7481

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ ผลของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมต่อเชื้อยีสต์และแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล

Effect of extracts of the bark of *Cotylelobium lanceolatum* in alcohol fermentation from molasses.

ชื่อผู้วิจัย นายวราวุฒิ ครูส่ง นายอัฐพิชญ์ ไทยตระกูล* นายปราโมทย์ ธรรมรัตน์**

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ประจำปี 2530

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2529 ถึง ตุลาคม 2530

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง โทร. 3267342

* โรงงานสุราอยุธยา จ. อยุธยา
** สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

T101431

บทคัดย่อ

จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมด้วยวิธี paper chromatography โดยใช้ตัวทำละลายที่ประกอบด้วย เอธิลอะซิเตท : กรดฟอร์มิค : น้ำ อัตราส่วน 10 : 2 : 3 โดยปริมาตร พบว่ามีแทนนินเป็นส่วนประกอบหลักนอกจากนี้ยังมีสารชนิดอื่นอีกด้วย ปริมาณแทนนินในสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซนต์ เท่ากับ 10.6 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักแห้ง

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล สามารถจำแนกได้ 5 กลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา แบคทีเรียกลุ่มที่ทำให้เกิดปัญหาการหมักทำให้ประสิทธิภาพการหมักลดลง มีรูปร่างกลมอยู่เป็นคู่ แกรมบวก สามารถสร้างกรดได้ เจริญเด่นในชั่วโมงที่ 8 ของการหมัก และจากการทดสอบยับยั้งเชื้อยีสต์และแบคทีเรียด้วยสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมพบว่า สารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมให้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าเชื้อยีสต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถสร้างกรด

RCH
HD
9119
.M65
3925 ผ

หมายเลขทะเบียน 101431
วัน.เดือน.ปี 15 JUL 2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเติมเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัด ระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc-90 พบว่าการเติมเปลือกไม้เคี่ยมปริมาณ 5 เปอร์เซนต์ของน้ำหมักในชั่วโมงที่ 8 และการเติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมปริมาณ 1.5 เปอร์เซนต์ของน้ำหมักในชั่วโมงที่ 8 เช่นกัน ให้ผลการหมักที่ดีที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบผลของการหมักกับน้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เคี่ยมหรือสารสกัด พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักที่เติมเปลือกไม้เคี่ยม 5 เปอร์เซนต์ในชั่วโมงที่ 8, น้ำหมักที่เติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม 1.5 เปอร์เซนต์ในชั่วโมงที่ 8 และน้ำหมักที่ไม่เติมสารใดเลยเท่ากับ 8.1, 8.3 และ 8.5 เปอร์เซนต์ โดยปริมาตร ตามลำดับภายในเวลา 36 ชั่วโมง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of extracts of the bark of *Cotyledobium lanceolatum* in alcohol fermentation from molasses

Warawut Krusong, Natthasit Thaitrakul and Pramote Tammarat

Abstract

The results of analysed of *Cotyledobium lanceolatum* bark's extract by paper chromatographic method showed that they were essentially tannin, and ethyl acetate-formic acid-water (10 : 2 : 3 V/V) were appropriate solvent in seperation. Therefore, tannin content in bark's extract was investigated, and found that there were 10.6 percent tannin content, dry weight basis.

Screening the bacteria able to grow in fermentation mashes found that the most important bacteria, cause a decrease in ethanol production yield were gram-positive bacteria with paired-cocci shape, could produce acid and grew dominantly in 8 hours of fermentation times. The bark's extract able to inhibit their growth. However, bark's extract also able to inhibit yeast but less than in bacteria.

The optimum condition for addition the bark and it's extract in fermentation mashes were obtained. Addition not only the bark at 5.0 percent (W/V) in 8 hours of fermentation time but also it's extract at 1.5 percent (V/V) in 8 hours of fermentation time gave good fermentation. Comparison to no addition fermentation mashes found that alcohol content in fermentation mashes with added 5 percent bark, added 1.5% bark's extract and not added anything were 8.1, 8.3 and 8.5 percent (V/V), respectively, within 36 hours.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญภาพ	ข
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	12
ผลการทดลอง	17
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	38
เอกสารอ้างอิง	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบของกากน้ำตาล	3
2	วิตามินที่มีอยู่ในกากน้ำตาล	4
3	การแยกสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมด้วยวิธี paper chromatography	18
4	ปริมาณแทนนินในเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมด้วยเอธานอล	18
5	ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม	25
6	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ด้วยสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แนวทางในการผลิตแอลกอฮอล์โดยผ่าน Embden-Meyerhof pathway	6
2	เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* Sc-90 กับแบคทีเรียในการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร	20
3	แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล	22-24
4	ผลของเปลือกไม้เดี่ยมต่อการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90 ในชั่วโมงที่ 32 โดยเปรียบเทียบกับน้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เดี่ยม	28
5	ผลของสารสกัดจากเปลือกไม้เดี่ยมต่อการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90 ในชั่วโมงที่ 32 โดยเปรียบเทียบกับน้ำหมักที่ไม่เติมสารสกัดจากเปลือกไม้เดี่ยม	29
6	เวลาที่เหมาะสมในการเติมเปลือกไม้เดี่ยม ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหมักต่อการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90 ในชั่วโมงที่ 32 โดยเปรียบเทียบกับน้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เดี่ยม	31
7	เวลาที่เหมาะสมในการเติมสารสกัดจากเปลือกไม้เดี่ยมปริมาณ 1.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหมักต่อการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90 ในชั่วโมงที่ 32 โดยเปรียบเทียบกับน้ำหมักที่ไม่เติมสารสกัดจากเปลือกไม้เดี่ยม	32
8	ปริมาณเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* Sc-90 ในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล	34
9	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในน้ำหมักระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90	35
10	ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90	36
11	ปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* Sc-90	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ขบวนการหมักแอลกอฮอล์ในปัจจุบันนิยมใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ เนื่องจากมีปริมาณมาก หาง่ายและราคาถูก นอกจากนี้ตามโรงงานแอลกอฮอล์หรือโรงงานสุราทั่วไปยังคงใช้น้ำจากแม่น้ำโดยตรงไม่มีการทำให้สะอาดและไม่มีการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักใหญ่ก่อนทำการหมัก จึงทำให้เกิดปัญหาขึ้นตามมา อีกทั้งถ้าในกากน้ำตาลที่ใช้มีแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่เป็นปริมาณมาก โดยเฉพาะกากน้ำตาลค้างปีซึ่งตรวจพบแบคทีเรียจำนวนมากถึง 8.4×10^7 เซลต่อมิลลิลิตร (จรูญและคณะ, 2525) จะยิ่งส่งผลกระทบต่อการหมักยิ่งขึ้นทำให้ได้ผลผลิตแอลกอฮอล์ต่ำกว่าที่ควรจะได้รับ ดังนั้นจึงสมควรต้องหาทางแก้ไขโดยเร็ว แนวทางหนึ่งที่อาจเป็นได้ก็คือ การใช้เปลือกไม้เคี่ยมหรือสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม ซึ่งตามปกติชาวบ้านจะใช้เปลือกไม้เคี่ยมโดยนำไปย่างจนแห้งแล้วใส่ลงไปในกระบอกน้ำตาลสดเพื่อป้องกันการเสียของน้ำตาลสด อันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในน้ำตาลสดหรือน้ำตาลโตนด ดังนั้นจึงสมควรศึกษาการนำเปลือกไม้เคี่ยมหรือสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดปัญหา อันจะก่อให้ประสิทธิภาพในการหมักสูงขึ้น และยังลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจของประเทศอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

ในการผลิตแอลกอฮอล์ทั้งที่เป็นเครื่องดื่มและเชื้อเพลิง มักนิยมใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ กากน้ำตาลหรือน้ำเหลือง (molasses) เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย (Paturau, 1969) ในการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย ประมาณกันว่าน้ำตาลทรายที่ผลิตขึ้นมาทุก 3 ตัน จะให้กากน้ำตาลประมาณ 1 ตัน แต่คุณสมบัติของกากน้ำตาลนั้นจะดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของโรงงานน้ำตาลเป็นสำคัญ

กากน้ำตาลแบ่งออกเป็น 3 ชนิดคือ

1. black strap molasses คือกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว มีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณ 50-60 เปอร์เซนต์

2. refinery molasses คือกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ มีน้ำตาลอยู่ประมาณ 48 เปอร์เซนต์

3. hightest molasses หรือ invert molasses ซึ่งผลิตโดยนำน้ำอ้อยมา invert แล้วระเหยให้ข้นเป็นน้ำเชื่อม ดังนั้น hightest molasses จึงไม่ใช่กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทราย มีน้ำตาลอยู่ 77 เปอร์เซนต์ (ภัทรา, 2520 ; Paturau, 1969)

กากน้ำตาลมีองค์ประกอบซับซ้อน อาจแบ่งได้ 3 ส่วนคือ total sugar, Non-sugar organic matter และ Incorganic matter ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าในกากน้ำตาลมี total sugar อยู่ประมาณ 48-56 เปอร์เซนต์ ซึ่งแบ่งเป็นซูโครส 30-40 เปอร์เซนต์ น้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคสและฟรุคโตส) 15-20 เปอร์เซนต์ และน้ำตาลที่ใช้หมักไม่ได้ (non fermentable sugar) ซึ่งเกิดมาจากการรวมตัวของน้ำตาลรีดิวซ์กับสารประกอบไนโตรเจน น้ำตาลชนิดนี้มีอยู่ประมาณ 2-4 เปอร์เซนต์

