.* (2012) คัดแยกเชื้อยีสต์จากการหมักลูกพลับโดยใช้อาหาร YPD agar และใช้อาหาร L-lysine agar เพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่าง *Saccharomyces* และ non-*Saccharomyces* สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 453 ไอโซเลท โดยที่ 226 ไอโซเลท แยกได้จากการหมักโดยวิธีตามธรรมชาติ และ 180 ไอโซเลทสามารถเจริญได้บนอาหาร L-lysine agar ในขณะที่ 227 โคโลนี แยกได้จากการเติมเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ทางการค้าซึ่งมีเพียง 29 โคโลนี ที่สามารถเจริญได้บนอาหาร L-lysine agar ซึ่งการหมักเอทานอลโดยวิธีธรรมชาติสามารถจำแนกยีสต์ได้ทั้งหมด 8 สายพันธุ์คือ *Pichia guilliermond*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces florentinus*, *Cryptococcus* sp., *Dekkera anomala*, *Pichia kluyveri* และ *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.1.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล

ความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสายพันธุ์ แต่กระบวนการหมักเอทานอลยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ปัจจุบันจึงมีการคัดเลือกยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมในการหมักเอทานอล นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาการผลิตเอทานอลโดยการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* แต่แบคทีเรียมีความสามารถทนต่อเอทานอลได้ต่ำกว่ายีสต์ ซึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์ ได้แก่ ความทนต่อเอทานอล ความทนต่อความเข้มข้นของสับสเตรท และความทนอุณหภูมิสูง การเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์จะถูกยับยั้งด้วยเอทานอล โดยพบว่าเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 1-2 ส่งผลให้การเจริญเติบโตของยีสต์ลดลง ซึ่งเอทานอลจะไปยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และโปรตีนทำให้การเจริญเติบโตลดลงเนื่องจากโปรตีนในเซลล์เสื่อมสภาพ (denature) ในขณะที่ความเข้มข้นของสับสเตรทสูงกว่าร้อยละ 14 จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ และอัตราการหมักจะลดลง เนื่องจากเซลล์ยีสต์จะเกิดพลาสโมไลซิส นอกจากนี้อุณหภูมิที่ใช้หมักเอทานอลก็มีความสำคัญ โดยทั่วไปช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล คือ 25-38 องศาเซลเซียส นอกจากนี้อุณหภูมิในกระบวนการหมักเอทานอลมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์สำหรับการออกซิเดชั่นทำให้เกิดการสะสมของไพรูเวท และเอทานอล (สาวิตรี, 2540)

Lin *et al.* (2012) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอลโดยการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD broth ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 4 นำไปหมักเอทานอลที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 10, 20, 30, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า เมื่ออุณหภูมิของการหมักเอทานอลเพิ่มขึ้นเชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น โดยสามารถผลิตเอทานอลสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีปริมาณเอทานอลสูงสุดภายในระยะเวลาการหมัก 2 วัน แต่การหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เชื้อยีสต์มีการผลิตเอทานอลลดลง โดยมีปริมาณเอทานอลต่ำกว่าร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิของการหมัก 50 องศาเซลเซียส การศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD broth ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2, 4, 8, 16 และ 30 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน พบว่า เมื่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นเชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น โดยสามารถผลิตเอทานอลสูงสุดที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 16 แต่ที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 30 เชื้อยีสต์ผลิตเอทานอลลดลง เมื่อคำนวณอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะ พบว่า การหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 8 และ 16 มีอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะสูงสุด เช่นเดียวกับการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลที่พีเอชต่างๆ คือ 3, 4, 5, 5.5 และ 6 พบว่า เชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่พีเอช 4 และ 5

2.3.1.2 กระบวนการหมักเอทานอล

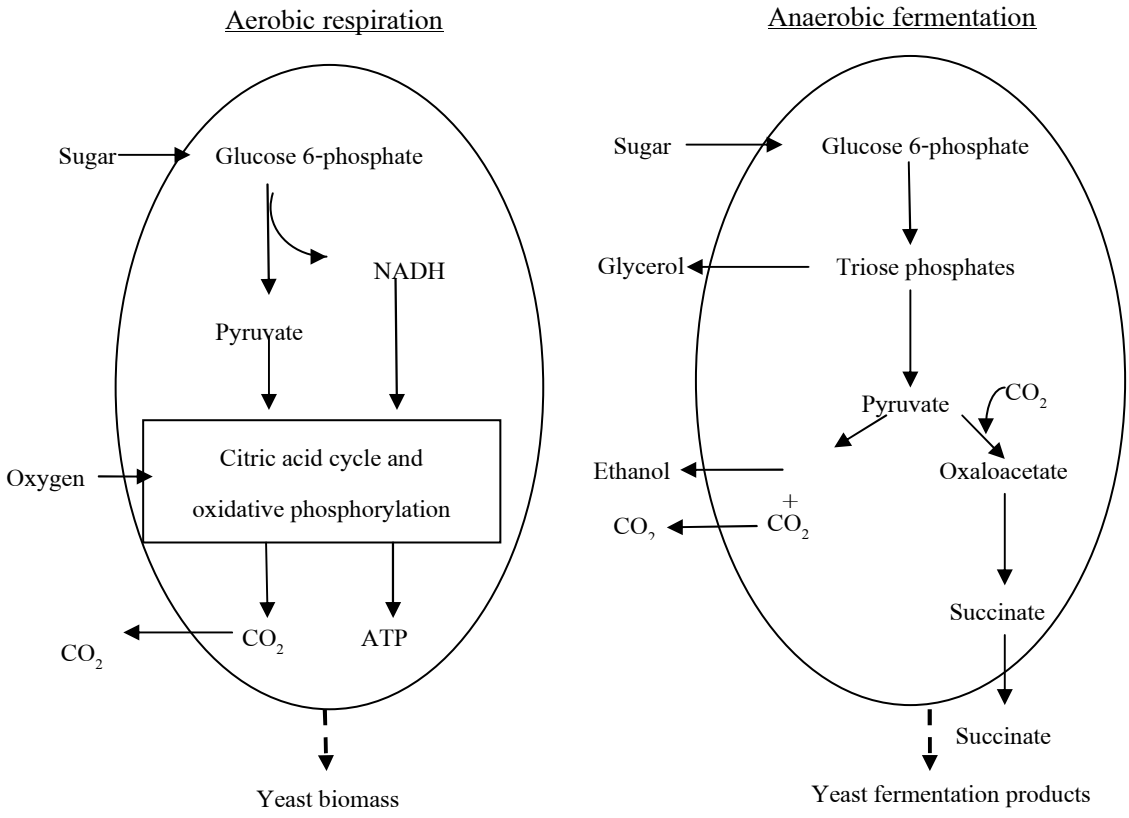
กระบวนการหมักเอทานอลในสภาวะที่มีอากาศยีสต์จะเจริญเติบโตเนื่องจากมีการออกซิเดชันของกลูโคสเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์โดยวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) และในกระบวนการลูกโซ่หายใจ ซึ่งออกซิเจนจะทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายและเป็นองค์ประกอบของไซโตโครมในกระบวนการลูกโซ่หายใจเพื่อสร้างมวลเซลล์ (รูปที่ 3) แต่ในกระบวนการหมักเอทานอลในสภาวะที่ไม่มีอากาศ เริ่มต้นจากน้ำตาลถูกเปลี่ยนไปตามวิถีไกลคอไลซิส (Glycolytic pathway) หรือกระบวนการเอมบ์เดนเมเยอร์ฮอฟพาร์นาส (Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway) จะได้ไพรูเวท (pyruvate) โดยน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล จะให้ไพรูเวท 2 โมเลกุลดังสมการ

$$\text{glucose} + 2\ \text{ATP} + 2\ \text{NAD}^{+} \longrightarrow 2\ \text{pyruvate} + 4\ \text{ATP} + 2\ (\text{NADH}+\text{H}^{+})$$

ต่อจากนั้นไพรูเวทเกิดการแยกเอาคาร์บอนไดออกไซม์ออก เรียกว่าการเกิดการดีคาร์บอกซิเลชั่น (decarboxylation) โดยมีเอนไซม์ไพรูเวทดีคาร์บอกซีเลส (pyruvate decarboxylase) เป็นตัวเร่งสร้างแอซิตัลดิไฮด์ (acetaldehyde) และจะถูกรีดิวส์โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) เป็นเอทานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ (รูปที่ 4) ซึ่งการหมักน้ำตาลของยีสต์สามารถคำนวณได้ด้วยสมการ Gay-Lussac ต่อไปนี้

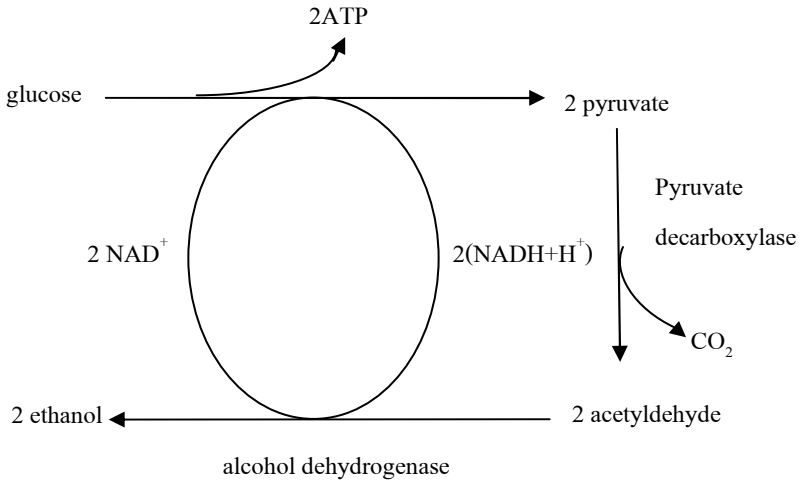
$$\underset{\text{glucose 180 g}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{ethanol 92 g}}{C_2H_5OH} + \underset{\text{carbondioxide 88 g}}{2\ CO_2}$$

ซึ่งตามทฤษฎีการหมักเอทานอล กลูโคส 1 กรัม จะให้ปริมาณเอทานอล 0.511 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.489 กรัม นั่นมีค่าผลผลิตทางทฤษฎี (theoretical yield) สำหรับการผลิตเอทานอลเท่ากับร้อยละ 51.1 แต่ในการหมักทั่วไป กลูโคส 1 กรัม จะให้เอทานอลเพียงร้อยละ 90 ของผลผลิตทางทฤษฎี เพราะกลูโคสส่วนหนึ่งยีสต์จะใช้เพื่อการเจริญเติบโต และบางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตพลอยได้ เช่น กลีเซอรอล และซัคซิเนท นอกจากนี้กระบวนการหมักเอทานอลยังขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น เอทานอล ความเข้มข้นของสับสเตรท สารอาหาร และสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ พีเอช ออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ (สาวิตรี, 2540)



รูปที่ 3 กระบวนการใช้น้ำตาลของยีสต์ในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน

ที่มา : Walker (1998)



รูปที่ 4 กระบวนการผลิตเอทานอลของยีสต์

ที่มา : Walker (1998)

2.3.2 แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก (acetic acid bacteria)

แบคทีเรียกรดอะซิติกจัดอยู่ในแฟมิลี *Acetobacteraceae* ปัจจุบันประกอบด้วย 12 จีนัสต่างๆ ดังนี้ *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Granulibacter*, *Kozakia*, *Neoasaia*, *Saccharibacter*, *Swaminathania*, *Tanticharoenia* และ *Ameyamaea* มีจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมด 59 สายพันธุ์ (Tanasupawat *et al*., 2009; Guillamon and Mas, 2011; Barrao *et al*., 2011; Sengun and Karabiyikli, 2011) ซึ่งแต่ละจีนัสจะมีสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดอะซิติกต่างกัน กลุ่มที่ผลิตกรดอะซิติกได้ คือ จีนัส *Acetobacter* และ *Gluconobacter* เซลล์รูปร่างเป็นแท่ง แกรมลบ จัดเป็นพวกต้องการออกซิเจนในการหายใจ (obligate aerobe) สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติกได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีช่วงพีเอช 5.3-6.3 (Hutkins, 2006) แบคทีเรียจีนัส *Gluconobacter* สามารถออกซิไดซ์เอทานอลได้เป็นกรดอะซิติกเพียงอย่างเดียวแต่ให้ปริมาณกรดอะซิติกต่ำ (สมใจ, 2550) แบคทีเรียจีนัส *Acetobacter* สามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ เรียกว่า overoxidation แหล่งคาร์บอนที่ดี ได้แก่ กลีเซอรอล เอทานอล น้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 30 ไม่สร้างรงควัตถุสีน้ำตาล และมีระบบยูบิควิโนน (ubiquinone) ชนิด Q9 เป็นองค์ประกอบหลักภายในเซลล์ ซึ่งแตกต่างกับจีนัส *Gluconobacter* และ *Gluconacetobacter* ที่มีระบบยูบิควิโนนชนิด Q10 สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล และเจริญเติบโตที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 30 สำหรับคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดอะซิติกจีนัสที่สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติก และคุณลักษณะทางสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติกที่นิยมนำมาผลิตกรดอะซิติก แสดงในตารางที่ 1 (Bartowsky and Henschke, 2008)

Holt *el at.* (1994) พบว่า ลักษณะของแบคทีเรียจีนัส *Acetobacter* เซลล์มีลักษณะทรงรีเป็นท่อนตรงหรือโค้ง ขนาด 0.6-0.8x1.0-1-4.0 ไมโครเมตร อาจเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงต่อกันเป็นสาย บางชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้ บางชนิดเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมลบ จัดเป็นพวก obligate aerobe ต้องการออกซิเจนในการหายใจสามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติก และสามารถออกซิไดซ์กรดอะซิติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ 25-30 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญ 5.4-6.3

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดอะซิติก จีนัส และสายพันธุ์ต่างๆ

Distinguishing acetic acid bacteria (AAB) from lactic acid bacteria (LAB)		
	AAB	**LAB**
Gram stain	Negative	Positive
Catalase reaction	Positive	Negative
Motility	Motile or non-motile	Non-motile
Oxygen requirement	Obligately aerobic	Aerobic or anaerobic
Production of acetic acid from ethanol	Yes	No
Sugar metabolism	Hexose monophosphate pathway	Homo-or hetero-fermentative
G+C content (mol %)	> 50	< 50

Distinguishing AAB genera			
	Acetobacter	***Gluconacetobacter***	***Gluconobacter***
Motility and flagellation	Peritrichous or non-motile	Peritrichous or non-motile	Polar or non-motile
Oxidation of ethanol to acetic acid	+	+	+
Oxidation of acetic acid to CO_2 and H_20	+	+	-
Oxidation of lactate to CO_2 and H_20	+	+or -	-

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดอะซิติก จีนัส และสายพันธุ์ต่างๆ (ต่อ)

	Distinguishing AAB genera		
	Acetobacter	*Gluconacetobacter*	*Gluconobacter*
Growth on 0.35% acetic acid containing medium	+	+	+
Growth in the presence of 30% glucose	-	+or -	-or weak+
Ketogenesis from glycerol	+or -	+or -	+
Acid production from			
Glycerol	+or -	+	+
D-mannitol	+or -	+or -	+
Raffinose	-	-	-
Production of soluble brown pigment(s)	-	Variable	Variable
Ubiquinone type	Q-9	Q-10	Q-10

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดอะซิติก จีนัส และสายพันธุ์ต่างๆ (ต่อ)

	Distinguishing AAB species						
	Acetobacter				*Gluconacetobacter*		*Gluconobacter*
	aceti	***oeni***	***pasteurianus***	*tropicalis*	*hansenii*	*liquefaciens*	*oxydans*
Growth on carbon sources							
Glycerol	+	+	Variable	+	+	Variable	+
Ethanol	+	-	Variable	-	-	+	+
Dulcitol	-		-		Variable	-	Variable
Sodium acetate	+		Variable		-	Variable	-
Formation from D-glucose of							
2-keto-D-gluconic acid	+	-	Variable	+	Variable	+	+
5-keto-D-gluconic acid	+	+	-	-	Variable	Variable	+
2,5-keto-D-gluconic acid	-				-	+	+
Acid production from							
D-glucose	+		Variable	+	+	+	+

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดอะซิติก จีนัส และสายพันธุ์ต่างๆ (ต่อ)

	Distinguishing AAB species						
	Acetobacter				*Gluconacetobacter*		*Gluconobacter*
	aceti	*oeni*	*pasteurianus*	*tropicalis*	*hansenii*	*liquefaciens*	*oxydans*
Acid production from							
D-mannose	+		-	Variable	+	+	+
D-galactose	+		Variable	+			
L-arabinose	+		Variable	-			+
D-xylose	+		Variable	+weak			
Ketogenesis from							
Glycerol	+	+	-	-	+	+	+
Sorbitol	+		-		+	+	+
Mannitol	Variable		-	-	+	+	
Nitrate reduction	-		+	+			
N_2 fixation					-	-	
G + C content (mol %)	56.2-57.2	58.1	51.8-53	55.2-56.6	58-63	62-65	56-64

- = negative, + = positive, variable = 11-89% of strains positive.

ที่มา : Bartowsky and Henschke (2008)

โดยทั่วไปน้ำส้มสายชูสามารถหมักด้วยวิธีตามธรรมชาติโดยแบคทีเรียกรดอะซิติกที่ติดมากับวัตถุดิบซึ่งมีคุณสมบัติ ได้แก่ มีความทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลซึ่งใช้สำหรับหมักเอทานอลโดยยีสต์ มีความทนต่อเอทานอล และสามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติก แต่ส่วนมากจะเกิดปฏิกิริยา overoxidation มีความทนต่อกรดอะซิติกที่เซลล์แบคทีเรียผลิตขึ้น สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด สามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดอะซิติกได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง และสามารถเจริญเติบโตได้ที่ค่าพีเอชต่ำ ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าวสามารถสรุปเกณฑ์การคัดเลือกแบคทีเรียกรดอะซิติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อหมักน้ำส้มสายชูได้ดังนี้

2.3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเกิดปฏิกิริยา overoxidation และคุณสมบัติทางชีวเคมี

ปฏิกิริยา overoxidation เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในน้ำส้มสายชูหมักเมื่อมีแบคทีเรียกรดอะซิติกคงเหลือในน้ำส้มสายชูโดยพบในจีนัส *Acetobacter* ซึ่งสามารถออกซิไดซ์กรดอะซิติกในสภาวะที่มีออกซิเจนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ จึงใช้การเกิดปฏิกิริยา overoxidation ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างจีนัส *Acetobacter* และจีนัส *Gloconobacter* ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ต้องการในการคัดเลือกกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก

กุลวดี (2552) คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกจากตัวอย่างผลไม้ 7 ชนิด ได้แก่ สับปะรด เงาะ องุ่น ลำใย เสาวรส มะละกอ และมังคุด โดยใช้เทคนิค Enrichment culture เลือกโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหาร Bromocresol purple ethanol agar จากสีม่วงเป็นสีเหลืองมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า มีทั้งหมด 35 ไอโซเลท จากตัวอย่างสับปะรด เงาะ ลำใย และมะละกอเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง เมื่อทดสอบปฏิกิริยา overoxidation พบว่า เป็นจีนัส *Acetobacter* จำนวน 27 ไอโซเลท จีนัส *Gloconobacter* จำนวน 8 ไอโซเลท นำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่า ไอโซเลทหมายเลข K10 ซึ่งแยกได้จากสับปะรด จัดเป็น *Acetobacter aceti* K10 สามารถผลิตกรดได้สูงสุดวันที่ 7 เท่ากับ 13.37 กรัมต่อลิตร

Sokollek *et al.* (1998) ได้จำแนกความแตกต่างระหว่างจีนัส *Acetobacter* และ *Gluconobacter* ที่คัดแยกได้จากอุตสาหกรรมการหมักน้ำส้มสายชูในประเทศเยอรมัน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Acetic acid ethanol medium พบว่า *Acetobacter europaeus* สามารถเกิดปฏิกิริยา overoxidation และเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. ที่แยกได้จากไซเดอร์ ไวน์ และน้ำส้มสายชูที่ความเข้มข้นของเอทานอลและกรดอะซิติกต่างๆ พบว่า ทุกสายพันธุ์เจริญได้ดีบนอาหาร Reinforced acetic acid ethanol medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 1-2 วัน โคโลนีมีลักษณะสีเหลืองขนาด 1-2 มิลลิเมตร เซลล์มีลักษณะเป็นแท่ง เคลื่อนที่ไม่ได้ ดังนั้นความแตกต่างระหว่าง

จีนัส *Acetobacter* และ *Gluconobacter* คือ จีนัส *Acetobacter* สามารถเกิดปฏิกิริยา overoxidation ซึ่งสามารถออกซิไดซ์กรดอะซิติกให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้

Seearunruangchai *et al.* (2004) คัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติกจากตัวอย่างเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ น้ำส้มสายชู ดอกไม้ น้ำผึ้ง ดิน น้ำ และผลไม้ต่างๆ ในประเทศไทยโดยใช้อาหาร Glucose ethanol yeast extract broth (GEY broth) พบว่า สามารถจำแนกได้ทั้งหมด 40 ไอโซเลท ทุกไอโซเลทมีลักษณะเป็นแท่งสั้น แกรมลบ สามารถเกิดวงใส (clear zone) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของแคลเซียมคาร์บอเนตและเมื่อนำมาจำแนกพบว่า กลุ่มแรกเป็นสายพันธุ์ *Acetobacter pasteurianus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด กลุ่มที่ 2 เป็นสายพันธุ์ *Acetobacte orientalis* และกลุ่มที่ 3 เป็นสายพันธุ์ *Gluconacetobacter liquefaciens*

Gullo and Giudici (2008) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดอะซิติกในการหมักน้ำส้มสายชูโดยวิธีพื้นบ้าน พบว่า แบคทีเรียกรดอะซิติกที่คัดแยกได้สามารถผลิตกรดอะซิติกได้เร็ว ไม่เกิดปฏิกิริยา overoxidation ทนต่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกได้สูง ทนต่อค่าพีเอชต่ำ ทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูง เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ 25-30 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดอะซิติกอยู่ระหว่าง 5.0-6.5 ซึ่ง *Gluconacetobacter europaeus* และ *Acetobacter malorum* เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการเลือกมาผลิตเป็นกล้าเชื้อน้ำส้มสายชู

Maal and Shafiee (2009) คัดแยกเชื้อ *Acetobacter* จากเชอรี่ในประเทศอิหร่าน เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Carr medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีฟ้าเล็กๆ และเมื่อครบ 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีผิวเรียบ มีเงา เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลืองนำไปทดสอบ พบว่า เป็นแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง แท่งสั้นปลายมน เซลล์อยู่ติดกันเป็นคู่ และเซลล์ที่เรียงต่อกันเป็นสายยาว ผลการสร้างแคตาเลสเป็นบวก และออกซิเดสเป็นลบ

2.3.2.2 ความสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีเอทานอล

ความสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเอทานอลเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดอะซิติก เพราะแบคทีเรียกรดอะซิติกจะต้องเจริญเติบโตและทนต่อความเข้มข้นของปริมาณเอทานอลก่อนที่จะออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติก

มัลลิกา และพัฒนา (2549) ศึกษาการผลิตกรดอะซิติกจากเอทานอลโดยแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *Acetobacter pasteurianus* TISTR 520 พบว่า ความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้นร้อยละ 6 เหมาะสมสำหรับใช้ผลิตกรดอะซิติก เนื่องจากแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์

Acetobacter pasteurianus TISTR 520 สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติกได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 4.4 แต่ที่ปริมาณเอทานอลเริ่มต้นสูงกว่าร้อยละ 6 การผลิตกรดอะซิติกจะลดลง และที่ความความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่าร้อยละ 10 จะไม่พบการผลิตกรดอะซิติก

วัลลภา (2550) ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียกรดอะซิติกทนร้อนจากอาหารหมัก โดยคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกที่สามารถเจริญเติบโต และผลิตกรดอะซิติกได้ 28 ไอโซเลท พบว่า ทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่งสั้นหรือรูปไข่ มีความสามารถสร้างกรดจากน้ำตาลชนิดต่างๆ ผลการทดสอบเอนไซม์แคตาเลสให้ผลบวก สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีจำนวน 10 ไอโซเลทสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สามารถจัดแบ่งได้ 3 กลุ่ม พบว่า กลุ่มที่ 1 เป็น *Gluconobacter frateurii* กลุ่มที่ 2 เป็น *Acetobacter tropicalis* และกลุ่มที่ 3 เป็น *Acetobacter pasteurianus*

Lisdiyanti *et al.* (2001) คัดแยกและจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดอะซิติกจากดอกไม้ ผลไม้ และอาหารหมัก เช่น ดอกพุทธรักษา มะม่วง เงาะ ฝรั่ง และไวน์ ที่ประเทศอินโดนีเซีย พบว่า สามารถคัดแยกได้จำนวน 81 ไอโซเลท ซึ่ง 46 ไอโซเลท เกิดวงใสรอบอาหารเลี้ยงเชื้อ (clear zones) เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน แกรมลบ สามารถผลิตกรดอะซิติกจากเอทานอลออกซิไดซ์อะซิเตท และแลคเตสเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้

Ndoye *et al.* (2007) คัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติกจากมะม่วงในประเทศเซเนกัล (Senegal) พบว่า เป็นสายพันธุ์ *Acetobacter senegalensis* เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งกว้าง 0.8 ไมโครเมตร ยาว 1.2-2 ไมโครเมตร เป็นแบคทีเรียแกรมลบไม่สร้างสปอร์อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นคู่ เป็นสายสั้นหรือบางครั้งเป็นสายยาว อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ 35 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 28-40 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเอทานอลร้อยละ 10

Maal and Shafiee (2009) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* ที่คัดแยกได้จากเชอรี่ในอาหารที่มีเอทานอลร้อยละ 4-10 พบว่า ในระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง เชื้อ *Acetobacter* จะเจริญเติบโตและผลิตกรดอะซิติกได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลร้อยละ 4-6 แต่จะไม่มีการเจริญเติบโตและผลิตกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลร้อยละ 8-10 ภายใน 24 ชั่วโมงแรก แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการหมักเป็น 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลร้อยละ 4-7 มีการ

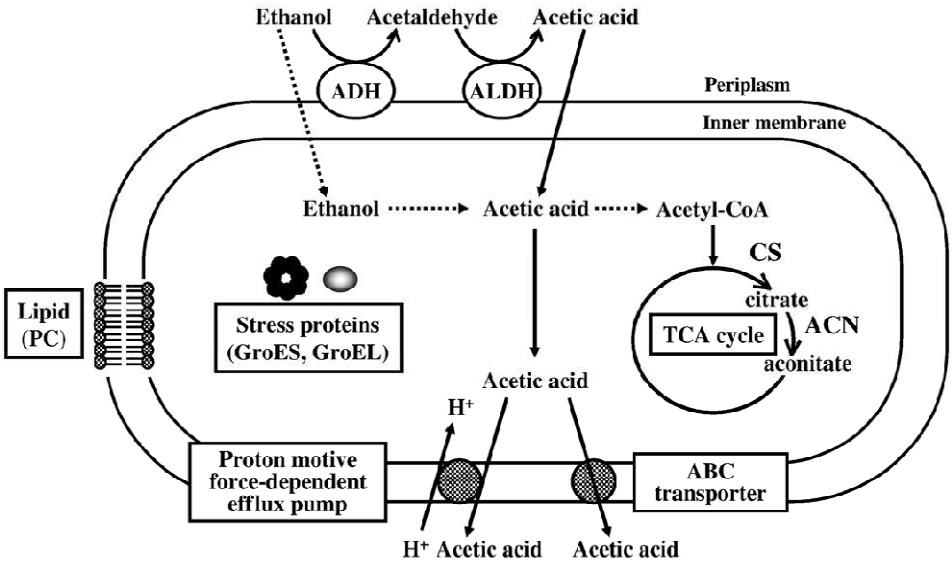
เจริญเติบโตและผลิตกรดอะซิติกสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลร้อยละ 8-10 และเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* ในอาหารที่มีเอทานอลร้อยละ 5, 6 และ 9 ที่อุณหภูมิ 34 และ 36 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *Acetobacter* สามารถเจริญและผลิตกรดอะซิติกที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ได้สูงกว่าอุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส

2.3.2.3 ความสามารถในการทนกรดอะซิติก

โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดอะซิติกจะสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติกระดับหนึ่งเท่านั้นและจะถูกยับยั้งด้วยกรดอะซิติกที่เซลล์ผลิตขึ้นเป็นสาเหตุให้เกิดการลดจำนวนของเซลล์ลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งปริมาณกรดอะซิติกที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าพีเอชลดลงซึ่งส่งผลให้เซลล์ทำงานหนักในการรักษาสมดุลภายในเซลล์ (สุมณฑา, 2545) เนื่องจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียต้องอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อย และดูดซึมสารอาหารเพื่อผลิตพลังงาน

Nakano and Fukaya (2008) ศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทนกรดอะซิติกของแบคทีเรียกรดอะซิติก พบว่า แบคทีเรียกรดอะซิติกจะออกซิไดซ์เอทานอลบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส (alcoholdehydrogenase, ADH), อัลดีไฮด์ดีไฮด์โดรจิเนส (aldehyde dehydrogenase, ALDH) และกรดอะซิติกจะถูกขับออกภายนอกเซลล์ แต่กรดอะซิติกภายในเซลล์ส่วนหนึ่งจะเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) ซึ่งเซลล์จะพยายามรักษาพีเอชโดยการขับโปรตอนออกนอกเซลล์เพื่อรักษาสมดุลภายในเซลล์ ซึ่งโปรตีนที่มีความสำคัญกับกระบวนการนี้คือ GroES และ GRoEL (รูปที่ 5)

Maal *et al.* (2010) คัดแยกเชื้อ *Acetobactor* จากผลแอปริคอตในประเทศอิหร่าน โดยใช้อาหาร Carr medium และ Glucose yeast extract calcium carbonate agar (GYC medium) พบว่า โคโลนีมีลักษณะเป็นท่อน แท่งสั้น ปลายมน แกรมลบ ให้ผลแคตาเลสเป็นบวก ออกซิเดสเป็นลบ สามารถหมักเอทานอลได้กรดอะซิติก เจริญได้ในอาหารที่มีเอทานอลร้อยละ 5, 7 และ 9 ซึ่งสามารถผลิตกรดอะซิติกได้ถึงร้อยละ 8.53 ภายในเวลา 144 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 5 กลไกการต้านทานต่อกรดอะซิติกของแบคทีเรีย *Acetobacter* และ *Gluconacetobacter*

ที่มา **:** Nakano and Fukaya (2008)

2.3.2.4 ความสามารถในการผลิตกรดอะซิติก

ปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดอะซิติกคือ ต้องมีความสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีปริมาณเอทานอลและมีความสามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงและเร็วโดยที่ไม่ถูกยับยั้งด้วยกรดอะซิติกที่เซลล์ผลิตขึ้น

Maal and Shafiee (2009) คัดแยกเชื้อ *Acetobacter* จากเชอรี่ในประเทศอิหร่าน เมื่อทดสอบการผลิตกรดอะซิติก พบว่า สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีเอทานอลสูงสุดร้อยละ 9 ผลิตกรดอะซิติกได้สูงร้อยละ 9.5 ภายในเวลา 7 วัน เมื่อเทียบกับแบคทีเรียกรดอะซิติกที่ใช้หมักอยู่ประจำซึ่งต้องใช้ระยะเวลาถึง 14-30 วัน และพบว่า น้ำส้มสายชูที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์มีกลิ่น และรสชาติดี

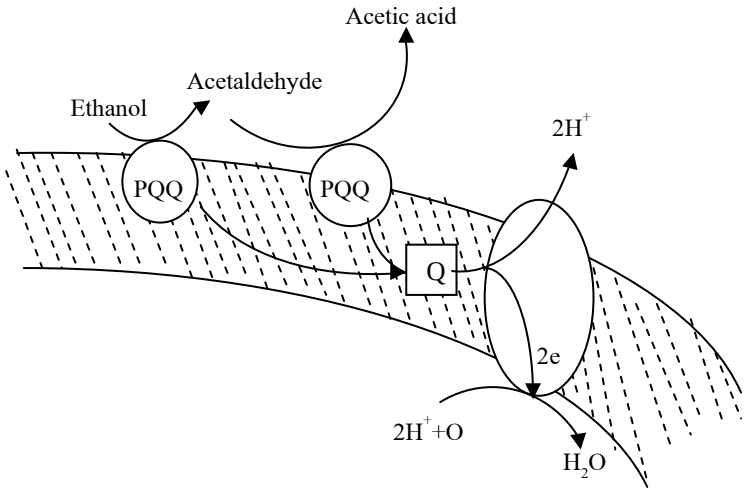
แบคทีเรียที่นิยมนำมาผลิตกรดอะซิติก ได้แก่ *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter peroxidans* และ *Gluconobacter oxydans* ซึ่งขั้นตอนการผลิตกรดอะซิติกสามารถแบ่งได้ 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก แบคทีเรียกรดอะซิติกจะออกซิไดซ์เอทานอลเป็นแอซิตัลดิไฮด์ (acetaldehyde) โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcoholdehydrogenase) และขั้นตอนที่สอง เป็นการเปลี่ยนแอซิตัลดิไฮด์ไปเป็นกรดอะซิติก โดยเอนไซม์แอซิตัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (acetaldehyde dehydrogenase) ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้เกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีสารไพโรโลควิโนไลนี (pyrroloquinoline, PQQ) ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ คือ รับไฮโดรเจนแล้วเกิด

การรีดิวซ์ไซโตโครม การขนย้ายอิเล็กตรอนมีผลให้เกิดแรงขับเคลื่อนโปรตอนข้ามเยื่อหุ้มเซลล์ และนำไปสังเคราะห์ ATP (รูปที่ 6) โดยมีสมการผลิตกรดอะซิติกดังนี้

$$C_2H_5OH + O_2 \longrightarrow CH_3COOH + H_2O$$

Ethanol (46 g) Oxygen (32 g) acetic acid (60 g) water (18 g)

จากสมการดังกล่าว สามารถคำนวณการผลิตกรดอะซิติกได้ว่า การออกซิไดซ์เอทานอล 1 โมล จะทำให้ได้กรดอะซิติก 1 โมล หรือการออกซิไดซ์เอทานอล 1 ลิตร จะได้กรดอะซิติก 1.036 กิโลกรัม และน้ำ 0.313 กิโลกรัม หรือเทียบได้กับการออกซิไดซ์เอทานอลร้อยละ 1 (v/v) จะได้กรดอะซิติกร้อยละ 1 (w/v) (สุมณฑา, 2545; สมใจ, 2550)



รูปที่ 6 การออกซิไดซ์เอทานอลโดยเชื้อ *Acetobacter*

ที่มา : Adam (1998)

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

3.1 วัตถุดิบ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1.1 ผลตาลโตนดสุก

คัดเลือกผลตาลโตนดสุกพันธุ์ตาลหม้อ จากหมู่ที่ 4 ตำบลบ้านกลาง อำเภอปะนาเระ จังหวัดปัตตานี เดือนสิงหาคม- ตุลาคม พ.ศ. 2555 ผลตาลโตนดสุกมีลักษณะใหม่พันธุ์ตาลหม้อ ผลใหญ่ หล่นจากต้น 1-3 วัน โดยสังเกตจากขั้วมีสีขาวไม่มีรอยแตก จากนั้นนำผลตาลโตนดสุกมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาคั้นเนื้อผลตาลจากส่วนเส้นใย (mesocarp) ผลตาลโตนดสุก

3.1.2 การเตรียมน้ำผลตาลโตนดสุกจากส่วนเส้นใยผลตาลโตนดสุก

การตรียมน้ำกรองเพื่อใช้คั้นเนื้อผลตาลจากส่วนเส้นใยผลตาลโตนดสุก โดยนำน้ำกรองมาต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที เก็บน้ำกรองที่ผ่านการต้มในภาชนะที่ปิดสนิทไว้ใช้คั้นน้ำผลตาลจากส่วนเส้นใยผลตาลโตนดสุกต่อไป

นำผลตาลโตนดสุกล้างน้ำให้สะอาด วางให้สะเด็ดน้ำ ปอกเปลือก ใช้ผลตาลโตนดสุกในอัตราส่วนต่อน้ำ 1:2 (w/v) คั้นเอาเนื้อตาลจากเส้นใย (mesocarp) ผลตาลโตนดสุกจนหมด นำน้ำผลตาลโตนดสุกที่ได้มากรองด้วยกระชอน และนำไปพาสเจอไรซ์โดยต้มในน้ำร้อนจนกระทั่งอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามวิธีของ นฤมล (2533) บรรจุใส่แกลลอนพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำไปใช้ศึกษาจะนำน้ำผลตาลโตนดสุกที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ละลายก่อนนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Yeast extract powder (Merck)

2. Peptone (Merck)
3. Agar (Merck)
4. D-glucose (Merck)
5. Malt extract (Merck)
6. Plate count agar (PCA, Merck)
7. Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$)
8. Calcium carbonate ($CaCO_3$, Ajax)
9. Boric acid (H_3BO_3, Ajax)
10. Sodium hydroxide (NaOH, Merck)
11. Sodium arsenate (Na_3NAsO_4, Ajax)
12. Potassium hydrogen phthalate ($KHC_8H_4O_4$, Ajax)
13. Chloramphenicol ($C_{11}H_{12}C_{12}N_2O_5$, Sigma)
14. Phenolphthalein ($C_{20}H_{14}O_4$, Carlo ERGA)
15. Sodium potassium tartrate ($NaKC_4H_4O_6$, Ajax)
16. Sodium carbonate (Na_2CO_3, Ajax)
17. Ammonium molybdate ($(NH_4)_6MO_7O_{24}$, Ajax)
18. 99% Ethanol (C_2H_5OH, Merck)
19. Acetic acid (CH_3COOH, Merck)
20. Sulfuric acid (H_2SO_4, Lab-Scan)
21. Hydrochloric acid (HCL, Lab-Scan)

3.1.4 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

1. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ เช่น หลอดทดลอง ขวดปรับปริมาตร ปิเปต บิกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ และจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. ขวดแก้วอาหารเลี้ยงเชื้อ (Duran bottle) ปริมาตร 250 และ 500 มิลลิลิตร
3. ถังหมัก ขนาด 10 ลิตร (Nalgene)
4. ไมโครปิเปต (Micropipet, Rainin)

3.2 เครื่องมือ

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave, Hirayama)
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Thermo รุ่น Spectronic15)
3. เครื่องเขย่า (Shaker, IKA รุ่น KS400ic)
4. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter, Mettler Toledo รุ่น SevenEasy S-20K)
5. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Binder รุ่น BF 240)
6. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow, Clean รุ่น 0192)
7. เครื่องชั่งน้ำหนัก 3 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, รุ่น TG 5002-S)
8. เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Sartorius, รุ่น ED2245)
9. เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebulliometer, Dujardin Salleron)
10. ตู้อบ (Oven, Memmert รุ่น UFE500)
11. เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle Furnace, Carbolite)
12. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer, TEL-TRU)
13. เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (Hand Refractometer, ATAGO รุ่น PAL-1)
14. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope, Carl Zeiss รุ่น Axio ScopeA1)
15. เครื่องวัดความหนืด (Brookfield รุ่น DV II+ Pro)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำผลตาลโตนดสุก

นำน้ำผลตาลโตนดสุกมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีได้แก่ วัดความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson method (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดด้วย Hand refractometer วิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีน วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (Proximate Analysis) ได้แก่ โปรตีน เถ้า และเส้นใยอาหาร (AOAC., 2000) และปริมาณแร่ธาตุต่างๆ (โพแทสเซียม โซเดียม แมกนีเซียม เหล็ก แมงกานีส ทองแดง แคลเซียม ฟอสฟอรัส และสังกะสี)

3.3.2 คัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของเชื้อยีสต์จากส่วนเส้นใยของผลตาลโตนดสุก

3.3.2.1 การคัดแยกเชื้อยีสต์

นำผลตาลโตนดสุกใหม่มาหั่นเอาส่วนเส้นใยเป็นชิ้นปริมาณ 10 กรัมใส่ในอาหาร Yeast extract peptone dextrose broth (YEPD broth ประกอบด้วย กลูโคส 20.0 กรัม เปปโตน 20.0 กรัม และยีสต์สกัด 10.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.5 บรรจุในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาเจือจางในสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จนถึงระดับ 10^{-5} นำมาเกลี่ยบนอาหาร Yeast extract peptone dextrose agar (YEPD agar ประกอบด้วย กลูโคส 20.0 กรัม เปปโตน 20.0 กรัม ยีสต์สกัด 10.0 กรัม และผงวุ้น 20.0 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร) เติมสารคลอแรมเฟนนิคอล (chloramphenicol) 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกยีสต์จากโคโลนีที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว โดยคัดเลือกยีสต์ให้ได้จำนวน 20 โคโลนี นำมาขีด (streak) บนอาหาร YEPD agar เพื่อให้ได้เซลล์ยีสต์ที่บริสุทธิ์ นำเซลล์ยีสต์ที่ได้ไปตรวจสอบรูปร่างโดยคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะ กลม นูน สีขาวนวล ขอบเรียบ และเก็บไว้ในอาหารเอียง YEPD agar ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Li *et al.* (2011)

3.3.2.2 ศึกษาคุณสมบัติของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากเส้นใยผลตาลโตนดสุก

1.) ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ไอโซเลทต่างๆ ที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสต่างๆ

นำเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากอาหาร YEPD agar slant ข้อ 3.3.2.1 จำนวน 20 ไอโซเลท เลี้ยงในอาหารแข็ง YEPD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเชื้อยีสต์ไอโซเลทละ 1 ลูป เลี้ยงในอาหาร Yeast extract peptone dextrose broth (YEPD broth ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 10.0 กรัม เปปโตน 20.0 กรัม และกลูโคส 20.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ปรับปริมาณน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 15 (w/v) ในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของยีสต์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาว

คลื่น 600 นาโนเมตร และวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YEPD agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ยีสต์ทั้งหมดรายงานผลเป็น CFU/ml

2.) ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเติบโต และทนต่อเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลทต่างๆ

นำเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาล ข้อ 1 จำนวน 1 ลูปเลี้ยงในอาหารแข็ง YEPD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเชื้อยีสต์จำนวน 1 ลูป เลี้ยงในอาหารเหลว YEPD ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 (v/v) ในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของยีสต์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ยีสต์ทั้งหมดโดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YEPD agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ทั้งหมดรายงานผลเป็น CFU/ml

3.) ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลทต่างๆ

นำเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถเจริญในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลและทนต่อเอทานอลจากข้อ 1 และ ข้อ 2 มาศึกษาความสามารถผลิตเอทานอล โดยนำเชื้อยีสต์จำนวน 1 ลูป ลงในอาหารเหลว YEPD ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ปริมาณร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว YEPD ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ที่ปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 (w/v) ใน ฟลาส์กขนาด 1000 มิลลิลิตร ปิดฝาภาชนะหมักด้วยจุกสำลี สภาวะการหมักแบบมีการเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างปริมาตร 60 มิลลิลิตร ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 12 วัน เพื่อวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer

3.3.2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุก

1.) ศึกษาการหมักเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครส

นำเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 ที่มีความสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดจากจำนวน 1 ลูปมาศึกษาความสามารถผลิตเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคสเป็น 10 และ 15 องศาบริกซ์ ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 1000 มิลลิลิตร ปิดฝาภาชนะหมักด้วยจุกสำลี สภาวะการหมักแบบมีการเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างปริมาตร 60 มิลลิลิตร ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 12 วัน เพื่อวัดปริมาณ เอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer

2.) ศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ในน้ำผลตาลโตนดสุก

นำเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 ที่มีความสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดจำนวน 1 ลูปมาศึกษาความสามารถผลิตเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลน้ำตาลกลูโคส 15 องศาบริกซ์ เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 300, 500 และ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร(w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักไวน์น้ำผลตาลโตนดสุกปริมาตร 600 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 1000 มิลลิลิตร ปิดฝาภาชนะหมักด้วยจุกสำลี สภาวะการหมักแบบมีการเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างปริมาตร 60 มิลลิลิตร ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน เพื่อวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Compleat Randomized design) ทดลอง 3 ซ้ำ และนำข้อมูลไปวิเคราะหาค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Dancan’s new multiple rang test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95 %

3.) ศึกษาการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ในน้ำผลตาลโตนดสุก

นำเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 จำนวน 1 ลูปมาศึกษาการผลิตเอทานอลในผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลซูโครส และน้ำตาลกลูโคสเป็น 10 และ 15 องศาบริกซ์ เติมปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาตร 600 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 1000 มิลลิลิตร ปิดฝาภาชนะหมักด้วยจุกสำลี สภาวะการหมักแบบมีการเขย่าด้วย

ความเร็ว 110 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างปริมาตร 60 มิลลิลิตร ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน เพื่อวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Compleat Randomized design) ทดลอง 3 ซ้ำ และนำข้อมูลไปวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Dancan's new multiple rang test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95 %

3.3.2.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ *Candida stellimalicola* โดยวิธีชีวโมเลกุล และการจัดจำแนกด้วยวิธีชีวเคมีด้วยเครื่อง Vitek 2 compact โดยการส่งจัดจำแนกยังสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยการเลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส เวลา 3-5 วัน จากนั้นทำการสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่บริเวณ D1/D2 บน 26S rDNA ใช้ไพรเมอร์ 934F และ LR6 ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ตั้งสภาวะขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (denaturation) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ขั้นตอนการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 1 นาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที 30 วินาที ทั้งหมด 30 รอบปฏิกิริยา และขั้นตอนสุดท้ายการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (extension) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ polymerase chain reaction (PCR) ของยีน 26S rDNA ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี Big Dye Terminator Reaction ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานในธนาคารยีน

3.3.3 ศึกษาการใช้เชื้อยีสต์เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์เพื่อหมักเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุก

3.3.3.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *Candida stellimalicola*

ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลซูโครส และน้ำตาลกลูโคส 15 องศาบริกซ์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยเติมเชื้อยีสต์ *C. stellimalicola* ลงไปฟลาส์กละ 1 ลูป เขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสุ่มตัวอย่างปริมาตร 15 มิลลิลิตรทุกๆ 3 ชั่วโมง ที่เวลา 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) และวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ยีสต์โดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YEPD agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ยีสต์รายงานผลเป็น CFU/ml

3.3.3.2 ศึกษาการหมักเอทานอลด้วยยีสต์บริสุทธิ์ *Candida stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก

การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์บริสุทธิ์โดยนำน้ำผลตาลโตนดมาปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็น 10 องศาบริกซ์ ใส่ในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร เติมเชื้อยีสต์ลงไปฟลาส์กละ 1 ลูป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 17 ชั่วโมง

1.) ศึกษาการหมักเอทานอลด้วยยีสต์บริสุทธิ์ *Candida stellimalicola*

เตรียมน้ำผลตาลโตนดสุกปริมาตร 6 ลิตรที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็น 10 และ 15 องศาบริกซ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 5 ด้วยกรดอะซิติก บรรจุในภาชนะหมักขนาด 10 ลิตร เติมกล้าเชื้อยีสต์ปริมาณร้อยละ 10 (v/v) หมักที่อุณหภูมิห้อง ปิดฝาภาชนะหมักด้วยจุกสำลี สภาวะการหมักแบบไม่มีการเขย่า สุ่มตัวอย่างปริมาตร 400 มิลลิลิตร ทุกๆ 3 วันเป็นเวลา 18 วัน วิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกด้วยการไทเทรต (AOAC., 2000) วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง Hand refractometer วัดความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson method (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) วัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ยีสต์โดยวิธี spread plate technique บน

อาหารเลี้ยงเชื้อ YEPD agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ยีสต์รายงานผลเป็น CFU/ml

ผลการทดลองนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลต่างๆด้วยวิธี Independent-Sample T-Test

2.) ศึกษาการหมักเอทานอลด้วยยีสต์บริสุทธิ์ *Candida stellimalicola*

การเตรียมเนื้อผลตาลโตนดสุกปริมาตร 6 ลิตรที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 5 ด้วยกรดอะซิติก บรรจุในภาชนะหมักขนาด 10 ลิตร เติมกล้าเชื้อยีสต์ปริมาณร้อยละ 10 (v/v) หมักที่อุณหภูมิห้องปิดฝาภาชนะหมักด้วยจุกสำลี สภาวะการหมักแบบไม่มีการเขย่า สุ่มตัวอย่างปริมาตร 400 มิลลิลิตร ทุกๆ 10 วันเป็นเวลา 60 วัน วิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกด้วยการไทเทรต (AOAC., 2000) วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง Hand refractometer วัดความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson method (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) วัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ยีสต์โดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YEPD agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ยีสต์รายงานผลเป็น CFU/ml

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Compleat Randomized design) ทดลอง 3 ซ้ำ และน้ำข้อมูลไปวิเคราะหาค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Dancan’s new multiple rang test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95 %

3.) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลด้วยยีสต์บริสุทธิ์ *Candida stellimalicola* ที่สภาวะการหมักต่างๆ

การเตรียมเนื้อผลตาลโตนดสุกปริมาตร 600 มิลลิลิตรที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาริกซ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 5 ด้วยกรดอะซิติก บรรจุในภาชนะหมักขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อยีสต์ปริมาณร้อยละ 10 (v/v) โดยใช้สภาวะการหมักแบบเขย่า 110 รอบต่อนาที สภาวะการหมักแบบไม่มีการเขย่า และสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างปริมาตร 60 มิลลิลิตร ทุกๆ 2 วันเป็นเวลา 14 วัน วิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกด้วยการไทเทรต (AOAC., 2000) วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง Hand refractometer วัดความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดย

วิธี Somogyi-Nelson method (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) วัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ยีสต์โดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YEPD agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์รายงานผลเป็น CFU/ml

4.) ศึกษาการหมักเอทานอลยีสต์บริสุทธิ์ *Candida stellimalicola*

เตรียมเนื้อผลตาลโตนดสุกปริมาตร 6 ลิตร ที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็น 10 องศาบริกซ์ ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 5 ด้วยกรดอะซิติก บรรจุในภาชนะหมักขนาด 10 ลิตร เติมกล้าเชื้อยีสต์บริสุทธ์ ปริมาณร้อยละ 10 (v/v) หมักที่อุณหภูมิห้องปิดฝาภาชนะหมักด้วยจุกสำลี โดยเลือกสภาวะการหมักแบบมีกวนด้วยแท่งแม่เหล็กความเร็ว 300 รอบ/นาที สุ่มตัวอย่างปริมาตร 400 มิลลิลิตร ทุกๆ 2 วันเป็นเวลา 14 วัน วิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกด้วยการไทเทรต (AOAC., 2000) วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง Hand refractometer วัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson method (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) วัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ยีสต์โดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YEPD agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงนับจำนวนเซลล์รายงานผลเป็น CFU/ml

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Compleat Randomized design) ทดลอง 3 ซ้ำ และน้ำข้อมูลไปวิเคราะหาค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Dancan’s new multiple rang test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95 %

3.3.4 การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกจากผลตาลโตนดสุก

3.3.4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก

นำเนื้อผลตาลโตนดสุกใหม่มาหั่นเป็นชิ้นปริมาณ 10 กรัม ใส่ในขวดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose ethanol yeast extract broth (GEY broth) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (ประกอบด้วยกลูโคส 20.0 กรัม เอทานอล 50.0 มิลลิลิตร ยีสต์สกัด 10.0 กรัม และน้ำกลั่น 1.0 ลิตร) ที่ปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ตามวิธีการของ Seearunruangchai *et al.* (2004) และสุ่มตัวอย่างมาเจือจางในสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จนถึงระดับ 10^{-8} spread plate บนอาหาร Glucose yeast extract calcium carbonate agar (GYC agar ประกอบด้วยกลูโคส 100.0 กรัม ยีสต์สกัด 10.0 กรัม แคลเซียมคาร์บอเนต 20.0 กรัม และผงวุ้น 15.0 กรัมในน้ำกลั่น 1.0 ลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกแบคทีเรียกรดอะซิติกจากโคโลนีที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวมีวงใส (clear zone) นำเซลล์แบคทีเรียกรดอะซิติกไปตรวจสอบรูปร่าง การย้อมสีแกรม โดยคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแท่งสั้น ติดสีแกรมลบ นำไปทดสอบปฏิกิริยาแคตาเลส (catalase) ทดสอบการเกิดปฏิกิริยา overoxidation และทดสอบการสร้างเซลลูโลส ตามวิธีการของ Hidalgo *et al.* (2012) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกมีลักษณะแท่งสั้น ติดสีแกรมลบ การทดสอบปฏิกิริยาแคตาเลส (catalase) ให้ผลเป็นบวก ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส ไม่เกิดปฏิกิริยา overoxidation ไม่พบการสร้างเซลลูโลส โดยคัดเลือกแบคทีเรียกรดอะซิติกให้ได้จำนวน 20 โคโลนี เก็บเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกที่แยกได้บนอาหารเอียง Glucose yeast extract agar (GYE agar ประกอบด้วยกลูโคส 100.0 กรัม ยีสต์สกัด 10.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1.0 ลิตร) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.4.2 ศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก

1.) ความสามารถในการเจริญได้ในอาหารที่มีเอทานอล

นำเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกที่คัดแยกได้จากอาหาร GYE agar slant จำนวน 20 ไอโซเลท ข้อ 3.3.4.1 จำนวน 1 ลูป เลี้ยงในอาหาร Glucose yeast extract broth (GYE broth ประกอบด้วยกลูโคส 100.0 กรัม ยีสต์สกัด 10.0 กรัม และ ในน้ำกลั่น 1.0 ลิตร) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นของปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 (v/v) ในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์รายงานผลเป็น CFU/ml

2.) ความสามารถในการทนต่อกรดอะซิติก

นำเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีเอทานอล ข้อ 1 จำนวน 1 ลูป เลี้ยงในอาหาร GYE broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกร้อยละ 2 และ 4 (v/v) ในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์รายงานผลเป็น CFU/ml

3.) ความสามารถในการผลิตกรดอะซิติก

นำเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลทต่างๆ ที่เจริญได้ในอาหารที่มีเอทานอลข้อ 1 และทนต่อกรดอะซิติก 2 จำนวน 1 ลูป เลี้ยงในอาหาร GYE broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตรในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกปริมาณร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว GYE ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความความเข้มข้นของปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 (v/v) ปิดภาชนะหมักด้วยจุกสำลี นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตรทุกๆ 5 วันเป็นเวลา 60 วัน เพื่อวัดปริมาณกรดอะซิติกด้วยการไทเทรต (AOAC., 2000)

4.) การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติก

การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดอะซิติก *Acetobacter ghanensis* ที่มีคุณสมบัติผลิตกรดอะซิติกได้เร็วและสูงจากข้อ 3 มาจำแนกสายพันธุ์โดยวิธีชีวโมเลกุล โดยการส่งจัดจำแนกยังสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.3.5 ศึกษาการใช้แบคทีเรียกรดอะซิติก *Acetobacter ghanensis* เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์

3.3.5.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *Acetbacter ghanensis*

เตรียมไวน์เนื้อผลตาลโตนดสุกมาพาสเจอร์ไรซ์โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิทันทีให้ได้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร เติมเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก *Acetbacter ghanensis* ลงไปฟลาส์กละ 1 ลูป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที โดยสุ่มตัวอย่างปริมาตร 15 มิลลิลิตร ทุกๆ 3 ชั่วโมง ที่เวลา 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก คำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (Spectific growth rate, μ) และวิเคราะห์ปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดอะซิติก โดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์รายงานผลเป็น CFU/ml

3.3.5.2 การหมักให้เกิดกรดอะซิติกด้วยแบคทีเรียกรดอะซิติกที่บริสุทธิ์

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก *A. ghanensis* โดยนำไวน์น้ำผลตาลโตนดสุกมาพาสเจอร์ไรซ์โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิทันทีให้ได้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร เติมเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก *A. ghanensis* ลงไปฟลาส์กละ 1 ลูป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เตรียมไวน์เนื้อผลตาลโตนดสุกปริมาตร 6 ลิตร ที่มีปริมาณเอทานอลอยู่ในช่วงร้อยละ 6 มาพาสเจอร์ไรซ์โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิทันทีให้ได้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บรรจุในภาชนะหมักขนาด 10 ลิตร เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก *A. ghanensis* ปริมาณร้อยละ 10 (v/v) หมักที่อุณหภูมิห้องปิดฝาภาชนะหมักด้วยจุกสำลี โดยสุ่มตัวอย่างปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทุกๆ 10 วันเป็นเวลา 60 วัน ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกด้วยการไทเทรต (AOAC., 2000) วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง Hand refractometer วัดความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson method (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) วัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer วิเคราะห์ปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดอะซิติกโดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์รายงานผลเป็น CFU/ml และหมักจนได้ปริมาณกรดอะซิติกมากกว่าร้อยละ 4

3.3.6 ศึกษาคุณภาพของน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลตาลโตนดสุกเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด

3.3.6.1 ศึกษาคุณภาพทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก

นำน้ำส้มสายชูผลตาลโตนดสุกข้อ 3.3.5.2 มาทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกด้วยการไทเทรต (AOAC., 2000) วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง Hand refractometer วัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson method (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas chromatography วิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีน วิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุต่างๆ (โพแทสเซียม โซเดียม แมกนีเซียม เหล็ก ทองแดง แคลเซียม ฟอสฟอรัส และสังกะสี) และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (Proximate Analysis) ได้แก่ โปรตีน เถ้า และเส้นใยอาหาร (AOAC., 2000)

3.3.6.2 ศึกษาคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยรวมของน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก

นำน้ำส้มสายชูผลตาลโตนดสุกข้อ 3.3.5.2 ทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของกลิ่นโดยให้คะแนนความชอบ 1-9 (9-point hedonic scale) ความชอบจาก 1 (ไม่ชอบมากที่สุด)

ถึง 9 (ชอบมากที่สุด) โดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกจำนวน 10 คน (Fernandez *et al.*, 2009; Kykkidou *et al.*, 2009; Ucak *et al.*, 2011)

3.3.6.3 ศึกษาการใช้น้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลตาลโตนดสุกในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด

จากการสำรวจผลิตภัณฑ์น้ำสลัดที่วางจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด จึงนำมาดัดแปลงเป็นสูตรน้ำสลัดมาตรฐาน การเตรียมผลิตภัณฑ์น้ำสลัดสูตรมาตรฐานมีส่วนประกอบได้แก่ น้ำมันพืช น้ำตาล ไข่ไก่ น้ำส้มสายชูกลั่น และเกลือ เช่นเดียวกับสูตรของ วรางคณา (2544) การเตรียมผลิตภัณฑ์น้ำสลัดที่มีส่วนประกอบของน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลตาลโตนดทดแทนน้ำส้มสายชูกลั่น นำน้ำสลัดที่ได้มาศึกษาสมบัติทางเคมี ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter ทางกายภาพ ได้แก่ ค่าความหนืด โดยใช้เครื่อง Brookfield และศึกษาทางประสาทสัมผัส ได้แก่ สี กลิ่น เนื้อสัมผัส และการยอมรับรวม โดยให้คะแนนความชอบ 1-9 (9-point hedonic scale) ความชอบจาก 1 (ไม่ชอบมากที่สุด) ถึง 9 (ชอบมากที่สุด) โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน จนกระทั่งได้สูตรน้ำสลัดสูตรที่ได้รับการยอมรับจากผู้ทดสอบชิมสูงสุด นำน้ำสลัดสูตรดังกล่าวมาศึกษาสมบัติทางเคมี ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter ทางกายภาพ ได้แก่ ค่าความหนืด โดยใช้เครื่อง Brookfield และศึกษาทางประสาทสัมผัส ได้แก่ สี กลิ่น เนื้อสัมผัส และการยอมรับรวม โดยให้คะแนนความชอบ 1-5 (5-point hedonic scale) ความชอบจาก 1 (ไม่ชอบมาก) ถึง 5 (ชอบมาก) โดยใช้ผู้ทดสอบชิมซึ่งเป็นผู้บริโภคทั่วไปจำนวน 50 คน

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำผลตาลโตนดสุก

การเตรียมน้ำผลตาลโตนดทำโดยนำผลตาลโตนดสุกมาคั้นกับน้ำอัตราส่วน 1:2 จากนั้นนำน้ำผลตาลโตนดสุกที่ได้มาตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีโดยน้ำหนักแห้ง ได้แก่ ปริมาณความชื้น ปริมาณโปรตีน ปริมาณเถ้า ปริมาณเยื่อใยหยาบ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ปริมาณกรดทั้งหมด ค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณแร่ธาตุต่างๆ พบว่า น้ำผลตาลโตนดสุกมีความชื้นร้อยละ 91.79±0.02 (w/w) โปรตีนร้อยละ 0.15±0.10 (w/w) เถ้าร้อยละ 0.29±0.05 (w/w) เยื่อใยหยาบร้อยละ 6.50±0.05 (w/w) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ 5.10±0.15 องศาบริกซ์ ปริมาณกรดทั้งหมด 0.53±0.02 ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.47-5.10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 1.38±0.02 กรัมต่อลิตร ปริมาณเบต้าแคโรทีนน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และประกอบด้วยแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ แคลเซียม 21.79±0.37 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แมกนีเซียม 40.16±0.67 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โพแทสเซียม 845.24±5.34 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฟอสฟอรัส 22.00±0.27 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และโซเดียม 51.05±3.92 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ไม่พบธาตุเหล็ก ทองแดง และสังกะสี (ตารางที่ 2) ซึ่งปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ในน้ำผลตาลโตนดสุกประกอบด้วยน้ำตาลและแร่ธาตุต่างๆ ซึ่งจะแตกต่างกันในผลไม้แต่ละชนิด และความอ่อนแก่ของผลไม้ชนิดนั้นๆ ซึ่งการสกัดผลตาลโตนดสุกในอัตราส่วนต่อน้ำ 1:2 (w/v) ทำให้คุณสมบัติทางเคมีและปริมาณแร่ธาตุต่างๆน้อยกว่าปริมาณของเนื้อผลตาลโตนดสุกโดยตรง ในขณะที่เบต้าแคโรทีนเป็นเม็ดสีที่ไม่ละลายในน้ำจึงทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์พบปริมาณเบต้าแคโรทีนน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเบต้าแคโรทีนที่ได้จากผลตาลโตนดสุกโดยตรงเท่ากับ 17.65 มิลลิกรัมต่อเนื้อผลตาลโตนดสุก 100 กรัม (มนัสนันท์, 2544) เช่นเดียวกับการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนของผลตาลโตนดสุกจำนวน 4 สายพันธุ์ จากจังหวัดต่างๆในประเทศศรีลังกา พบว่า ผลตาลโตนดสุกจากพื้นที่และสายพันธุ์ต่างกันจะมีปริมาณเบต้าแคโรทีนต่างกันซึ่งจะมีปริมาณเบต้าแคโรทีนอยู่ในช่วง 15.9-2525.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Ariyasena *et al.*, 2001) และผลตาลจากประเทศแคเมอรูน

(Cameroon) มีปริมาณเบต้าแคโรทีนอยู่ในช่วง 27.42±0.90 มิลลิกรัมต่อ100กรัม (Ali *et al*., 2010) ส่วนกรดที่พบในผลไม้ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของกรดอินทรีย์ (organic acid) ได้แก่ กรดซิตริก กรดมาลิก กรดแอสคอร์บิก และกรดแลกติก สมยศ (2555) รายงานความเป็นกรดในเนื้อผลตาลโตนดสุกในรูปกรดแลกติก พบว่า มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.12-0.21 ค่าพีเอชของเนื้อผลตาลโตนดสุกอยู่ในช่วง 3.56-6 ค่าพีเอชอยู่ในช่วงกรด (นฤมล, 2533; มนัสนันท์ และคณะ, 2544) ซึ่งอยู่ในช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์คือ 3.5-6.5 (สาวิตรี, 2549) อีกทั้งช่วงพีเอชที่เป็นกรดดังกล่าวยังสามารถควบคุมจำนวนจุลินทรีย์ชนิดอื่นช่วยลดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียซึ่งเจริญได้ดีที่พีเอช 6.5-7.5 (วิไล, 2547) จึงสามารถทำให้คัดแยกเชื้อยีสต์ได้ดีขึ้น

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำผลตาลโตนดสุก

Properties and compositions	Results	มนัสนันท์ และคณะ (2544)	Ali *et al.* (2010)
Moisture content (dry basic, %)	91.79±0.02	93	-
Total soluble solid (°Brix)	5.10±0.15		4.58±0.12
pH	4.47-5.10	3.56	-
Reducing sugar (g/L)	1.38±0.02		-
Acidity (%)	0.53±0.02	0.59	-
Protein (%)	0.15±0.10	0.14	0.85±0.13
Ash (%)	0.29±0.05	0.38	0.73±0.12
Crude fiber (%)	6.50±0.05	2.73	-
β-Carotene (mg/L)	<1	0.061	2.74±0.90
Trace elements (mg/kg)			-
Copper (mg/kg)	<LOQ		-
Calcium (mg/kg)	21.79±0.37	0.14	10.77±0.20
Iron (mg/kg)	<LOQ	<LOQ	0.21±0.15
Magnesium (mg/kg)	40.16±0.67		2.06±0.25
Potassium (mg/kg)	845.24±5.34		-
Phosphorus (mg/kg)	22.00±0.27	1.12	56.74±0.42
Sodium (mg/kg)	51.05±3.92		-
Zinc (mg/kg)	<LOQ		-

LOQ = limit of quantitative

4.2 ผลการคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีสต์จากผลตาลโตนดสุก

4.2.1 การคัดแยกเชื้อยีสต์

การคัดแยกเชื้อยีสต์ทำโดยการนำผลตาลโตนดสุกใหม่มาหั่นเป็นชิ้นจำนวน 10 กรัม หมักในอาหารเหลว YEPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ปรับพีเอช 5.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง YEPD พบว่า จากการหมักเนื้อผลตาลโตนดที่ระยะเวลาการคัดแยกเชื้อจำนวน 4 ครั้ง มีปริมาณเชื้อยีสต์อยู่ในช่วง $1.90x10^{6}$-$4.60x10^{9}$ CFU/ml (6.28-9.66 log CFU/ml) ซึ่งผลการศึกษาใกล้เคียงกับรายงานผลการวิจัยของ สมยศ (2555) โดยทำการคัดแยกเชื้อยีสต์จากผลตาลโตนดสุกที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า มีปริมาณเชื้อยีสต์อยู่ในช่วง $1.80x10^{3}$-$4.45x10^{6}$ CFU/ml (3.26-6.64 log CFU/ml) และจากความแตกต่างของจำนวนเชื้อยีสต์ที่วิเคราะห์ได้เนื่องจากการคัดแยกเชื้อยีสต์จำนวน 4 ครั้ง จากสภาพพื้นที่เก็บผลตาลโตนดสุกที่แตกต่างกันมีทั้งบริเวณกลางแจ้ง ใต้พุ่มไม้ และเนื้อผลตาลจากส่วนเส้นใยผลตาลโตนดสุกมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเพียง 5.10±0.02 องศาบริกซ์ จึงเป็นปัจจัยที่มีผลให้ปริมาณเชื้อยีสต์อยู่ในช่วง $1.90x10^{6}$-$4.60x10^{9}$ CFU/ml (6.28-9.66 log CFU/ml)

จากโคโลนียีสต์ที่มีลักษณะกลมนูน สีขาวนวล ขอบเรียบ สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลท และนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อคัดเลือกเชื้อยีสต์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ลักษณะเซลล์ของยีสต์มีทั้งขนาดใหญ่ ขนาดเล็ก เซลล์แบบกลม (round) เซลล์แบบกลมรี (spheroidal, spherical) เซลล์แบบรี (ellipsoidal) เซลล์แบบรูปไข่ (oval, ovoidal) และเซลล์มีลักษณะยาว (elongated) พบการแตกหน่อขั้วเดียว (monopolar budding) การแตกหน่อสองขั้ว (bipolar budding) และการแตกหน่อหลายขั้ว (multipolar budding) จำนวน 48 ไอโซเลท ในขณะที่ 33 ไอโซเลท เซลล์มีลักษณะแบบรีหัวและท้ายแหลม (apiculate) และเซลล์แบบมะนาวฝรั่ง (apiculate) เซลล์แบบรีหัวและท้ายแหลม (apiculate) สอดคล้องกับการศึกษาของ อรวรรณ (2554) พบว่า โคโลนีของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากเนื้อผลตาลโตนดสุกจำนวน 10 โคโลนี มีลักษณะกลม สีขาวขุ่น พื้นผิวโคโลนีมีลักษณะมันวาวและด้าน โคโลนีมีผิวเรียบ เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เซลล์ยีสต์มีลักษณะ 4 แบบคือ แบบมะนาวฝรั่ง (apiculate) เซลล์แบบวงรี เซลล์แบบยาว (elongated) และเซลล์แบบกลม เช่นเดียวกับ Tuntiwongwanich and Leenanoon (2009) พบว่า

โคโลนีของยีสต์ที่คัดแยกได้จากเนื้อผลตาลโตนดสุกมี 2 ลักษณะคือ โคโลนีมีรูปร่างกลม (circular) และโคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เซลล์มีลักษณะแบบรีหัวและท้ายแหลม แบบกลมรี และแบบกลมรียาว เมื่อนำไปส่งดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าเซลล์มีลักษณะหัวและท้ายกลมแบบผลมะนาว (apiculateor lemon shape) เซลล์รูปไข่ยาวรี (oval to elongate shape) และแบบรูปไข่ (oval shape)

ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีลักษณะโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ เซลล์มีขนาดใหญ่ ลักษณะเซลล์มีทั้งแบบกลมและแบบรี ได้จำนวน 20 ไอโซเลท โดยกำหนดรหัสสายพันธุ์ Y01-Y20 (ตารางที่ 3)

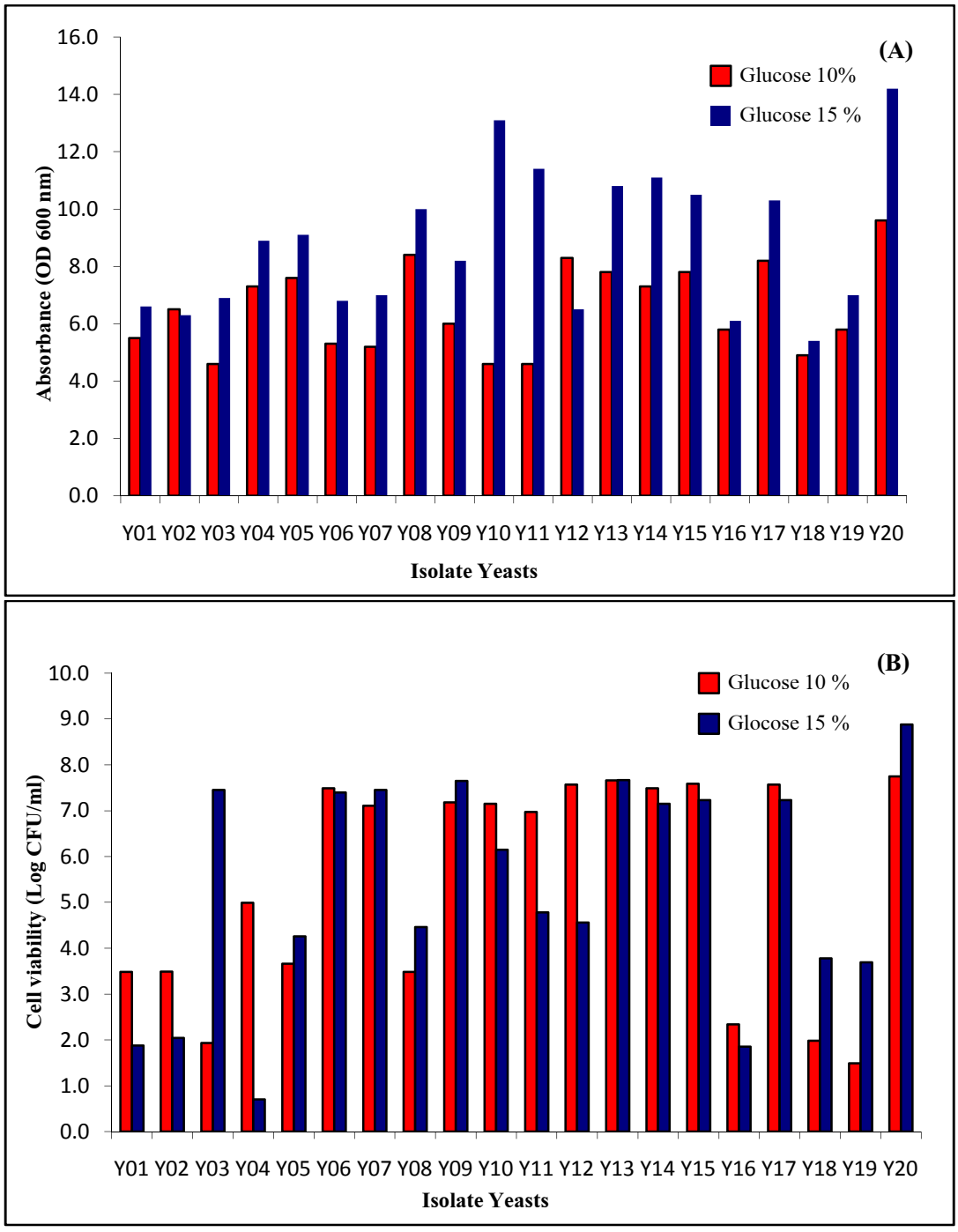
ตารางที่ 3 การกำหนดรหัสของยีสต์ที่คัดแยกได้จากผลตาลโตนดสุก

ครั้งที่คัดแยก	จำนวนไอโซเลท	จำนวนไอโซเลทที่คัดเลือกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ไอโซเลท
1	20	7	Y01, Y02
2	21	15	Y03, Y04, Y05, Y06, Y07,
3	20	10	Y08, Y09, Y10
4	20	16	Y11, Y12, Y13, Y14, Y15,
			Y16, Y17, Y18, Y19, Y20
	81	48	20