สารพวก non-sugar organic ในกากน้ำตาล เป็นสารที่มีผลต่อสีและกลิ่นของกากน้ำตาล สารพวกนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มสารประกอบที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่นโปรตีน ซึ่งมีอยู่ในปริมาณต่ำ นอกจากนี้ยังมีกรดอมิโน เอไมด์ (amide) เป็นต้น ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งเป็นสารประกอบที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบซึ่งมีอยู่ประมาณ 1 ใน 3 ของ non sugar organic ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของกากน้ำตาล

Components	Usual range (at 75% dry matter) %
Total sugars :	48 - 56
sucrose	30 - 40
reducing sugars	15 - 20
unfermentable sugars	2 - 4
Non-sugars organic matter :	9 - 12
soluble gums and other carbohydrates	4.0
organic acids such as aconitic acid	3.0
citric acid, malic acid, succinie acid etc.	trace
waxes, sterols, pigments and vitamins	trace
nitrogen components as protein (i.e. Nx 6.25)	2 - 3
Sulphated ash :	10 - 15
sodium (as Na)	0.1 - 0.4
potassium (as K)	1.5 - 5.0
calcium (as Ca)	0.4 - 0.8
chloride (as Cl)	0.7 - 3.0
phosphorus (as P)	0.6 - 2.0

ที่มา : Paturau (1969)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 วิตามินที่มีอยู่ในกากน้ำตาล

วิตามิน	mg/kg
Biotin	1.2-3.2
Folic acid	0.04
Inositol	6000
Ca-Pantothenate	54-64
Pyridoxine	2.6-5.0
Riboflavin	2.5
Thiamine	1.8
Nicotinic acid	30-800
Choline	600-800

ที่มา : Paturau (1969)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของกากน้ำตาลที่สำคัญได้แก่ กรดอะโคนิติก (aconitic acid) ซึ่งอาจมีอยู่สูงถึง 3 เปอร์เซนต์ และยังมีกรดชนิดอื่น ๆ อีกเช่น กรดซิตริค กรดมาลิคและกรดซักซินิค เป็นต้น นอกจากกรดอินทรีย์แล้วยังมีสารพวก wax, sterols, เม็ดสี (pigment) และวิตามินอีกด้วย สำหรับวิตามิน (ตารางที่ 2) ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของกากน้ำตาลคือ ไบโอติน (biotin) ซึ่งยีสต์สามารถใช้ในการหมักได้

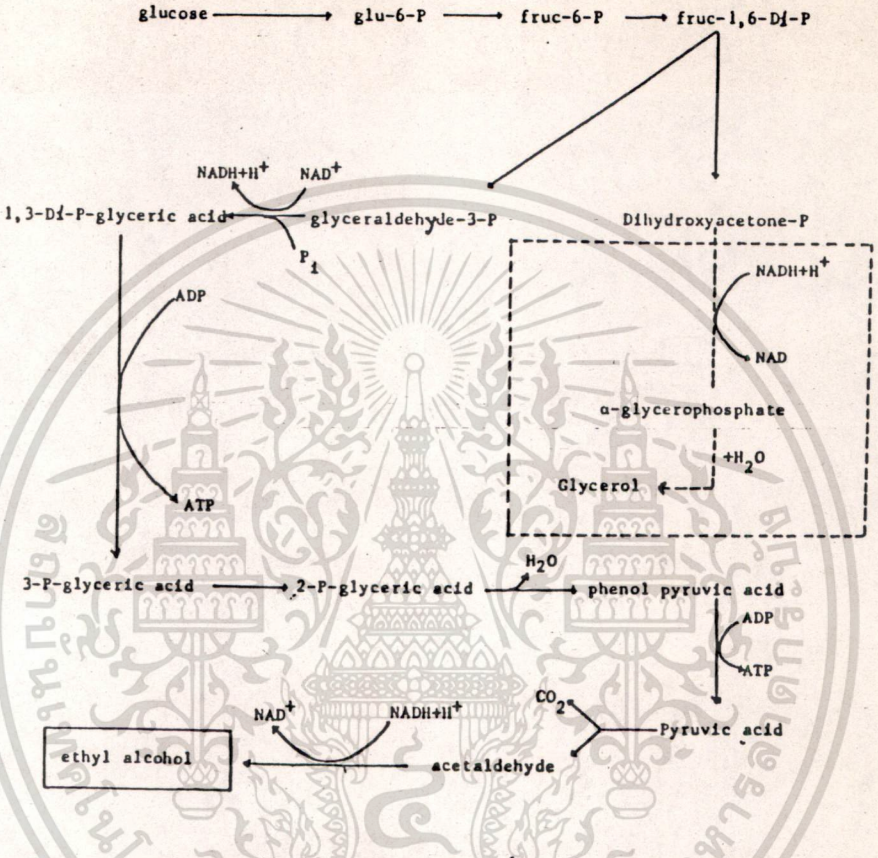
ในกากน้ำตาลมีสารที่มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ เช่นซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ทั้งนี้เนื่องจากการใช้ SO_2 ในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย ทำให้มี SO_2 ตกค้างอยู่ในกากน้ำตาล จากนั้น SO_2 จะทำปฏิกริยากับน้ำตาลรีดิวซ์ได้ซัลไฟท์ไอออนเกิดขึ้นและส่งผลยับยั้งการหมักของยีสต์ต่อไป การยับยั้งของไอออนนี้จะสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อพีเอชลดลง กล่าวคือเมื่อพีเอชลดลงถึง 5.0 เริ่มเกิดการยับยั้งเมื่อมีปริมาณโซเดียมซัลไฟท์ 1000 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และเมื่อพีเอชลดถึง 4.0 จะเริ่มเกิดการยับยั้งที่ปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (Rainbow, 1971 a) นอกจากนี้แล้วปริมาณเกลืออนินทรีย์ที่มีอยู่หลายชนิดในกากน้ำตาล กลับส่งผลยับยั้งกระบวนการแอลกอฮอล์บางส่วนทำให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์น้อยลง และเกิดการหมักที่ทำให้ได้สารอื่น เช่น glycerol, 2, 3-butanediol, acetoin, acetaldehyde, volatile acid เป็นต้น ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้เนื่องจากการรักษาสมดุลย์ของปริมาณภายในเซลล์ยีสต์นั่นเอง (Tajima and Yashizumi, 1973)

ขบวนการหมักแอลกอฮอล์

ขบวนการหมักแอลกอฮอล์ที่รู้จักกันเป็นขบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นโดยอาศัยปฏิกริยาของเอนไซม์ ในการเปลี่ยนแปลงสับสเตรท เช่นน้ำตาลกลูโคส ภายใต้สภาพที่ไม่ต้องการอากาศ ทั้งนี้โดยอาศัยเชื้อยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* เชื้อยีสต์สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์ได้โดยผ่านทาง glycolysis หรือ Embden-Meyerhof-Parnas pathway ดังที่แสดงในภาพที่ 1

ตามทฤษฎียีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้ 51.1 เปอร์เซนต์ และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักของน้ำตาล ดังสมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 แนวทางในการผลิตแอลกอฮอลโดยผานทาง Embden Meyerhoff Parnas pathway

ที่มา : Paturau (1969)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \xrightarrow[\text{or acid}]{\text{enzyme}} nC_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2nC_2H_5OH + 2nCO_2$$

starch/cellulose/hexan	hexose	ethanol	gas
162 grams	180 grams	92 grams	88 grams
	(100)	(51.1)	(49.8)

แต่ในทางปฏิบัติพบว่ายีสต์สามารถหมักน้ำตาลได้ประมาณ 95 เปอร์เซนต์ ให้เป็นแอลกอฮอล์ นอกจากนั้นยีสต์ใช้น้ำตาลที่เหลือสำหรับการเจริญเติบโตและเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่น ๆ ดังนี้

1. ethanol	48.4%	6. lactic acid	0.0 - 0.2%
2. carbondioxide	46.5%	7. succinic acid	0.5 - 0.77%
3. acetaldehyde	0.0 - 0.03%	8. fusel oil	0.25 - 0.5%
4. acetic acid	0.05 - 0.25%	9. furfural	trace
5. glyceral	2.5 - 3.6%		

ปัญหาของการหมักแอลกอฮอล์

ในการผลิตแอลกอฮอล์ในโรงงาน บ่อยครั้งที่โรงงานต้องประสบกับปัญหาการหมักตกต่ำ อันเนื่องมาจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียในระหว่างการหมัก แบคทีเรียดังกล่าวปนเปื้อนและเจริญขึ้นมาด้วยสาเหตุหลายประการ (จรูญ, 2525)

1. จากเชื้อในหลอดที่เก็บไว้ไม่บริสุทธิ์ มีแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ทำให้แบคทีเรียลุกลามในการเตรียมกล้าเชื้อและถังหมักใหญ่ต่อไป

2. การเตรียมกล้าเชื้อไม่ดีพอ มีแบคทีเรียปนเปื้อนมาก ทั้งนี้อาจเนื่องจากการฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ดีพอ ภาชนะไม่สะอาดและปิดจุกสำลีไม่ดีเชื้อแบคทีเรียจากอากาศผ่านเข้าไปได้