4.2.2 ผลของความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาล

การศึกษาความสามารถการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ทั้ง 20 ไอโซเลท ในอาหารเหลว YEPD ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 (w/v) เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะให้อากาศโดยเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 ยีสต์มีการเจริญเติบโตโดยมีปริมาณค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ในช่วง 4.6-9.6 มีปริมาณเซลล์ยีสต์อยู่ในช่วง 1.49-7.75 log CFU/ml ($3.1x10^2$-$5.6x10^8$ CFU/ml) โดยไอโซเลท Y20 มีการเจริญเติบโตสูงสุด เท่ากับ 7.75 log CFU/ml ($5.6x10^8$ CFU/ml) รองลงมาได้แก่ Y15, Y17, Y12, Y13, Y14, Y06, Y09, Y10 และ Y07 มีการเจริญเติบโตในช่วง 7.11-7.59 log CFU/ml ($1.3x10^8$-$3.9\ x10^8$ CFU/ml) ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 15 พบว่า ยีสต์มีการเจริญเติบโตโดยมีปริมาณค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) อยู่ในช่วง 6.1-14.2 มีปริมาณเซลล์ยีสต์ตั้งแต่ 0.77-8.88 log CFU/ml (30-$7.5x10^9$ CFU/ml) โดยไอโซเลท Y20 มีการเจริญเติบโตสูงสุด เท่ากับ 8.88 log CFU/ml ($7.5x10^9$ CFU/ml) รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท Y13, Y09, Y03, Y07, Y06, Y15, Y17, Y14, และ Y10 มีการเจริญเติบโตในช่วง 6.15-7.67 log CFU/ml ($1.4x10^7$-$4.7x10^8$ CFU/ml) และพบว่า การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์บางไอโซเลทในอาหารที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 15 จะมีปริมาณค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 (รูปที่ 7A) ส่วนปริมาณเซลล์ยีสต์ พบว่า มีเพียง 10 ไอโซเลท ที่มีปริมาณเซลล์มากกว่า 10^6 CFU/ml และมีจำนวน 8 ไอโซเลท มีความสามารถเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็นร้อยละ 15 เพราะยีสต์สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหาร ส่วนยีสต์ที่มีความสามารถเจริญลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นเพราะความเข้มข้นของน้ำตาลสูงทำให้เกิดแรงดันออสโมติก (osmotic effect) ซึ่งทำให้น้ำในเซลล์ไหลออกนอกเซลล์ทำให้การเจริญเติบโตลดลง (สาวิตรี, 2549)

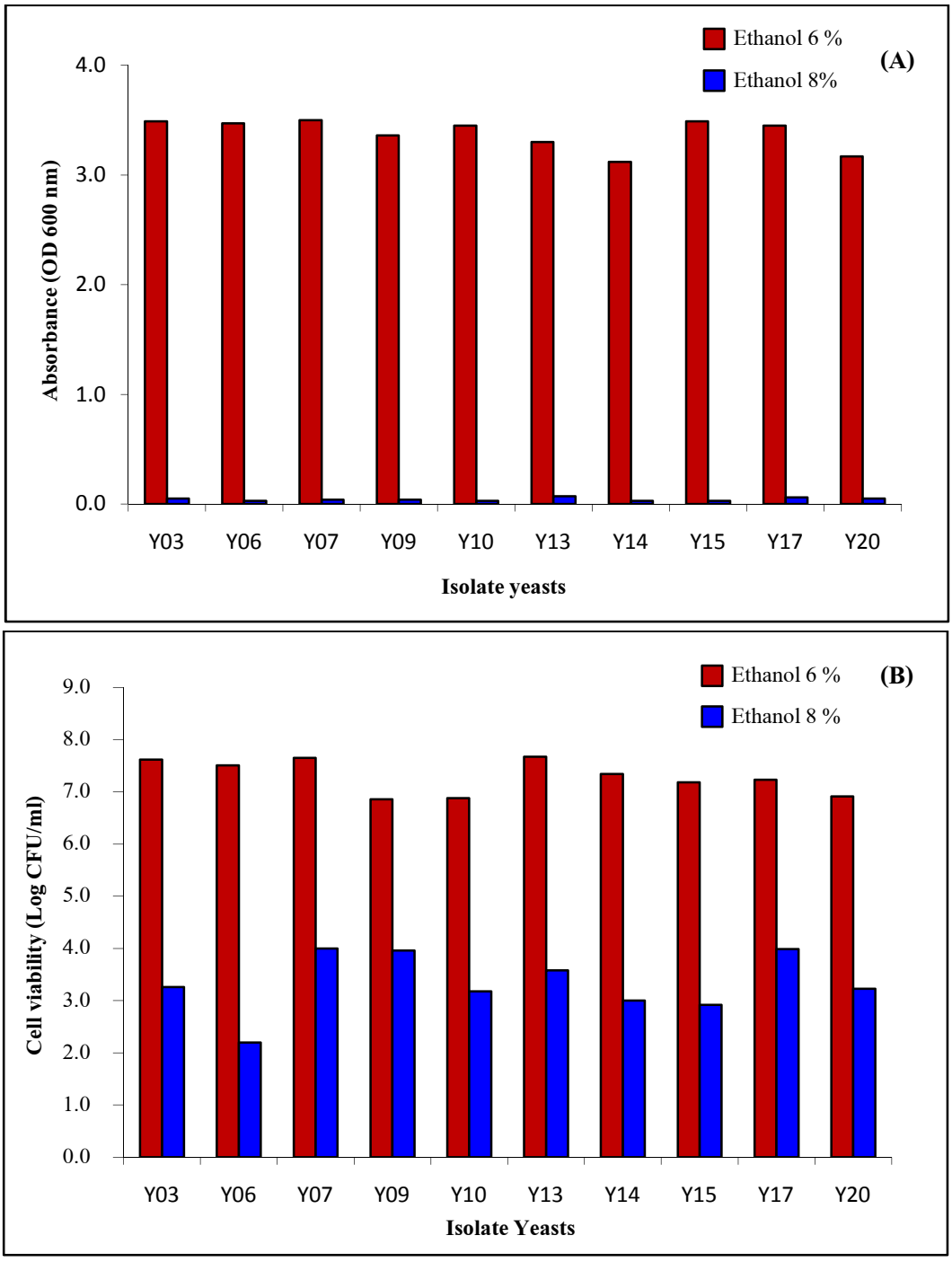
ดังนั้นจึงมีเพียง 10 ไอโซเลทที่มีความสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 มีปริมาณเซลล์ยีสต์สูงมากกว่า 10^6 CFU/ml (รูปที่ 7B) ทั้งนี้การเตรียมกล้าเชื้อในการหมักไวน์จะคำนึงถึงความสามารถเจริญได้ในน้ำหมัก และมีปริมาณเซลล์ยีสต์อยู่ในช่วง $2x10^6$-$5x10^6$ CFU/ml (ไพบูลย์ และคณะ, 2549) จึงนำไอโซเลท Y03, Y06, Y07, Y09, Y10, Y13, Y14, Y15, Y17 และ Y20 ไปทดสอบความสามารถการทนเอทานอลในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 7 ปริมาณค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) (A) และปริมาณเซลล์ยีสต์ (log CFU/ml) (B) ของเชื้อยีสต์ไอโซเลทต่างๆในอาหารเหลว YEPD ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.2.3 ผลของความสามารถในการทนต่อเอทานอล

การทดสอบความสามารถในการทนต่อเอทานอลโดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ทั้ง 10 ไอโซเลท ที่มีความสามารถเจริญเติบโตในอาหารเหลว YEPD ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 ได้แก่ ไอโซเลท Y03, Y06, Y07, Y09, Y10, Y13, Y14, Y15, Y17 และ Y20 มาทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหารเหลว YEPD สภาวะที่มีเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 (v/v) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 6 ยีสต์แต่ละไอโซเลท มีปริมาณค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) อยู่ในช่วง 3.12-3.50 (รูปที่ 8A) มีปริมาณเซลล์ยีสต์อยู่ในช่วง 6.86-7.67 log CFU/ml ($7.2x10^6$-$4.7x10^7$ CFU/ml) (รูปที่ 8B) โดยไอโซเลท Y13 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 7.67 log CFU/ml ($4.7x10^7$ CFU/ml) รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท Y07, Y03, Y06, Y14, Y17, Y15, Y20, Y10 และ Y09 มีการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 6.86-7.67 log CFU/ml ($7.2x10^6$-$4.5x10^7$CFU/ml) ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 8 ยีสต์แต่ละไอโซเลทมีปริมาณค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) อยู่ในช่วง 0.03-0.07 มีปริมาณเซลล์ยีสต์อยู่ในช่วง 2.2-4.0 log CFU/ml ($1.6x10^2$-$9.9x10^3$ CFU/ml) โดยไอโซเลท Y07 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 4.0 log CFU/ml ($9.9x10^3$ CFU/ml) รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท Y17, Y09, Y15, Y13, Y03, Y20, Y10, Y14 และ Y06 มีปริมาณเซลล์ยีสต์อยู่ในช่วง 2.20-3.99 log CFU/ml ($1.6x10^2$-$9.8x10^3$ CFU/ml) ซึ่งน้อยกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 6 แสดงให้เห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์และปริมาณเซลล์ลดลง เนื่องจากเอทานอลจะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและโปรตีนซึ่งมีผลให้การเจริญเติบโตลดลง ในขณะที่เซลล์ยีสต์ตายเกิดจากปฏิกิริยาที่เอทานอลทำให้โปรตีนในเซลล์เสื่อมสภาพ (Brown *et al.*, 1981) การศึกษาของ Pina *et al.* (2004) พบว่า ความสามารถทนต่อเอทานอลของยีสต์ non-*Saccharomyces* และ *Saccharomyces cerevisiae* จะขึ้นอยู่กับปริมาณของกรดไขมันและสเตรอลที่เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับอาหาร สภาวะการเพาะเลี้ยง และสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้เพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงนำเชื้อยีสต์ทั้ง 10 ไอโซเลท ซึ่งมีความสามารถเจริญเติบโตในอาหารเหลว YEPD สภาวะที่มีเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 (v/v) ไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลต่อไป

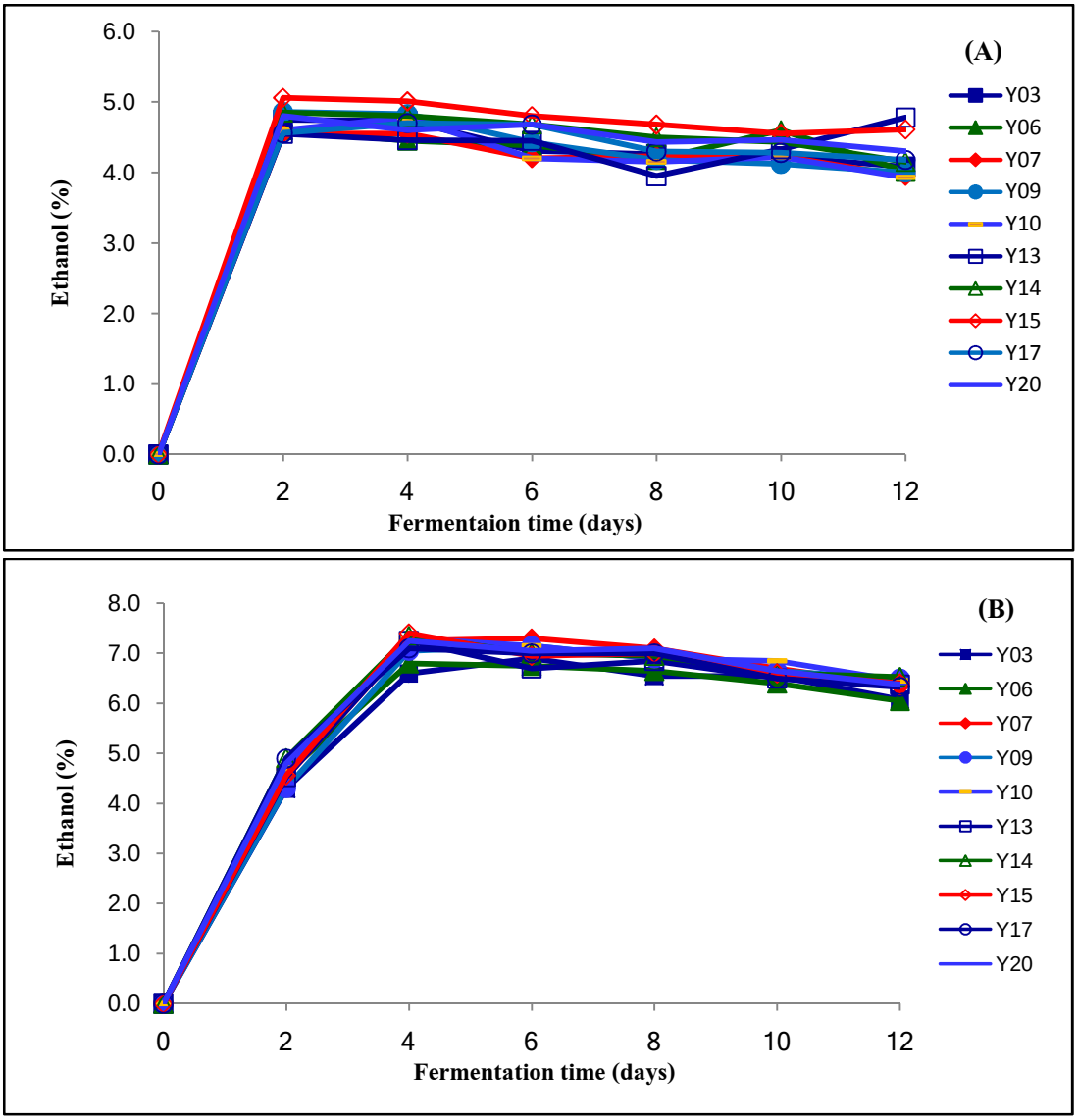


รูปที่ 8 ปริมาณค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) (A) และปริมาณเซลล์ยีสต์ (log CFU/ml) (B) ของเชื้อยีสต์ ไอโซเลทต่างๆ ในอาหาร YEPD ที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.2.4 ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการผลิตเอทานอล

ความสามารถของยีสต์ไอโซเลทในการผลิตเอทานอล และการเจริญเติบโตในอาหารเหลว YEPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 และในอาหารที่มีเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 ได้แก่ ไอโซเลท Y03, Y06, Y07, Y09, Y10, Y13, Y14, Y15, Y17 และ Y20 โดยเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YEPD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) เท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ปริมาณร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว YEPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 (w/v) เขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 เชื้อยีสต์ทุกไอโซเลทสามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 4.5-5.0 ภายในระยะเวลา 2 วัน (รูปที่ 9A) ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 15 สามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 6.6-7.4 ภายในระยะเวลา 4 วัน (รูปที่ 9B) แสดงให้เห็นว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสความสามารถในการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นทุกไอโซเลท สอดคล้องกับการศึกษาของ Solieri and Giudici (2008) พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลยีสต์สามารถผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นมีอัตราการหมักเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเป็นร้อยละ 45 อัตราการหมักและความสามารถในการผลิตเอทานอลลดลงอันเนื่องมาจากแรงดันออสโมติก (osmotic stress) การยับยั้งโดยเอทานอลที่เซลล์ผลิตขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2, 4, 8, 16 และ 30 พบว่า เมื่อใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2-16 ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 2-24 ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง แต่ที่ระดับน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 30 ความสามารถในการผลิตเอทานอลลดลง (Lin *et al.*, 2012)

ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอล พบว่า เชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 ผลิตเอทานอลได้เท่ากับร้อยละ 5.0 และ 7.4 ภายในเวลา 2 วัน และ 4 วัน ตามลำดับ ซึ่งได้ปริมาณเอทานอลสูง และเร็วกว่าเชื้อยีสต์ทุกไอโซเลท มีความสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 ได้โดยมีค่าเท่ากับ $3.9x10^8$ และ $1.7x10^8$ CFU/ml ตามลำดับ เช่นเดียวกับความสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 ได้เท่ากับ $1.5x10^7$ และ $4.4x10^3$ CFU/ml ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 ไปจำแนกสายพันธุ์เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกต่อไป



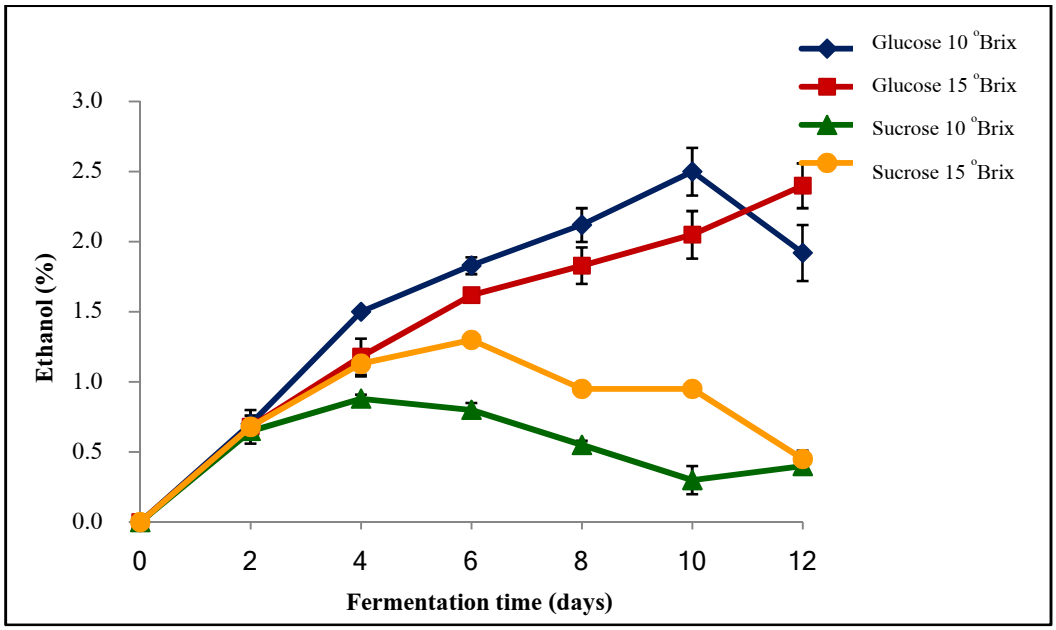
รูปที่ 9 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลทต่างๆในอาหารเหลว YEPD ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 (A) และน้ำตาลกลูโคสร้อยละ15 (B) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที

4.2.5 ผลของความสามารถในการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ในน้ำผลตาลโตนดสุก

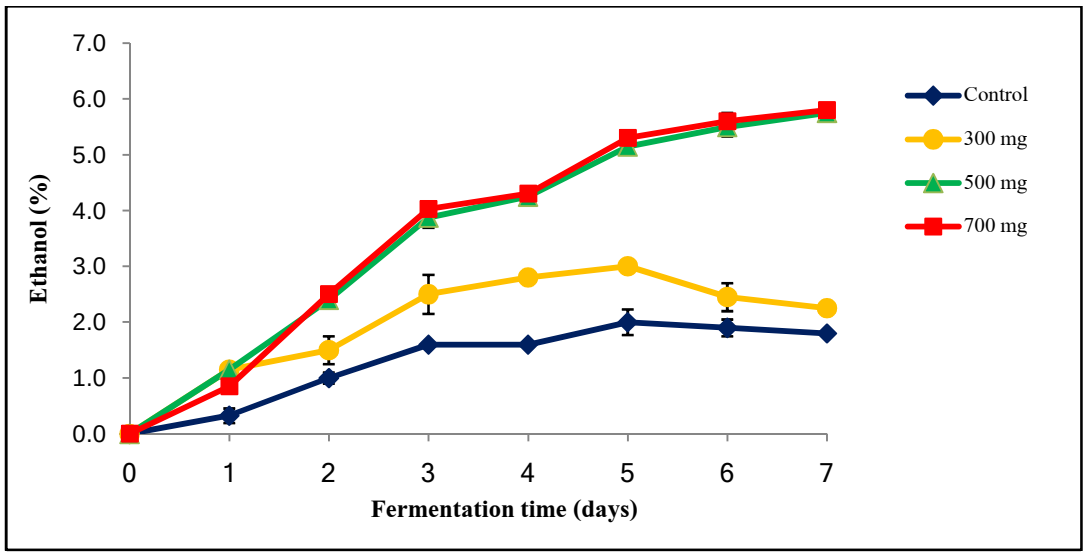
การหมักไวน์ผลตาลโตนดสุกที่ปรับปริมาณความหวานด้วยน้ำตาลซูโครส และน้ำตาลกลูโคส เป็น 10 และ 15 องศาบริกซ์ ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ด้วยยีสต์ไอโซเลท Y15 นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับปริมาณความหวานด้วยน้ำตาลซูโครส 10 องศาบริกซ์ ได้สูงสุดเพียงร้อยละ 0.88 ที่ระยะเวลาการหมัก 4 วัน และผลิตเอทานอลร้อยละ 1.30 ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับปริมาณความหวานด้วยน้ำตาลซูโครส 15 องศาบริกซ์ ที่ระยะเวลาการหมัก 6 วัน แต่เมื่อหมักไวน์ผลตาลโตนดสุกที่ปรับปริมาณความหวานด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็น 10 องศาบริกซ์ เชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดร้อยละ 2.5 ที่ระยะเวลาการหมัก 10 วัน ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการหมักไวน์ผลตาลโตนดสุกด้วยน้ำตาลกลูโคส 15 องศาบริกซ์ ให้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 2.4 ที่ระยะเวลาการหมัก 12 วัน (รูปที่ 10) แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ผลิตเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลซูโครส ทั้งนี้เพราะยีสต์สามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรือน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในผลไม้ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ได้ดีกว่าน้ำตาลโมเลกุลคู่ ซึ่งเป็น น้ำตาลซูโครส ซึ่งยีสต์จะต้องย่อยน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตสก่อนการหมักเอทานอล และเมื่อเทียบกับการหมักเอทานอลในอาหารเหลว YEPD ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 ยีสต์ไอโซเลท Y15 สามารถผลิต เอทานอลได้ร้อยละ 5.0 และ 7.4 ภายในระยะเวลา 2 วันและ 4 วัน นอกจากนี้อาจเป็นเพราะน้ำผลตาลโตนดสุกที่นำมาใช้หมักเอทานอลมีการเจือจางผลตาลโตนดสุกด้วยน้ำอัตราส่วน 1:2 นั้นอาจทำให้แหล่งไนโตรเจนสารอาหารต่างๆรวมทั้งแร่ธาตุ และวิตามินมีปริมาณลดลงจึงไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและการหมักไวน์เป็นสาเหตุทำให้เกิดการหมักหยุดชะงักทำให้ยีสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ (ไพบูลย์ และคณะ, 2549)

4.2.6 ผลของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตเอทานอล

การเติมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ในวัตถุดิบที่ใช้หมักไวน์จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นแต่ก็ขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารที่มีอยู่ในวัตถุดิบ (Pramanik and Rao, 2005) การเติมแหล่งไนโตรเจนจึงเป็นวิธีหนึ่งที่เพิ่มประสิทธิภาพในการหมักไวน์แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ได้แก่ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $[(NH_4)_2PO_4]$ และแอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ ดังนั้นจึงเลือกเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 300, 500 และ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักไวน์น้ำผลตาลโตนดสุกโดยเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 ปรับปริมาณความหวานด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็น 15 องศาบริกซ์ นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการหมักไวน์โดยไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเพิ่มขึ้น (รูปที่ 11) และเชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 5.75-5.85 ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 500 และ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร(w/v) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) สอดคล้องกับการหมักไวน์น้ำผึ้ง พบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก (สมบูรณ์, 2535) และใกล้เคียงกับผลการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 500 และ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร (w/v) ยีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะเพิ่มขึ้นสามารถผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 8.55-8.56 (Nantitanon, 2006) เมื่อเทียบกับการหมักไวน์ที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตสามารถผลิตเอทานอลได้เพียงร้อยละ 6.87 เพราะการหมักไวน์ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณไนโตรเจนไม่เพียงพอจะทำให้กระบวนการหมักหยุดชะงัก (Coleman *et al.*, 2007) ซึ่งแหล่งไนโตรเจนมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ยีสต์ และความสามารถในการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ด้วย (Bafrncova *et al.,* 1999) ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนและคำนึงถึงการใช้สารเคมีที่ปริมาณเหมาะสมต่อกระบวนการหมัก ซึ่งปริมาณที่เติมทั่วไปคือ 0.5-1.0 กรัมต่อน้ำหมัก 1 ลิตร จึงเลือกเติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนในการหมักไวน์ผลตาลโตนดสุก



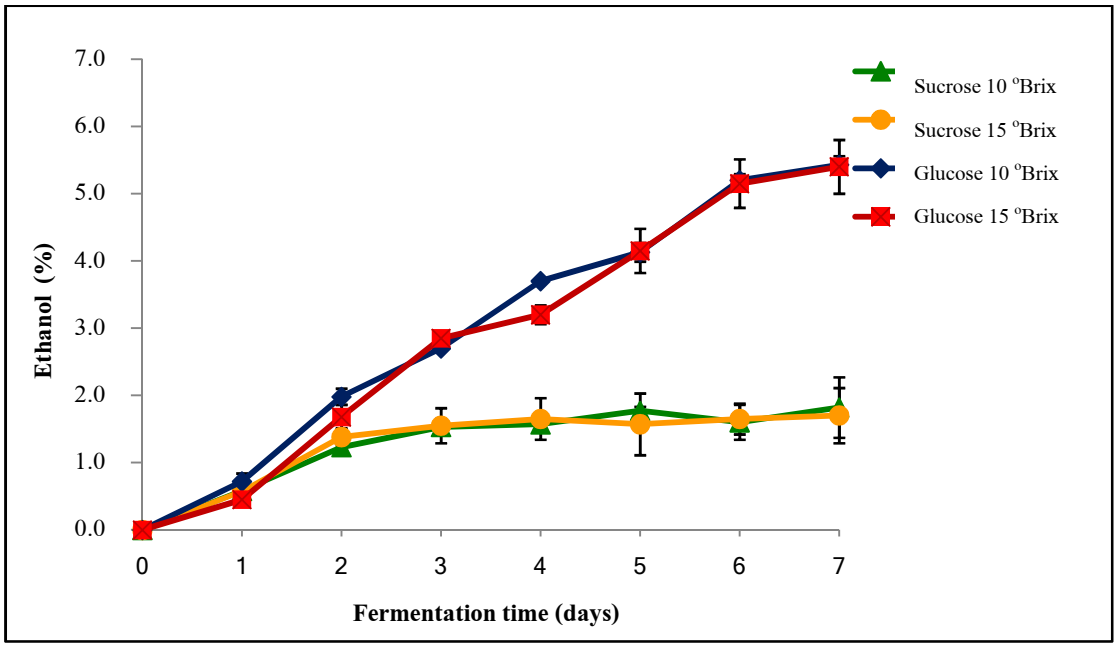
รูปที่ 10 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15ในน้ำลูกตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส 10 และ 15 องศาบริกซ์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที



รูปที่ 11 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 ในน้ำลูกตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 15 องศาบริกซ์ ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ ระดับต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที

จากผลการศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการหมักไวน์ผลตาลโตนดสุกนั้น จึงนำมาศึกษาการหมักไวน์ผลตาลโตนดสุกที่ปรับปริมาณความหวานด้วยน้ำตาลซูโครส และน้ำตาลกลูโคสเป็น 10 และ 15 องศาบริกซ์ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ด้วยยีสต์ไอโซเลท Y15 นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลซูโครส 10 องศาบริกซ์ ได้สูงสุดเพียงร้อยละ 1.82 ที่ระยะเวลาการหมัก 7 วัน และผลิตเอทานอลร้อยละ 1.70 ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลซูโครส 15 องศาบริกซ์ ที่ระยะเวลาการหมัก 7 วัน แต่เมื่อหมักไวน์ผลตาลโตนดสุกที่ด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็น 10 องศาบริกซ์ เชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 5.43 ที่ระยะเวลาการหมัก 7 วัน ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลใกล้เคียงกันกับการหมักไวน์ผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 15 องศาบริกซ์ ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับร้อยละ 5.40 ที่ระยะเวลาการหมัก 7 วัน ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) (รูปที่ 12) แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และยีสต์สามารถผลิตเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ด้วยน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าน้ำตาลซูโครส 10 และ 15 องศาบริกซ์

ดังนั้นจากผลการศึกษาการผลิตเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 และ 15 องศาบริกซ์ ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด จึงเลือกการเติมน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ และเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 500 มิลลิกรัมต่อลิตรในการหมักเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกต่อไป



รูปที่ 12 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 ในน้ำลูกตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส 10 และ 15 องศาบริกซ์ ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] 500 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที

4.2.7 ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ด้วยวิธีชีวโมเลกุลด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอของยีนที่บริเวณ D1/D2 บน 26S rDNA พบว่า ยีสต์ไอโซเลท Y15 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์สายพันธุ์ *Candida stellimalicola* โดยมีความคล้ายคลึง (%Similarity) เท่ากับร้อยละ 98 ผลทดสอบการเกิดปฏิกิริยาชีวเคมีด้วยเครื่องไวเทค 2 คอมแพค พบว่า ยีสต์ *C. stellimalicola* มีความสามารถใช้น้ำตาล และสารอินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ L-malate, Glycerol, D-galactose, D-glucose, D-mannose, L-sorbitol, DL-lactase และ Acetate แสดงดังตารางที่ 4

ยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* โคโลนีมีรูปร่างกลม สีขาวนวล ขอบเรียบ (รูปที่ 13) รูปร่างเซลล์เป็นแบบทรงรี (รูปที่ 14) เป็นสายพันธุ์ที่พบได้ทั่วไปในกระบวนการหมัก พบครั้งแรกจากการคัดแยกยีสต์จากผลมะเฟืองในประเทศไทย จัดเป็นสปีชีส์อะนามอร์ฟิกยีสต์ (anamorphic yeast) เป็นยีสต์ที่มีระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Suzuki *et al*., 1994) ซึ่งมีการศึกษาระบบยูบิควินโนน-7 ของยีสต์จีนัส *Candida* spp. บน 18S rDNA พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* มีระบบยูบิควิโนน-7 หรือโคเอนไซม์คิว (ubiquinone-7) ซึ่งการทดสอบชนิดของยูบิควิโนนมีความสำคัญในลูกโซ่หายใจเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์ (Suzuki and Nakase, 2002) ขณะเดียวกันก็สามารถคัดแยกเชื้อยีสต์ *C. stellimalicola* จากกระบวนการหมักโกโก้ (Nielsen *et al*., 2005) จากนมเปรี้ยวโดยใช้นมควายหมักแบบดั้งเดิมในประเทศอินโดนีเซีย (Jatmiko *et al*., 2012) และจากกระบวนการหมักมะกอกตามธรรมชาติในประเทศอิตาลี (Tofolo *et al*., 2013)

อย่างไรก็ตามยีสต์ที่ได้จากการคัดแยกในผลตาลโตนดสุกไม่ได้มีเพียงเชื้อยีสต์ในกลุ่ม *Saccharomycess* spp. แต่เป็นยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Shamala and Sreekantiah (1988) รายงานไว้ว่า ยีสต์ที่พบได้ทั่วไปในพืชตระกูลปาล์มส่วนใหญ่เป็น *Saccharomycess* spp. และ *Candida* spp. มากที่สุด เช่นเดียวกับการคัดแยกเชื้อยีสต์จากผลตาลโตนดสุกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมตาลพบเชื้อยีสต์ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Kloeckera apiculata*, *Candida krusei*, *Candida valida*, *Kloeckera japonica* และ *Candida tropicalis* ซึ่งมีเพียงเชื้อยีสต์ 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Kloeckera* spp. และ *Candida* spp. (สมยศ, 2555) นอกจากนี้ในผลตาลโตนดสุกยังพบเชื้อยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ *Candida krusei*, *Saccharomyces* spp., *Kloeckera*

apiculate , *Hanseniaspora* spp., *Hanseniaspora guillermondii*, *Pichia kudriavzevii*, *Isaatchenkia orientalis* (สมศรี, 2529; อรวรรณ, 2554) และจากผลการคัดแยกเชื้อยีสต์ในผลตาลโตนดสุก พบว่ามีปริมาณยีสต์ $4.67x10^5$ โคโลนีต่อกรัม จากปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด $4.3 x10^5$ โคโลนีต่อกรัม (มนัสนันท์, 2544) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ในผลตาลโตนดสุกจะมีปริมาณยีสต์มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น เนื่องจากเนื้อจากส่วนเส้นใยผลตาลโตนดสุกมีค่าพีเอชอยู่ในช่วงกรดเล็กน้อย และมีความชื้นสูงซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ และจากการคัดแยกได้เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* ยังสอดคล้องกับการศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในการหมักไวน์ พบว่า ระยะเริ่มแรกของการบวนการหมักจะพบเชื้อยีสต์สายพันธุ์ non-*Saccharomyces* ซึ่งปัจจัยที่ทำให้พบเชื้อยีสต์ non-*Saccharomyces* แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด ปริมาณของน้ำตาล และกรดอินทรีย์ในผลไม้นั้นๆ แต่เมื่อยีสต์สายพันธุ์ non-*Saccharomyces* เริ่มกระบวนการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอลจะพบเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces* เพิ่มขึ้น (Hidalgo *et al*., 2012; Li *et al*., 2011)

ตารางที่ 4 ผลการใช้น้ำตาลและอินทรีย์สารชนิดต่างๆของเชื้อยีสต์ *C. stellimalicola*

Characteristics	Reaction
L-Lysine-arylamidase	-
L-malate assimilation	+
Leucine-arylamidase	-
Arginine	-
Erythritol assimilation	-
Glycerol assimilation	+
Tyrosine arylamidase	-
β-N-acetyl-glucosaminidase	-
Arbutine assimilation	-
Amygdaline assimilation	-
D-galactose assimilation	+
Gentiobiose assimilation	-
D-glucose assimilation	+
Lactose assimilation	-
Methyl-α-D-glucopyranoside assimilation	-
D-cellobiose assimilation	-
y-glutamyl-transferase	-
D-maltose assimilation	-
D-raffinose assimilation	-
PNP-N-acetyl-β-D-galactosaminidase 1	-

ตารางที่ 4 การใช้น้ำตาลและอินทรีย์สารชนิดต่างๆ ของเชื้อยีสต์ *C. stellimalicola* (ต่อ)

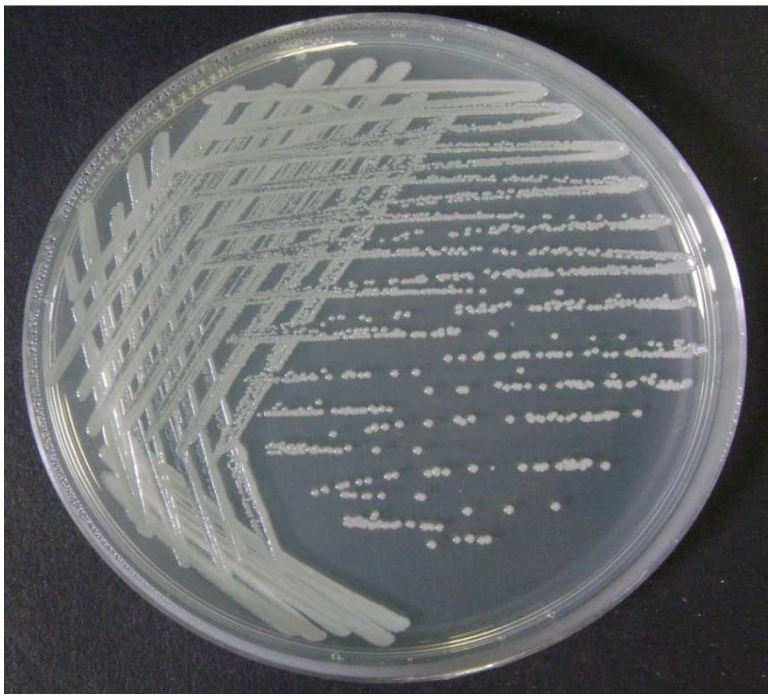
Characteristics	Reaction
D-mannose assimilation	+
D-melibiose assimilation	-
D-melezitose assimilation	-
L-sorbose assimilation	-
L-rhamnose assimilation	-
Xylitol assimilation	-
L-sorbitol assimilation	+
Saccharose/sucrose assimilation	-
Urease	-
α-glucosidase	-
D-turanose assimilation	-
D-trehalose assimilation	-
Nitrate assimilation	-
L-arabinase assimilation	-
D-galacturonate assimilation	-
Esculin hydrolysis	-
L-glutamate assimilation	-
D-xylose assimilation	-
DL-lactase assimilation	+
Acetate assimilation	+
Citrate (sodium) assimilation	-
Glucuronate assimilation	-
L-proline assimilation	-

ตารางที่ 4 การใช้น้ำตาลและอินทรีย์สารชนิดต่างๆ ของเชื้อยีสต์ *C. stellimalicola* (ต่อ)

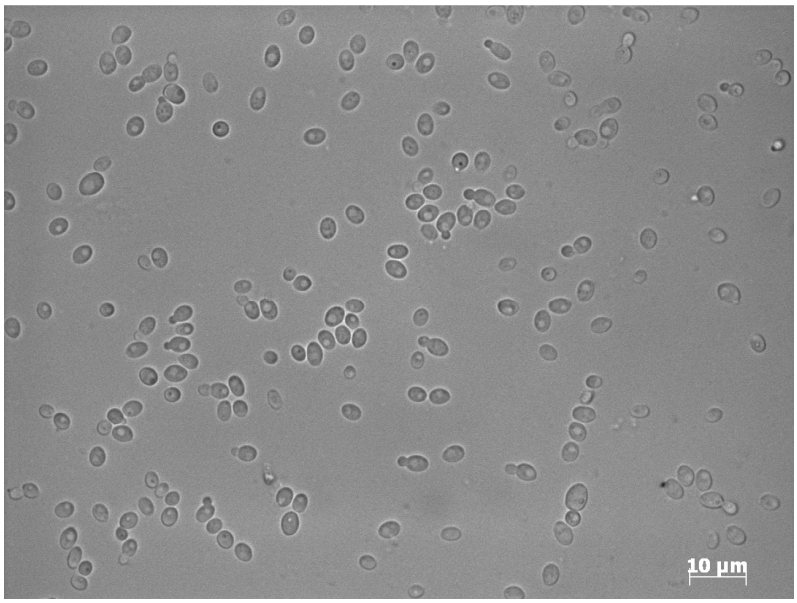
Characteristics	Reaction
2-keto-D-gluconate assimilation	-
N-acetyl-glucosamine assimilation	-
D-gluconate assimilation	-

\+ สามารถเกิดปฏิกิริยาได้

\- ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา



รูปที่ 13 ลักษณะโคโลนีของเชื้อยีสต์ *C. stellimalicola* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sabouraud agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



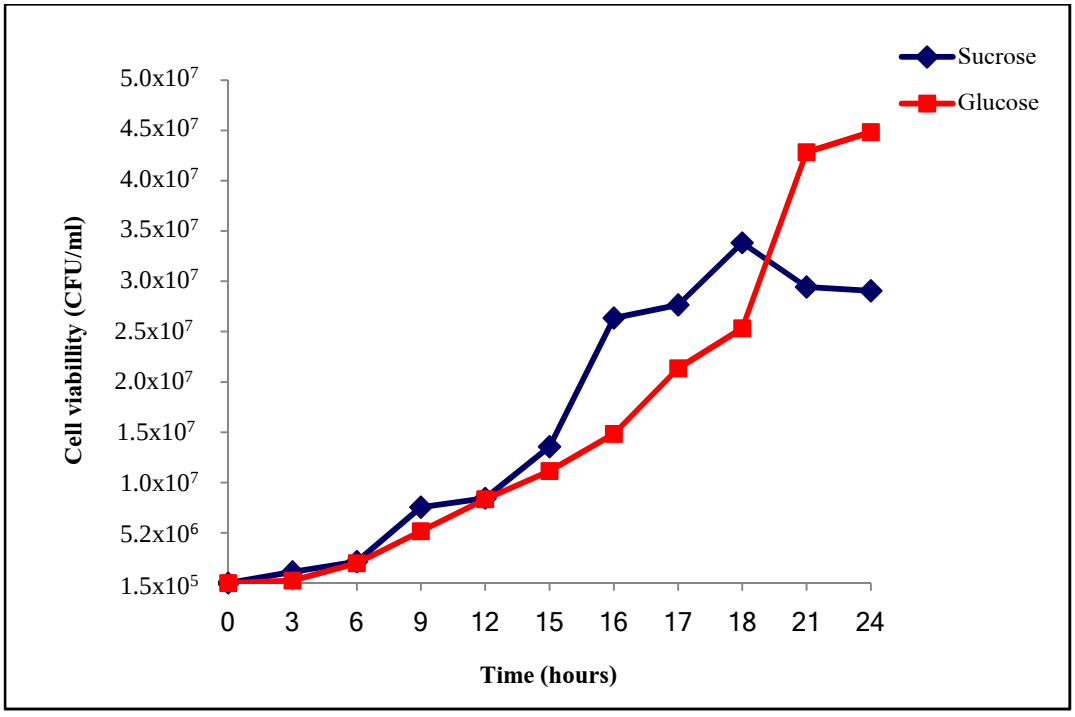
รูปที่ 14 ลักษณะรูปร่างเซลล์ของยีสต์ *C. stellimalicola* ที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

4.3 ผลของการใช้เชื้อยีสต์ *Candida stellimalicola* เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์เพื่อหมักเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุก

4.3.1 ผลการเจริญของเชื้อยีสต์ *Candida stellimalicola*

การเตรียมกล้าเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* เพื่อนำไปผลิตเป็นกล้าเชื้อหมักไวน์ผลตาลโตนดสุก โดยการศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะในน้ำผลตาลสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคสเป็น 15 องศาบริกซ์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* ที่เลี้ยงในน้ำผลตาลโตนดสุกที่มีน้ำตาลซูโครสยีสต์มีการเจริญเติบโตในระยะ lag phase ในช่วงชั่วโมงที่ 0-6 การเจริญในช่วง log phase ในช่วงเวลาประมาณ 9-18 ชั่วโมง จากนั้นจึงเข้าสู่ช่วง stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 21-24 (รูปที่ 15) แต่การเลี้ยงเชื้อยีสต์ในน้ำผลตาลสุกที่มีน้ำตาลกลูโคสการเจริญในช่วง lag phase ในช่วงชั่วโมงที่ 0-6 การเจริญในช่วง log phase ในช่วงชั่วโมงที่ 9-24 ซึ่งใช้ระยะเวลานานกว่าการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่มีน้ำตาลซูโครสซึ่งมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ในชั่วโมงที่ 16 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.35 ชั่วโมง$^{-1}$ มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 2.65x10^{7} CFU/ml ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อยีสต์ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่มีน้ำตาลกลูโคสมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ในช่วงชั่วโมงที่ 17 และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.34 ชั่วโมง$^{-1}$ (ตารางที่ 5) และมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 2.15x10^{7} CFU/ml จากการเลี้ยงยีสต์ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส พบว่า ยีสต์จะเจริญเติบโตเร็วกว่าและมีปริมาณเซลล์ยีสต์มากกว่าการเลี้ยงในน้ำผลตาลโตนดสุกที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสในช่วงเวลาเริ่มต้นถึง 18 ชั่วโมง แต่ระยะเวลาหลังจาก 18 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ยีสต์ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสกลับมากกว่าเนื่องจากยีสต์จะใช้น้ำตาลฟรุกโตสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีอยู่ในผลตาลโตนดสุก แต่ในขณะเดียวกันเมื่อยีสต์ใช้น้ำตาลฟรุกโตสหมดแล้วไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ทำให้มีปริมาณเซลล์น้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส สอดคล้องกับผลการทดสอบความสามารถการใช้น้ำตาลต่างๆ ซึ่งยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* ไม่มีความสามารถใช้น้ำตาลซูโครสแต่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ โดยการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์เพื่อการหมักไวน์โดยทั่วไปจะใช้ระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง แต่ระยะเวลาของการเจริญเติบโตสูงสุดจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุดิบ และสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ ในขณะที่ยีสต์สายพันธุ์ *Candida tropicalis*

พบว่า มีอัตราการเจริญสูงสุดช่วงชั่วโมงที่ 12 มีอัตราการเจริญสูงสุด เท่ากับ 0.54 ชั่วโมง$^{-1}$ และมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.61x10^{7} CFU/ml (สุธีรา, 2554) ในขณะที่ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048 เมื่อเลี้ยงในน้ำคั้นลำข้าวฟ่างหวานที่ 15 องศาบริกซ์ มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.37 และ 0.36 ชั่วโมง$^{-1}$ (ลักษณา และคณะ, 2554) ดังนั้นการคัดเลือกสภาวะการเลี้ยงเชื้อยีสต์เริ่มต้นควรอยู่ในระยะ log phase เพื่อใช้ผลิตกล้าเชื้อหมักไวน์ โดยเลือกระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณเพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้นที่ว่องไว เพื่อจะช่วยให้ระยะเวลาการหมักสั้นลง จึงเลือกการเตรียมกล้าเชื้อในน้ำผลตาลโตนดสุกที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสที่ระยะเวลา 17 ชั่วโมง เพื่อใช้ผลิตกล้าเชื้อยีสต์สำหรับหมักเอทานอลต่อไป



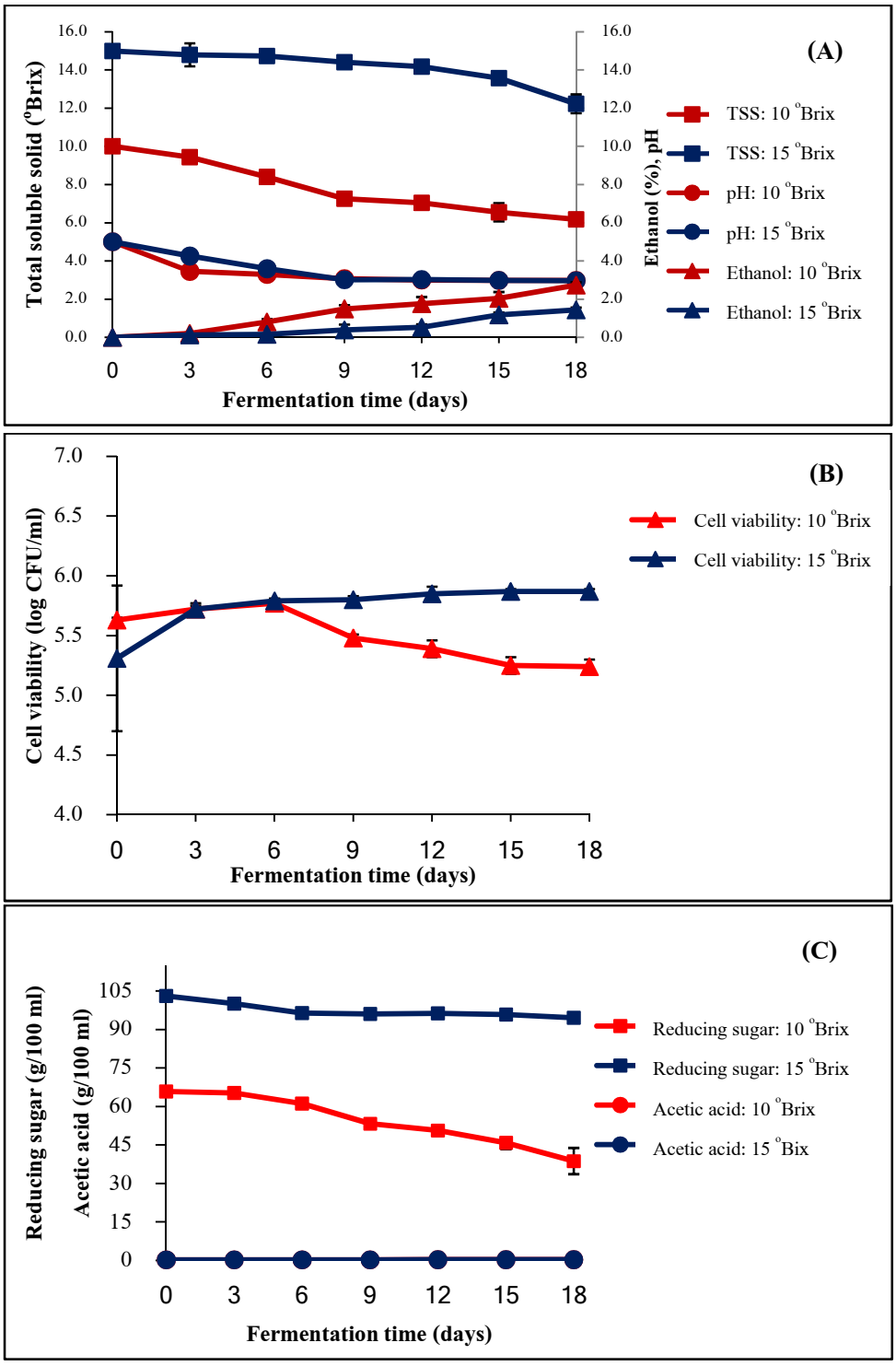
รูปที่ 15 การเจริญเติบโตปริมาณเซลล์ยีสต์ (CFU/ml) ของยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่มีปริมาณซูโครสและกลูโคส 15 องศาบริกซ์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที

ตารางที่ 5 การเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลซูโครส และกลูโคส 15 องศาบริกซ์

Time (hrs)	Cell viability (CFU/ml)		Specific growth rate, μ (h^{-1})	
	Sucrose	Glucose	Sucrose	Glucose
0	$1.73x10^5$	$1.50x10^5$	-	-
3	$1.27x10^6$	$4.10x10^5$	0.43	0.44
6	$2.29x10^6$	$2.14x10^6$	0.30	0.43
9	$7.70x10^6$	$5.30x10^6$	0.22	0.23
12	$8.60x10^6$	$8.50x10^6$	0.10	0.13
15	$1.37x10^7$	$1.13x10^7$	0.28	0.11
16	$2.65x10^7$	$1.50x10^7$	0.35	0.32
17	$2.78x10^7$	$2.15x10^7$	0.13	0.34
18	$3.40x10^7$	$2.55x10^7$	0.10	0.23
21	$2.96x10^7$	$4.30x10^7$	-	0.10
24	$2.92x10^7$	$4.50x10^7$	-	0.02

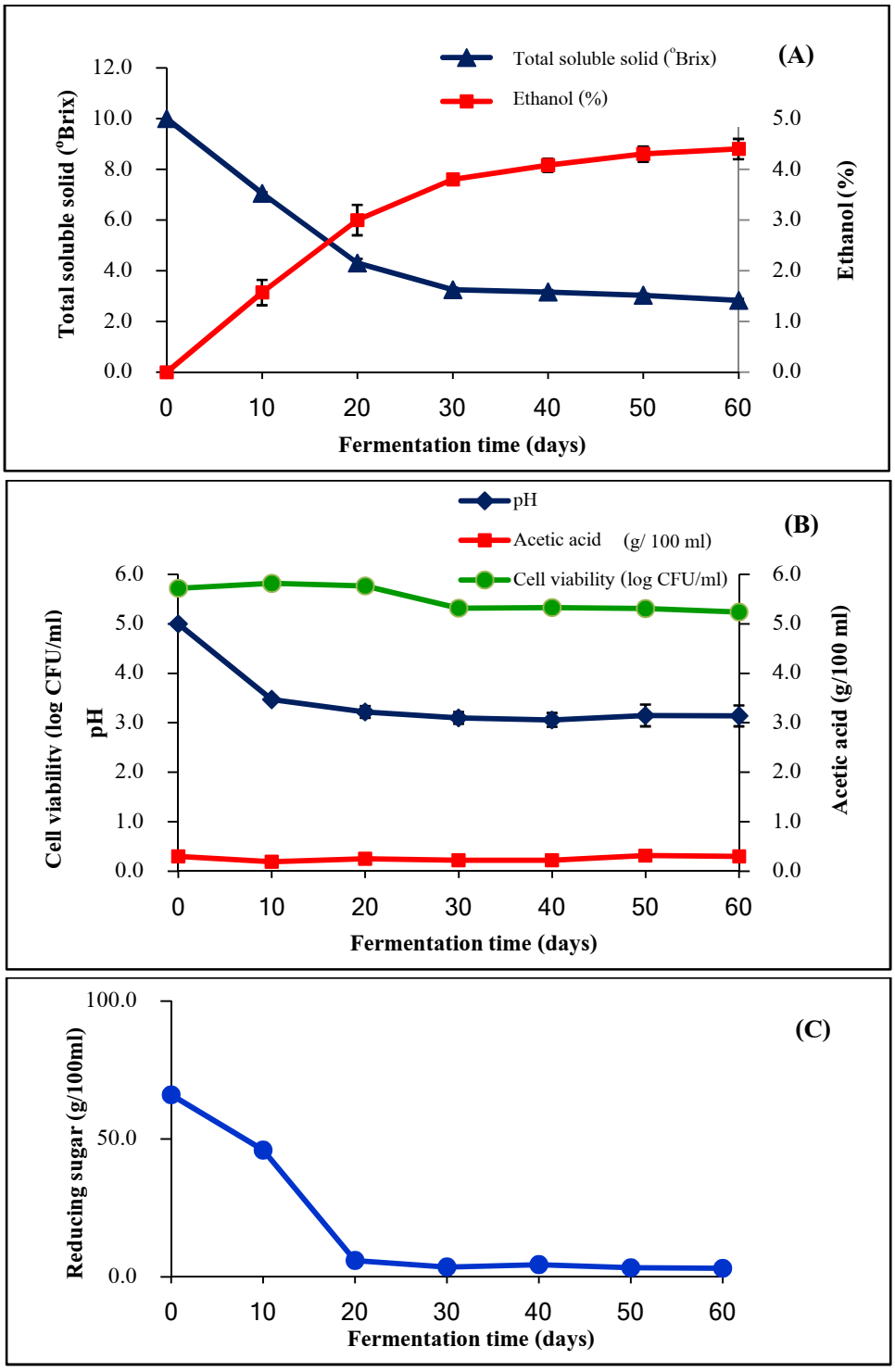
4.3.2 ผลการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *Candida stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก

ผลการศึกษาการหมักเอทานอลด้วยยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 และ 15 องศาบริกซ์ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตความ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (w/v) ปริมาตร 6 ลิตร ในถังหมักขนาด 10 ลิตร หมักที่อุณหภูมิห้อง (31.0±2.0 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลาการหมัก 18 วัน พบว่า ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก (รูปที่ 16A) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาล และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก ปริมาณเซลล์ยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 6 และจะค่อยๆลดลงจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก แต่ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 15 องศาบริกซ์ ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตจะเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก (รูปที่ 16B) ในขณะที่เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักยังมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือ 6.17±0.35 และ 12.23±0.49 องศาบริกซ์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ 38.79±5.1 และ 94.53±0.76 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (รูปที่ 16C) ที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 10 และ 15 องศาบริกซ์ ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชลดลงตามระยะเวลาการหมักจนถึงวันที่ 9 และเริ่มคงที่จนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก ในขณะที่การผลิตกรดอะซิติกค่อนข้างคงที่จนสิ้นสุดระยะเวลาการหมักในวันที่ 18 เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมักยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดร้อยละ 2.73±0.15 ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ สูงกว่าน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 15 องศาบริกซ์ (ร้อยละ 1.43±0.12) แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ผลิตเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ ได้สูงกว่าการหมักในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 15 องศาบริกซ์ เพราะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงเกินไปทำให้เซลล์เกิดแรงดันออสโมติก ดังนั้นจึงเลือกการปรับน้ำผลตาลโตนดสุกด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็น 10 องศาบริกซ์ เพื่อใช้ในการหมักเอทานอลต่อไป



รูปที่ 16 ผลการผลิตเอทานอล การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (A) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (B) ปริมาณเซลล์ยีสต์ และกรดอะซิติก (C) ของการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก 6 ลิตร ที่ ด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 และ 15 องศาบริกซ์ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

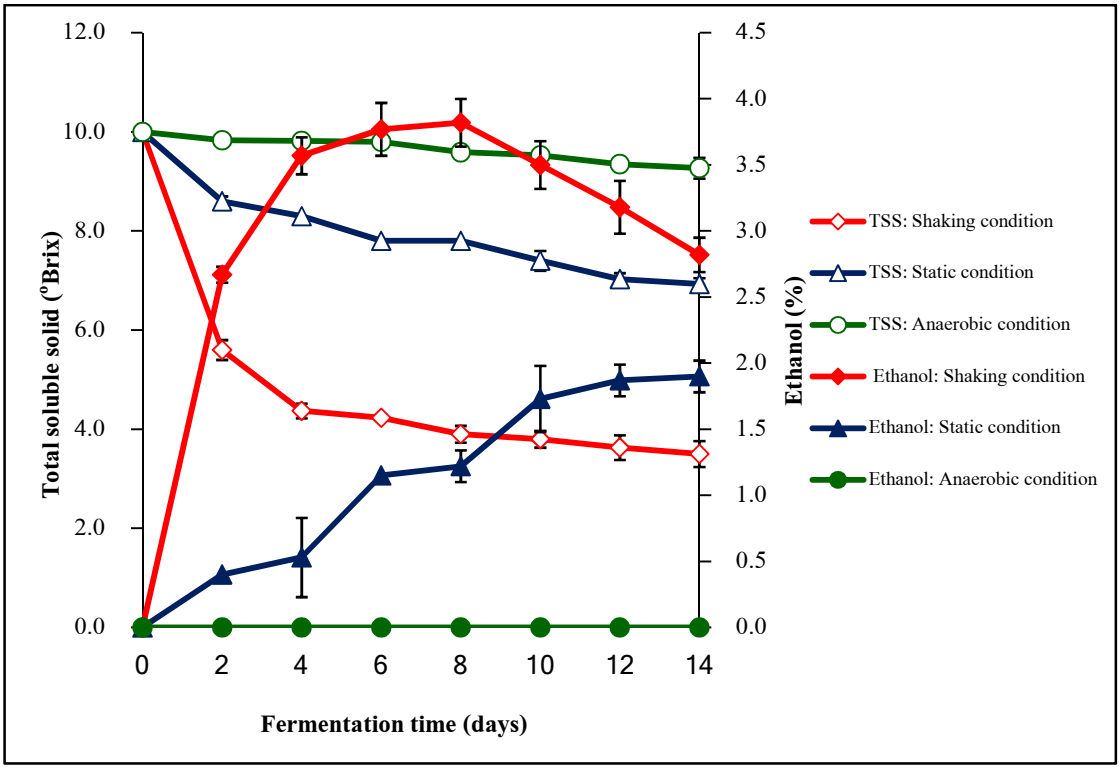
จากผลการศึกษาการหมักเอทานอลโดยใช้น้ำผลตาลโตนดสุก 6 ลิตร ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็น 10 องศาบริกซ์ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 18 วัน ยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* ผลิตเอทานอลได้สูงสุดเพียงร้อยละ 2.73±0.15 ดังนั้นจึงศึกษาการหมักเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับปริมาณความหวานด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร(w/v) ปริมาตร 6 ลิตร ในถังหมักขนาด 10 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (31.0±2.0 องศาเซลเซียส) โดยเพิ่มระยะเวลาการหมักเป็น 60 วัน พบว่ายีสต์สามารถผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลสูงสุดร้อยละ 4.40±0.20 (รูปที่ 17A) ที่ระยะเวลาการหมัก 14 สูงกว่าการผลิตเอทานอลวันที่ 0-12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นในช่วง 10 วัน ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ค่าพีเอช (รูปที่ 17B) และน้ำตาลรีดิวซ์ (รูปที่ 17C) ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 20 วันแรกของการหมัก และจะเริ่มคงที่ตั้งแต่วันที่ 30 จนสิ้นสุดระยะการหมัก ในขณะที่ปริมาณกรดอะซิติกค่อนข้างคงที่ตลอดระยะวลาการหมัก 60 วัน แสดงให้เห็นว่ายีสต์ *C. stellimalicola* มีความสามารถผลิตเอทานอลได้แต่ใช้ระยะเวลาในการหมักนานเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักที่ใช้ระยะเวลา 18 วัน สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดร้อยละ 2.73±0.15 การหมักเอทานอลที่ต้องใช้ระยะเวลานานอาจเป็นเพราะสภาวะที่ใช้ในการหมัก หรืออาจเกิดจากวัตถุดิบคือน้ำผลตาลโตนดสุก หรือความสามารถในการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ซึ่งแตกต่างกับผลการศึกษาคุณสมบัติของยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* ที่แยกได้จากผลมะเฟือง พบว่า เชื้อยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวขาดความสามารถในการหมักเอทานอล (Suzuki *et al.*, 1994)



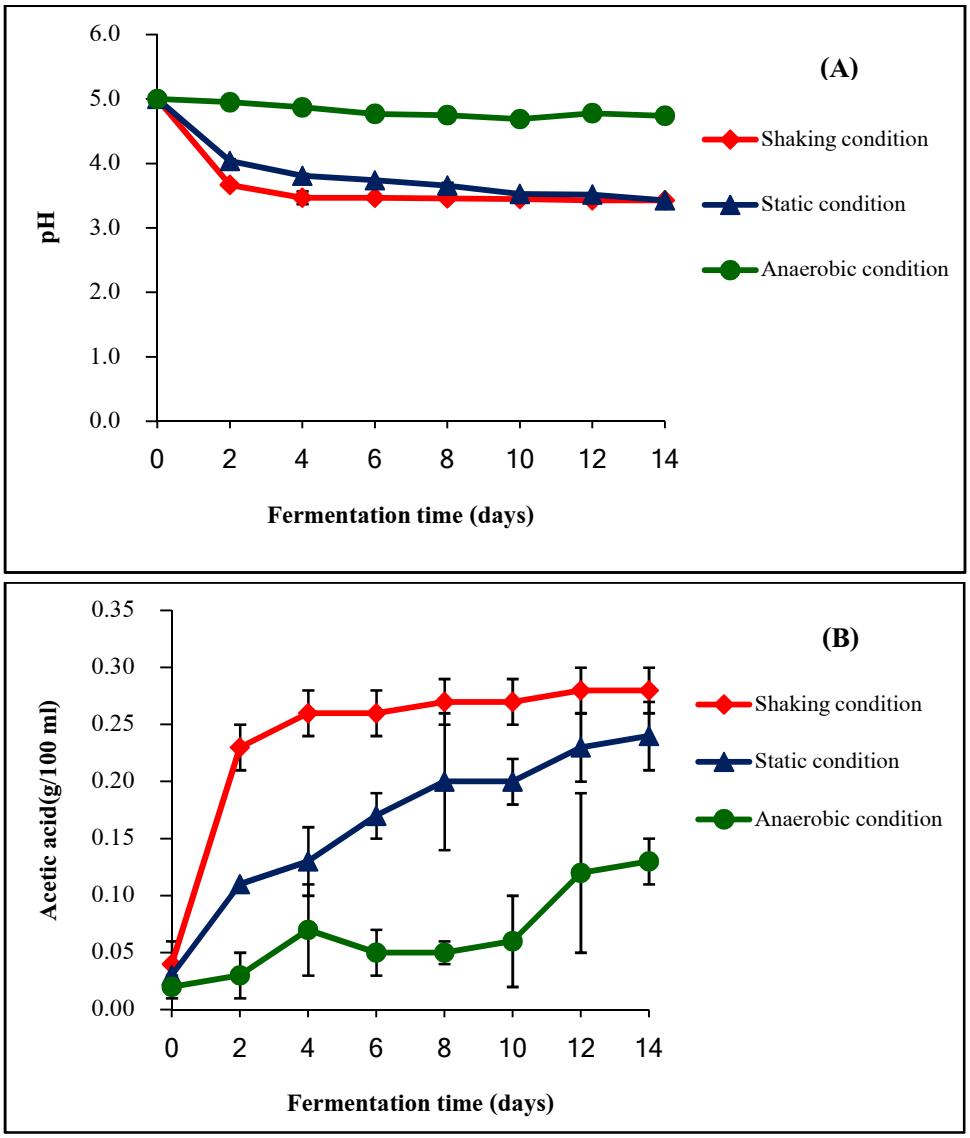
รูปที่ 17 ผลการผลิตเอทานอล (A) การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช กรดอะซิติก ปริมาณเซลล์ยีสต์ (B) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (C) ของเชื้อยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก 6 ลิตร ที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร และหมักที่อุณหภูมิห้อง

จากผลการศึกษาการหมักเอทานอลโดยใช้น้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ปริมาตร 6 ลิตร พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* มีความสามารถผลิตเอทานอลแต่ใช้ระยะเวลานาน ดังนั้นจึงศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (w/v) โดยการหมักน้ำผลตาลโตนดสุกปริมาตร 600 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้สภาวะการหมักแบบไม่มีการเขย่า สภาวะการหมักแบบมีการเขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที และสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศ พบว่า สภาวะการหมักแบบมีการเขย่ายีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงและเร็วกว่าสภาวะการหมักแบบไม่เขย่า และสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยการผลิตเอทานอลจะเพิ่มขึ้นสูงสุดวันที่ 8 มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 3.82±0.18 รองลงมาคือ สภาวะการหมักแบบไม่มีการเขย่ามีปริมาณเอทานอลร้อยละ 1.90±0.12 และไม่พบการผลิตเอทานอลในสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศ (รูปที่ 18) การเขย่าจะทำให้การเจริญเติบโต และการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเนื่องจากเชื้อ *C. stellimalicola* ได้รับสารอาหารและออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้นสอดคล้องกับการศึกษาการหมักไวน์องุ่นด้วยยีสต์ non-*Saccharomyces* สายพันธุ์ *Kluyveromyces thermotolerans* และ *Torulaspora delbrueckii* พบว่าภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำปริมาณเซลล์ยีสต์จะลดลงหลังจากระยะเวลาการหมักผ่านไป 2 วัน และสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเพียงร้อยละ 0.65-0.70 ซึ่งแตกต่างกับสภาวะการหมักที่มีออกซิเจนที่มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น (Hansen *et al.*, 2001) การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลของสภาวะการหมักแบบเขย่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0-4 วัน เหลือเพียง 4.37±0.15 องศาบริกซ์ ในขณะเดียวกันที่สภาวะการหมักแบบไม่มีการเขย่า และสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศจะลดลงเพียงเล็กน้อยตามระยะเวลาการหมักจนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก ค่าพีเอชจะลดลงตามระยะเวลาการหมัก ในขณะที่สภาวะการหมักแบบเขย่า ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 4 แต่เมื่อถึงวันที่ 6 ค่าพีเอชจะลดลงเล็กน้อยทุกสภาวะการหมักจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก (รูปที่ 19A) การผลิตกรดอะซิติกจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาการหมักถึงวันที่ 4 และจะคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก (รูปที่ 19B) เมื่อหมักเอทานอลในสภาวะแบบเขย่า จะมีปริมาณกรดอะซิติกสูงกว่าการหมักที่สภาวะการหมักแบบไม่มีการเขย่า และสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) จากนั้นปริมาณกรดค่อนข้างคงที่ในทุกสภาวะการหมัก ปริมาณ

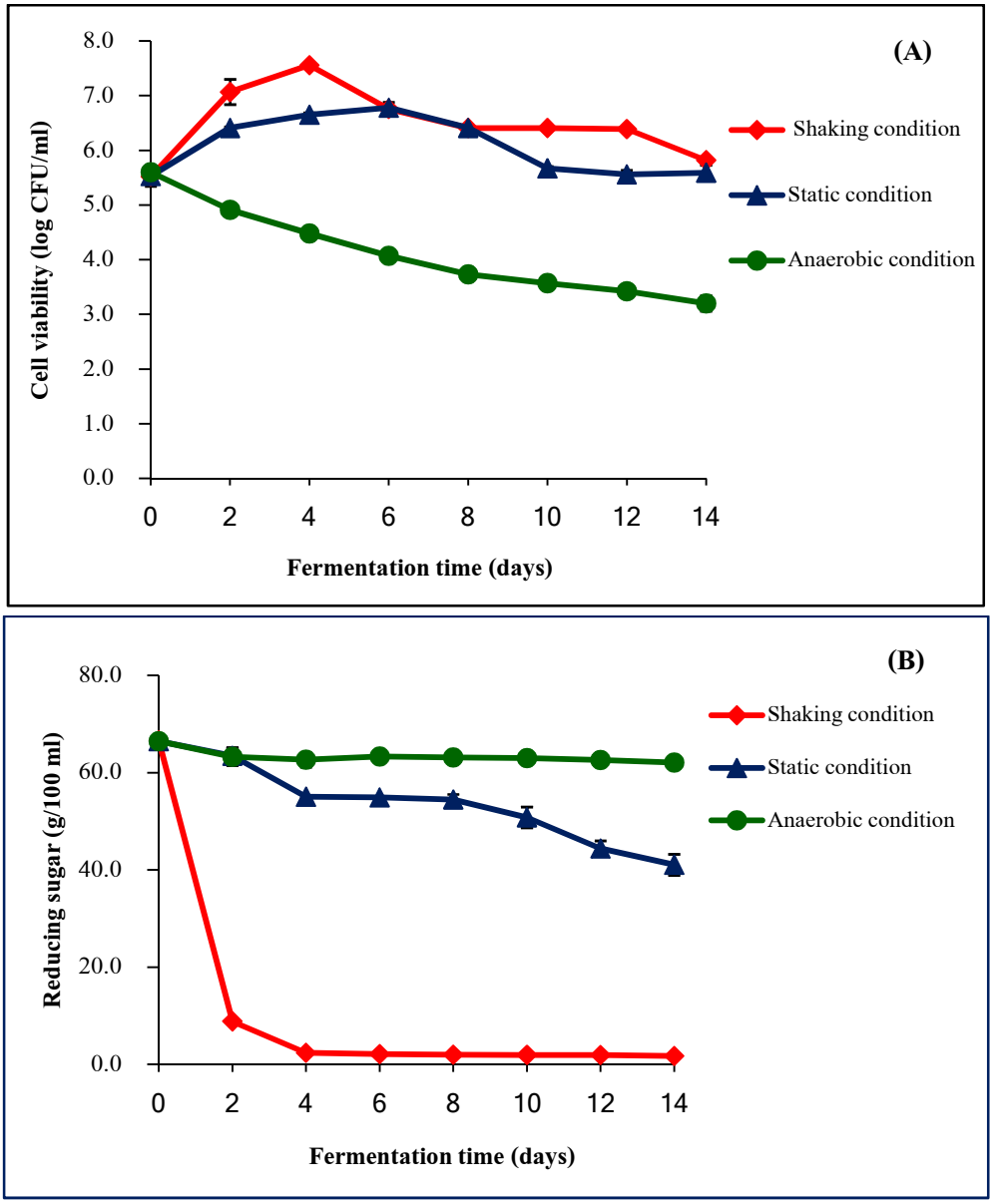
เซลล์ยีสต์ในสภาวะการหมักแบบเขย่าสูงกว่าการหมักแบบไม่มีการเขย่าในช่วง 0-8 วัน ส่วนปริมาณเซลล์ในสภาวะแบบไม่มีการเขย่าจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ แต่ในสภาวะแบบไม่มีอากาศปริมาณเซลล์ยีสต์จะลดลงตั้งแต่วันแรกของการหมัก (รูปที่ 20A) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วภายในช่วงระยะเวลา 0-4 วันแรกของสภาวะหมักแบบเขย่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสภาวะการหมักแบบไม่มีการเขย่าจะลดลงตามระยะเวลาการหมัก (รูปที่ 20B) ดังนั้นจึงเลือกสภาวะการหมักเอทานอลด้วยน้ำผลตาลโตนดสุกแบบมีการเขย่าใช้ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 18 ผลของสภาวะการหมักไวน์น้ำผลตาลโตนดสุกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลของยีสต์ *C. stellimalicola* ที่สภาวะการหมักต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