3. แบคทีเรียในกากน้ำตาลมีมากเกินไป โดยเฉพาะกากน้ำตาลเก่าที่เก็บไว้ในถังเก็บของโรงงานน้ำตาลและโรงงานสุราเป็นเวลานานค้างปี

กากน้ำตาลที่ผลิตในบ้านเรามีแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่มาก ถ้าเป็นกากน้ำตาลใหม่ ๆ จะมีแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ประมาณ 1×10^2 เซลต่อมิลลิลิตร แต่ถ้าเป็นกากน้ำตาลเก่าค้างปีจะตรวจพบแบคทีเรียจำนวนมากถึง 8.4×10^7 เซลต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกากน้ำตาลเก่าส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหญ่จะสร้างกรดได้ สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วง พีเอชต่ำของหมักร่วมกับยีสต์ กากน้ำตาลเก่าจะมีค่าพีเอชเริ่มต้นประมาณ 4.3 (ซึ่งค่าปกติควรอยู่ประมาณ 5.5) แสดงว่าแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกากน้ำตาลได้สร้างกรดขึ้นในช่วงการเก็บ ถ้านำกากน้ำตาลที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนสูงนี้ไปหมักแอลกอฮอล์จะทำให้ผลผลิตต่ำกว่าปกติ (จรูญและคณะ, 2525) กล่าวคือโดยปกติแล้วแบคทีเรียจะเจริญเร็วกว่ายีสต์ เมื่อแบคทีเรียสร้างกรดมากขึ้นทำให้ยีสต์เจริญไม่ได้ ช่วง 8 ชั่วโมงแรกของการหมักนับว่ามีความสำคัญมากที่สุด ถ้ามีแบคทีเรียมากตั้งแต่ช่วงแรกของการหมักได้แอลกอฮอล์น้อยมากเกือบจะไม่ได้ ทั้งนี้เพราะยีสต์เพิ่มจำนวนไม่ได้ แต่ถ้าภายใน 8 ชั่วโมงแรกนั้นยีสต์สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้และสร้างแอลกอฮอล์ออกมา ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบ้าง การหมักก็จะดำเนินต่อไปได้ ถึงแม้จะตรวจพบว่ามีแบคทีเรียปนเปื้อนแต่ความเสียหายจะมีน้อย (จรูญ, 2525)

แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล ได้แก่แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus sp.*, *Gluconobacter sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pediococcus sp.* และ *Lactobacillus sp.* โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus sp.* นี้ จะมีมากอย่างมาก ถ้าเวลาในการหมักนานขึ้นปริมาณของแบคทีเรียสกุลนี้จะสูงขึ้นและเป็น predominant ในช่วงท้ายของการหมักจะตรวจพบแบคทีเรียสกุลนี้ 80-90 เปอร์เซนต์ (ณัฐศิษฐ์, 2528) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Carr และ Davies (1972) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากกระบวนการผลิตวิสกี้ ส่วนใหญ่เป็นพวก lactic acid bacteria ชนิด *Lactobacillus fermentum*, *L.brevis*, *L.delbrueckii*, *L.plantarum*, *L.casei*, *Leuconostoc sp.*, *Streptococcus lactis* และ *Pediococcus cerevisiae*

แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกากน้ำตาล พบว่าใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในการทำน้ำตาลสดและน้ำตาลเมา ซึ่งได้แก่แบคทีเรียพวกที่สร้างกรดแลคติค ตามที่ Okafor (1975) ได้ศึกษาแบคทีเรียในน้ำตาลเมาจากต้นปาล์ม *Elaeis sp.* และ *Raphia sp.* ในประเทศไนจีเรีย รายงานว่าแบคทีเรียที่พบบ่อย ๆ มี 5 จีนัสได้แก่ *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* และ *Acetobacter* นอกจากนี้จากการศึกษาของ *Faparusi* และ *Bassir* (1971) พบว่าในการหมักน้ำตาลเมาในธรรมชาติ ในระยะแรกจะมีแบคทีเรีย *Lactobacillus*, *Leuconostoc* และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นส่วนใหญ่ หลังจากวันที่สามส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อยีสต์พวก *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia sp.* และ *Candida mycoderma* สำหรับเชื้อ *Acetobacter* จะเริ่มพบหลังจาก 24 ชั่วโมงไปแล้ว

อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในถังหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลในโรงงานมีหลายชนิดด้วยกัน ดังรายงานของปราโมทย์และคณะ (2529) ซึ่งศึกษาปัญหาที่เกิดจากการหมักน้ำตาลเก่าของโรงงานแอลกอฮอล์พบว่าแบคทีเรียที่เจริญปนเปื้อนในถังหมักมีหลายกลุ่ม กลุ่มแรกเป็นพวกที่มีรูปร่างกลมและพวกที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นมาก แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะเจริญและเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อมีการให้อากาศ แต่ไม่เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดปัญหาการหมักมากนัก อย่างไรก็ตามแบคทีเรียในกลุ่มนี้อาจทำให้เกิดปัญหาในถังกล้าเชื้อที่มีการให้อากาศและมาเชื้อไม่ดีพอ แบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่พบว่าเป็นต้นเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดปัญหาผลการหมักต่ำ ได้แก่แบคทีเรียพวก *Lactobacilli* ซึ่งไม่สร้างเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส ไม่พบการสร้างสปอร์ สามารถสร้างกรดและก๊าซจำนวนมาก แต่มีบางสายพันธุ์ที่สร้างเฉพาะกรดโดยไม่สร้างก๊าซ

แนวทางในการป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย

แนวทางในการป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำหมัก อาจทำได้หลายวิธีทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสาเหตุของการปนเปื้อนเป็นหลัก ดังนี้ (จรูญ, 2525)

1. การทำให้เชื้อยีสต์ที่ใช้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ทุก 3-6 เดือน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียซึ่งจะลุกลามต่อไปในการเตรียมกล้าเชื้อและถังหมักใหญ่ได้

2. การป้องกันแบคทีเรียปนเปื้อนในช่วงการเตรียมกล้าเชื้อ โดยอาศัยการปรับพีเอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง 3.5-4.0 นึ่งฆ่าเชื้อราว 15-20 นาที นอกจากนี้อาจทำการล้างภาชนะที่ใส่ด้วยโปตัสเซียมซัลไฟท์ 200 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร อาจแช่ไว้ค้างคืนจึงได้

3. ถ้าแบคทีเรียในกากน้ำตาลมีมากเกินไป อาจแก้ไขได้โดยการปรับพีเอชให้เป็นกรด 3.5-4.0 เติมกล้าเชื้อให้มากกว่าเดิม 2-3 เท่า คืออาจจะใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 5-10 เปอร์เซนต์และรีบผ่าส่าให้เร็วที่สุดทันทีที่สูบกากน้ำตาลเข้าถังหมัก อย่างไรก็ตามต้องควบคุมให้กล้าเชื้อมีแบคทีเรียปนเปื้อนน้อยที่สุดอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังมีการใช้สารปฏิชีวนะในการป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เช่นการใช้เพนนิซิลิน-จี ในระดับความเข้มข้น 2-5 พีพีเอ็ม (ปราโมทย์และคณะ, 2529) แต่ผลของการยับยั้งจะใช้ได้ผลดีเมื่อมีปริมาณแบคทีเรียไม่มากนัก ดังนั้นการใช้เพนนิซิลินจึงน่าจะเหมาะสมสำหรับใส่ในถังกล้าเชื้อป้องกันไม่ให้มีแบคทีเรียปนเปื้อนในถังกล้าเชื้อมากกว่าที่จะใช้ใส่ในถังหมักใหญ่

ในการป้องกันการเสียของน้ำตาลสด โดยทั่วไปนิยมนำกระบอกมารมควันหรือลวกน้ำร้อนก่อนเพื่อฆ่าเชื้อในกระบอกให้หมดเสียก่อน และก่อนนำไปรองน้ำตาลก็ต้องใส่เปลือกไม้หรือเนื้อไม้บางชนิดลงไปเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ไม้ที่ใช้มีต่างชนิดกันตามแต่ชนิดของพืชในเขตนั้น ๆ เช่นในประเทศไทยนิยมใช้ ไม้พยอม (*Shorea floribunda*), ไม้เคี่ยม (*Cotylelobium lanceolatum*), ไม้ตะเคียน (*Hopea adorata*), และไม้มะเกลือ (*Diospyros mollis*) (ธนิต, 2510) ในประเทศฟิลิปปินส์ ใช้ Tangal bark (*Verteria indicans*) (Kozaki, 1976) ซึ่งไม้เหล่านี้อยู่ในวงศ์ Dipterocarpaceae เหมือนกัน (วินิจ วนันดร, 2503) ส่วนในทวีปแอฟริกา เช่นประเทศไนจีเรียใช้เปลือกของต้น *Saccoglottis gabonensis* ซึ่งเป็นไม้ที่อยู่ในวงศ์ Humiriaceae (Faparusi and Bassir, 1972)

ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของเปลือกไม้ชนิดต่าง ๆ ที่กล่าวมา จากการวิเคราะห์พบว่าสารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป็นสาร essential phenolic compound (Faparusi and Bassir, 1972) ซึ่งสารประกอบฟีนอลเหล่านี้สามารถละลายได้ดีในเมธานอลและเอธานอล (Siekel, 1964) และจากการศึกษาปฏิกริยาของสารที่สกัดจากเปลือกไม้ *Saccoglottis gabonensis* ต่อจุลินทรีย์ในน้ำตาลสด ของ Faparusi and Bassir (1972) พบว่าสารสกัดจากเปลือกไม้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดี แต่ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของยีสต์อย่างมีนัยสำคัญ และการที่เปลือกไม้ช่วยป้องกันการเสียของน้ำตาลสดได้ เนื่องจากมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกรด นอกจากนี้ Kozaki, (1976) ได้ทำการวิเคราะห์สารสกัดจากเปลือกไม้ด้วยวิธี paper chromatographyและวิธีอื่น ๆ ปรากฏว่าสารเหล่านี้เป็นสารพวกโพลีฟีนอล เช่นเดียวกับแทนนิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะไม้เคี่ยม

ไม้เคี่ยม เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ มีขนาดความสูง 20-40 เมตร พบได้ในป่าดงดิบทางภาคใต้ตั้งแต่บุมพรลงไป จัดอยู่ในวงศ์ Disterocarpaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cotylelobium lanceolatum* craib (ลดาวัลย์, 2524) ลักษณะของไม้เคี่ยม เปลือกนอกเรียบมีสีน้ำตาล มีรอยด่างสีเทาสลับเหลือง เปลือกด้านในเป็นสีน้ำตาลอ่อน เมื่อทิ้งไว้นาน ๆ จะมีสีน้ำตาลเกือบดำ ลักษณะของเนื้อไม้มีเสี้ยน ค่อนข้างสั้น ละเอียด แข็ง เหนียว หนักและแข็งแรง (จำลอง, 2526) ดังนั้นจึงจัดอยู่ในจำพวกไม้เนื้อแข็ง (ฌรงค์, 2523)

ตามปกติแล้วไม้เคี่ยมถูกใช้ในการก่อสร้าง แต่เนื่องจากส่วนเปลือกมีสารแทนนิน (tannin) สูง จึงใช้ในการฟอกหนัง, ยาผากสมาน และใส่ในกระบอกน้ำตาลสดเพื่อป้องกันการหมักของน้ำตาล (ลดาวัลย์, 2524)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสกัดสารจากเปลือกไม้เคี่ยม

นำชิ้นเปลือกไม้เคี่ยมมาป่นด้วยเครื่องบดจนเป็นผงละเอียด แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรง นำผงเปลือกไม้เคี่ยม 30 กรัม มาสกัดด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในเครื่องสกัด (Soxhlet extraction apparatus) ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 6 ชั่วโมง จนกระทั่งสีของสารสกัดในคอลัมน์ของเครื่องสกัดใส นำสารสกัดที่ได้มาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) จนกระทั่งสารสกัดมีปริมาตรประมาณ 40 มิลลิลิตร เก็บสารสกัดในขวดแก้วทึบแสง

2. การวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม

การวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม ทำโดยวิธี paper chromatography โดยใช้ระบบที่ให้ตัวทำละลาย (solvent) เคลื่อนที่จากด้านบนลงมาด้านล่าง (one way descending system) ตามวิธีการของ Hathway, (1960) โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ

isopropanol : formic acid : water ในอัตราส่วน 2 : 5 : 5 โดยปริมาตร

ethyl acetate : formic acid : water ในอัตราส่วน 10 : 2 : 3 โดยปริมาตร

หลังจากผ่านขบวนการ นำกระดาษมาส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเลต จากนั้นทำเครื่องหมายตำแหน่งของจุด (spot) ที่เกิดขึ้น เพื่อทำการเปรียบเทียบค่า Rf ของสารที่แยกออกมากับ Rf ของสารละลายมาตรฐาน

สำหรับสารละลายมาตรฐานที่ใช้คือ แทนนิน (tannin) ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซนต์

3. การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม

3.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นเชื้อในการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล

โดยนำตัวอย่างน้ำส่าในถังหมักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 และ 32 ชั่วโมงตามลำดับ มาทำการเจือจางด้วยน้ำเกลือ (normal saline)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.85 เปอร์เซนต์ โดยทำตัวอย่างให้มีความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} และ 10^{-7}ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละความเจือจางมาทำ standard plate count แบบ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified MY agar (มีส่วนประกอบดังนี้ ยีสต์สกัด 3.0 กรัม มอลท์สกัด 3.0 กรัม เปปโตน 5.0 กรัม กากน้ำตาล 40 กรัม (น้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 2 เปอร์เซนต์) วุ้น 15.0 กรัม แคลเซียมคาร์บอเนท 15.0 กรัม แอมโมเนียม-ซัลเฟต 0.5 กรัม น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 6.8-7.0) โดยใช้ปิเปตปราศจากเชื้อดูดตัวอย่างใส่จานเพาะเชื้อ ซึ่งปราศจากเชื้อ 3 จาน โดยใส่จานละ 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อเขี่ยให้ตัวอย่างกระจายจนทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียที่สร้างกรดด้วย เก็บเชื้อไว้ใน modified MY agar slant เพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป

สำหรับเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบผลการยับยั้งด้วยสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม ได้แก่เชื้อที่ใช้ในการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น

- *Saccharomyces cerevisiae* Sc. 90
- *Saccharomyces cerevisiae* var. *burgundy*
- *Saccharomyces cerevisiae* var. *champange*
- *Saccharomyces cerevisiae* var. *montrachet*
- *Saccharomyces sp.* var. *sake*

นอกจากนี้ยังมีเชื้อยีสต์ *Saccharomyces chevarii* ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ที่พบมากในน้ำตาลเมา ได้รับมาจากหน่วยจุลชีววิทยา สถาบันวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัย-เกษตรศาสตร์

เชื้อยีสต์ทุกตัวเก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ด้วยสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม

ก่อนทดสอบต้องเตรียมเชื้อแบคทีเรียในอาหาร modified MY agar slant และเชื้อยีสต์ในอาหาร PDA อายุ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำเป็นสารละลายเชื้อด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 5 มิลลิลิตร

ในขณะเดียวกัน เทอาหารเลี้ยงเชื้อ modified MY agar สำหรับแบคทีเรียและ PDA สำหรับเชื้อยีสต์ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้จนผิวหน้าของอาหารแห้งสนิท

ปลูกเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ โดยใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้เชื้อละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในอาหารของมัน จากนั้นกระจายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าของอาหารด้วยแท่งแก้ว แล้วจึงใช้ paper disc (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.0 มิลลิเมตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จุ่มสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม (แล้วเสด็ดให้แห้ง) วางทับบนผิวหน้าของเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงใช้ paper disc จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ และนำกลับที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว วางทับบนผิวหน้าเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อเดียวกันตามลำดับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูบริเวณของการยับยั้ง (inhibition zone)

4. การหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลโดยการเติมเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม

4.1 ปริมาณของเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดที่เหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล

4.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ โดยปลูกเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* Sc. 90 บนอาหาร PDA slant บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงถ่ายเชื้อลงในอาหารกากน้ำตาล ซึ่งเตรียมโดยละลายกากน้ำตาลให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5 เปอร์เซนต์ และเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซนต์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

การเตรียมกากน้ำตาล ก่อนอื่นต้องนำกากน้ำตาลมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Lane และ Eynon (AOAC, 1975)(ภาคผนวก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การหมักโดยการเติมกากน้ำตาลให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 15-18 เปอร์เซนต์ และเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซนต์ ปรับพีเอชเท่ากับ 4.5 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อยีสต์จากข้อ 4.1.1 ลงในกากน้ำตาลทันทีที่เตรียมเสร็จ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.1.3 การหมักที่เติมเปลือกไม้เคี่ยม โดยเติมเปลือกไม้ที่บดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 5.0 เปอร์เซนต์ (โดยปริมาตร) ที่ชั่วโมงที่ 8 ของการหมัก เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 32 เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการหมัก

4.1.4 การหมักที่เติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม โดยเติมสารสกัดในปริมาณ 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 5.0 เปอร์เซนต์ (โดยปริมาตร) ที่ชั่วโมงที่ 8 ของการหมัก เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 32 เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการหมัก

4.1.5 การหมักเปรียบเทียบ โดยการหมักกากน้ำตาลเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 ปราศจากการเติมเปลือกไม้เคี่ยมหรือสารสกัด เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 32 เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการหมัก

4.1.6 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการหมักของน้ำหมัก (ภาคผนวก) ได้แก่

ก. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Lane และ Eynon (AOAC, 1975)

ข. ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่อง Ebulliometer

ค. พีเอช โดยเครื่องวัดพีเอช (pH meter)

ง. ตรวจนับเซลล์ยีสต์ โดยใช้ haemacytometer

4.2 เวลาที่เหมาะสมในการเติมเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดในการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล

4.2.1 เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ กากน้ำตาล และทำการหมักเช่นเดียวกับข้อ 4.1.1 และ 4.1.2

4.2.2 เติมเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 ในชั่วโมงที่ 8, 16, และ 24 ของการหมัก เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 28 เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการหมัก

4.2.3 การหมักเปรียบเทียบเช่นเดียวกับข้อ 4.1.5 และทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการหมักของน้ำหมักเช่นเดียวกับข้อ 4.1.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การเปรียบเทียบผลของการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลที่เติมเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดในปริมาณและเวลาที่เหมาะสม