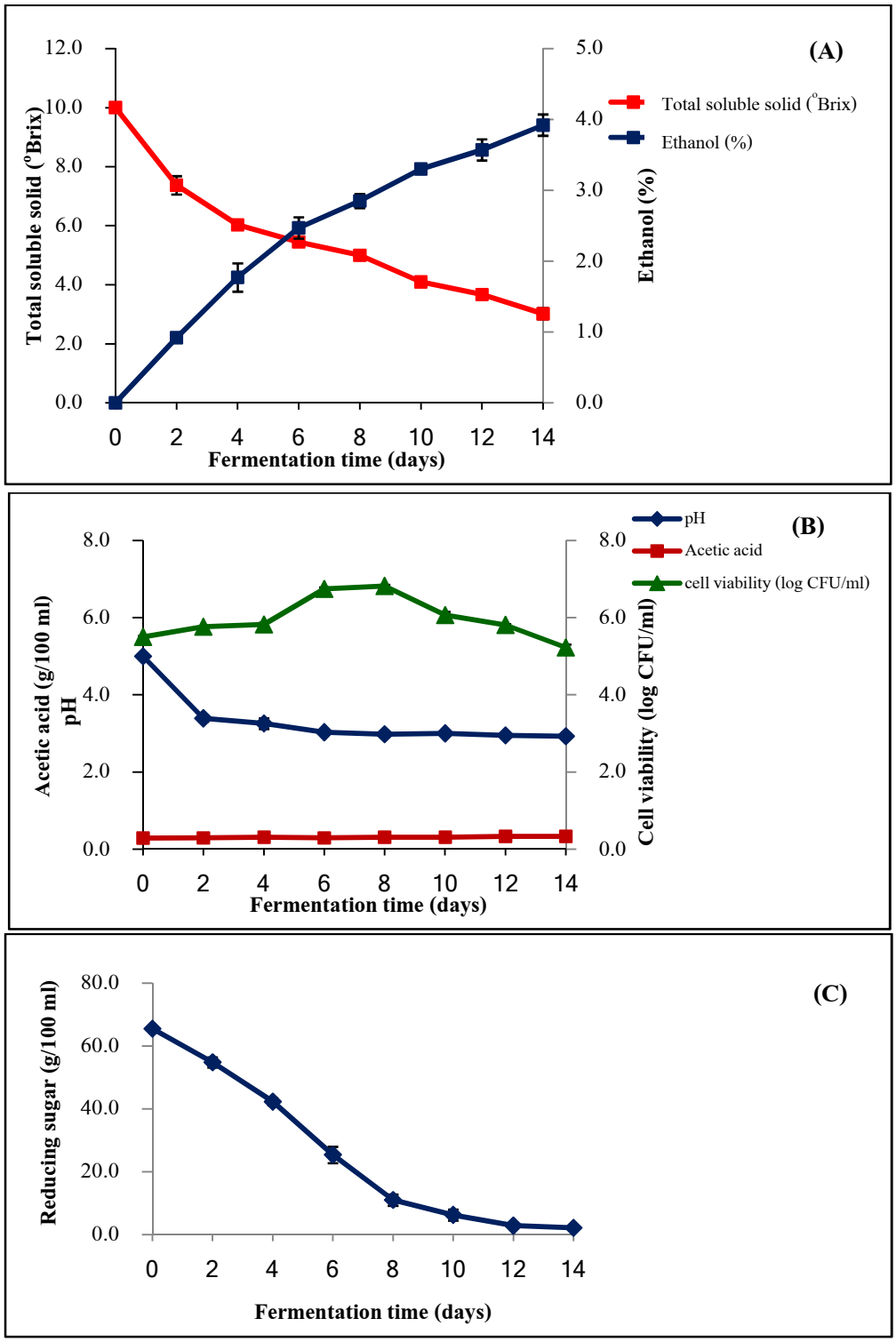
รูปที่ 19 ผลเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช (A) และปริมาณกรดอะซิติก (B) ของยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก ที่สภาวะการหมักต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 20 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์ (log CFU/ml) (A) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/100 ml) (B) ของยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่สภาวะการหมักต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากผลการศึกษาสภาวะการหมักเอทานอลแบบมีการเขย่าปริมาตร 600 มิลลิลิตร นำมาปรับใช้ขยายขนาดการหมักน้ำผลตาลโตนดสุกปริมาตร 6 ลิตร ในถังหมักขนาด 10 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (31.0±2.0 องศาเซลเซียส) โดยใช้วิธีการกวนด้วยแท่งแม่เหล็กความเร็ว 300 รอบต่อนาที พบว่า เชื้อยีสต์ *C. stellimalicola* สามารถผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักโดยผลิตเอทานอลสูงสุดวันที่ 14 เท่ากับร้อยละ 3.92±0.15 สูงกว่าที่ระยะเวลาการหมักวันที่ 0-12 (รูปที่ 21) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และเร็วกว่าการหมักน้ำผลตาลโตนดสุกปริมาตร 6 ลิตร แบบไม่มีการกวนซึ่งใช้ระยะเวลานานถึง 60 วัน ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ได้ใกล้เคียงกับการหมักเอทานอลจากผลตาลโตนดสุกโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ผสมเปรียบเทียบกับยีสต์ทำขนมปัง พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 1.3-1.65 ที่ระยะเวลาการหมัก 2 วัน (Balakumar and Arasaratnum, 2009) ถึงแม้ว่ายีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้ในสภาวะที่มีการกวน แต่ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ก็ไม่สูงมากเมื่อเทียบกับเชื้อยีสต์สายพันธุ์อื่นๆที่แยกได้จากผลไม้ต่างๆ อาจเป็นเพราะเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากผลตาลโตนดสุกซึ่งในผลตาลโตนดสุกมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้เพียงประมาณ 4-5 องศาบริกซ์ ซึ่งโดยทั่วไปอยู่ในรูปของน้ำตาลฟรุกโตส ในขณะที่การหมักไวน์เติมน้ำตาลกลูโคส จึงทำให้ยีสต์ที่คัดแยกได้มีความสามารถหมักเอทานอลได้น้อย อีกทั้งไม่สามารถหมักเอทานอลได้ในน้ำผลตาลโตนดที่ปรับด้วยน้ำตาลซูโครส 10 และ 15 องศาบริกซ์ และยังสอดคล้องกับผลการศึกษาเนื้อผลตาลโตนดสุก พบว่า ในเนื้อผลตาลโตนดสุกมีสาร steroidal saponin เป็น tetraglycoside (flabillifer II) เป็นสารที่ทำให้เนื้อผลตาลโตนดสุกมีรสขม (Jansz *et al.*, 1994) ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต และการหมักเอทานอลของยีสต์ (Nikawela *et al.*, 1998a: Ariyasena *et al.*, 2001) สาร flabelliferin F_B ที่ปริมาณ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ร้อยละ 50-75 ในขณะที่สาร flabelliferin F_n ปริมาณเพียง 60 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์โดยสิ้นเชิง แต่สาร flabelliferin F_C และ flabelliferin F_D จะไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ (Nikawela *et al.*, 1998b) อีกทั้งการเปิดขวดเพื่อเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลทุกๆ 2 วัน อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณเอทานอลบางส่วนสูญหายไป ดังนั้นจึงเลือกการผลิตเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกแบบมีการกวนที่ระยะเวลาการหมัก 14 วัน เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับหมักน้ำส้มสายชูด้วยแบคทีเรียกรดอะซิติก แต่เนื่องจากปริมาณเอทานอลที่เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* ผลิตได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 3.92±0.15 จากนั้นจึงปรับ

เอทานอลในน้ำหมักให้เท่ากับร้อยละ 6 โดยการเติมเอทานอลร้อยละ 95 เพราะจากสมการการออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกเทียบได้กับเอทานอลร้อยละ 1 (v/v) แบคทีเรียกรดอะซิติกสามารถออกซิไดซ์ไปเป็นกรดอะซิติกได้ร้อยละ 1 (w/v) สอดคล้องกับการหมักเอทานอลในน้ำเวย์เต้าหู้ด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* V1116 พบว่า ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับร้อยละ 8.26 จากนั้นจึงปรับเอทานอลในน้ำหมักเท่ากับร้อยละ 10 โดยการเติมเอทานอลร้อยละ 95 (กุลวดี, 2552) และใกล้เคียงกับผลการศึกษาการผลิตกรดอะซิติกจากเอทานอลโดยแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *Acetobacter pasteurianus* TISTR 520 พบว่า ความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้นที่ร้อยละ 6 เหมาะสมที่จะใช้ผลิตกรดอะซิติก เนื่องจากให้ปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดเท่ากับร้อยละ 4.4 (มัลลิกา และพัฒนา, 2549)



รูปที่ 21 ผลการผลิตเอทานอล (A) ปริมาณเซลล์ (log CFU/ml) ปริมาณกรด พีเอช (B) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/100 ml) (C) ของเชื้อยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก 6 ลิตร ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ กวนด้วยแท่งแม่เหล็กความเร็ว 300 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาด 10 ลิตร และหมักที่อุณหภูมิห้อง

4.4 ผลการคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดอะซิติกจากผลตาลโตนดสุก

4.4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติก

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกทำโดยนำส่วนเส้นใยผลตาลโตนดสุกปริมาณ 10 กรัม หมักในอาหารเหลว GEY (glucose ethanol yeast extract) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน โดยทำการหมักผลตาลโตนดจำนวน 4 ครั้ง และคัดเลือกโคโลนีที่เกิดวงใสได้ทั้งหมด 250 ไอโซเลท เมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆได้แก่ การย้อมแกรม พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบหรือแกรมแปรผันมีจำนวน 177 ไอโซเลท เซลล์มีลักษณะทรงรี เป็นท่อนตรง อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเรียงต่อกันเป็นสาย การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสให้ผลเป็นบวกจำนวน 148 ไอโซเลท ซึ่งในกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจนทำเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์แต่แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลสได้จะย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ออกซิเจนและน้ำ การทดสอบการสร้างออกซิเดสซึ่งเป็นการทดสอบการมีเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดสให้ผลเป็นลบมีจำนวน 125 ไอโซเลท การทดสอบการเกิดปฏิกิริยา Overoxidation ให้ผลเป็นลบแสดงว่าแบคทีเรียกรดอะซิติกจะไม่สามารถออกซิไดซ์กรดอะซิติกไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งจะส่งผลให้ปริมาณกรดอะซิติกลดลงเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีจำนวน 65 ไอโซเลท และทดสอบการสร้างเซลลูโลสให้ผลเป็นลบมีจำนวน 41 ไอโซเลท คือไม่สร้างเซลลูโลสบนผิวหน้าน้ำหมัก และจากระยะเวลาที่คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกระหว่างวันที่ 3-5 พบว่า การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกวันที่ 3 จะได้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกที่ไม่สร้างเซลลูโลสจำนวน 26 ไอโซเลท สูงกว่าการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกระหว่างวันที่ 4-5 ซึ่งมีเพียง 15 ไอโซเลท เพราะการสร้างเซลลูโลสบนผิวหน้าน้ำหมักส่งผลให้การเจริญเติบโต และการผลิตกรดอะซิติกลดลงเนื่องจากการขาดออกซิเจน จึงสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติกได้ทั้งหมดจำนวน 37 ไอโซเลท ซึ่งสอดคล้องกับแบคทีเรียกรดอะซิติกที่คัดแยกจากผลไม้ ดอกไม้ ไวน์ และจากการหมักน้ำส้มสายชู (กุลวดี 2552; Seearunruangchai *et al.* 2004; Zahoor *et al.*, 2006; Ndoye *et al.*, 2007; Kadere *et al.*, 2008; Kommanee *et al.*, 2012)

ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียกรดอะซิติกจำนวน 37 ไอโซเลท จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และจากการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

หรือ แกรมแปรผัน เซลล์มีลักษณะเป็นท่อนตรง การสร้างเอนไซม์แคตาเลสให้ผลเป็นบวก การทดสอบการสร้างออกซิเดสให้ผลเป็นลบ ไม่สร้างเซลลูโลส และไม่เกิดปฏิกิริยา Overoxidation ได้จำนวน 20 ไอโซเลท กำหนดรหัสสายพันธุ์ A01-A20 (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 การกำหนดรหัสของแบคทีเรียกรดอะซิติกที่คัดแยกจากผลตาลโตนดสุก

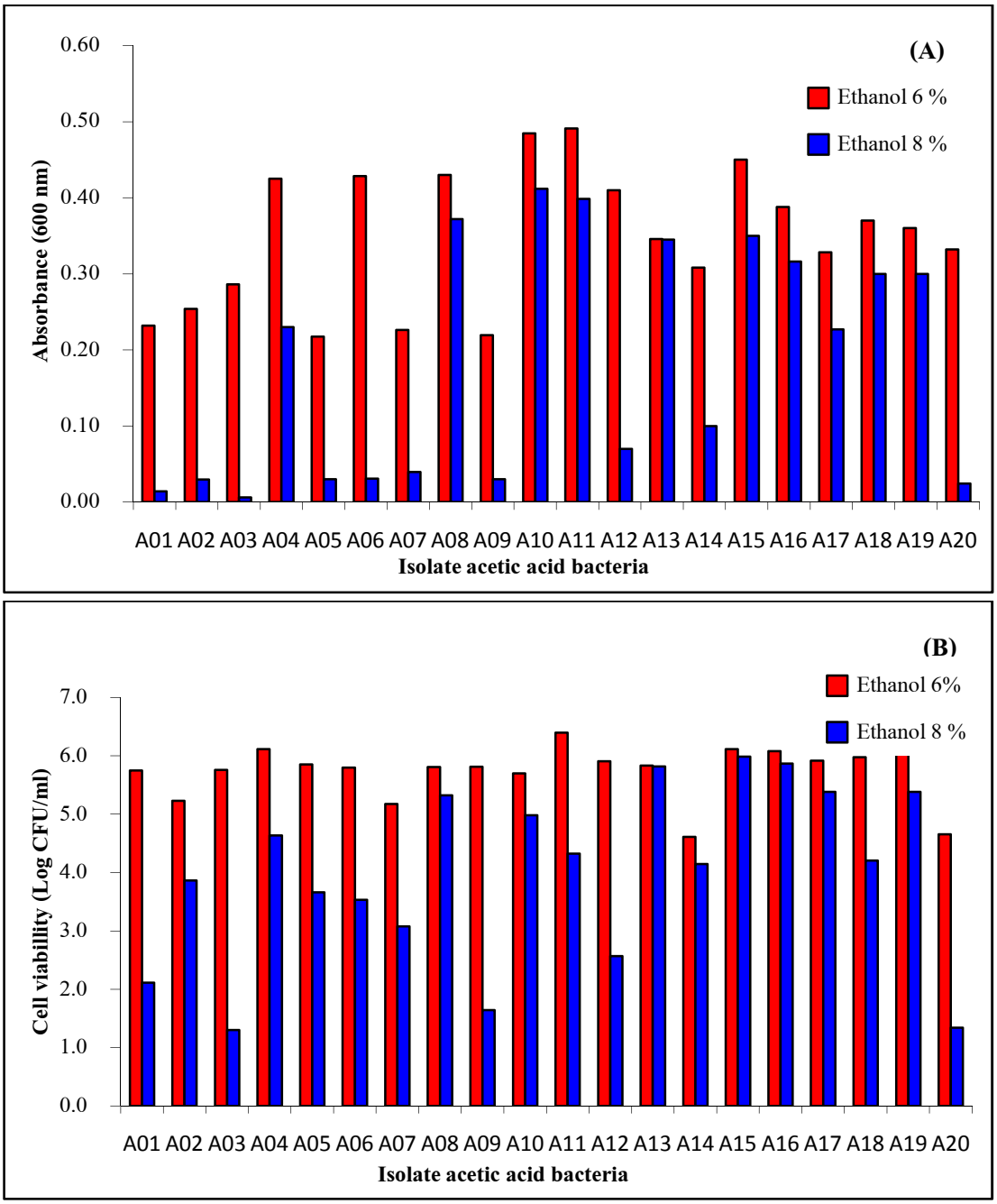
Days	Days of isolate	Total Colony	clear zone	Gram			Catalase Test		Oxidase test		Over oxidation		Cellulose		Total of acetic acid bacteria	Select Isolate from characterization Isolate number
				+	-	variable	+	-	+	-	+	-	+	-		
1	3	20	20	2	3	15	18	4	5	13	4	9	1	8	8	A01, A02, A03
	4	20	20	5	1	14	13	2	3	10	5	5	2	3	3	A04
	5	20	20	3	2	15	10	7	2	8	4	4	4	-	-	
2	3	20	20	5	5	10	13	2	3	10	6	4	1	3	3	A05, A06
	4	20	20	4	2	14	10	4	2	8	6	2	1	1	1	
	5	20	20	5	2	13	12	3	4	9	6	3	3	-	-	
3	3	20	20	7	3	10	10	3	4	9	3	6	3	3	3	A07, A08
	4	20	20	10	2	10	13	-	1	12	10	2	2	-	-	
	5	20	20	8	1	11	9	3	-	9	9	5	4	4	-	
4	3	70	30	9	8	13	20	1	-	20	4	16	4	12	12	A09, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16
	4	50	20	7	1	12	12	1	1	11	5	6	2	4	4	A17, A18, A19
	5	30	20	8	1	9	8	1	2	6	3	3	3	3	3	A20
Total		333	250	73	31	146	148	31	27	125	65	65	30	41	37	20

4.4.2 ผลของความสามารถในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดอะซิติก ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเอทานอล

การทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก จำนวน 20 ไอโซเลท ในอาหารเหลว GYE ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของเอทานอล ร้อยละ 6 และ 8 (v/v) เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 6 มีปริมาณค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ในช่วง 0.22-0.49 มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียอยู่ในช่วง 4.61-6.40 log CFU/ml ($4.1x10^4$-$2.5x10^6$ CFU/ml) โดยไอโซเลท A11 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 6.40 log CFU/ml ($2.5x10^6$ CFU/ml) รองลงมาได้แก่ A19, A15, A04, A16, A18, A17, A12, A05, A13, A09, A08, A06, A03, A01, A10, A02, A07, A20 และ A14 ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 8 มีปริมาณค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ในช่วง 0.01-0.41 มีปริมาณเซลล์อยู่ในช่วง 1.30-5.99 log CFU/ml (20-$9.7x10^5$ CFU/ml) โดยไอโซเลท A15 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 5.99 log CFU/ml ($9.7x10^5$ CFU/ml) รองลงมาได้แก่ A16, A17, A19, A08, A18, A13, A04, A11, A14, A10, A02, A05, A06, A07, A12, A01, A09, A20 และ A03 พบว่า การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลร้อยละ 6 จะมีการเจริญเติบโต (OD_{600}) และมีปริมาณเซลล์สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 8 ทุกไอโซเลท แสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคที่เรียกรดอะซิติกลดลง (รูปที่ 22A และ 22B) เช่นเดียวกับการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter pasteurianus* PHD-23 ที่คัดแยกได้จากดอกกระดุมทอง ที่ระยะเวลาการหมัก 3 วัน เชื้อจะเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 2-4 แต่การเจริญเติบโตจะลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6-8 (Kommanee *et al.*, 2012) การเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* ที่คัดแยกจากลูกพีชในประเทศอิหร่านในอาหาร Carr (ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 30.0 กรัม โบรโมครีซอลกรีน 0.02 กรัม ผงวุ้น 20 กรัม และน้ำกลั่น 1.0 ลิตร) ที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 3-10 พบว่า เชื้อ *Acetobacter* จะมีอัตราการเจริญเติบโต และผลิตกรดอะซิติกอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 24 ชั่วโมงในอาหารที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 3 มีอัตราการเจริญเติบโตและผลิตกรดอะซิติกลดลงในอาหารที่มีเอทานอลร้อยละ 4-5 แต่จะไม่มีการเจริญเติบโตในอาหารที่มี

ปริมาณเอทานอลร้อยละ 6-10 และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการหมักเป็น 96 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 3-7 จะมีอัตราการเจริญเติบโตและผลิตกรดอะซิติกสูงกว่าอาหารที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 8-10 (Maal and Shafiee, 2012) เช่นเดียวกับการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกที่คัดแยกได้จากน้ำส้มสายชูหมักพื้นบ้านในอาหาร SM broth (ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 5.0 กรัม กลูโคส 50.0 กรัม และน้ำกลั่น 1.0 ลิตร) ที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 2-10 พบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกจะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 2-5 แต่เมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นร้อยละ 6-10 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดอะซิติกลดลงจากร้อยละ 90 เหลือเพียงร้อยละ 70 (Gullo *et al*., 2006)

ดังนั้นจึงเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกที่มีความสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 ได้ 10 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท A04, A08, A10, A11, A13, A15, A16, A17, A18 และ A19 ซึ่งมีการเจริญเติบโต และมีปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลร้อยละ 6 อยู่ในช่วง $5.0x10^{5}$-$2.5x10^{6}$ CFU/ml และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลร้อยละ 8 มีการเจริญเติบโตและมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในช่วง $2.1x10^{4}$-$9.7x10^{5}$ CFU/ml เพื่อนำไปศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกรดอะซิติกต่อไป



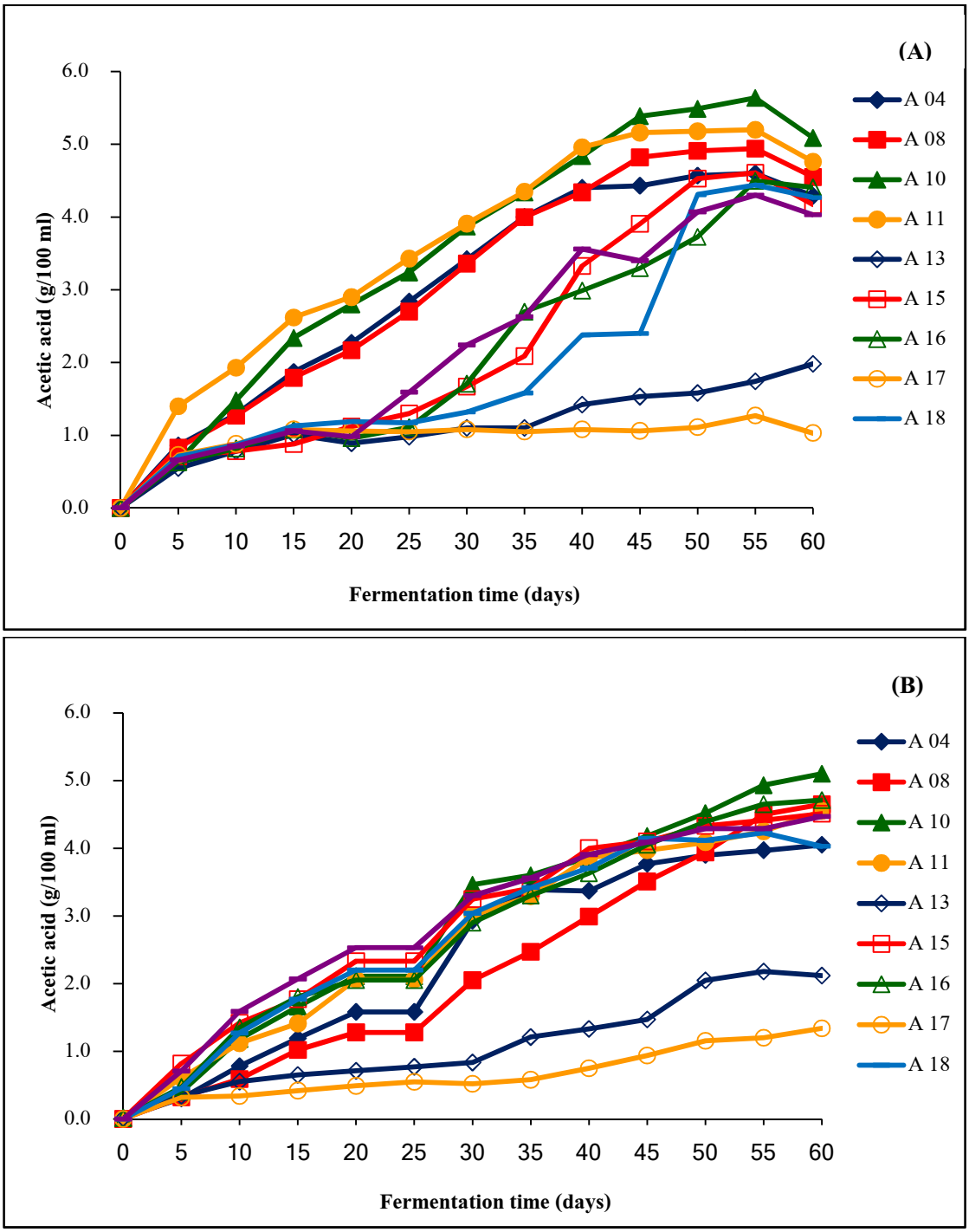
รูปที่ 22 การเจริญเติบโต ปริมาณค่าการดูดกลืนแสง(OD_{600}) (A) และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (log CFU/ml) (B) ของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลทต่างๆในอาหารเหลว GYE ที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.4.3 ผลของความสามารถในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกรดอะซิติกแตกต่างกัน

การทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกจำนวน 10 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท A04, A08, A10, A11, A13, A15, A16, A17, A18 และ A19 ในอาหาร GYE ที่มีความเข้มข้นของปริมาณกรดอะซิติกร้อยละ 2 และ 4 (v/v) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกทั้ง 10 ไอโซเลท ไม่สามารถเจริญเติบโต (OD_{600}) และไม่มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของปริมาณกรดอะซิติกร้อยละ 2 และ 4 เนื่องจากการเติมกรดอะซิติกร้อยละ 2 และ 4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ค่าพีเอชของอาหารลดต่ำลงประมาณ 3.05 และ 2.53 ส่งผลให้เซลล์เกิดความเครียด (cell stress) เพราะปริมาณกรดอะซิติกที่สูงทำให้กิจกรรมแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase, ADH) ลดลง อีกทั้งค่าพีเอชที่ต่ำทำให้เซลล์จะต้องทำงานหนักเพื่อรักษาสมดุลภายในเซลล์ ซึ่งโดยทั่วไปแบคทีเรียกรดอะซิติกสามารถเจริญเติบโตได้ที่ค่าพีเอชต่ำ แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีการปรับพีเอชด้วยกรดอะซิติก เพราะกรดอะซิติกจะไปขัดขวางการขับโปรตอนออกนอกเซลล์ (Nakano and Fukaya, 2008) เช่นเดียวกับการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกในอาหารที่มีปริมาณกรดอะซิติกเข้มข้นจะมีผลให้การรอดชีวิตจะลดลง (Sokollek *et al.*, 1998) สอดคล้องกับการศึกษาการเติมกรดอะซิติกร้อยละ 0.2-4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า แบคทีเรียกรดอะซิติก *Acetobacter* sp. มีเจริญเติบโตลดลงที่ปริมาณกรดอะซิติกมากกว่าร้อยละ 0.2 โดยสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมกรดอะซิติก (Lu *et al.,* 1999) นอกจากนี้อาจเป็นเพราะเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผลตาลโตนดสุก ซึ่งในผลตาลโตนดสุกมีปริมาณกรดทั้งหมดเพียงร้อยละ 0.53±0.02 ค่าพีเอช 4.47-5.1 ซึ่งอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่แบคทีเรียกรดอะซิติกที่คัดแยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลทไม่สามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกรดอะซิติกร้อยละ 2 และ 4 ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียกรดอะซิติกทั้ง 10 ไอโซเลท ไปศึกษาความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกต่อไป

4.4.4 ผลของความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเอทานอลต่างๆ

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดอะซิติกในการผลิตกรดอะซิติก โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกทั้ง 10 ไอโซเลทที่มีความสามารถเจริญเติบโตในอาหารเหลว GYE ที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 ได้แก่ ไอโซเลท A04, A08, A10, A11, A13, Y13, A15, A16, A17 และ A18 มาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกในอาหารเหลว GYE ที่มีความเข้มข้นของเอทนอลร้อยละ 6 และ 8 (v/v) เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกในอาหารที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท A04, A08, A10 และ A11 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้เร็วที่สุด 4.00-4.35 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 35 วัน (รูปที่ 23A) โดยไอโซเลท A10 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงสุด 5.64±0.18 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ไอโซเลท A11 ผลิตกรดอะซิติกได้สูงสุด 5.20±0.20 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 55 วัน ในขณะที่ไอโซเลท A15, A16, A18 และ A19 ผลิตกรดอะซิติกได้ 4.30-4.61 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 50-60 วัน และไอโซเลท A17 ผลิตกรดอะซิติกได้น้อยสุดเพียง 1.27±0.17 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 55 วัน ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 8 พบว่า ไอโซเลท A04, A08, A10 และ A11 ผลิตกรดอะซิติกน้อยกว่าการผลิตกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลร้อยละ 6 โดยไอโซเลท A10 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงสุด 5.10±0.27 กรัมต่อ100 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 60 วัน รองลงมาได้แก่ไอโซเลท A16 สามารถผลิตกรดอะซิติก 4.71±0.40 กรัมต่อ100 มิลลิลิตร ขณะที่ไอโซเลท A16, A17 และ A19 สามารถผลิตกรดอะซิติกในเอทานอลร้อยละ 8ได้สูงกว่าการผลิตกรดอะซิติกในเอทานอลร้อยละ 6 (รูปที่ 23B) แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 6 เป็นร้อยละ 8 สามารถแบ่งแบคทีเรียกรดอะซิติกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก คือ แบคทีเรียไอโซเลท A04, A08, A10, A11, A15, A18 และ 19 สามารถผลิตกรดอะซิติกในเอทานอลร้อยละ 6 สูงกว่าการผลิตกรดอะซิติกในเอทานอลร้อยละ 8 ส่วนแบคทีเรียไอโซเลท A13, A16 และ A17 สามารถผลิตกรดอะซิติกในเอทานอลร้อยละ 8 สูงกว่าการผลิตกรดอะซิติกในเอทานอลร้อยละ 6 ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลท A10 ซึ่งสามารถผลิตกรดอะซิติกได้เร็วและสูงที่สุดไปจำแนกสายพันธุ์เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตกรดอะซิติกจากน้ำผลตาลโตนดสุกต่อไป



รูปที่ 23 การผลิตกรดอะซิติกของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลทต่างๆในอาหารเหลว GYE ที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 (A) และเอทานอลร้อยละ 8 (B) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที

4.4.5 ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติก

การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลท A10 โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยวิธีชีวโมเลกุลด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสบน 16S rDNA พบว่า แบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลท A10 ที่คัดแยกได้จากผลตาลโตนดสุกมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acetobacter ghanensis* โดยมีความคล้ายคลึง (% Similarity) เท่ากับร้อยละ 98 พบครั้งแรกจากการคัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติกในการหมักเมล็ดโกโก้จากประเทศกาน่า (Ghana) การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ พบว่า แบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *A. ghanensis* สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มียีสต์สกัดที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 30 สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติกได้ สามารถผลิตกรดกลูโคนิก แต่ไม่สามารถผลิต 2-ketogluconic acid หรือ 5-ketogluconic acid จากน้ำตาลกลูโคส เจริญเติบโตได้เล็กน้อยในกลีเซอรอลแต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลมอลโตส และเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ อีกทั้งไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน (Cleenwerck *et al*., 2007) เมื่อศึกษาการเจริญเติบโตและการออกซิเดชั่นของแบคทีเรียกรดอะซิติกระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ พบว่าแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *A. ghanensis* สามารถเจริญเติบโตได้ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ที่มีเอทานอล กรดแลกติก และแมนนิทอล โดยสามารถอออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติกได้ภายใน 24 ชั่วโมง (Moens *et al*., 2014) นอกจากนี้จากผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติกจากผลไม้ต่างๆ ในประเทศไทย เช่น มะม่วง องุ่น พุทรา ส้ม เงาะ มะกรูด ลองกอง สับปะรด มะขาม ฝรั่ง แอปเปิ้ล สตอเบอรี และมะเฟือง พบว่า สามารถจำแนกแบคทีเรียกรดอะซิติกออกเป็น 7 กลุ่ม คือ *A. pasteurianus*, *A. orientalis*, *A. lovaniensis*, *A. indonesiensis*, *A. tropicalis*, *A. ghanensis* และ *A. orleanensis* ซึ่งคัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *A. ghanensis* ได้จำนวน 5 ไอโซเลท จากพุทรา มะกรูด แอปเปิ้ล และสับปะรด ซึ่งสามารถผลิตกรดได้จากน้ำตาล D-arabinose, D-glucose และ D-sorbitol บางไอโซเลทสามารถผลิตกรดได้จากน้ำตาล L-arabinose, D-fructose, D-mannose, D-melibiose และ D-xylose แต่ไม่สามารถผลิตกรดได้จาก mesoerythritol, dulcitol, D-galactose, glycerol, lactose, maltose, D-mannitol, L-rhamnose, raffinose , L-sorbose และ ซูโครส ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มี meso-erythritol, D-arabitol, L-arabitol และ meso-ribitol ไม่สามารถผลิต 2-keto-D-gluconic acid และ 5-keto-D-gluconic acid หรือ 2,5-diketo-D-gluconic acid จากน้ำตาลกลูโคส เจริญได้เล็กน้อยในกลีเซอรอล แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลมอลโตส และเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Kommanee *et al*., 2012) ปัจจุบันมีการคัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติกจากแหล่งและวัตถุดิบที่หลากหลายเพื่อให้ได้กล้าเชื้อที่มีคุณสมบัติเหมาะสม คือ มีความสามารถผลิตกรดอะซิติกได้เร็วและสูง ทนต่อความเข้มข้นของปริมาณเอทานอลเริ่มต้น และความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่

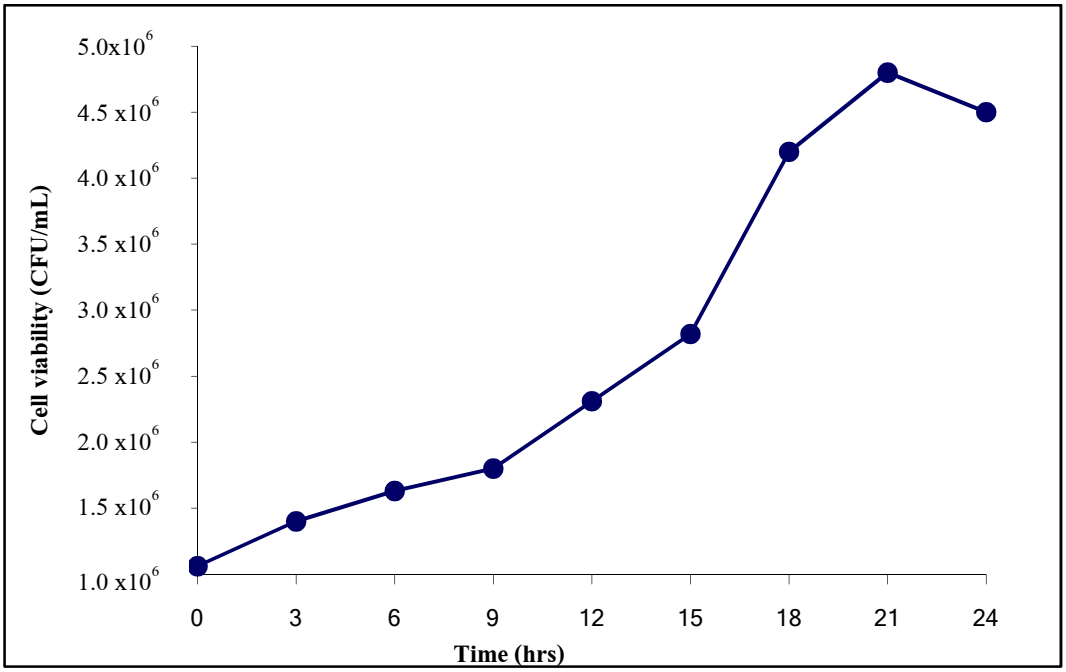
เซลล์ผลิตขึ้นเอง เพื่อเป็นการลดต้นทุนและระยะเวลาในกระบวนการหมัก เช่น *Gluconobacter frateurii*, *Acetobacter tropicalis* และ *Acetobacter pasteurianus* คัดแยกได้จากอาหารหมัก เช่น สาโท ขนมจีน และข้าวหมาก (วัลลภา, 2550) *Acetobacter aceti* จากผลไม้ ดอกไม้ (ณัฐดา และ สมบูรณ์, 2533) แบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ใหม่คัดแยกได้จากดอกไม้ ผลไม้ และอาหารหมัก จากประเทศอินโดนีเซียคือ *Acetobacter syzygii*, *Acetobacter cibinongensis*, *Acetobacter orientalis* (Lisdiyanti *et al*., 2001) ในขณะที่คัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติกจากผลไม้ต่างๆในประเทศไทยพบสายพันธุ์ *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter orientalis*, *Gluconacetobacter liquefaciens* (Seearunruangchai *et al*., 2004) *Acetobacter pasteurianus* คัดแยกได้จากน้ำส้มสายชูหมัก (Gullo *et al*., 2009) ซึ่งจากการคัดแยกแบคทีเรียจากวัตถุดิบที่หลากหลาย สังเกตได้ว่าแบคทีเรียกรดอะซิติกจีนัส *Acetobacter* ส่วนมากจะคัดแยกได้จากอาหารหมัก ไวน์ เบียร์ และน้ำส้มสายชูหมัก เพราะสามารถทนต่อกรดได้ดี ส่วนจีนัส *Gluconobacter* จะคัดแยกได้จากผลไม้และดอกไม้เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสายพันธุ์ที่นิยมนำมาใช้ผลิตกรดอะซิติกคือจีนัส *Acetobacter* มากกว่าจีนัส *Gluconobacter* เพราะมีความสามารถทนต่อกรดอะซิติกได้สูงกว่า สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ทำให้ได้แบคทีเรียกรดอะซิติกที่คัดแยกได้จากผลตาลโตนดสุกคือ สายพันธุ์ *A. ghanensis* เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4.5 ผลการใช้เชื้อ *Acetobacter ghanensis* เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์เพื่อหมักกรดอะซิติกในไวน์น้ำผลตาลโตนดสุก

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตกรดอะซิติก พบว่า แบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *A. ghanensis* มีความสามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดอะซิติกในอาหารที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 สูงและเร็วกว่าในอาหารที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 8 ดังนั้นจึงเลือกใช้ไวน์ผลตาลโตนดสุกที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและการหมักน้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุกต่อไป

4.5.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Acetobacter ghanensis*

การเตรียมกล้าเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *A. ghanensis* เพื่อนำไปผลิตเป็นกล้าเชื้อหมักน้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุก โดยการศึกษาการเจริญเติบโตสูงสุดในน้ำผลตาลโตนดสุกที่มีเอทานอลร้อยละ 6 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า แบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *A. ghanensis* มีการเจริญเติบโตในระยะ lag phase ในช่วงชั่วโมงที่ 0-6 การเจริญในช่วง log phase ในช่วงเวลาประมาณ 9-21 ชั่วโมง (รูปที่ 24) จากนั้นจึงเข้าสู่ช่วง stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 21-24 ซึ่งมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ในชั่วโมงที่ 18 และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.09 ชั่วโมง$^{-1}$ มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 4.20×10^{6} CFU/ml (ตารางที่ 7) ซึ่งอยู่ในระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณเพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้นที่ว่องไว โดยทั่วไปการเลือกช่วงระยะเวลาเพื่อการเตรียมกล้าเชื้อจะเลือกช่วงเวลา log phase ซึ่งเป็นช่วงระยะเวลาที่เซลล์มีการแบ่งตัวแบบทวีคูณ ซึ่งจะทำให้ลดระยะเวลาในการหมักสั้นลง จึงเลือกการเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *A. ghanensis* ในไวน์น้ำผลตาลโตนดสุกที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อใช้ทำกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกหมักน้ำส้มสายชูต่อไป



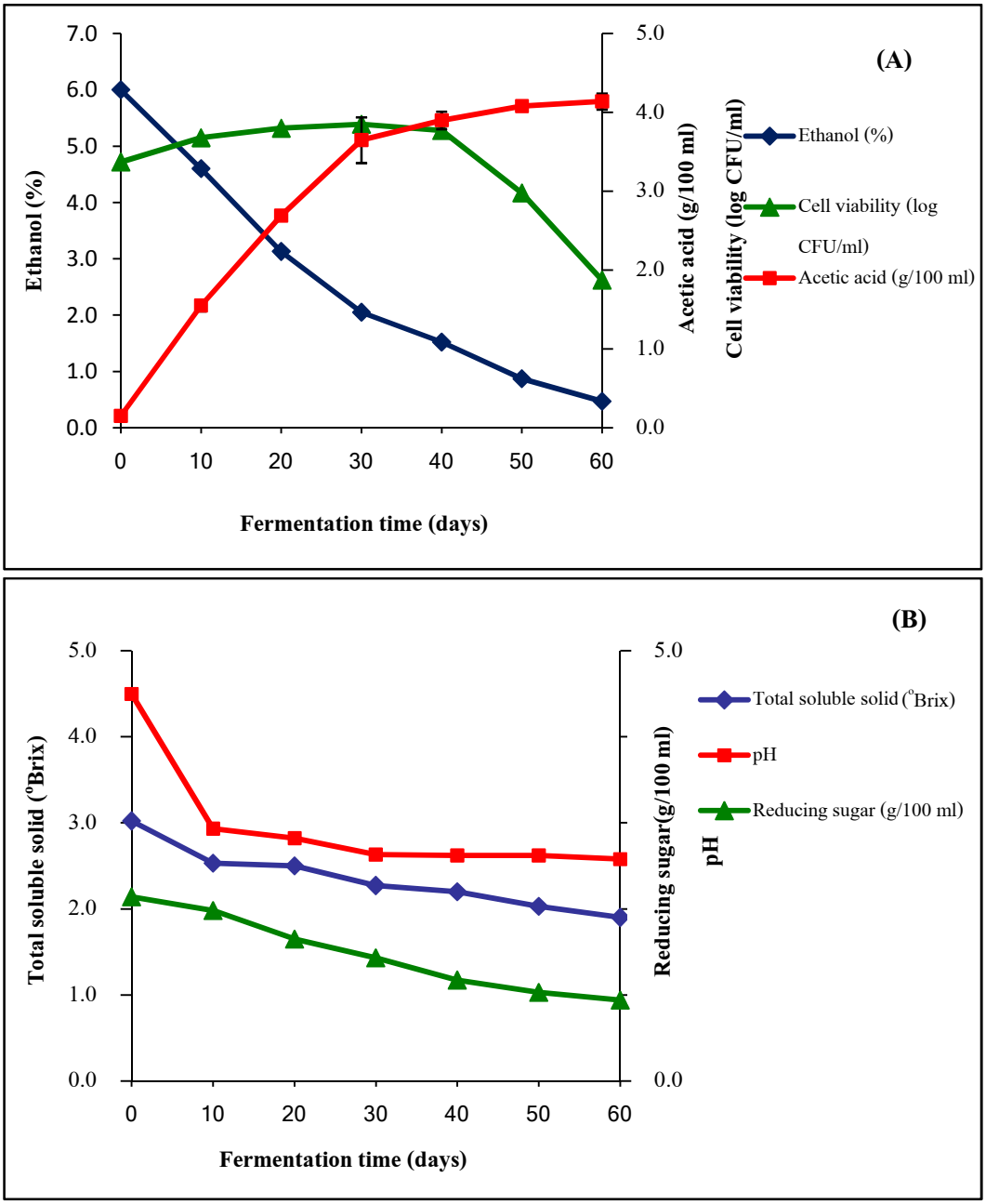
รูปที่ 24 การเจริญเติบโตปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) ของแบคทีเรีย *A. ghanensis* ในไวน์น้ำผลตาลโตนดสุกที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 7 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *A. ghanensis* ในไวน์น้ำผลตาลโตนดสุกที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6

Time (hrs)	Cell viability (CFU/ml)	Specific growth rate, μ (h^{-1})
0	$1.06x10^6$	-
3	$1.40x10^6$	0.07
6	$1.63x10^6$	0.04
9	$1.80x10^6$	0.06
12	$2.31x10^6$	0.07
15	$2.82x10^6$	0.09
18	$4.20x10^6$	0.09
21	$4.80x10^6$	0.01
24	$4.50x10^6$	-

4.5.2 ผลการหมักน้ำส้มสายชูด้วยเชื้อ *Acetobacter ghanensis* ในไวน์น้ำผลตาลโตนดสุก

ผลของการหมักน้ำส้มสายชูในไวน์ผลตาลโตนดสุกที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 ด้วยแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *A. ghanensis* ปริมาตร 6 ลิตร ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (31.0±2.0 องศาเซลเซียส) พบว่า แบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *A. ghanensis* ผลิตกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักจนถึงวันที่ 60 จะมีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดร้อยละ 4.14±0.10 ในขณะที่เชื้อ *A. ghanensis* จะมีการเจริญเติบโตและมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 30 (รูปที่ 25A) มีปริมาณเซลล์สูงสุด 5.39±0.03 log CFU/ml และจะลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช (รูปที่ 25B) เนื่องจากแบคทีเรียเปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดอะซิติก และปริมาณกรดอะซิติกที่เพิ่มขึ้นส่งผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. ghanensis* ลดลง เนื่องจากเซลล์เกิดความเครียด (cell stress) ซึ่งปริมาณกรดอะซิติกที่สูงจะไปลดกิจกรรมแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส (alcohol dehydrogenase, ADH) ภายในเซลล์ เมื่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสจะลดลง โดยที่ปริมาณกรดอะซิติกร้อยละ 8 กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสของเชื้อ *Acetobacter pasteurianus* สายพันธุ์ MSU 10 และ SKU 1108 จะเหลือประมาณร้อยละ 70 ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ IFO 3191 กิจจกรรมของเอนไซม์คงเหลือร้อยละ 47 (Kanchanarach *et al*., 2010) จากผลการหมักกรดอะซิติกในน้ำผลตาลโตนดสุกดังกล่าวใกล้เคียงกับการหมักกรดอะซิติกจากผลสตรอเบอร์รี่โดยใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์หมักในขวดแก้วให้กรดอะซิติกสูงสุดร้อยละ 5.5 ที่ระยะเวลาการหมัก 60 วัน ในขณะที่การหมักโดยวิธีธรรมชาติให้ปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดเพียงร้อยละ 3.5 (Hidalgo *et al* ., 2013) ถึงแม้ว่าปริมาณกรดอะซิติกวันที่ 40, 50 และ 60 ของการหมักเท่ากับร้อยละ 3.90±0.11, 4.08±0.05 และ 4.14±0.10 ตามลำดับ จะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) แต่ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 204 พ.ศ 2543 เรื่อง น้ำส้มสายชู กำหนดให้น้ำส้มสายชูหมักต้องมีปริมาณกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกการหมักน้ำส้มสายชูเป็นระยะเวลา 50 วัน ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 25 การผลิตกรดอะซิติก (A) การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล ค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (B) จากการหมักน้ำส้มสายชูจากเชื้อ *A. ghanensis* ในไวน์ผลตาลโตนดสุก 6 ลิตร ในถังหมักขนาด 10 ลิตร และหมักที่อุณหภูมิห้อง

4.6 ผลการศึกษาคุณภาพของน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด

น้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก จะมีลักษณะเป็นของเหลวขุ่น สีเหลืองอมส้ม มีกลิ่นเปรี้ยว จึงนำมาทดสอบคุณภาพทางเคมี การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสดังนี้

4.6.1 ผลการศึกษาคุณภาพทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก

ผลการทดสอบคุณภาพทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก พบว่า เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก น้ำส้มสายชูที่ได้มีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดร้อยละ 4.14±0.10 มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้คงเหลือ 1.9±0.26 มีค่าพีเอช 2.58±0.01 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.94±5.72 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร โดยผลการทดสอบปริมาณเอทานอล และปริมาณแร่ธาตุต่างๆ พบว่า น้ำส้มสายชูผลตาลโตนดสุกมีปริมาณเอทานอลคงเหลือเพียงร้อยละ 0.24±0.00 ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 204 กำหนดให้น้ำส้มสายชูหมักต้องมีปริมาณเอทานอลตกค้างไม่เกินร้อยละ 0.5 และปริมาณกรดอะซิติกไม่ต่ำกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับปริมาณ ทองแดง สังกะสี และเหล็ก ก็มีไม่เกินปริมาณที่กำหนด และไม่พบซัลเฟอร์ ในขณะที่ปริมาณแร่ธาตุต่างๆได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม (ตารางที่ 8) ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่มีอยู่ในผลตาลโตนดสุกกลับมีปริมาณลดลง เพราะในกระบวนการหมักยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกได้ใช้ในกิจกรรมภายในเซลล์ ซึ่งแร่ธาตุต่างๆจะเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของระบบเอนไซม์ (enzyme system) ในขณะที่แร่ธาตุบางชนิด เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และสังกะสี เป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) เกี่ยวข้องกับระบบเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซีส (glycolysis) ในขณะที่ แมกนีเซียม และเหล็ก ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบเอนไซม์ในวัฏจักรเครป (krebs cycle) (วราวุฒิ, 2538) แต่กลับไม่พบเบต้าแคโรทีนเหลืออยู่ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการสกัดเนื้อผลตาลโตนดสุกโดยการใช้ผลตาลโตนดสุกในอัตราส่วนต่อน้ำ 1:2 (w/v) ทำให้ปริมาณเบต้าเคโรทีนที่มีอยู่น้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อสิ้นสุดกระบวกการหมักน้ำส้มสายชูซึ่งอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดค่าพีเอชเท่ากับ 2.58±0.01 ซึ่งเบต้าแคโรทีนจะไม่เสถียรต่อสภาวะที่เป็นกรด ส่งผลให้มีปริมาณลดลง สอดคล้องกับการเก็บเนื้อผลตาลโตนดสุกที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บจะส่งผลให้ปริมาณของเบต้าแคโรทีนลดลง (บุณยกฤต, 2545) เนื่องจากสภาวะที่มีออกซิเจนจะส่งผลให้เกิดการออกซิเดชั่นของเบต้าแคโรทีน (Fennema, 1985) เช่นเดียวกับการศึกษาความคงตัวของเบต้าแคโรทีน พบว่า ที่ค่าพีเอช 3 จะส่งผล

ให้การเปลี่ยนแปลงของสีซีดลงเร็วกว่าที่ค่าพีเอช 4-8 (Qian *et al* ., 2012) นอกจากนี้ อุณหภูมิ ออกซิเจน และแสงล้วนส่งผลต่อการสลายตัวของเบต้าแคโรทีนทั้งสิ้น

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบคุณภาพทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก

Properties and compositions	Palmyra palm juice	Palmyra palm vinegar
Acetic acid (%)	0.02±0.02	4.14±0.10
Total soluble solid (^{o}Brix)	5.10±0.15	1.9±0.26
pH	4.47-5.10	2.58±0.01
Reducing sugar (g/100 ml)	1.38±0.02	0.94±5.72
Ethanol (%w/v)	-	0.24±0.00
Protein (%)	0.15±0.10	0.03
Ash (%)	0.29±0.05	0.24
Crude fiber (%)	6.5±0.05	4.1
β-Carotene (mg/L)	<1	ND
Sulphur (%)	ND	ND
Trace elements (mg/kg)		
Copper (mg/kg)	<LOQ	<LOQ
Calcium (mg/kg)	21.79±0.37	1.50±0.02
Iron (mg/kg)	<LOQ	0.02±0.00
Magnesium (mg/kg)	40.16±0.67	7.22±0.05
Phosphorous (mg/kg)	22.00±0.27	15.00±0.00
Potassium (mg/kg)	845.24±5.34	30.40±0.72
Sodium (mg/kg)	51.05±3.92	65.10±1.82
Zinc (mg/kg)	<LOQ	<LOQ

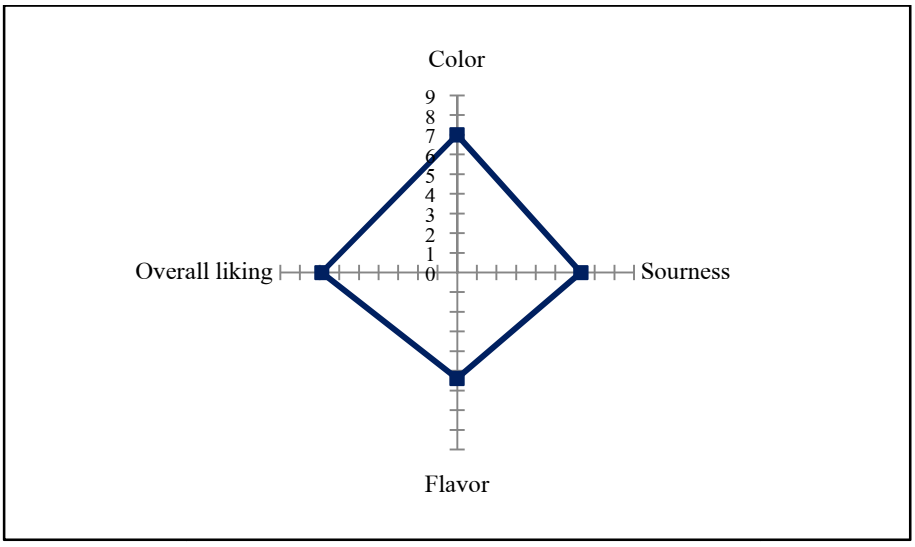
ND = not detected

LOQ = limit of quantitative

4.6.2 ผลการศึกษาคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยรวมของน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก (รูปที่ 26) ได้แก่ สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม ของน้ำส้มสายชูหมัก โดยใช้แบบทดสอบ hedonic scale 9 ระดับ และใช้ผู้ทดสอบจำนวน 10 คน พบว่า ผู้ทดสอบมีความชอบอยู่ในช่วง 5-7 คะแนน (เฉยๆถึงชอบปานกลาง) โดยมีความชอบด้านสี (7.00±1.49) มากที่สุด รองลงมาคือ ความเปรี้ยว (6.30±1.64) กลิ่นรส (5.40±1.07) และความชอบโดยรวม (6.90±1.20) (รูปที่ 27) มีข้อแนะนำคือ น้ำส้มสายชูหมักมีกลิ่นลูกตาลโตนดอยู่และรสน้ำส้มออกฝาด ซึ่งน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุกจะมีลักษณะเป็นของเหลวข่น สีเหลืองอมส้ม มีกลิ่นเปรี้ยว แต่ถ้าเทียบกับน้ำส้มสายชูหมักจากผลไม้ เช่น แอปเปิ้ล พบว่า น้ำส้มสายชูหมักจากแอปเปิ้ลมีสีน้ำตาล มีตะกอนเล็กน้อย มีปริมาณกรดน้ำส้ม 5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร มีกลิ่นรสเปรี้ยวมากกว่าน้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุกที่มีปริมาณกรดน้ำส้ม 4.14±0.10 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และมีกลิ่นผลตาลโตนดสุกค่อนข้างชัดเจนอาจทำให้ผู้ทดสอบชิมไม่คุ้นเคย เนื่องจากโดยทั่วไปน้ำส้มสายชูที่นิยมใช้ในครัวเรือนจะเป็นน้ำส้มสายชูกลั่นที่มีลักษณะเหลวใสไม่มีตะกอน มีกลิ่นเปรี้ยวฉุน แต่อย่างไรก็ตามน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุกเป็นน้ำส้มสายชูหมักที่เป็นผลิตภัณฑ์ใหม่จึงนำมาประยุกต์ใช้ในน้ำสลัดในขั้นตอนต่อไป

รูปที่ 26 น้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก



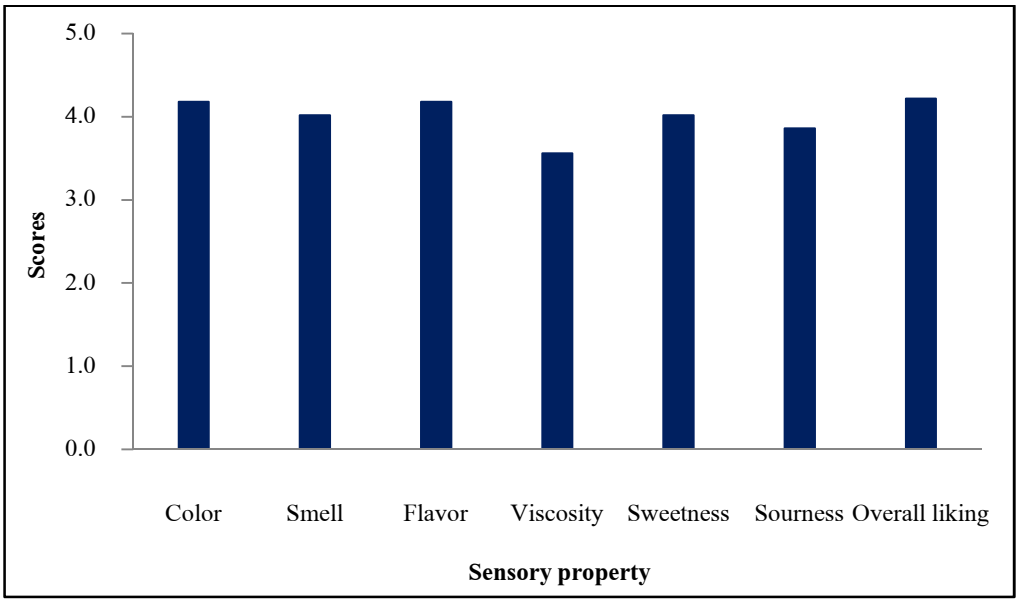
รูปที่ 27 ผลการประเมินคุณภาพ สี กลิ่น รสชาติ ของน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก

4.6.3 ผลการใช้น้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุกในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด

จากการศึกษาคุณภาพทางเคมีและกายภาพ พบว่า น้ำสลัดทั้ง 4 สูตร มีค่าพีเอช ระหว่างช่วง 3.43-3.69 โดยน้ำสลัดสูตรควบคุม (control) มีค่าพีเอชต่ำสุดคือ 3.43 รองลงมาสูตรคือ สูตร A ส่วนน้ำสลัดสูตร B และ C มีค่าพีเอช 3.62 และ 3.69 ตามลำดับ โดยน้ำสลัดสูตร C มีความหนืดสูงสุดเท่ากับ 41,691 เซ็นติปัวส์ ตามด้วยน้ำสลัดสูตร A มีค่าความหนืดเท่ากับ 40,421 เซ็นติปัวส์ ในขณะที่สูตรควบคุม (control) และสูตร B มีค่าความหนืดต่ำลงเท่ากับ 40,115 และ 40,180 เซ็นติปัวส์ ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบทางประสาทสัมผัส ได้แก่ สี กลิ่น กลิ่นรส รสเปรี้ยว รสหวาน ความหนืด และความชอบโดยรวมของน้ำสลัดทั้ง 4 สูตร โดยใช้แบบทดสอบ 9-point hedonic scale test ใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 30 คน พบว่า ผู้ทดสอบชิมมีความชอบด้านสี กลิ่น กลิ่นรส รสเปรี้ยว รสหวาน ความหนืด และความชอบโดยรวม ในผลิตภัณฑ์ทั้ง 4 สูตร แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) โดยมีความชอบด้านสีอยู่ในช่วง 6-7 คะแนน (ชอบถึงชอบปานกลาง) และให้คะแนนความชอบสีในสูตร C สูงกว่าสูตร A, B และสูตรควบคุม (control) ความเปรี้ยว ผู้ทดสอบชิมมีความชอบระดับเฉยๆถึงชอบเล็กน้อย เช่นเดียวกับความชอบโดยรวม ผู้ทดสอบชิมชอบสูตรควบคุม (control) (6.37±1.45) มากที่สุด รองลงมาคือ สูตร C (6.30±1.24) ซึ่งน้ำสลัดสูตร C เป็นสูตรที่ใช้น้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุกทดแทนทั้งหมด ทำให้สีของน้ำสลัดเข้มขึ้น กลิ่นไม่เปรี้ยวฉุน และรสชาติไม่เปรี้ยวจนเกินไป เมื่อเทียบกับน้ำสลัดสูตรควบคุม เพราะมีปริมาณกรดอะซิติกน้อยกว่าอยู่ 1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร สอดคล้องกับการทดสอบการยอมรับผลิตภัณฑ์น้ำสลัด พบว่า ผู้บริโภคร้อยละ 97 จะยอมรับน้ำสลัดที่มีกลิ่น และกลิ่นรสของน้ำส้มสายชูที่ไม่ฉุนเกินไป (วัลลภ, 2550) และมีข้อเสนอแนะคือ ให้ลดความหนืด และน้ำสลัดรสชาติเข้มข้นเกินไป จากผลการทดสอบชิม พบว่า น้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุกสามารถใช้ทดแทนน้ำส้มสายชูกลั่นในการทำน้ำสลัดได้ ดังนั้นจึงเลือกสูตรน้ำสลัดสูตร C ซึ่งเป็นสูตรที่ใช้น้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุกเพียงอย่างเดียวเพื่อใช้ปรับปรุงสูตรน้ำสลัดให้มีรสชาติเป็นยอมรับของผู้บริโภคต่อไป

ผลการศึกษาพัฒนาปรับปรุงสูตรน้ำสลัดที่เหมาะสมโดยใช้น้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุก โดยการเพิ่มน้ำส้มสายชูร้อยละ 20, 30, 40 และ 50 ลดรสเค็ม และรสหวาน เมื่อนำมาทดสอบคุณภาพเคมี พบว่า น้ำส้มสายชูสูตร D มีค่าพีเอชต่ำสุดคือ 3.32 รองลงมาคือสูตร C ค่าพีเอช 3.37 ตามด้วยสูตร B และ สูตร A ค่าพีอช 3.41 และ 3.50 ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 19) นำมาทดสอบทางประสาทสัมผัสได้แก่ สี กลิ่น กลิ่นรส ความหนืด รสหวาน รสเค็ม รสเปรี้ยว และความชอบโดยรวม โดยใช้แบบทดสอบ 9-point hedonic scale test ใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 30 คน พบว่า ผู้ทดสอบชิมมีความชอบด้านสี กลิ่น ความหนืด ในผลิตภัณฑ์ทั้ง 4 สูตร แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ในขณะที่ผู้ทดสอบชิมมีความชอบ ด้านกลิ่นรส รสหวาน รสเค็ม รสเปรี้ยว และความชอบโดยรวมของน้ำสลัดสูตร B สูงสุด (7.17±0.87) ซึ่งเป็นน้ำสลัดที่ใช้ปริมาณน้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดร้อยละ 30 ดังนั้นจึงคัดเลือกน้ำสลัดสูตร B ไปทดสอบความชอบต่อไป

ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยคัดเลือกน้ำสลัดสูตร B มาทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสการยอมรับโดยรวมของน้ำสลัดได้แก่ สี กลิ่น กลิ่นรส ความหนืด รสหวาน รสเค็ม รสเปรี้ยว และความชอบโดยรวม โดยใช้แบบทดสอบ 5-point hedonic scale test ใช้ผู้ทดสอบชิมซึ่งเป็นผู้บริโภคทั่วไปจำนวน 50 คน เพศหญิงจำนวน 38 คน เพศชายจำนวน 12 คน ส่วนใหญ่มีช่วงอายุ 15-30 จำนวน 31 คน รองลงมาคืออายุ 31-45 จำนวน 13 คน และ อายุ 46-60 จำนวน 6 โดยมีผู้ทดสอบชิมที่เคยทานน้ำสลัดจำนวน 46 คน พบว่า ผู้ทดสอบชิมชอบสี กลิ่น กลิ่นรส รสเปรี้ยว รสหวาน ความหนืด และความชอบโดยรวมอยู่ในช่วง (3.56±0.91)-(4.22±0.71) คะแนน (เฉยๆถึงชอบเล็กน้อย) โดยมีความชอบสีและกลิ่นรสที่ระดับคะแนนเท่ากันคือ (4.18±0.69)-(4.18±0.77) รองลงมาคือ กลิ่นและความหวาน (4.02±0.80)-(4.02±0.94) โดยผู้บริโภคมีความชอบด้านความหนืดน้อยที่สุดคือ (3.56±0.91) และมีความชอบโดยรวม (4.22±0.71) (รูปที่ 28) ซึ่งอยู่ในระดับที่ชอบเล็กน้อย ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุกมาเป็นส่วนผสมในน้ำสลัดได้ โดยมีจุดเด่นในด้านความชอบสี และกลิ่นที่น่าสนใจแตกต่างจากน้ำสลัดที่มีส่วนผสมของน้ำส้มสายชูทั่วไป



รูปที่ 28 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดสูตรใช้น้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุกที่ระดับต่างๆ (n=50) (คะแนน 5 = ชอบมาก 4 = ชอบเล็กน้อย 3 = เฉยๆ 2 = ไม่ชอบเล็กน้อย 1 = ไม่ชอบมาก)

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การคัดแยกเชื้อยีสต์จากผลตาลโตนดสุกโดยคัดเลือกเชื้อยีสต์จากลักษณะของโคโลนี ที่มีสีขาวนวล ขอบเรียบ ได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลท นำมาคัดเลือกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 20 ไอโซเลท ศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส พบว่า เชื้อยีสต์จำนวน 10 ไอโซเลท มีความสามารถเจริญเติบโต และมีปริมาณเซลล์ยีสต์มากกว่า 10^6 CFU/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 เมื่อนำเชื้อยีสต์ทั้ง 10 ไอโซเลท มาศึกษาความสามารถทนต่อเอทานอล พบว่า เชื้อยีสต์ทั้ง 10 ไอโซเลท เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลร้อยละ 6 สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลร้อยละ 8 ดังนั้นจึงนำเชื้อยีสต์ทั้ง 10 ไอโซเลท มาศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลในอาหารที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 พบว่า เชื้อยีสต์ทุกไอโซเลทสามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 4.5-5 ภายในระยะเวลา 2 วัน และที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 15 เชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 6.6-7.4 ภายในระยะเวลา 4 วัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ พบว่า ยีสต์ไอโซเลท Y15 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด จึงนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์ พบว่า ยีสต์ไอโซเลท Y15 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์สายพันธุ์ *Candida stelimalicolla* เมื่อนำมาศึกษาการเจริญในน้ำผลตาลโตนดสุกที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *C. stelimalicolla* มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ในช่วงชั่วโมงที่ 17 เท่ากับ 0.34 ชั่วโมง$^{-1}$ และเมื่อนำมาหมักเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ ปริมาตร 6 ลิตร เชื้อยีสต์ *C. stelimalicolla* สามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 3.92±0.15 ภายในระยะเวลา 14 วัน แต่เนื่องจากปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักไม่เพียงพอต่อการหมักกรดอะซิติก จึงเติมเอทานอลเพิ่มลงไปในไวน์ที่ได้จากการหมักโดยเชื้อยีสต์คำนวณให้มีเอทานอลร้อยละ 6 (v/v)

การคัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติกจากผลตาลโตนดสุกโดยคัดเลือกโคโลนีที่เกิดวงใสในอาหาร GYC agar จำนวนทั้งหมด 250 ไอโซเลท นำมาคัดเลือกแบคทีเรียกรดอะซิติกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยคัดเลือกเซลล์ที่ติดสีแกรมลบ มีลักษณะแท่งสั้น ให้ผลแคตาเลสเป็นบวก ออกซิเดสเป็นลบ ไม่สร้างเซลลูโลส และไม่เกิดปฏิกิริยา overoxidation จำนวน 20 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีปริมาณ

เอทานอลร้อยละ 6 พบว่า แบคทีเรียกรดอะซิติกมีการเจริญเติบโตโดยมีค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) อยู่ในช่วง 0.22-0.49 มีปริมาณเซลล์ $4.1x1^{4}$-$2.5x10^{6}$ CFU/ml แต่การเจริญเติบโตจะลดลงในอาหารที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 8 โดยแบคทีเรียกรดอะซิติกมีการเจริญเติบโตโดยมีค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) อยู่ในช่วง 0.01-0.40 มีปริมาณเซลล์ 20-$9.7x10^{5}$ CFU/ml จึงคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถทนต่อเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 จำนวน 10 ไอโซเลท แต่แบคทีเรียกรดอะซิติกทั้ง 10 ไอโซเลทไม่สามารถเจริญเติบโตและมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกรดอะซิติกร้อยละ 2 และ 4 ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียกรดอะซิติกทั้ง 10 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอะซิติก พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท A10 สามารถผลิตกรดอะซิติกในอาหารที่มีเอทานอลร้อยละ 6 ได้สูงสุดเท่ากับ 5.64±0.18 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 55 วัน ในขณะที่การผลิตกรดอะซิติกในอาหารที่มีเอทานอลร้อยละ 8 ได้สูงสุดเท่ากับ 5.10±0.27 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 60 วัน เมื่อนำมาจัดจำแนก พบว่า แบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลท A10 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *Acetobacter ghanensis* มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.09 ชั่วโมง$^{-1}$ ในช่วงชั่วโมงที่ 18 เมื่อนำมาหมักกรดอะซิติกในไวน์น้ำผลตาลโตนดสุกที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 ปริมาตร 6 ลิตร พบว่า แบคทีเรียกรดอะซิติก *A. ghanensis* สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงสุดเท่ากับ 4.14±0.10 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 60 วัน

เมื่อนำน้ำส้มสายชูผลตาลโตนดสุกที่ปริมาตรต่างกันมาใช้เป็นส่วนผสมในการปรุงน้ำสลัดได้ 4 สูตร การทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการให้คะแนนความชอบ 9-point hedonic scale test พบว่า น้ำสลัดทั้ง 4 สูตรได้รับการยอมรับความชอบโดยรวมที่ระดับคะแนน 6 (ชอบเล็กน้อย) ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงสูตรน้ำสลัดตามข้อแนะนำได้น้ำสลัดสูตรใหม่จำนวน 4 สูตร นำมาทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการให้คะแนนความชอบ 9-point hedonic scale test พบว่า น้ำสลัดสูตร B ได้รับการยอมรับความชอบโดยรวมที่ระดับคะแนน 7 (ชอบปานกลาง) เมื่อนำน้ำสลัดสูตร B มาประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสกับผู้บริโภคทั่วไป จำนวน 50 คน พบว่าผู้บริโภคให้การยอมรับความชอบโดยรวมที่ระดับคะแนน 4 (ชอบเล็กน้อย) (5-point hedonic scale test) ซึ่งสามารถนำผลการทดสอบชิมดังกล่าวมาปรับปรุงสูตรน้ำสลัดเพื่อให้เป็นที่ยอมรับต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลในน้ำผลตาลโตนดสุกด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *C. stelimalicolla* เปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์สายพันธุ์อื่นๆที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล
2. ควรศึกษาความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกในไวน์น้ำผลตาลโตนดสุกด้วยเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกสาย *A. ghanensis* เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์อื่นๆที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอะซิติก เพื่อลดระยะเวลาการหมัก
3. ควรศึกษาอิทธิพลของสาร flabelliferin ที่มีในผลตาลโตนดสุกต่อการเจริญเติบโตของยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติก

เอกสารอ้างอิง

กุลวดี คตชนะเลขา. 2552. การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำเวย์เต้าหู้และน้ำเวย์เนยแข็ง. วิทยานิพนธ์ระดับปริญาโท สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จารุวรรณ มณีศรี. 2551. เทคโนโลยีอาหารหมัก. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์โฟร์เพซ, กรุงเทพมหานคร.

ณัฐดา วโรจน์แสงอรุณ และ สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2533. การผลิตน้ำส้มสายชูจากเชื้อ *Acetobacter aceti* ที่แยกจากวัสดุธรรมชาติ. รายงานผลการวิจัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นฤมล เหลืองนภา. 2533. การผลิตและการใช้เนื้อลูกตาลสุกผงในขนมไทยบางชนิด. วิทยานิพนธ์ระดับปริญาโท สาขาคหกรรมศาสตร์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นฤมล โตอ่อน. 2548. ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนและการประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

บุณยกฤต รัตนพันธุ์. 2545. การศึกษากระบวนการผลิตแป้งขนมสำเร็จรูป. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร สถาบันเทคโนโลนีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

บุษกร อุตรภิชาติ. 2550. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. โครงการส่งเสริมการผลิตเอกสารวิชาการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ, สงขลา.

ปิฎฐะ บุนนาค. 2535. ปาล์ม. บรรณกิจเทรดดิ้ง, กรุงเทพมหานคร.

ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย, พัฒนา เหล่าไพบูลย์, คณิต วิชิตพันธุ์, ลักษณา เหล่าไพบูลย์, สุกานดา วิชิตพันธุ์, พรเทพ ถนนแก้ว, และคณะ. 2549. ไวน์ผลไม้และสาโท ผลิตด้วยความมั่นใจได้อย่างไร. พิมพ์ครั้งที่ 2. ศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ร่วมกับศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, ขอนแก่น.

มารวย เมฆานวกุล และชวลิต นิยมธรรม. 2541. ปาล์ม. กองแผนงานและโครงการพิเศษ สำนักงานปลัดกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพมหานคร.

มนัสนันท์ บุญทราพงษ์, กมลวรรณ แจ้งชัด, อนุวัตร แจ้งชัด และวิชัย หฤทัยธนาสันติ์. 2544. การศึกษาคุณภาพของเนื้อตาลสุกและขนมตาลที่ผลิตจากเนื้อตาลสุกผ่านกระบวนการพาสเจอไรเซชั่น. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39, วันที่ 5-7 กุมภาพันธ์ 2544, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

มนัสนันท์ บุญทราพงษ์. 2544. การพัฒนาแป้งข้าวเจ้าและส่วนผสมสำเร็จรูปในการผลิตขนมตาล เพื่ออุตสาหกรรมขนาดเล็ก. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท สาขาพัฒนาผลิตภัณฑ์ อุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มัลลิกา บุญมี และพัฒนา เหล่าไพบูลย์. 2549. การศึกษาการผลิตกรดอะซิติกจากเอทานอลโดยวิธีทางชีวภาพและความเป็นไปได้ในการผลิตเชิงอุตสาหกรรม ใน บทสรุปผู้บริหาร โครงการวิจัยการส่งเสริมการผลิตและจำหน่ายเอทานอล. ศูนย์วิจัยด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมและสารอันตราย ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ลักขณา เหล่าไพบูลย์, กุลเชษฐ์ เพียรทอง, วรวุฒิ ศรีดี, ประสิทธิ์ ใจศิล, มัลลิกา บุญมี และ พัฒนา เหล่าไพบูลย์. 2554. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในระดับขยายขนาด. วรสารวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 16(8): 919-930.

วิไล รังสาดทอง. 2547. เทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. กรุงเทพมานคร.

วรางคณา สงวนพงษ์. 2544. การลดขนาดแป้งมันสำปะหลังดัดแปรและสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของแป้งที่ได้. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอก สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพมหานคร.

วัลลภ บรรจง. 2550. การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำสลัดชนิดข้นคอเลสเตอรอลต่ำ. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท สาขาคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัลลภา หล่อเหลี่ยม. 2550. ความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. ยีสต์:ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

สุธีรา ศรีสุข. 2554. การคัดแยกยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลกติกจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากในการทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน. วิทยานิพนธ์ ระดับปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

สมใจ ศิริโชค. 2550. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ศูนย์ส่งเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพมหานคร.

สมบูรณ์ เตธัญญวรากูล. 2535. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักในการผลิตไวน์น้ำผึ้ง. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมศรี ลีปิพัฒนาวิทย์. 2529. จุลินทรีย์ในผลตาลสุก. วรสารครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์. 5 (1): 11-17.

สมยศ ตันติวงศ์วาณิช. 2555. การแยก จำแนก และคัดเลือกยีสต์ที่มีคุณสมบัติช่วยทำให้ขึ้นฟูจากผลตาลสุกของไทยเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อตั้งต้นในการทำขนมตาล. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอก สาขาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อรวรรณ พิ่งคำ. 2554. การประยุกต์เทคโนโลยีกล้าเชื้อยีสต์สำหรับผู้ผลิตขนมตาล. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

Adam, M.R. 1985. Vinegar. Microbiology of Fermented Foods. Elsevier Applied Science Publishers, London.

Adam, M.R. 1998. Vinegar. *In* Microbiology of Fermented Foods. Vol.1 by Wood, B.J.B. Blackie Academic and Professional, London.

Ali, A., Alhadji, D., Tchiegan, C. and Saidou, C. 2010. Physical-chemical properties of palmyra palm (*Borassus aethiopum* Mart.) fruits from Northern Cameroon. African Journal of Food Science. 4(3), 115-119.

AOAC. 2000. Official Method of Analysis. 16th ed. Verginia: The Associate Analysis Chemists.

Ariyasena, D.D., Jansz, E.R. and Abeysekera, A.M. 2001. Some studies directed at increasing the potential use of palmyrah (*Borassus flabellifer* L.) fruit pulp. Journal of the Science of Food and Agriculture. 81, 1347-1352.

Bafrncova, P., Smogrovicova, D., Slavikova, I., Patkova, J. and Domeny, Z. 1999. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters. 21, 337-341.

Balakumar, S. and Arasaratnum, V. 2009. Comparison of industrial scale ethanol production from a palmyrah-based carbon source by commercial yeast and a mixed culture from palmyrah toddy. Journal of the Institute of Brewing. 115(2), 105-110.

Barrao, C.A., Saad,M.M., Chappuis, M.L., Boffa, M., Perret, X., Prez, R,O. and Barja, F. 2012. Proteome analysis of *Acetobacter pasteurianus* during acetic acid fermentation. Journal of Proteomics. 75, 1701-1717.

Bartowsky, E.J. and Henschke, P.A. 2008. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine-a review. International Journal of Food Microbiology.125, 60-70.