4.3.1 เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ กากน้ำตาล และทำการหมักเช่นเดียวกับข้อ 4.1.1 และ 4.1.2 โดยเติมเปลือกไม้และสารสกัดในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 และเติมลงไปในเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 4.2 เปรียบเทียบการหมักกับการหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดเช่นเดียวกับข้อ 4.1.5 เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 และ 36 ชั่วโมง

การหมักทำในขวดหมักขนาด 10 ลิตร ใช้น้ำหมักปริมาตร 8 ลิตร

4.3.2 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของน้ำหมักเช่นเดียวกับข้อ 4.1.6

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

1. การสกัดสารจากเปลือกไม้เคี่ยม

ในการสกัดสารจากเปลือกไม้สามารถใช้สารเคมีในการสกัดได้หลายชนิดด้วยกัน เช่นเมธานอล, เอธานอล และเอธิล อะซิเตท (ethyl acetate) เป็นต้น แต่จากการศึกษาของ Faparusi และ Bassir (1972) พบว่า เมธานอลให้ผลในการสกัดเปลือกไม้ *Saccoglottis gabonensis* สำหรับยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ เอธานอล และเอธิล อะซิเตท ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Siekel (1964) พบว่าเมธานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดที่ใช้ในการสกัดสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ออกมาจากพืชได้ดีที่สุด

สำหรับในการทดลองนี้ได้เลือกใช้เอธานอล 95 เปอร์เซนต์ สำหรับสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม (*Cotylelobium lanceolatum* craib) ทั้งนี้เนื่องจากเอธานอลให้ผลในการสกัดสารจากเปลือกไม้ได้ดีพอสมควร ประกอบกับเอธานอลไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ดังนั้นจึงสามารถประยุกต์ใช้สารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมด้วยเอธานอลในระหว่างการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์บางชนิดเช่นเดียวกับที่ Venkataramu และคณะ (1983) ได้ทดลองใช้สารสกัดจากไม้โอ๊ค ไม้สัก ไม้จันทน์ ซึ่งสกัดด้วยเอธานอล เติมลงไปในบรั่นดีเพื่อลดความกระด้างของบรั่นดี

2. การวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม

การวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมด้วยวิธี paper - chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ isopropanol : formic acid : water อัตราส่วน 2 : 5 : 5 (โดยปริมาตร) และ ethyl acetate : formic acid : water อัตราส่วน 10 : 2 : 3 (โดยปริมาตร) ผลของการแยกสารสกัดโดยพิจารณาจากค่า Rf ของสารที่แยกเปรียบเทียบกับค่า Rf ของแทนนิน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ แสดงอยู่ในตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดแรกให้ผลของการแยกส่วนประกอบของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมได้ชัดเจนและดีกว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดที่สองซึ่งไม่สามารถแยกส่วนประกอบของสารสกัดออกมาได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

101431

ตารางที่ 3 การแยกสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมด้วยวิธี paper chromatography

ตัวทำละลายที่ใช้	Rf[1]		
	จุดที่ 1	จุดที่ 2	แทนนิน[2]
isopropanol : formic acid : water = 2 : 5 : 5 (V/V)	0.81	0.89	0.76
ethyl acetate : formic acid : water = 10 : 2 : 3 (V/V)	1.0	1.0	0.84

1) Rf คิดจากระยะทางที่สารสกัดเคลื่อนที่หารด้วยระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

2) แทนนิน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ ใช้เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ

ตารางที่ 4 ปริมาณแทนนินในเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมด้วยเอธานอล

	ปริมาณแทนนิน[1]
เปลือกไม้เคี่ยม[2]	4.83
สารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมด้วยเอธานอล[3]	10.6

1) คิดเป็นเปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของเปลือกไม้เคี่ยม

2) และ 3) ใช้วิธีการวิเคราะห์ที่ดัดแปลงจาก AOAC (1980)

3) นำตัวอย่างมาต้มไล่เอธานอลเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

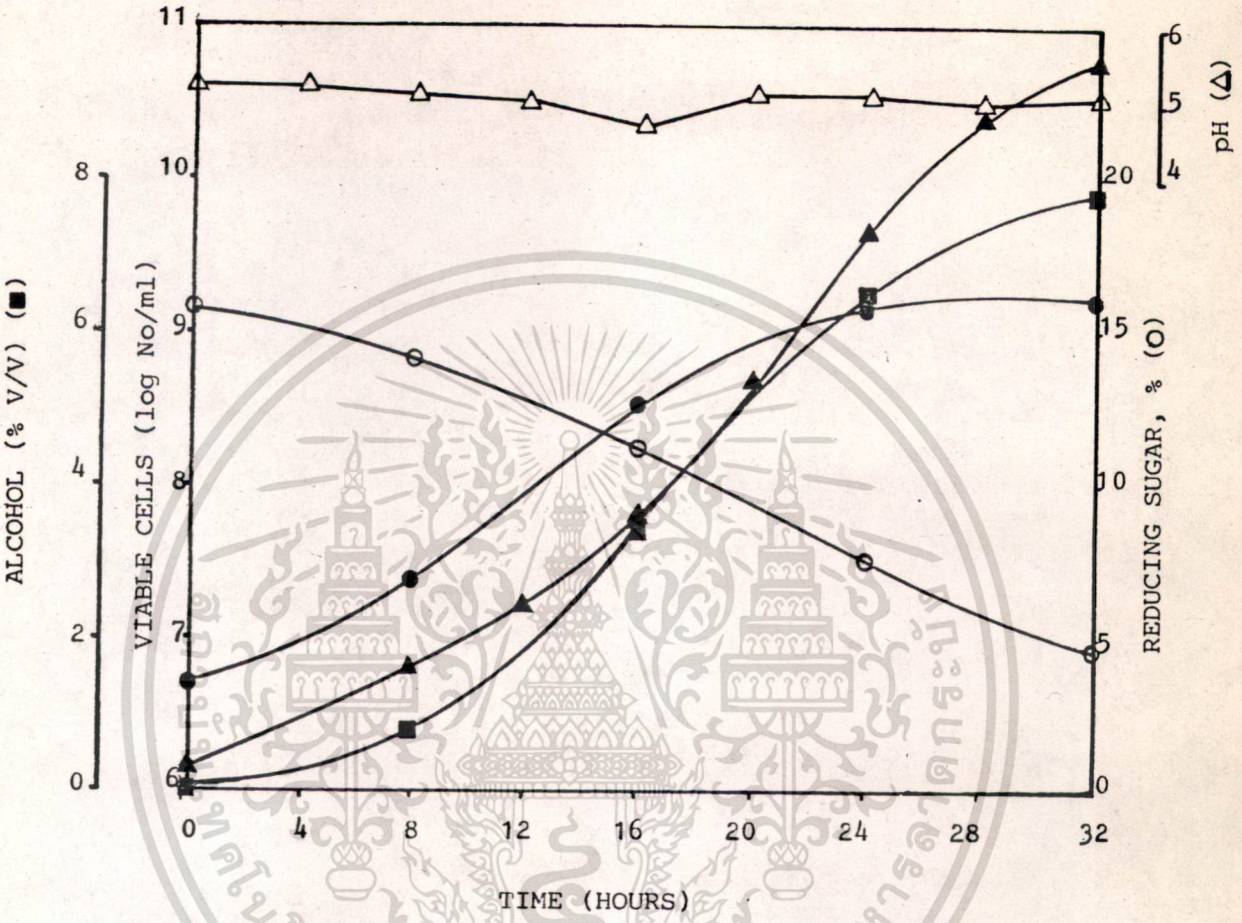
การแยกส่วนประกอบของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมด้วยตัวทำละลาย isopropanol : formic acid : water อัตราส่วน 2 : 5 : 5 (โดยปริมาตร) พบว่าสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมถูกแยกออกมาได้ 2 ส่วน โดยส่วนแรกมีค่า Rf ใกล้เคียงกับของแทนนิน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ อย่างมากและอีกส่วนหนึ่งมีค่า Rf มากกว่าของแทนนิน ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าสารที่แยกออกมาจากสารสกัด มีส่วนประกอบเป็นแทนนินอยู่ส่วนหนึ่ง ในขณะเดียวกันควรจะมีสารประกอบอื่นเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยเช่นกัน

จากการวิเคราะห์หาปริมาณแทนนินในเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดจากเปลือกไม้ด้วยเอธานอล โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการพลังงาน ผลของการวิเคราะห์แสดงอยู่ในตารางที่ 4 พบว่าในเปลือกไม้เคี่ยมมีปริมาณแทนนินเท่ากับ 4.83 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนัก) ขณะที่ในสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมมีปริมาณแทนนินเท่ากับ 10.6 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนัก) เมื่อเทียบกับน้ำหนักของเปลือกไม้เคี่ยมที่ใช้สารสกัด จากผลการวิเคราะห์นี้สอดคล้องกับการวิเคราะห์แยกส่วนประกอบด้วยวิธี paper chromatography

3. การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม

3.1 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล ก่อนอื่นทำการหมักกากน้ำตาลด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc. 90 โดยละลายกากน้ำตาลให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 15 เปอร์เซนต์ และเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซนต์ ปรับพีเอชเท่ากับ 4.5 ผลของการหมักแสดงอยู่ในตารางที่ 2 พบว่าเชลล์เริ่มต้นของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc. 90 ประมาณ 7.2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้เซลล์ยีสต์สูงสุด 1.4×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในเวลา 20 ชั่วโมง และให้แอลกอฮอล์สูงสุด 7.8 เปอร์เซนต์ โดยปริมาตรเมื่อเวลาผ่านไป 30 ชั่วโมง ค่าพีเอชประมาณ 5.0 ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนเข้ามาในระหว่างการหมักนั้น ปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในช่วงเริ่มต้นการหมักมีประมาณ 1.6×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ต่อจากนั้นจะเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อย ๆ จนถึง 7.5×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 30 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้รวดเร็วมากเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ แม้ว่าปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นจะต่ำกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *S.cerevisiae* Sc-90 (●) กับแบคทีเรีย (▲) ในการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หอสมุดกลาง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

สำหรับจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในระหว่างช่วงเวลาต่าง ๆ ของการหมักนั้นมีอยู่หลายชนิดด้วยกันดังแสดงอยู่ในภาพที่ 3 แบคทีเรียที่แยกมาจากน้ำหมักในช่วงเวลาต่าง ๆ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก นอกจากนี้ยังสามารถแยกแบคทีเรียเหล่านี้ได้เป็น 5 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังนี้ กลุ่มที่ 1 เซลมีรูปร่างเป็นท่อนต่อกันเป็นเส้นสายยาวได้แก่ แบคทีเรียระหัส 16.1 (เชื้อที่แยกจากน้ำหมักชั่วโมงที่ 16) กลุ่มที่ 2 เซลมีรูปร่างเป็นท่อนและมีสปอร์อยู่ด้านเดียวได้แก่แบคทีเรียระหัส 0.1, 4.1 กลุ่มที่ 3 เซลมีรูปร่างเป็นรูปไข่ได้แก่แบคทีเรียระหัส 4.2, 8.2, 8.4, 16.2, 20.1, 32.1 กลุ่มที่ 4 เซลมีรูปร่างกลมอยู่เป็นคู่ได้แก่ แบคทีเรียระหัส 8.1, 8.3 และกลุ่มที่ 5 เซลมีรูปร่างเป็นท่อนและมีสปอร์อยู่บริเวณหัว-ท้ายเซล ได้แก่แบคทีเรียระหัส 8.5, 12.1, 26.1

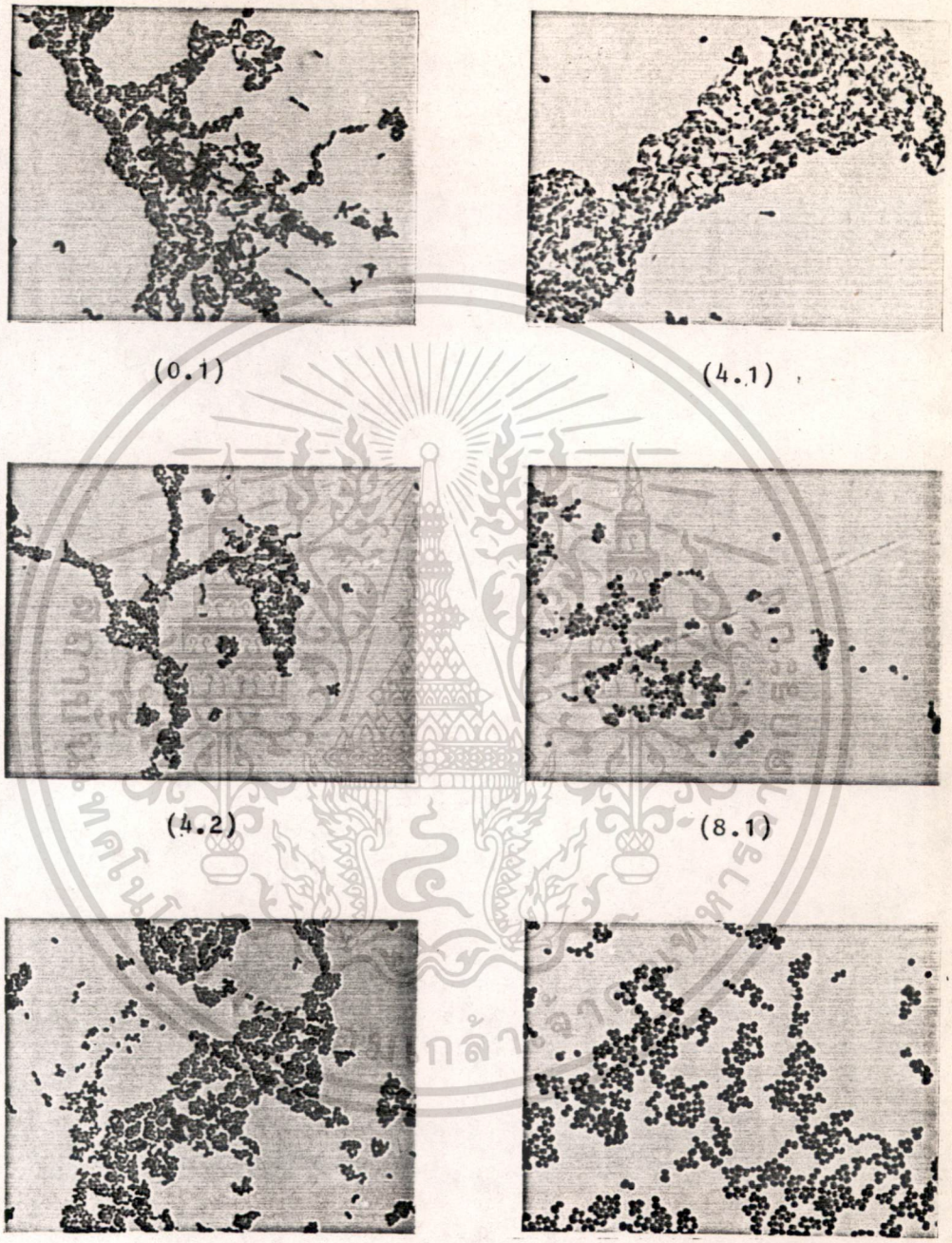
แบคทีเรียที่พบมากตลอดช่วงการหมักได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่มที่ 3 โดยพบตั้งแต่เริ่มต้นการหมักในชั่วโมงที่ 4, 8, 16, 20 และ 32 ตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดออกมาเป็นเชื้อในกลุ่มที่ 4 พบในชั่วโมงที่ 8

3.2 ผลการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ด้วยสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม จากตารางที่ 5 พบว่าสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซนต์ ให้ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลได้สูงกว่า เมื่อใช้เอธานอล 95 เปอร์เซนต์ แสดงว่าสารสกัดที่สกัดออกจากเปลือกไม้เคี่ยมมีสารชนิดอื่น เช่นแทนนิน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียนอกเหนือจากเอธานอล 95 เปอร์เซนต์ ที่ใช้ในการสกัดสาร

ผลของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 กลุ่ม ที่แยกได้จากข้อ 3.1 พบว่าเชื้อที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมมากที่สุดได้แก่ เชื้อในกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่สร้างกรดออกมาและเจริญเด่นในชั่วโมงที่ 8 ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการหมักโดยตรง ดังนั้นการที่สารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมให้ผลยับยั้งเชื้อกลุ่มนี้ได้สูง จึงน่าที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการหมักได้เพิ่มขึ้น

สำหรับผลของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมต่อเชื้อยีสต์ แสดงอยู่ในตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่าเอธานอล 95 เปอร์เซนต์ ที่ใช้ในการสกัดสารจากเปลือกไม้ให้ผลในการยับยั้งเชื้อยีสต์ทุกสายพันธุ์สูงกว่าสารสกัดจากเปลือกไม้ แสดงว่าสารที่สกัดออกมาจากเปลือกไม้มีผลต่อเซลยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



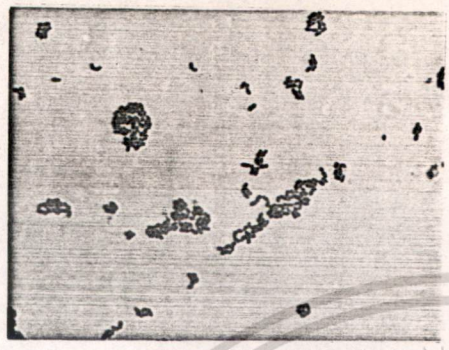
(0.1) (4.1)

(4.2) (8.1)

(8.2) (8.3)

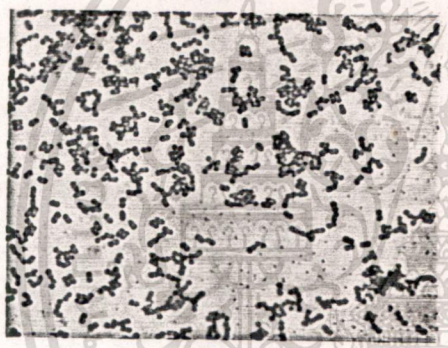
ภาพที่ 3 แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(8.4)

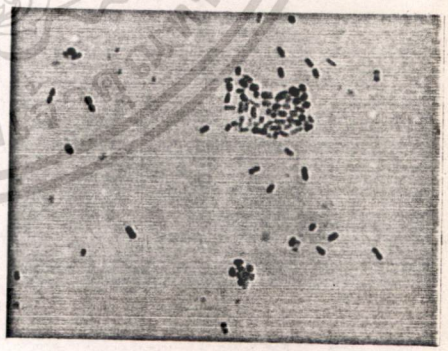
(8.5)