Brown, S.W., Oliver, S.G., Harrison, D.E.F. and Righehato, R.G. 1981. Ethanol Inhibition of yeast growth and fermentation:differences in the magnitude and complexity og the effect. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology.

Chaurasiya, A.K., Chakraborty, I. and Saha, J. 2011. Value addition of palm and studies on the storage life. Journal of Food Science and Technology. 51(11), 768-773.

Cleenwerck, I., Camu, N., Engelbeen, K.,Winter, T.D.,Vandemeulebroecke,K., Paul De Vos, P.D.and Vuyst, L.D. 2007. *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of *Ghanaian cocoa* beans. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 57, 1647-1652.

Coleman, M.C., Fish, R. and Block, E.D. 2007. Temperture - dependent kinetic model for nitrogen limited wine fermentation. Applied and Environmental Microbiology. 73(18), 5878-5884.

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28(3), 350-356.

Fennema, O.R. 1985. Food Chemistry. 2nd Edition. New York and Basel: Marecel Dekker.

Fernandez, K., Aspe, E. and Roeckel, M. 2009. Shelf-life extension on fillets of Atlantic Salmon *(Salmo salar)* using natural additives, superchilling and modified atmosphere packaging. Food Control. 20, 1036-1042.

Guillamon, M.J. and Mas, A. 2011. Acetic acid bacteria. Molecular Wine Microbiology. 227-255. Doi: 10.1016/B978-0-12-375021-1.10009-8

Gullo, M., Caggia, C., Vero, L.D. and Giudici, P. 2006. Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar". International Journal of Food Microbiology. 106, 209-212.

Gullo, M. and Giudici, P. 2008. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. International Journal of Food Microbiology. 125, 46-53.

Gullo, M., Vero, L.D. and Giudici, P. 2009. Succession of selection strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. Applied and Environmental Microbiology. 75(8), 2585-2589.

Hansen, E.H,. Nissen,P., Sommer, P., Nielsen, J.C. and Arneborg, N. 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Applied Microbiology. 91, 541-547.

Harigan, W.F. 1998. Laboratory method in food microbiology. Academic Press, USA.

Hidalgo, C., Mateo, E., Mas, A. and Torija, M.J. 2012. Identification of yeast and acetic acid bacteria isolated from the fermentation and acetification of persimmon (*Diospyros kaki*). Food Microbiology. 30(1), 98-104.

Hidalgo, C., Torija, M.J., Mas, A. and Mateo, E. 2013. Effect of inculation on strawberry fermentation and acetification processes usng native strains of yeast and acetic acid bacteria. Food Microbiology. 34, 88-94.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stsley, J.T. and Williams, S.T.1994. Gram-negative aerobic/microaerophilic rods and cocci. Bergey's manual of determinative bacteriology. The Williams and Wilkin Co., Maryland, USA.

Hutkins, R.W. 2006. Microbiology and Technology of Fermented Foods. Blackwell Publishing., Australia.

Jansz, E.R., Nikawela, J.K., Gooneratne, J. and Theivendirarajah, K. 1994. Studies on the bitter Principle and debittering of palmyrah fruit pulp. Journal of Science of Food and Agriculture. 65, 185-189.

Jatmiko,Y.D., Lopes, M.D.B. and Barton, M.D. 2012. Molecular identification of yeasts isolated from dadih by RFLP-PCR and assessment on their ability in utilizing lactate. Microbiology Indonesia. 6, 30-34.

Kadere,T.T., Miyamoto, T., Oniang o, R.K., Kutima, P.M. and Njoroge, S.M. 2008. Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). African Journal of Biotechnology. 7 (16), 2963-2971.

Kanchanarach,W., Theeragool, G., Yakushi, T., Toyama, H., Adachi, O. and Matsushita. K. 2010. Characterization of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains and their quinoprotein alcohol dehydrogenase. Applied Microbiology and Biotechnology. 85, 741-751.

Kommanee, J., Tanasupawat, S., Yukphan, P., Thongchul, N., Moonmangmee, D. and Yamada, Y. 2012. Identification of *Acetobacter* strains isolated in Thailand based on the phenotypic, chemotaxonomic, and molecular characterizations. ScienceAsia. 38, 44-53.

Kykkidou, S., Giatrakou, V., Papavergou. A., Kontominas, G. and Savvaidis, I.N. 2009. Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4 ^{o}C. Food Chemistry. 115, 169-175.

Li, E., Liu, A., Xue, B. and Liu, Y. 2011. Yeast species associated with spontaneous wine fermentation of *Cabernet Sauvignon* from Ningxia, China. World Journal of Microbiology and Biotechnoly. 27, 2475-2482.

Lin,Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S. and Kong H. 2012. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. Biomass and Bioenergy. 47, 395-401.

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. and Komagata, K. 2001. Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. Journal of General and Applied Microbiology. 47, 119-131.

Lu, S.F., Lee, F.L. and Chen, H. K. 1999. A thermotolerant and high acetic acid- producing bacterium *Acetobacter* sp. I14-2. Journal of Applied Microbiology. 86, 55-62.

Maal, K.B. and Shafiee, R. 2009. Isolation and identification of an acetobacter strain from Iranian white-red cherry with high acetic acid productivity as potential strain for cherry vinegar production in food and agriculture biotechnology. Engineering and Technology. 54, 201-204.

Maal, K.B., Shafiei, R. and Kabiri, N. 2010. Production of apricot vinegar using an isolated *Acetobacter* strain from Iranian apricot. Engineering and Technology. 71, 177-180.

Maal, K.B. and Shafiee, R. 2012. Characterization of an *Acetobacter* strain isolated from Iranian peach that tolerates high temperatures and ethanol concentrations. 8(4), 239-243.

Moens, F., Lefeber, T. and Vuyst, L.D. 2014. Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. Applied and Environmental Microbiology. 80(6), 1848-1857.

Nakano, S. Fukaya, M. 2008. Analysis of proteins responsive to acetic acid in *Acetobacter*: molecular mechanisms conferring acetic acid resistance in acetic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology. 125, 54-59.

Nantitanon, W. 2006. Effects of ammoniacal nitrogen addition in wine fermentation. MSc. Thesis, Graduate Scholl of Biotechnology Ciang Mai University.

Ndoye, B., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Dauphin, R.D., Guiro, A.T., Stefanie, S.V., Trappen, S.V., Willems, A. and Thonart, P. 2007. *Acetobacter senegalensis* sp. nov., a thermotolerant acetic acid bacterium isolated in Senegal (sub-Saharan Africa) from mango fruit (*Mangifera indica L.*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 57, 1576-1581.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. The Journal of Biological Chemistry. 153, 375-380.

Nielsen, D. S., Honholt, S., Debrah, K. T. and Jespersen, L. 2005. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentation analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Yeast. 22, 271-284.

Nikawela, J.K., Abeysekara, A.M. and Jansz, E.R. 1998. Flabelliferins- steroidal saponins from palmyrah (*Borassus flabellifer L.*) I. Isolation by flash chromatography quantifiifation and saponin related activity. Journal of the National Science Council Sri Lanka. 26, 9-18.

Nikawela, J.K., Wijeyaratne. S.C., Jansz, E.R. and Abeysekara, A.M. 1998. Flabelliferins-steroidal saponins from palmyrah (*Borassus flabellifer L.*) II. Preliminary investigations of effect on yeast and selected bacteria. Journal of the National Science Council Sri Lanka. 26, 141-150.

Nilugin, S.E. and Mahendran, T. 2010. Preparation of ready-to-serve (RTS) beverage from palmyrah (*Borassus flabellifer* L.) fruit pulp. The Journal of Agricultural Science. 5(2), 80-88.

Qian, C., Decker, E.A., Xiao, H. and McClements, D.J. 2012. Physical and chemical stability of b-carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. Food Chemistry. 132, 1221-1229.

Pina, C., Santos, C., Couto, J.A. and Hogg, T. 2004. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeast in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* influence of different culture conditions. Food Microbiology. 21, 439-447.

Pramanik, K., and D.E. Rao. 2005. Kinetic study on ethanol fermentation of grape waste using *Saccharomyces cerevisiae* yeast isolated from toddy. The Institution of Engineers (India) Publications 85, 53-58.

Seearunruangchai, A., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Thawai, C., Itoh, T. and Yamada, Y. 2004. Identification of acetic acid bacteria isolated from fruits collected in Thailand. Journal of General and Applied Microbiology. 50, 47-53.

Sengun, I.Y. and Karabiyikli, S. 2011. Importance of acetic acid bacteria in food industry. Food Control. 22, 647-656.

Shamala, T. R. and Sreekantiah, K. R. 1988. Microbiological and biochemical studies on traditional Indian palm wine fermentation. Food Microbiology. 5 (3), 157-162.

Sokollek, S.J., Hertel, C. and Hammes, W.P. 1998. Cultivation and preservation of vinegar bacteria. Journal of Biotechnology. 60, 195-206.

Solieri, L. and Giudici, P. 2008. Yeasts associated to traditional balsamic vinegar: ecological and technological features. International Journal of Food Microbiology. 125, 36-45.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. The Journal of Biological Chemistry. 195, 19-23.

Suzuki, M. and Nakase, T. 2002. A phylogenetic study of ubiquinone-7 species of the genus *Candida* based on 18s ribosomal DNA sequence divergence. Journal of General and Applied Microbiology. 48, 55-65.

Suzuki, M., Nakase, T. and Komagata, K. 1994. *Candida stellimalicola*, a new species of anamorphic yeast isolated from star apple in Thailand. Journal of General and Applied Microbiology. 40, 115-121.

Tanasupawat, S., Kommanee, J., Malimas, T., Tukphan, P., Nakagawa, P. and Yamada, Y. 2009. Identificationof *Acetobacter*, *Gluconobacte*r and *Asia* strain isolated in Thailand based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer restriction and 16S rRNA gene seguence analyses. Microbes and Environment. 24(2), 135-143.

Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Suzzi, G. and Corsetti, A. 2013. Yeast biota associated to naturally fermented table olives fromdifferent Italian cultivars. International Journal of Food Microbiology. 161, 203-208.

Tuntiwongwanich, S. and Leenanon, B. 2009. Morphology and identification of yeasts isolated from toddy palm in Thailand. Journal of Microscopy Society of Thailand. 23(1), 34-37.

Ucak, I., Ozogul, Y. and Durmus, M. 2011. The effects of rosemary extract combination with vacuum packing on the quality changes of Atlantic mackerel fish burgers. International Journal of Food Science and Technology. 46, 1157-1163.

Walker, G.M. 1998. Yeast physiology and biotechnology. John Wiley&Sons, England.

Wood, B. J.B. 1998. Protein-rich foods based on fermented vegetables. *In* Microbiology of Fermented Foods. Vol.2 by Wood, B. J. B. Blackie Academic and Professional, London.

Zahoor, T., Siddique, F. and Farooq, U. 2006. Isolation and characterization of vinegar culture (*Acetobacter aceti*) from indigenous sources. British Food Journal. 108(6), 429-439.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast extract peptone dextrose broth (YEPD broth)

ประกอบด้วย	Glucose	20.0	กรัม
	Peptone	20.0	กรัม
	Yeast extract	10.0	กรัม
	Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ผสมส่วนประกอบต่างๆด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Glucose ethanol yeast extract broth (GEY broth) (Seearunruangchai *et al*., 2004)

ประกอบด้วย	Glucose	20.0	กรัม
	Yeast extract	10.0	กรัม
	Ethanol	50	มิลลิลิตร
	Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ผสมส่วนประกอบต่างๆ ด้วยน้ำกลั่น ยกเว้นเอทานอล นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงเติมเอทานอล

3. Glucose yeast extract broth (GYE broth)

ประกอบด้วย	Glucose	100.0	กรัม
	Yeast extract	10.0	กรัม
	Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ผสมส่วนประกอบต่างๆด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Carr medium อาหารทดสอบปฏิกิริยา overoxidation (Maal *et al*., 2010)

ประกอบด้วย	Bromocresol green	0.02	กรัม
	Yeast extract	30.0	กรัม
	Ethanol	20	มิลลิลิตร
	Agar	20	กรัม
	Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ผสมส่วนประกอบต่างๆ ด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงเติมเอทานอล

การทดสอบปฏิกิริยา overoxidation

1. นำเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวมีวงใส (clear zone) บนอาหาร GYC agar ป้ายเชื้อเป็นวงกลมบนอาหาร Carr medium เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 เซนติเมตร บริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2. เมื่อครบระยะเวลา 3-5 วัน สังเกตผลจากการเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเขียว-ฟ้า เป็นสีเหลืองรอบบริเวณที่ป้ายเชื้อ

3. ติดตามการเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเหลืองกลับมาเป็นสีเขียวภายในเวลา 14 วัน โดยคัดเลือกโคโลนีที่ไม่เกิดปฏิกิริยา overoxidation

5. อาหารทดสอบการสร้างเซลลูโลส (กุลวดี, 2552)

ประกอบด้วย	Glucose	7.0	กรัม
	Yeast extract	3.0	กรัม
	KH_2PO_4	1.0	กรัม
	Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ผสมส่วนประกอบต่างๆ ด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การทดสอบการสร้างเซลลูโลส

นำเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก จำนวน 1ลูป ลงในอาหาร Glucose yeast extract medium (GYE medium) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตแผ่นเซลลูโลสที่เกิดขึ้น

6. Glucose yeast extract calcium carbonate agar (GYC agar)

ประกอบด้วย	Glucose	100.0	กรัม
	Yeast extract	10.0	กรัม
	Agar	20.0	กรัม
	Calcium carbonate	20.0	กรัม
	Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ผสมส่วนประกอบต่างๆ ด้วยน้ำกลั่น ยกเว้นแคลเซียมคาร์บอเนต นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำแคลเซียมคาร์บอเนต มาผสม

ภาคผนวก ข
วิธีการเตรียมสารเคมีและวิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก (AOAC., 2000)

สารเคมีประกอบด้วย

1) น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์

	-นำน้ำกลั่นต้มเดือดนาน	20	นาที

2) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ประกอบด้วย	-โซเดียมไฮดรอกไซด์	4.0	กรัม
	-น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

3) สารละลายฟีนอฟทาลีน

ประกอบด้วย	-ฟีนอฟทาลีน	1.0	กรัม
	-เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95	100	มิลลิลิตร

4) โพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท ($KHC_8H_4O_4$)

วิธีการหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

1. อบโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท ($KHC_8H_4O_4$) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้ววางให้เย็นในโถดูดความชื้น
2. ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท 0.3 กรัม ใส่ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. เติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 3 หยด
4. นำไปไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนกระทั่งถึงจุดยุติ
5. คำนวณหาค่าความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากสูตร

ความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ $= \frac{\text{กรัม } KHC_8H_4O_4 \times 1{,}000}{\text{(นอร์มัล)} \quad NaOH \times 204.229}$ มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. ดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาส์กขนาด 250 มิลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่นปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. เติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 3 หยด
4. นำไปไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนกระทั่งถึงจุดยุติ จะได้สารละลายสชมพูอ่อน
5. คำนวณปริมาณกรดอะซิติก จากสูตร

$$\text{ปริมาณกรดอะซิติก (กรัม/100มิลิลิตร)} = \frac{N \times V1 \times 60.1 \times 100}{1{,}000 \times V2}$$

กำหนดให้ N คือ ความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มัล)

V1 คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

V2 คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

60.1 คือ มวลโมเลกุล (M.W) ของกรดอะซิติก

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol Method (Dubois *et al.*, 1956)

สารเคมีประกอบด้วย

2.1 Phenol ร้อยละ 5

ประกอบด้วย	- Phenol	5.0	กรัม
	-น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

2.2 Sulfuric acid (Glacial)

วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสและวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.3 เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

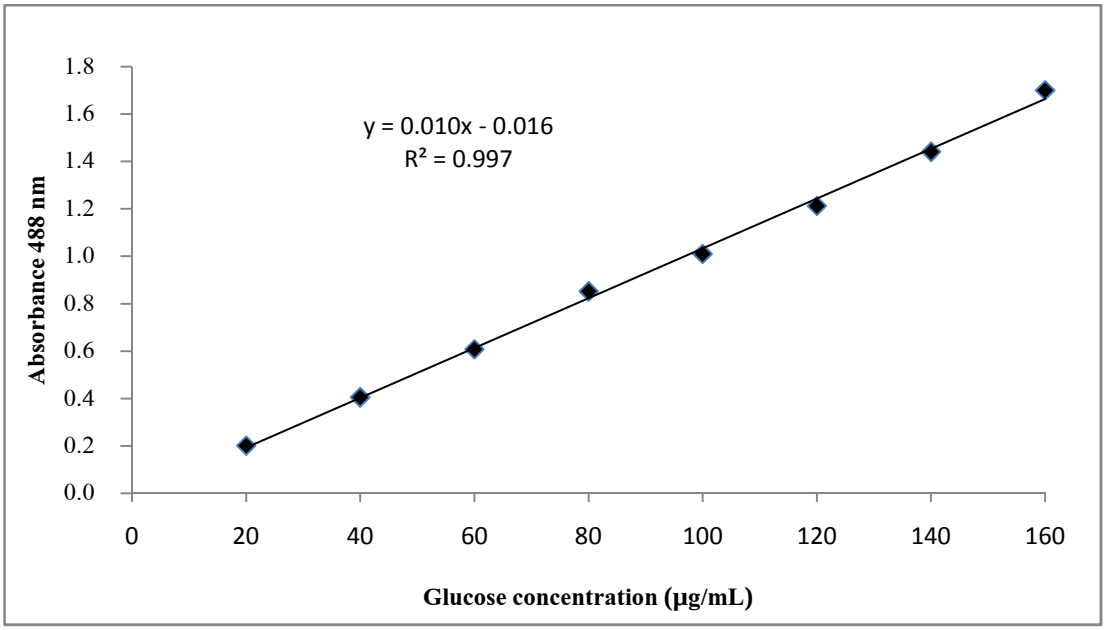
2.4 นำสารละลายกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

2.5 เติมฟีนอลร้อยละ 5 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.6 เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 30 นาที

2.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคส และค่าการดูดกลืนแสง

2.8 การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสม แล้ววิเคราะห์ ตามวิธีการเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส



รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานปริมาณน้ำตาลกลูโคส

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Nelsion Somogyi method (Nelson, 1944; Somogyi, 1952)

สารเคมีประกอบด้วย

3.1 Somogyi Reagent

Solution I: ประกอบด้วย

Sodium potassium tartrate	12.0	กรัม
Sodium carbonate	24.0	กรัม
Sodium hydrogen carbonate	16.0	กรัม
Sodium sulphate	144.0	กรัม
Distilled water	800	มิลลิลิตร

ละลายสารละลายต่างๆด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 800 มิลลิลิตร

Solution II:ประกอบด้วย

Copper sulphate	4.0	กรัม
Sodium sulphate	36.0	กรัม
Distilled water	200	มิลลิลิตร

ละลายสารละลายต่างๆด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เตรียม Somogyi reagent โดยผสม Solution I Solution II

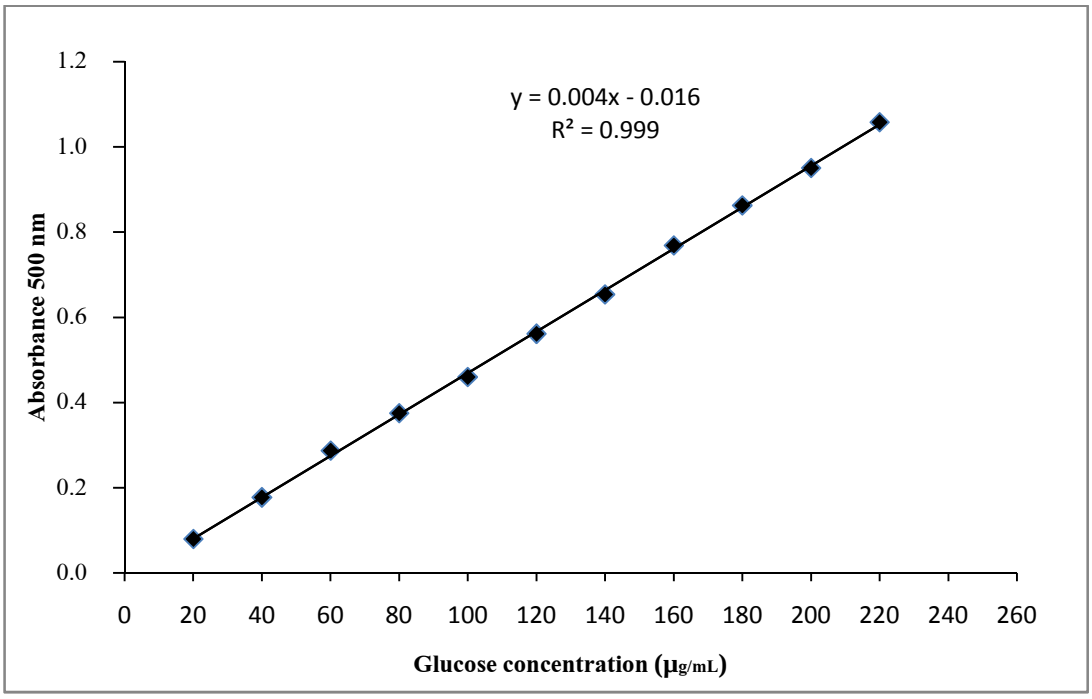
3.2 Nelson Reagent

Ammonium molybdate	50.0	กรัม
Sodium arsenate	3.5762	กรัม
Sulpuric acid	42	มิลลิลิตร
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลาย Ammonium molybdate ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริก คนให้เข้ากัน เติม Sodium arsenate ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน กรอง (หากมีตะกอน) เก็บในขวดสีชา

วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสและวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 และ 220 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. นำสารละลายกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
3. เติมสารละลาย Somogyi Reagent ปริมาตร 1มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที
4. เติมสารละลาย Nelson Reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
5. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร
6. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส
7. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมแล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส



รูปภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานปริมาณน้ำตาลกลูโคส

4. การย้อมแกรมแบคทีเรีย (Harrigan, 1998)

สารเคมีประกอบด้วย

4.1 Crystal violet

สารละลาย A

Ammonium oxylate 1 %

Ammonium oxylate	1.0	กรัม
Distilled water	80	มิลลิลิตร

ละลาย Ammonium oxylate 1.0 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร

สารละลาย B

Crystal violet	1.0	กรัม
Ethanol 95%	20	มิลลิลิตร

ละลายคริสตันไวโอเลท 1 กรัม ใน เอทานอล 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย A เอมโมเนียมออกซาเลท 1% ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงกรองเอาตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง

4.3 Iodine (Gram's)

สารเคมีประกอบด้วย

Iodine crystal	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายไอโอดีนคริสตันและโปแทสเซียมไอโอไดด์ ด้วยน้ำกลั่น

4.4 Safranin

สารเคมีประกอบด้วย

Safranin O	0.25	กรัม
Ethanol 95 %	10	มิลลิลิตร
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายซาฟานินด้วยเอทานอล และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

วิธีการย้อมแกรม

1. นำเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก จำนวน 1 โคโลนี ที่มีอายุเซลล์ 18 ชั่วโมง มาย้อมสีแกรม
2. หยดน้ำพร้อมกับกระจายเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ทำให้แห้งโดยผ่านเปลวไฟ
3. หยดสีคริสตันไวโอเลทให้ท่วมรอยสเมียร์วางไว้เป็นเวลา 1 นาที
4. ล้างสีคริสตันไวโอเลทด้วยสารละลายไอโอดีนและหยดให้ท่วมรอยสเมียร์วางไว้เป็นเวลา 1 นาที
5. ล้างสารละลายไอโอดีนออกด้วยเอทานอลสังเกตจนไม่มีสีติดออกมาแล้วล้างด้วยน้ำอีกครั้ง
6. หยดสีซาฟานินให้ท่วมรอยสเมียร์วางไว้ เป็นเวลา 1 นาที
7. ล้างสีออกด้วยน้ำแล้วซับให้แห้ง นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 1000 เท่า

5. การทดสอบแคตาเลส (Zahoor *et al*., 2006)

เป็นการทดสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส

สารเคมีประกอบด้วย

ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ร้อยละ 3 เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีการ

1. กระจายเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวมีวงใส (clear zone) บนอาหาร GYC agar มีอายุเซลล์ไม่เกิน 24 ชั่วโมงลงบนแผ่นสไลด์
2. หยดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ สังเกตฟองอากาศที่เกิดขึ้น

การอ่านผลการทดสอบ

เกิดฟองอากาศ อ่านผล +

ไม่เกิดฟองอากาศอ่านผล -

6. การทดสอบออกซิเดส (Zahoor *et al*., 2006)

สารเคมีประกอบด้วย

เตรียมสารละลาย Dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1 % ในน้ำเกลือ 0.85 %

วิธีการ

1. นำเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวมีวงใส (clear zone) บนอาหาร GYC agar 24 ชั่วโมง มา 1 โคโลนี ลากเป็นเส้นบนกระดาษกรอง
2. หยดสารละลาย dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride สังเกตการเปลี่ยนสีภายใน 30 วินาที

การอ่านผลการทดสอบ

เกิดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้ม อ่านผล +

ไม่มีสีเกิดขึ้น อ่านผล -

7. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer

ส่วนประกอบของเครื่อง Ebulliometer

A คือ สเกลสำหรับอ่านค่าแอลกอฮอล์

B คือ หลอดแก้วสำหรับวัดปริมาตรตัวอย่าง

C คือ เครื่อง Ebulliometer

D คือ ตะเกียงแอลกอออล์

E คือ เทอร์โมมิเตอร์

F คือ คอนเดนเซอร์

วิธีวิเคราะห์

1. เติมน้ำลงในหลอดแก้วสำหรับวัดปริมาตรตามที่กำหนด และเติมลงใน ebulliometer
2. เติมน้ำในคอนเดนเซอร์เพื่อใช้หล่อเย็น
3. จุดตะเกียงแอลกอฮอล์
4. เสียบเทอร์โมมิเตอร์ในช่องเสียบเทอร์โมมิเตอร์

5. อ่านค่าอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำจาก plastic calculating scale และหมุนสเกลให้จุดเดือดของน้ำตรงกับตำแหน่งศูนย์
6. วัดปริมาณแอลกอฮอล์ของตัวอย่างเช่นเดียวกับการวัดค่าจุดเดือดของน้ำ
7. การอ่านค่าปริมาณแอลกอฮอล์ โดยสังเกตุจากจุดเดือดของแอลกอฮอล์ให้ตรงกับสเกลด้านใน และอ่านค่าแอลกอฮอล์ที่ plastic calculating scale ที่วงด้านนอก

8. การคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) (สาวิตรี, 2549)

การเจริญอย่างรวดเร็ว (log of exponential growth phase) ในระยะการเจริญเติบโตช่วง exponential phase เซลล์มีการเจริญเติบโตที่อัตราคงที่ สามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \qquad (1)$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \qquad (2)$$

โดยกำหนดให้ x = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (biomass)

t = เวลามีหน่วยเป็นชั่วโมง

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (ชั่วโมง$^{-1}$)

เมื่อ integrate

$$\ln x - \ln x_o = \mu_{\max}.t \qquad (3)$$

X_o คือ มวลเซลล์เริ่มต้น

$$x = x_0.e^{(\mu_{\max}.t)} \qquad (4)$$

e คือ ฐานของ natural logarithm

จากกราฟการเจริญของเชื้อยีสต์ *C. stellimalicola* ช่วงการเจริญอย่างรวดเร็วในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 15-17 ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์ชั่วโมงที่ 15 (t_0) เท่ากับ 1.37x10^7 CFU/ml (x_0) และในชั่วโมงที่ 17 (t_1) เท่ากับ 2.78x10^7 CFU/ml (x_1) นำไปแทนค่าในสมการได้ดังนี้

$$\log\frac{{}^{x}1}{{}_{x}0} = \frac{\mu\Delta t}{2.303}$$

$$\log\frac{2.78x10^{7}}{1.37x10^{7}} = \frac{\mu(17-15)}{2.203}$$

$$\mu = \frac{0.31x2.303}{2}$$

$$\mu = 0.35$$

9. การวิเคราะห์ความหนืด (viscosity)

อุปกรณ์

1. Brookfiled viscometer
2. บิกเกอร์ขนาด 400 มิลลิลิตร

วิธีการทดสอบ

1. เปิดเครื่อง Brookfiled viscometer
2. กดปุ่ม Enter แล้วดึง cap spindle ออก
3. หน้าจอเครื่องโชว์ข้อความ Auto zero กด Enter อีกครั้ง
4. ใส่หัวโพรบ LVกด select spindle เลือกรหัสหัวโพรบ S64
5. ใส่ตัวอย่าง ลด stand ลง กดปุ่ม on motor
6. อ่านค่าความหนืดโดยอ่านจากค่าที่มีเปอร์เซ็น Torgue สูงสุด

สูตรคำนวณค่าความหนืด (CP) = 100/RPM*TK*SMC*Torgue

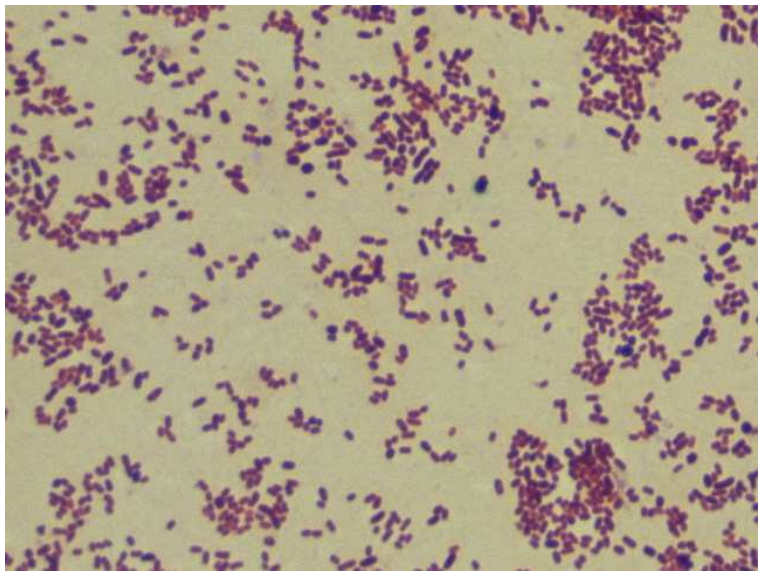
โดยที่ TK = 0.0973

SMC = 6.4

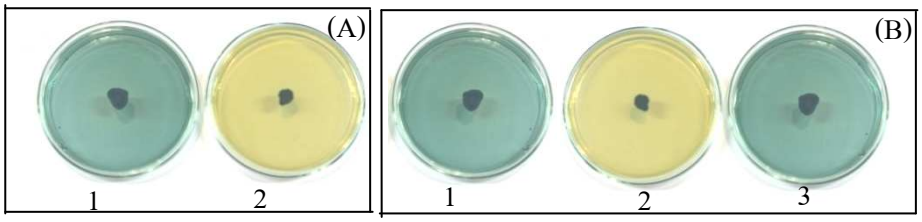
ภาคผนวก ค

รูปภาคผนวกที่ 3 การหมักส่วนเยื่อใยผลตาลโตนดสุกเพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

รูปภาคผนวกที่ 4 ลักษณะอาหาร GYC agar ที่เติม $CaCO_3$ 2% (w/v) และการเจริญของแบคทีเรียกรดอะซิติก บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปภาคผนวกที่ 5 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียกรดอะซิติก *Acetobacter ghanensis* ที่กำลังขยาย 1000 เท่า



รูป A ไม่เกิดปฏิกิริยา overoxidation รูป B เกิดปฏิกิริยา overoxidation

1.) อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น มีสีฟ้า

2.) เมื่อระยะเวลาผ่านไปประมาณ 5 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง

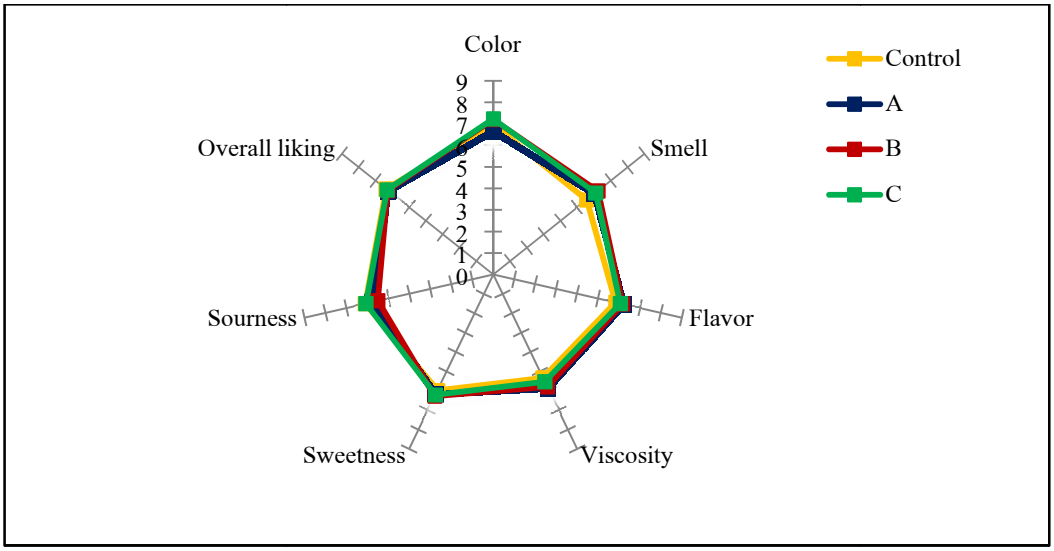
3.) ภายในระยะเวลา 14 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อสีเหลืองจะเปลี่ยนกลับมาเป็นสีฟ้า

รูปภาคผนวกที่ 6 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยา overoxidation ของแบคทีเรียกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ Carr medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

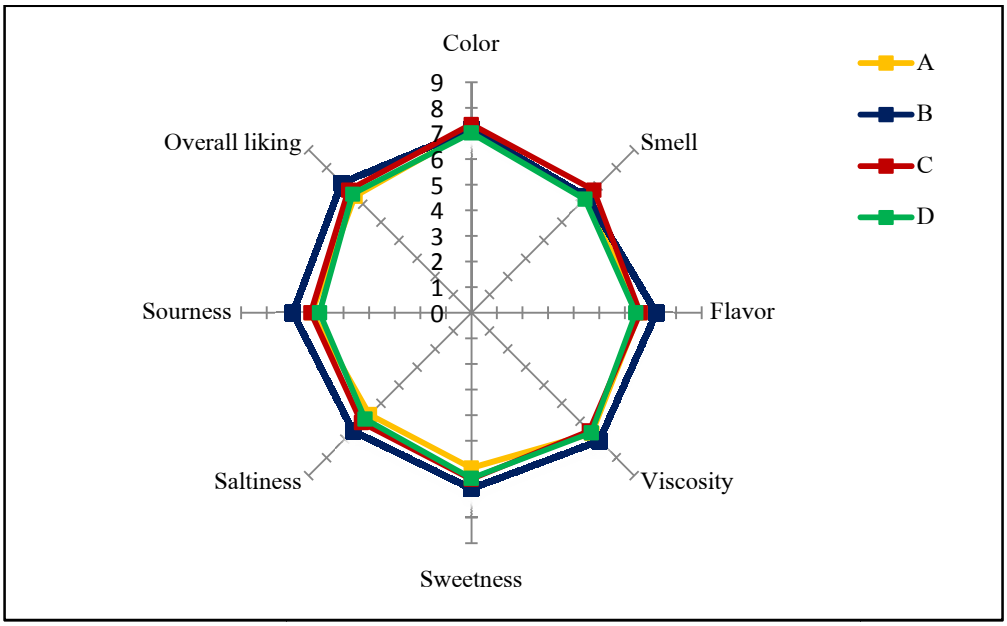
รูปภาคผนวกที่ 7 การทดสอบการสร้างเซลลูโลสของแบคทีเรียกรดอะซิติกในอาหาร GYE medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รูปภาคผนวกที่ 8 การหมักน้ำส้มสายชูจากผลตาลโตนดสุกที่อุณหภูมิห้อง

รูปภาคผนวกที่ 9 ผลิตภัณฑ์น้ำสลัดที่ใช้น้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุกเป็นส่วนผสม



รูปภาคผนวกที่ 10 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดสูตรใช้น้ำส้มสายชูหมักผสมกับน้ำส้มสายชูกลั่นทั้ง 4 สูตร (n=30)



รูปภาคผนวกที่ 11 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดสูตรน้ำส้มสายชูหมักที่อัตราส่วนต่างๆทั้ง 4 สูตร (n=30)

ภาคผนวก ง

แบบประเมินความพึงพอใจน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก

ชื่อผู้ทดสอบ..... วันที่.....

ตัวอย่าง **น้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก**

คำแนะนำ ทดสอบตัวอย่างแล้วให้คะแนนความชอบของตัวอย่าง ตามคำอธิบายและคะแนนความชอบดังสเกลที่กำหนด

กรุณาตอบแบบสอบถามโดยใช้คะแนนความพึงพอใจตามเกณฑ์ต่อไปนี้

1	=	ไม่ชอบมากที่สุด	2	=	ไม่ชอบมาก
3	=	ไม่ชอบปานกลาง	4	=	ไม่ชอบเล็กน้อย
5	=	เฉยๆ	6	=	ชอบเล็กน้อย
7	=	ชอบปานกลาง	8	=	ชอบมาก
9	=	ชอบมากที่สุด			

ลักษณะตัวอย่างที่ทดสอบ	ระดับคะแนนความชอบ
ลักษณปรากฏ (สี ความขุ่น)	
กลิ่นเปรี้ยว	
ความเปรี้ยว/ ความเป็นกรด	
ความชอบโดยรวม	

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

ขอขอบคุณท่านที่ตอบแบบสอบถาม

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

โดยวิธี Hedonic scale

ผลิตภัณฑ์ น้ำสลัดสูตรผสมน้ำส้มสายชูหมักจากผลตาลโตนดสุก

ชื่อผู้ทดสอบ..... วันที่.....เวลา.....

คำแนะนำ : กรุณาทดสอบตัวอย่างต่อไปนี้แล้วให้คะแนนคุณลักษณะต่างๆ ของตัวอย่าง โดยให้คะแนน 0-9 ซึ่งมีความหมายดังนี้

กรุณาตอบแบบสอบถามโดยใช้คะแนนความพึงพอใจตามเกณฑ์ต่อไปนี้

1 = ไม่ชอบมากที่สุด	4 = ไม่ชอบเล็กน้อย	7 = ชอบปานกลาง
2 = ไม่ชอบมาก	5 = เฉยๆ	8 = ชอบมาก
3 = ไม่ชอบปานกลาง	6 = ชอบเล็กน้อย	9 = ชอบมากที่สุด

ลักษณะตัวอย่างที่ทดสอบ	ระดับคะแนนความชอบ
ลักษณปรากฏ (สี)	
กลิ่น	
กลิ่นรส	
ความข้นหนืด	
ความหวาน	
ความเค็ม	
ความเปรี้ยว	
ระดับความชอบโดยรวม	

ข้อเสนอแนะ/หรือวิจารณ์

.....

.....

.....

หมายเหตุ - กลิ่นรส หมายถึง กลิ่นของผลิตภัณฑ์โดยรวมภายในปากขณะชิมตัวอย่าง

- ความชอบโดยรวม หมายถึง ความชอบที่มีต่อผลิตภัณฑ์เมื่อพิจารณาจากลักษณะโดยรวมทั้งหมด

ภาคผนวก จ

ตารางภาคผนวกที่ 1 ความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15

Isolates yeast	Absorbance (OD_{600})		Cell viability (CFU/ml)	
	Glucose 10%	Glucose 15%	Glucose 10%	Glucose 15%
Y01	5.5±0.00	6.6±0.01	$3.0x10^{4}$	$7.6x10^{2}$
Y02	6.5±0.00	6.3±0.00	$3.1x10^{4}$	$1.1x10^{3}$
Y03	4.6±0.00	6.9±0.04	$8.6x10^{2}$	$2.8x10^{8}$
Y04	7.3±0.00	8.9±0.02	$9.7x10^{5}$	30
Y05	7.6±0.00	9.1±0.04	$4.6x10^{4}$	$1.8x10^{5}$
Y06	5.3±0.00	6.8±0.00	$3.1x10^{8}$	$2.5x10^{8}$
Y07	5.2±0.00	7.0±0.01	$1.3x10^{8}$	$2.8x10^{8}$
Y08	8.4±0.00	10.0±0.03	$3.0x10^{4}$	$2.9x10^{5}$
Y09	6.0±0.00	8.2±0.03	$1.5x10^{8}$	$4.5x10^{8}$
Y10	4.6±0.00	13.1±0.01	$1.4x10^{8}$	$1.4x10^{7}$
Y11	4.6±0.01	11.4±0.01	$9.4x10^{7}$	$6.1x10^{5}$
Y12	8.3±0.02	6.5±0.01	$3.7x10^{8}$	$3.6x10^{5}$
Y13	7.8±0.00	10.8±0.03	$3.7x10^{8}$	$4.7x10^{8}$
Y14	7.3±0.02	11.1±0.04	$3.6x10^{8}$	$1.4x10^{8}$
Y15	7.8±0.03	10.5±0.01	$3.9x10^{8}$	$1.7x10^{8}$
Y16	5.8±0.02	6.1±0.02	$2.2x10^{3}$	$7.3x10^{2}$
Y17	8.2±0.01	10.3±0.03	$3.7x10^{8}$	$1.7x10^{8}$
Y18	4.9±0.01	5.4±0.01	$9.4x10^{2}$	$6.0x10^{4}$
Y19	5.8±0.00	7.0±0.01	$3.1x10^{2}$	$6.0x10^{4}$
Y20	9.6±0.02	14.2±0.03	$5.6x10^{8}$	$7.5x10^{9}$

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางภาคผนวกที่ 2 ความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ไอโซเลทต่างๆในอาหาร YEPD ที่มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 6 และ 8

Isolates yeast	Absorbance (OD_{600})		Cell viability (CFU/ml)	
	Ethanol 6%	Ethanol 8%	Ethanol 6%	Ethanol 8%
Y03	3.49±0.04	0.05±0.01	$4.2x10^7$	$1.8x10^3$
Y06	3.47±0.01	0.03±0.01	$3.2x10^7$	$1.6x10^2$
Y07	3.50±0.01	0.04±0.01	$4.5x10^7$	$9.9x10^3$
Y09	3.36±0.01	0.04±0.00	$7.2x10^6$	$9.1x10^3$
Y10	3.36±0.01	0.03±0.00	$7.6x10^6$	$1.5x10^3$
Y13	3.30±0.01	0.07±0.01	$4.7x10^7$	$3.8x10^3$
Y14	3.12±0.02	0.03±0.01	$2.2x10^7$	$1.0x10^3$
Y15	3.49±0.01	0.05±0.01	$1.5x10^7$	$4.4x10^3$
Y17	3.45±0.01	0.06±0.00	$1.7x10^7$	$9.8x10^3$
Y20	3.17±0.02	0.05±0.01	$8.2x10^6$	$1.7x10^3$

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางภาคผนวกที่ 3 ความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ไอโซเลทต่างๆในอาหารเหลว YEPD ที่มีความเข้มข้นกลูโคสร้อยละ 10 และ 15

Isolates	Glucose	Ethanol (%)						
		Fermentation time (days)						
		0	2	4	6	8	10	12
Y03	10	0.00±0.00	4.75±0.15	4.73±0.13	4.31±0.18	4.26±0.16	4.23±0.14	4.08±0.09
	15	0.00±0.00	4.30±0.28	6.60±0.26	6.90±0.10	6.55±0.20	6.55±0.20	6.08±0.10
Y06	10	0.00±0.00	4.60±0.20	4.45±0.13	4.38±0.15	4.18±0.08	4.60±0.20	4.01±0.19
	15	0.00±0.00	4.60±0.20	6.80±0.18	6.75±0.18	6.65±0.15	6.40±0.01	6.05±0.01
Y07	10	0.00±0.00	4.55±0.10	4.55±0.10	4.20±0.05	4.23±0.11	4.23±0.14	3.95±0.30
	15	0.00±0.00	4.53±0.10	7.25±0.13	7.30±0.18	7.10±0.18	6.70±0.44	6.35±0.13
Y09	10	0.00±0.00	4.86±0.10	4.83±0.03	4.43±0.18	4.18±0.20	4.12±0.28	4.00±0.05
	15	0.00±0.00	4.31±0.38	7.05±0.56	7.15±0.18	6.90±0.36	6.85±0.28	6.45±0.46
Y10	10	0.00±0.00	4.60±0.10	4.78±0.10	4.20±0.18	4.15±0.24	4.22±0.32	3.93±0.23
	15	0.00±0.00	4.70±0.20	7.30±0.35	7.15±0.38	6.90±0.26	6.83±0.28	6.45±0.46

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

133

ตารางภาคผนวกที่ 3 ความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ไอโซเลทต่างๆในอาหารเหลว YEPD ที่มีความเข้มข้นกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 (ต่อ)

Isolates	Glucose (%)	Ethanol (%) Fermentation time (days)						
		0	2	4	6	8	10	12
Y13	10	0.00±0.00	4.55±0.17	4.46±0.23	4.45±0.23	3.95±0.51	4.33±0.72	4.78±0.03
	15	0.00±0.00	4.53±0.16	7.25±0.36	6.70±0.26	6.85±0.35	6.50±0.20	6.38±0.21
Y14	10	0.00±0.00	4.85±0.10	4.80±0.09	4.68±0.18	4.50±0.17	4.43±0.15	4.15±0.18
	15	0.00±0.00	4.91±0.06	7.35±0.17	7.00±0.10	6.95±0.05	6.60±0.30	6.53±0.38
Y15	10	0.00±0.00	5.06±0.25	5.01±0.18	4.80±0.10	4.68±0.15	4.55±0.13	4.61±0.08
	15	0.00±0.00	4.56±0.11	7.40±0.17	6.95±0.18	7.00±0.26	6.60±0.17	6.40±0.20
Y17	10	0.00±0.00	4.56±0.13	4.70±0.17	4.68±0.12	4.30±0.18	4.28±0.20	4.18±0.13
	15	0.00±0.00	4.90±0.09	7.10±0.18	7.00±0.25	7.00±0.25	6.50±0.20	6.33±0.21
Y20	10	0.00±0.00	4.80±0.10	4.60±0.10	4.68±0.16	4.43±0.06	4.46±0.07	4.30±0.18
	15	0.00±0.00	4.81±0.04	7.25±0.09	7.05±0.23	7.10±0.17	6.65±0.30	6.38±0.21

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

134

ตารางภาคผนวกที่ 4 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส 10 และ 15 องศาบริกซ์

Carbon Source	Fermentation time (day)						
	0	2	4	6	8	10	12
Glucose 10 ^{o}Brix	0.00±0.00^{a}	0.70±0.00^{a}	1.50±0.12^{a}	1.83±0.06^{a}	2.12±0.12^{a}	2.50±0.70^{a}	1.93±1.07^{a}
Glucose 15 ^{o}Brix	0.00±0.10^{a}	0.68±0.12^{a}	1.18±0.13^{b}	1.62±0.03^{b}	1.85±0.13^{b}	2.05±0.17^{b}	2.40±0.36^{a}
Sucrose 10 ^{o}Brix	0.00±0.00^{a}	0.65±0.05^{a}	0.88±0.03^{c}	0.80±0.50^{d}	0.55±0.03^{d}	0.30±0.10^{c}	0.40±0.10^{b}
Sucrose 15 ^{o}Brix	0.00±0.00^{a}	0.65±0.08^{a}	1.12±0.09^{b}	1.30±0.00^{c}	0.95±0.00^{c}	0.93±0.03^{d}	0.43±0.06^{b}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

135

ตารางภาคผนวกที่ 5 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 15 องศาบริกซ์ ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ระดับต่างๆ

$(NH_4)_2SO_4$ Concentration (mg/L)	Fermentation time (day)						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	0.33±0.13[b]	1.00±0.10[c]	1.60±0.01[c]	1.60±0.00[c]	2.00±0.23[c]	1.90±0.15[c]	1.80±0.02[c]
300	1.15±0.05[a]	1.50±0.53[b]	2.50±0.35[b]	2.80±0.05[b]	3.00±0.00[b]	2.45±0.50[b]	2.25±0.00[b]
500	1.12±0.05[a]	2.50±0.00[a]	3.88±0.18[a]	4.25±0.05[a]	5.30±0.00[a]	5.50±0.17[a]	5.75±0.09[a]
700	0.90±0.04[a]	2.00±0.01[a]	4.03±0.13[a]	4.30±0.10[a]	5.38±0.08[a]	5.60±0.15[a]	5.85±0.05[a]

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางภาคผนวกที่ 6 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลท Y15 ในน้ำผลตาลโตนดสุกที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส 10 และ 15 องศาบริกซ์ ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

Carbon Source	Fermentation time (day)						
	1	2	3	4	5	6	7
Sucrose 10 ^{o}Brix	0.58±0.03^{a}	1.23±0.06^{c}	1.53±0.12^{b}	1.57±0.12^{c}	1.77±0.06^{b}	1.60±0.26^{b}	1.82±0.45^{b}
Sucrose 15 ^{o}Brix	0.57±0.15^{a}	1.38±0.13^{c}	1.55±0.26^{b}	1.65±0.31^{c}	1.55±0.46^{b}	1.65±0.23^{b}	1.70±0.41^{b}
Glucose 10 ^{o}Brix	0.72±0.12^{a}	1.98±0.12^{a}	2.70±0.00^{a}	3.70±0.00^{a}	4.13±0.14^{a}	5.20±0.09^{a}	5.43±0.13^{a}
Glucose15 ^{o}Brix	0.45±0.00^{b}	1.68±0.18^{b}	2.85±0.00^{a}	3.20±0.14^{b}	4.15±0.33^{a}	5.15±0.48^{a}	5.40±0.44^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

137

ตารางภาคผนวกที่ 7 การผลิตเอทานอลของยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก 6 ลิตร ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 และ 15 องศาบริกซ์

Parameters	Total soluble	Fermentation time (days)						
	Solid (^{o}Brix)	0	3	6	9	12	15	18
Ethanol (%)	10 ^{o}Brix	0.00±0.00^{a}	0.20±0.05^{a}	0.80±0.15^{a}	1.47±0.21^{a}	1.76±0.35^{a}	2.03±0.34^{a}	2.73±0.15^{a}
	15 ^{o}Brix	0.00±0.00^{a}	0.12±0.03^{a}	0.15±0.05^{b}	0.38±0.28^{b}	0.52±0.15^{b}	1.17±0.13^{b}	1.43±0.12^{b}
Total soluble solid	10 ^{o}Brix	10.00±0.00^{a}	9.43±0.31^{a}	8.4±0.17^{a}	7.25±0.08^{a}	7.03±0.06^{a}	6.55±0.48^{a}	6.17±0.35^{a}
(^{o}Brix)	15 ^{o}Brix	15.00±0.00^{b}	14.87±0.6^{b}	14.73±0.06^{b}	14.4±0.26^{b}	14.17±0.21^{b}	13.57±0.32^{b}	12.23±0.49^{b}
pH	10 ^{o}Brix	5.00±0.00^{a}	3.45±0.06^{a}	3.29±0.17^{a}	3.07±0.07^{a}	2.99±0.04^{a}	2.98±0.07^{a}	2.97±0.20^{a}
	15 ^{o}Brix	5.00±0.00^{a}	4.25±0.13^{b}	3.59±0.15^{b}	3.01±0.10^{a}	3.02±0.03^{a}	2.98±0.07^{a}	2.96±0.06^{a}
Reducing sugar	10 ^{o}Brix	65.83±1.04^{a}	65.27±0.87^{a}	61.14±1.08^{a}	53.37±1.7^{a}	50.71±1.98^{a}	45.82±2.4^{a}	38.79±5.10^{a}
(g/100 ml)	15 ^{o}Brix	103.00±1.80^{a}	100.03±1.14^{a}	96.37±1.62^{b}	96.03±1.95^{b}	96.27±0.68^{b}	95.76±0.89^{b}	94.53±0.76^{b}
Acetic acid	10 ^{o}Brix	0.30±0.02^{a}	0.31±0.06^{a}	0.31±0.03^{a}	0.30±0.01^{a}	0.35±0.01^{a}	0.34±0.02^{a}	0.35±0.01^{a}
(g/100 ml)	15 ^{o}Brix	0.30±0.02^{a}	0.31±0.06^{a}	0.31±0.01^{a}	0.30±0.01^{a}	0.35±0.01^{a}	0.36±0.01^{a}	0.35±0.01^{a}
Cell viability	10 ^{o}Brix	5.63±0.02^{a}	5.72±0.03^{a}	5.77±0.03^{a}	5.48±0.03^{b}	5.39±0.07^{b}	5.25±0.07^{b}	5.24±0.06^{b}
(log CFU/ml)	15 ^{o}Brix	5.31±0.61^{a}	5.72±0.05^{a}	5.79±0.02^{a}	5.80±0.03^{a}	5.85±0.06^{a}	5.87±0.02^{a}	5.87±0.02^{a}

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

138

ตารางภาคผนวกที่ 8 การผลิตเอทานอลของยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก 6 ลิตรที่ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

Parameters	Fermentation time (days)						
	0	10	20	30	40	50	60
Ethanol (%)	0.00±0.00^{g}	1.57±0.25^{f}	3.00±0.60^{e}	3.80±0.10^{d}	4.08±0.13^{c}	4.3±0.15^{b}	4.40±0.20^{a}
Total soluble solid (^{o}Brix)	10.00±0.00^{f}	7.05±0.05^{e}	4.30±0.17^{d}	3.25±0.08^{c}	3.15±0.09^{bc}	3.02±0.08^{b}	2.83±0.06^{a}
pH	5.00±0.00^{c}	3.47±0.06^{b}	3.22±0.12^{ab}	3.10±0.12^{a}	3.06±0.14^{a}	3.15±0.22^{a}	3.14±0.21^{a}
Reducing sugar (g/100 ml)	66.00±0.05^{d}	46.00±2.50^{c}	5.97±0.24^{b}	3.60±0.37^{a}	4.46±0.12^{a}	3.33±0.17^{a}	3.12±0.23^{a}
Acetic acid (g/100 ml)	0.30±0.05^{ab}	0.19±0.06^{c}	0.25±0.04^{abc}	0.22±0.03^{bc}	0.22±0.06^{bc}	0.32±0.00^{a}	0.25±0.07^{abc}
Cell viability (log CFU/ml)	5.72±0.05^{b}	5.82±0.03^{a}	5.77±0.03^{ab}	5.32±0.03^{c}	5.33±0.05^{c}	5.31±0.10^{c}	5.24±0.06^{c}

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

139

ตารางภาคผนวกที่ 9 การผลิตเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก 600 มิลลิลิตรปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ ที่สภาวะการหมักต่างๆ

Parameters	Conditions	Fermentation time (days)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
Ethanol (%)	Shaking condition	0.00±0.00^{a}	2.67±0.06^{a}	3.57±0.06^{a}	3.77±0.20^{a}	3.82±0.18^{a}	3.50±0.18^{a}	3.18±0.20^{a}	2.82±0.13^{a}
	Static condition	0.00±0.00^{a}	0.40±0.00^{b}	0.53±0.60^{b}	1.15±0.00^{b}	1.22±0.12^{c}	1.73±0.25^{b}	1.47±0.12^{b}	1.90±0.12^{b}
	Anaerobic condition	0.00±0.00^{a}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{c}
Total soluble solid (^{o}Brix)	Shaking condition	10.00±0.00^{a}	5.60±0.20^{a}	4.37±0.15^{a}	4.23±0.06^{a}	3.90±0.17^{a}	3.80±0.17^{a}	3.63±0.25^{a}	3.50±0.26^{a}
	Static condition	10.00±0.00^{a}	8.60±0.10^{b}	8.30±0.10^{b}	7.80±0.00^{b}	7.80±0.20^{b}	7.40±0.20^{b}	7.03±0.12^{b}	6.93±0.12^{b}
	Anaerobic condition	10.00±0.00^{a}	9.83±0.06^{c}	9.82±0.13^{c}	9.80±0.00^{c}	9.57±0.11^{c}	9.53±0.06^{c}	9.35±0.13^{c}	9.27±0.21^{c}
pH	Shaking condition	5.00±0.06^{a}	3.67±0.03^{a}	3.47±0.10^{a}	3.47±0.05^{a}	3.46±0.04^{a}	3.45±0.03^{a}	3.43±0.01^{a}	3.43±0.03^{a}
	Static condition	5.00±0.00^{a}	4.04±0.03^{b}	3.81±0.03^{b}	3.74±0.01^{b}	3.66±0.04^{b}	3.53±0.01^{a}	3.52±0.10^{b}	3.45±0.03^{a}
	Anaerobic condition	5.00±0.00^{a}	4.94±0.05^{c}	4.87±0.07^{c}	4.77±0.07^{c}	4.75±0.02^{c}	4.69±0.06^{b}	4.78±0.06^{c}	4.74±0.03^{b}
Reducing sugar (g/100 ml)	Shaking condition	66.67±0.29^{a}	8.80±0.03^{a}	2.41±0.56^{a}	2.13±0.14^{a}	2.00±0.07^{a}	1.98±0.03^{a}	1.94±0.30^{a}	1.76±0.04^{a}
	Static condition	66.50±0.05^{a}	63.50±1.75^{b}	55.08±0.23^{b}	54.92±0.02^{b}	54.50±1.09^{b}	50.83±2.16^{b}	44.42±1.66^{b}	41.08±2.18^{b}
	Anaerobic condition	66.50±0.05^{a}	63.28±1.81^{b}	62.67±1.51^{c}	63.31±0.86^{c}	63.10±1.02^{c}	62.98±0.93^{c}	62.62±0.65^{c}	62.07±0.40^{c}

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

140

ตารางภาคผนวกที่ 9 การเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก 600 มิลลิลิตรปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ ที่สภาวะการหมักต่างๆ (ต่อ)

Parameters	Conditions	Fermentation time (days)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
Acetic acid (g/100 ml)	Shaking condition	0.04±0.02^{a}	0.23±0.02^{a}	0.26±0.02^{a}	0.26±0.02^{a}	0.27±0.03^{a}	0.27±0.03^{a}	0.28±0.01^{a}	0.28±0.01^{a}
	Static condition	0.05±0.020^{a}	0.11±0.00^{b}	0.13±0.03^{b}	0.17±0.02^{b}	0.21±0.06^{a}	0.20±0.01^{b}	0.23±0.03^{a}	0.24±0.03^{a}
	Anaerobic condition	0.04±0.02^{a}	0.03±0.02^{c}	0.07±0.04^{c}	0.05±0.02^{c}	0.05±0.01^{b}	0.06±0.04^{c}	0.12±0.07^{b}	0.13±0.02^{b}
Cell viability (log CFU/ml)	Shaking condition	5.52±0.18^{a}	7.33±0.23^{a}	7.56±0.01^{a}	6.76±0.06^{a}	6.41±0.02^{a}	6.46±0.02^{a}	6.39±0.06^{a}	5.82±0.04^{a}
	Static condition	5.53±0.09^{a}	6.41±0.12^{b}	6.65±0.04^{b}	6.78±0.10^{a}	6.41±0.02^{a}	5.67±0.04^{b}	5.56±0.08^{b}	5.59±0.14^{a}
	Anaerobic condition	5.60±0.14^{a}	4.90±0.05^{c}	4.48±0.22^{c}	4.07±0.11^{b}	3.73±0.14^{b}	3.57±0.28^{c}	3.42±0.12^{c}	3.2±0.26^{b}

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

141

ตารางภาคผนวกที่ 10 การผลิตเอทานอลของยีสต์ *C. stellimalicola* ในน้ำผลตาลโตนดสุก 6 ลิตร ปรับด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 องศาบริกซ์ กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

Parameters	Fermentation time (days)							
	0	2	4	6	8	10	12	14
Ethanol (%)	0.00±0.00^{h}	0.92±0.06^{g}	1.77±0.20^{f}	2.47±0.15^{e}	2.85±0.10^{d}	3.30±0.05^{c}	3.57±0.15^{b}	3.92±0.15^{a}
Total soluble solid (^{o}Brix)	10.00±0.00^{h}	7.37±0.3^{g}	6.03±0.15^{f}	5.45±0.14^{e}	5.00±0.10^{d}	4.10±0.10^{c}	3.67±0.12^{b}	3.02±0.19^{a}
pH	5.00±0.00^{d}	3.39±0.08^{c}	3.26±0.14^{b}	3.03±0.03^{a}	2.98±0.03^{a}	3.00±0.01^{a}	2.95±0.05^{a}	2.93±0.06^{a}
Reducing sugar (g/100 ml)	65.50±0.50^{f}	54.83±1.6^{e}	42.29±1.17^{d}	25.37±4.86^{c}	11.00±1.80^{b}	6.24±1.75^{ab}	2.82±0.34^{a}	2.14±0.31^{a}
Acetic acid (g/100 ml)	0.29±0.03^{a}	0.30±0.06^{a}	0.31±0.02^{a}	0.30±0.01^{a}	0.31±0.01^{a}	0.31±0.01^{a}	0.33±0.02^{a}	0.33±0.01^{a}
Cell viability (log CFU/ml)	5.50±0.03^{d}	5.77±0.01^{c}	5.83±0.05^{c}	6.75±0.04^{a}	6.82±0.04^{a}	6.07±0.09^{b}	5.81±0.03^{c}	5.23±0.08^{e}

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

142

ตารางภาคผนวกที่ 11 ความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลทต่างๆ ในอาหารGYE broth ที่มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 6 และ 8

Isolate AAB	Absorbance (OD_{600})		Cell viability (CFU/ml)	
	Ethanol 6%	Ethanol 8 %	Ethanol 6 %	Ethanol 8 %
A01	0.23	0.01	$5.6x10^5$	130
A02	0.25	0.03	$1.7x10^5$	$7.3x10^3$
A03	0.29	0.01	$5.7x10^5$	20
A04	0.43	0.23	$1.3x10^6$	$4.3x10^4$
A05	0.22	0.03	$7.1x10^5$	$4.6x10^3$
A06	0.43	0.03	$6.3x10^5$	$3.4x10^3$
A07	0.23	0.04	$1.5x10^5$	$1.2x10^3$
A08	0.43	0.37	$6.4x10^5$	$2.1x10^5$
A09	0.22	0.03	$6.5x10^5$	44
A10	0.48	0.41	$5.0x10^5$	$9.6x10^3$
A11	0.49	0.40	$2.5x10^6$	$2.1x10^4$
A12	0.41	0.07	$8.1x10^5$	370
A13	0.35	0.35	$6.8x10^5$	$6.6x10^4$
A14	0.31	0.10	$4.1x10^4$	$1.4x10^4$
A15	0.46	0.35	$1.3x10^6$	$9.7x10^5$
A16	0.39	0.32	$1.2x10^6$	$7.4x10^5$
A17	0.33	0.23	$8.3x10^5$	$2.4x10^5$
A18	0.37	0.30	$9.5x10^5$	$1.6x10^5$
A19	0.36	0.30	$1.4x10^6$	$2.4x10^5$
A20	0.33	0.02	$4.5x10^4$	22

ตารางภาคผนวกที่ 12 ความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลทต่างๆในอาหารเหลว GYE ที่มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 6

Isolates	Acetic acid (g/100 ml)												
Days	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
A 04	0.00±0.00	0.86±0.03	1.29±0.09	1.87±0.05	2.27±0.02	2.84±0.05	3.42±0.08	4.00±0.08	4.40±0.05	4.43±0.00	4.57±0.04	4.60±0.02	4.29±0.06
A 08	0.02±0.01	0.83±0.02	1.27±0.17	1.79±0.05	2.17±0.09	2.70±0.17	3.36±0.24	4.00±0.37	4.34±0.19	4.82±0.40	4.91±0.50	4.94±0.49	4.55±0.43
A 10	0.00±0.00	0.64±0.10	1.48±0.37	2.34±0.40	2.8±0.09	3.24±0.08	3.87±0.13	4.34±0.17	4.84±0.15	5.39±0.15	5.49±0.14	5.64±0.18	5.09±0.40
A 11	0.00±0.00	1.40±0.04	1.93±0.05	2.62±0.07	2.9±0.08	3.43±0.09	3.91±0.21	4.35±0.12	4.96±0.18	5.16±0.08	5.18±0.09	5.20±0.06	4.76±0.07
A 13	0.02±0.01	0.55±0.03	0.78±0.03	1.01±0.08	0.89±0.05	0.92±0.00	0.98±0.11	1.10±0.29	1.42±078	1.53±0.93	1.58±0.95	1.74±1.31	1.98±1.89
A 15	0.02±0.02	0.71±0.03	0.78±0.03	0.88±0.04	1.12±0.04	1.20±0.33	1.67±0.83	2.09±1.20	3.33±0.98	3.91±0.70	4.54±0.29	4.61±0.36	4.17±0.32
A 16	0.00±0.00	0.63±0.03	0.82±0.04	1.08±0.04	0.96±0.05	1.11±0.19	1.71±0.77	2.70±0.06	2.99±1.31	3.30±0.89	3.73±0.41	4.50±0.48	4.41±0.28
A 17	0.02±0.01	0.73±0.00	0.88±0.05	1.08±0.02	1.06±0.09	1.05±0.05	1.08±0.09	1.06±0.02	1.08±0.04	1.06±0.08	1.11±0.04	1.27±0.17	1.03±0.33
A 18	0.00±0.00	0.71±0.02	0.87±0.02	1.13±0.08	1.19±0.13	1.17±0.18	1.32±0.24	1.58±0.39	2.38±0.38	2.41±0.05	4.31±1.25	4.44±1.15	4.27±0.97
A 19	0.00±0.00	0.66±0.04	0.85±0.03	1.06±0.04	0.98±0.03	1.59±0.37	2.24±0.55	2.63±1.34	3.56±1.03	3.40±0.55	4.07±0.00	4.30±0.22	4.03±0.05

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

144

ตารางภาคผนวกที่ 12 ความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกไอโซเลทต่างๆในอาหารเหลว GYE ที่มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 8 (ต่อ)

Isolates	Acetic acid (g/100 ml)												
Days	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
A 04	0.01±0.02	0.30±0.22	0.78±0.11	1.19±0.31	1.58±0.34	1.58±0.31	2.93±0.06	3.39±0.04	3.37±0.03	3.77±0.05	3.90±0.17	3.97±0.07	4.05±0.08
A 08	0.00±0.02	0.32±0.03	0.59±0.02	1.02±0.18	1.28±0.05	1.28±0.06	2.05±0.10	2.47±0.12	2.99±0.06	3.51±0.10	3.94±0.06	4.50±0.01	4.65±0.13
A 10	0.02±0.02	0.40±0.00	1.18±0.18	1.66±0.11	2.11±0.09	2.11±0.07	3.46±0.20	3.60±0.32	3.87±0.12	4.18±0.07	4.52±0.10	4.93±0.19	5.10±0.27
A 11	0.00±0.02	0.61±0.09	1.12±0.08	1.41±0.40	2.06±0.12	2.06±0.59	3.01±0.12	3.29±0.03	3.86±0.21	3.97±0.13	4.08±0.18	4.25±0.25	4.55±0.05
A 13	0.01±0.02	0.34±0.02	0.55±0.03	0.65±0.33	0.71±0.04	0.77±0.06	0.83±0.03	1.21±0.06	1.33±0.13	1.47±0.05	2.05±0.04	2.18±0.10	2.12±0.07
A 15	0.00±0.00	0.82±0.14	1.42±0.11	1.77±0.11	2.33±0.08	2.33±0.11	3.25±0.06	3.41±0.17	4.00±0.24	4.15±0.39	4.33±0.41	4.41±0.42	4.55±0.41
A 16	0.01±0.02	0.47±0.09	1.35±0.08	1.80±0.13	2.05±0.12	2.05±0.14	2.90±0.13	3.30±0.27	3.63±0.08	4.05±0.04	4.39±0.20	4.65±0.44	4.71±0.40
A 17	0.00±0.02	0.32±0.03	0.34±0.32	0.42±0.35	0.49±0.30	0.55±0.80	0.52±0.18	0.58±0.12	0.75±0.20	0.94±0.09	1.15±0.15	1.20±0.07	1.34±0.10
A 18	0.00±0.00	0.45±0.07	1.27±0.09	1.77±0.08	2.20±0.15	2.20±0.20	3.04±0.21	3.42±0.16	3.71±0.21	4.15±0.16	4.12±0.06	4.23±0.16	4.03±0.12
A 19	0.00±0.02	0.71±0.06	1.59±0.03	2.07±0.03	2.53±0.03	2.53±0.52	3.30±0.25	3.56±0.12	3.90±0.09	4.09±0.10	4.29±0.33	4.29±0.05	4.47±0.26

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางภาคผนวกที่ 13 การผลิตกรดอะซิติกด้วยเชื้อ *A. ghanensis* ในไวน์ผลตาลโตนดสุก 6 ลิตร ในถังหมักขนาด 10 ลิตร หมักที่อุณหภูมิห้อง

Parameters	Fermentation time (days)						
	0	10	20	30	40	50	60
Acetic acid (g/100 ml)	1.15±0.02^{e}	1.55±0.07^{d}	2.69±0.03^{c}	3.65±0.29^{b}	3.90±0.11^{a}	4.08±0.05^{a}	4.14±0.10^{a}
Ethanol (%)	6.00±0.00^{g}	4.60±0.20^{f}	3.13±0.03^{e}	2.05±0.17^{d}	1.52±0.08^{c}	0.87±0.08^{b}	0.47±0.06^{a}
Total soluble solid (^{o}Brix)	3.02±0.19^{e}	2.53±0.15^{d}	2.50±0.10^{cd}	2.27±0.06^{bcd}	2.20±0.10^{abc}	2.03±0.15^{ab}	1.90±0.26^{a}
pH	4.50±0.03^{d}	2.93±0.03^{c}	2.82±0.03^{b}	2.63±0.03^{a}	2.62±0.03^{a}	2.62±0.03^{a}	2.58±0.01^{a}
Reducing sugar (g/100 ml)	2.14±1.80^{f}	1.98±3.83^{e}	1.65±3.38^{d}	1.43±2.40^{c}	1.17±3.06^{b}	1.03±2.89^{a}	0.94±5.74^{a}
Cell viability (log CFU/ml)	4.73±0.04^{c}	5.15±0.04^{b}	5.31±0.03^{a}	5.39±0.03^{a}	5.22±0.04^{b}	4.17±0.05^{d}	2.62±0.08^{e}

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

146

ตารางภาคผนวกที่ 14 ส่วนผสมของน้ำสลัดสูตรต่างๆ

Ingredients (%)	Formula			
	Control	A	B	C
Sucrose	33	33	33	33
Olive oil	33	33	33	33
Salt	5	5	5	5
Egg	9	9	9	9
Distilled vinegar	20	13.2	10	-
Palmyra palm fruit vinegar	-	6.8	10	20

ตารางภาคผนวกที่ 15 ผลการทดสอบคุณภาพทางเคมีของน้ำสลัดสูตรต่างๆ

Formular	Physical propertys	
	pH	Viscosity (centipoise)
Control	3.43	40,115
A	3.51	40,421
B	3.62	40,180
C	3.69	41,691

ตารางภาคผนวกที่ 16 ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดสูตรต่างๆ

Formula	Sensory properties						
	Color	Smell	Flavor	Viscosity	Sweetness	Sourness	Overall liking
Control	6.97±1.16[a]	5.57±1.52[a]	5.83±1.60[a]	5.33±1.73[a]	5.97±1.35[a]	6.10±1.30[a]	6.37±1.45[a]
A	6.67±1.35[a]	6.03±1.35[a]	6.23±1.14[a]	5.87±1.61[a]	6.17±1.18[a]	5.77±1.76[a]	6.23±1.36[a]
B	7.20±1.32[a]	6.23±1.79[a]	6.17±1.29[a]	5.80±1.52[a]	6.13±1.31[a]	5.50±1.89[a]	6.27±1.64[a]
C	7.23±1.04[a]	6.10±1.42[a]	6.07±1.44[a]	5.53±1.89[a]	6.20±1.58[a]	6.07±1.57[a]	6.30±1.24[a]

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (n=30)

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางภาคผนวกที่ 17 ส่วนประกอบของน้ำสลัดสูตรน้ำส้มสายชูหมักที่อัตราส่วนต่างๆ

	Formula			
	A	B	C	D
Palmyra palm fruit vinegar (%)	20	30	40	50

ตารางภาคผนวกที่ 18 ผลการทดสอบคุณภาพทางเคมีของน้ำสลัดสูตรที่ใช้น้ำส้มสายชูร้อยละ 20, 30, 40 และ50

Formula	Chemical propertys	
	pH	Viscosity (centipoise)
A	3.50	30,576
B	3.41	30,048
C	3.37	29,620
D	3.32	26,304

ตารางภาคผนวกที่ 19 ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดสูตรผลตาลโตนดสุกที่ระดับน้ำส้มสายชูร้อยละ 20, 30, 40 และ 50

Formula	Sensory property							
	Color	Smell	Flavor	Viscosity	Sweetness	Saltinass	Sourness	Overall liking
A	7.13±1.14[a]	6.37±1.40[a]	6.57±1.19[b]	6.67±1.03[a]	6.07±1.62[b]	5.63±1.50[b]	6.23±1.43[ab]	6.43±1.36[b]
B	7.17±1.02[a]	6.40±1.22[a]	7.23±0.90[a]	7.07±1.11[a]	6.87±1.22[a]	6.53±1.38[a]	6.97±1.43[a]	7.17±0.87[a]
C	7.37±0.85[a]	6.77±1.22[a]	6.60±1.19[b]	6.53±1.43[a]	6.50±1.17[ab]	6.07±1.48[ab]	6.27±1.39[ab]	6.77±1.17[ab]
D	7.03±1.00[a]	6.27±1.05[a]	6.43±1.30[b]	6.63±1.30[a]	6.47±1.04[ab]	5.87±1.33[ab]	5.93±1.57[b]	6.57±1.30[ab]

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (n=30)

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

150

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวศิริพร อาจณรงค์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5520320401

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	**ชื่อสถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล	2546

ทุนการศึกษา

1. ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปี 2556
2. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี ประจำปีการศึกษา 2555

การตีพิมพ์เผยแพร่

Artnarong, S., Masniyom, P. and Maneesri, J. 2015. Preparation the substrate from palmyra palm fruit by *Candida stellimalicola* fermentation for acetic acid production. In Proceedings of 6th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Production. Khon Kaen, Thailand. July 29th-31st, 2015.

Artnarong, S., Masniyom, P. and Maneesri, J. 2015. Isolation of yeast and acetic acid bacteria from palmyra palm fruit pulp (*Borassus flabellifer* Linn.). International Food Research Journal. (Subnmitted)