(12.1)

(16.1)

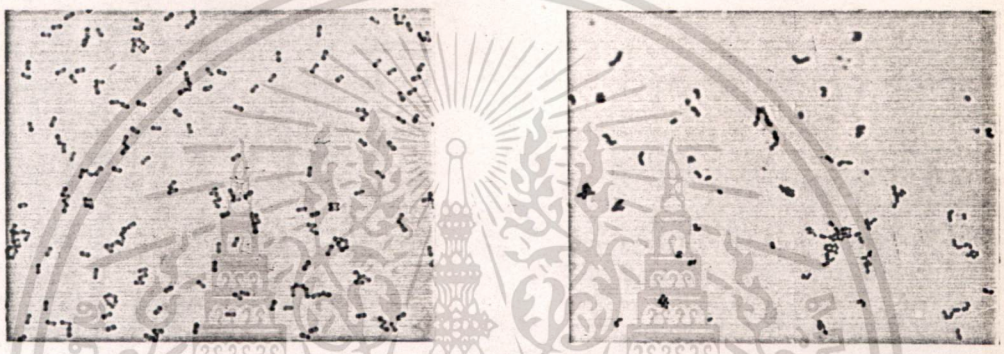
(16.2)



(20.1)

ภาพที่ 3 (ต่อ) แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(26.1) (32.1)

ภาพที่ 3 (ต่อ) แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม

กลุ่มของเชื้อ	ระหัสเชื้อ	ระยะของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)[1]		
		สารสกัด[2]	95%เอธานอล	น้ำกลั่น
1. เซลรูปร่างเป็นท่อนต่อกันเป็นเส้นสาย	16.1	9.0±1.0	8.0±7.5	-
2. เซลรูปร่างเป็นท่อนมีสปอร์อยู่ด้านเดียว	0.1	10.0±1.0	8.5±0.5	-
	4.1	13.0±0.5	8.0±0.5	-
3. เซลรูปไข่	4.2	11.0±1.0	8.5±0.5	-
	8.2	13.0±0.5	8.0±0.5	-
	8.4	11.0±1.0	9.0±1.0	-
	16.2	11.0±1.0	7.5±0.5	-
	20.1	9.0±1.0	7.0±0.5	-
	32.1	12.0±1.0	8.0±0.5	-
4. เซลรูปร่างกลม อยู่เป็นคู่	8.1	13.0±1.0	9.0±0.5	-
	8.3	14.0±1.0	8.0±0.5	-
5. เซลรูปร่างเป็นท่อนมีสปอร์อยู่หัว-ท้ายเซล	8.5	11.0±1.0	8.0±0.5	-
	12.1	9.0±0.5	8.0±1.0	-
	26.1	13.0±1.0	7.5±0.5	-

หมายเหตุ 1) ระยะของการยับยั้ง (inhibition zone) ใช้การวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของการยับยั้งเป็นหน่วยมิลลิเมตร และขนาดของแผ่น disc ที่ใช้ในการทดสอบเท่ากับ 7.0 มิลลิเมตร

2) สารสกัด คือสารสกัดเปลือกไม้เคี่ยม ซึ่งใช้เอธานอล 95 เปอร์เซนต์เป็นตัวสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ด้วยสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม

เชื้อยีสต์	ระยะของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
	สารสกัด	95%เอธานอล	น้ำกลั่น
Saccharomyces cerevisiae Sc-90[1]	13.0±0.5	13.5±0.5	8.0±0.5
S. cerevisiae var. *burgundy*[2]	13.0±0.5	14.0±0.5	8.5±0.5
S. cerevisiae var. *champagne*[2]	12.0±1.0	13.5±0.5	8.0±1.0
S. cerevisiae var. *montrachet*[2]	14.2±0.5	15.0±0.5	8.0±0.5
S. sake[3]	12.7±0.5	14.0±0.5	-
S. chevarii[4]	12.0±1.0	13.5±0.5	8.0±1.0

หมายเหตุ 1) เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักแอลกอฮอล์
2) เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์
3) เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักสาเก
4) เชื้อยีสต์ที่มีผลในการทำน้ำตาลเมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้อยหรือสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซนต์ สามารถลดความเป็นพิษของเอธานอล (แอลกอฮอล์) ต่อเชื้อยีสต์ลงได้บ้าง แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซนต์ ยังคงมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ด้วย

4. การหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลโดยการเติมเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม

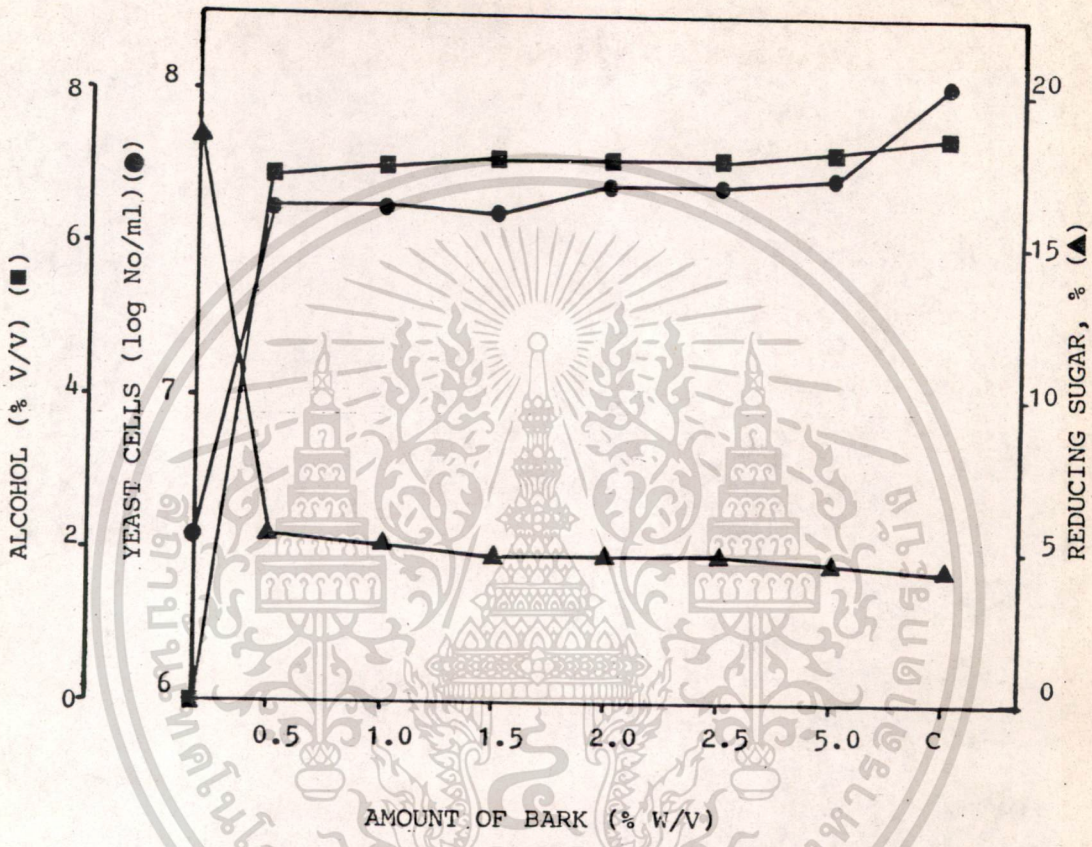
4.1 ผลของปริมาณของเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดในปริมาณต่าง ๆ ลงในการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล

ผลของการเติมเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดในปริมาณต่าง ๆ ลงในน้ำหมักซึ่งเตรียมจากกากน้ำตาลให้มีน้ำตาลรีดิวซ์ 18.5 เปอร์เซนต์ เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซนต์ ปรับพีเอช 5.2 และมีจำนวนเซลยีสต์ *S. cerevisiae* Sc. 90 เริ่มต้น 5.4×10^6 เซลต่อมิลลิลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 32 ชั่วโมง ทั้งมีเติมเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดในชั่วโมงที่ 8 ของการหมัก ผลของการหมักแสดงอยู่ในภาพที่ 4 และ 5

ในกรณีของการเติมเปลือกไม้เคี่ยมในปริมาณต่าง ๆ ที่ชั่วโมงที่ 8 พบว่าในชั่วโมงที่ 32 ผลของการหมักที่เติมเปลือกไม้เคี่ยม 5 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ได้เซลยีสต์สูงสุด 7.0×10^7 เซลต่อมิลลิลิตร และแอลกอฮอล์สูงสุด 7.2 เปอร์เซนต์ (โดยปริมาตร) ในขณะที่การเติมเปลือกไม้ปริมาณ 1.5, 2.0 และ 2.5 เปอร์เซนต์ ทำให้ได้จำนวนเซลยีสต์และแอลกอฮอล์ที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบผลการหมักที่ได้จากน้ำหมักที่เติมเปลือกไม้เคี่ยม 5.0 เปอร์เซนต์ กับน้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เคี่ยมพบว่าในน้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เคี่ยมให้จำนวนเซลยีสต์และปริมาณแอลกอฮอล์สูงกว่าเล็กน้อย

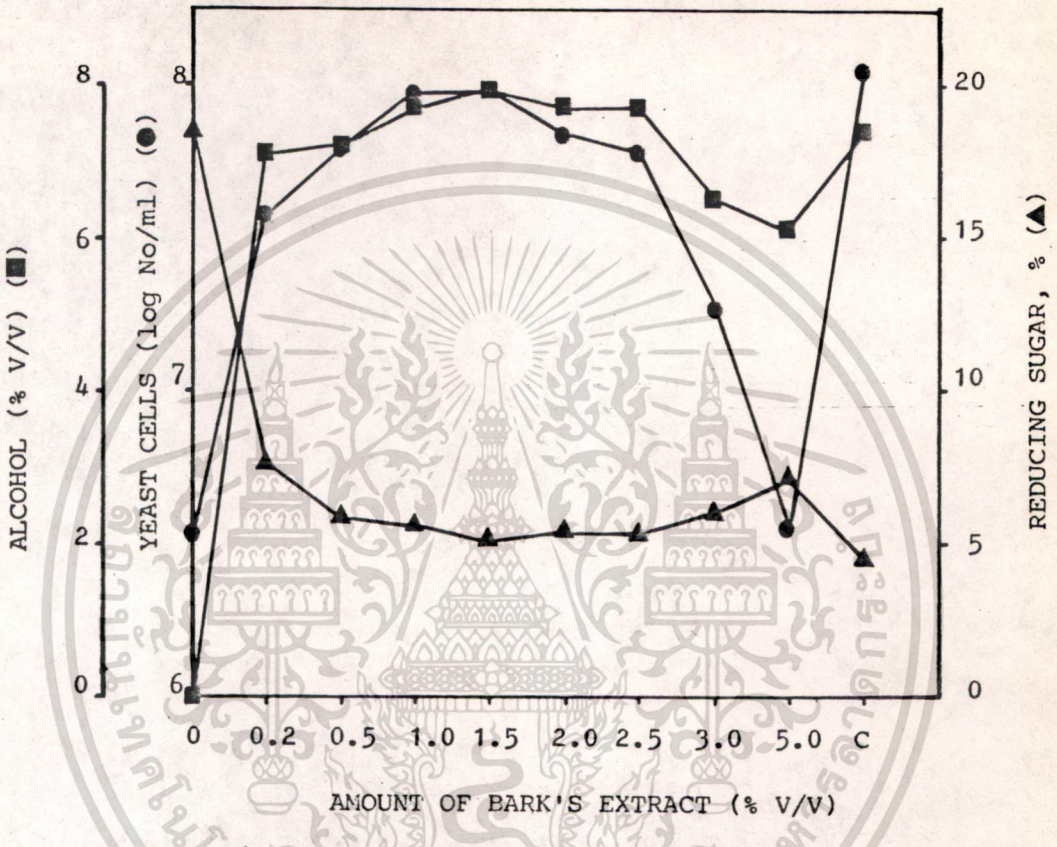
ส่วนในกรณีของการเติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมในปริมาณต่าง ๆ ที่ชั่วโมงที่ 8 พบว่าในชั่วโมงที่ 32 น้ำหมักที่เติมสารสกัด 1.5 เปอร์เซนต์ของน้ำหมักได้เซลยีสต์สูงสุด 9.6×10^7 เซลต่อมิลลิลิตร และปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด 7.9 เปอร์เซนต์ สำหรับการเติมสารสกัดในปริมาณที่มากกว่า 2.5 เปอร์เซนต์ขึ้นไปจะมีผลยับยั้งเซลยีสต์อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเติมสารสกัดปริมาณ 5.0 เปอร์เซนต์ ทำให้จำนวนเซลยีสต์ลดลงจนใกล้เคียงกับจำนวนเซลยีสต์ในช่วงเริ่มต้น อย่างไรก็ตามยังคงมีการหมักอยู่บ้าง แต่ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ได้อยู่ในเกณฑ์ต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 ผลของเปลือกไม้เคี่ยมต่อการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล ด้วยเชื้อ *S.cerevisiae* sc-90 ในชั่วโมงที่ 32 โดยเปรียบเทียบกับน้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เคี่ยม (C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 ผลของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมต่อการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ *S.cerevisiae* Sc-90 ในชั่วโมงที่ 32 โดยเปรียบเทียบกับน้ำหมักที่ไม่เติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม (C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการเปรียบเทียบผลของการหมักที่ได้จากน้ำหมักที่เติมสารสกัด 1.5 เปอร์เซนต์ของน้ำหมักกับน้ำหมักที่ไม่เติมสารสกัดพบว่าในน้ำหมักที่เติมสารสกัด 1.5 เปอร์เซนต์ของน้ำหมักให้ปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สูงกว่าในน้ำหมักที่ไม่เติมสารสกัด แต่ปริมาณเซลยีสต์ในน้ำหมักที่ไม่เติมสารสกัดกลับสูงกว่า นั่นแสดงว่าเซลยีสต์ในน้ำหมักที่เติมสารสกัดถูกยับยั้งลงไปบางส่วน แต่เซลยีสต์ที่เหลือรอดจากการยับยั้งของสารสกัดกลับมีประสิทธิภาพในการหมักสูงขึ้นกว่าปกติจึงทำให้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สูงขึ้น

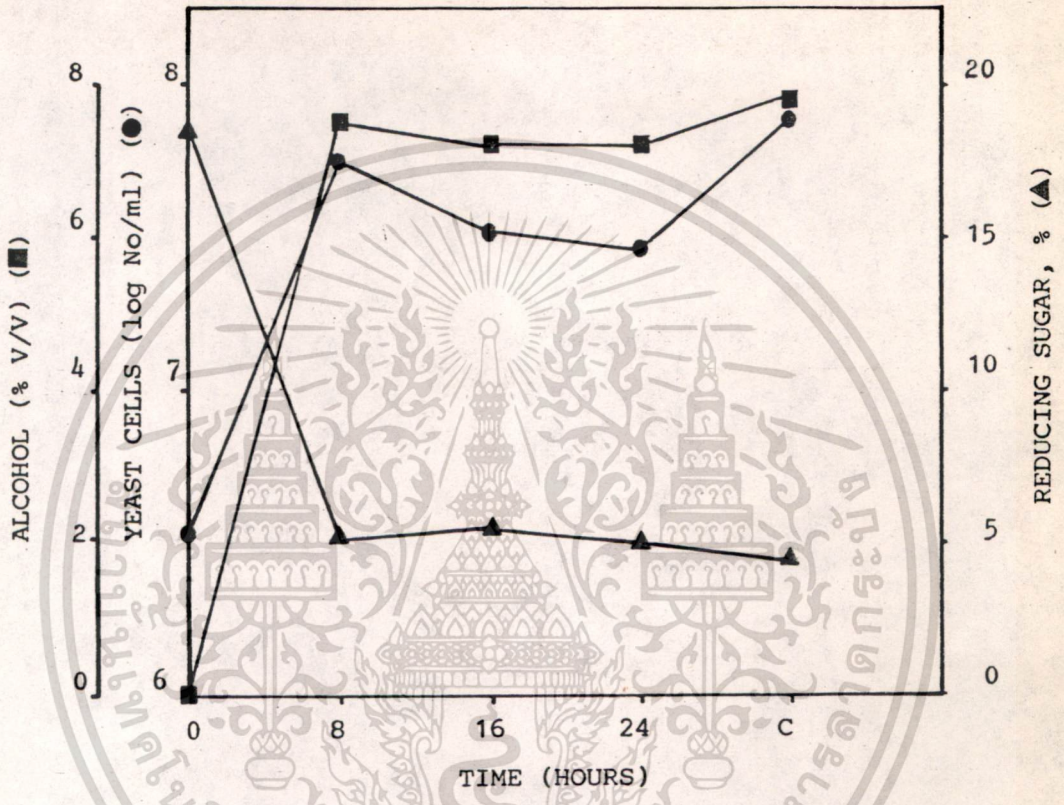
4.2 ผลของเวลาที่เหมาะสมในการเติมเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดในการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล

น้ำหมักที่ใช้มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 18.5 เปอร์เซนต์ พีเอช 5.2 และมีเซลยีสต์ *S. cerevisiae* Sc-90 เริ่มต้นเท่ากับ 5.3×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการเติมเปลือกไม้เคี่ยมปริมาณ 5 เปอร์เซนต์ของน้ำหมัก และเติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมปริมาณ 1.5 เปอร์เซนต์ของน้ำหมักลงไปในน้ำหมัก ลงไปในน้ำหมักในช่วงเวลาต่าง ๆ ผลของการหมักแสดงอยู่ในภาพที่ 6 และ 7 ตามลำดับ

ในกรณีเติมเปลือกไม้เคี่ยมลงในน้ำหมักพบว่าการเติมเปลือกไม้ลงในน้ำหมักในชั่วโมงที่ 8 ให้ได้ปริมาณเซลยีสต์สูงสุด 7.5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและได้แอลกอฮอล์สูงสุด 7.5 เปอร์เซนต์ หลังจากสิ้นสุดการหมักที่ชั่วโมงที่ 32 แล้ว อย่างไรก็ตามผลของการทดลองทั้งปริมาณเซลยีสต์และความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำหมักที่เติมเปลือกไม้ลงไปในชั่วโมงที่ 8 ต่ำกว่าในน้ำหมักที่ไม่ได้เติมเปลือกไม้ลงไปเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากผลของสารในเปลือกไม้ซึ่งถูกแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักสกัดออกมานั่นเอง

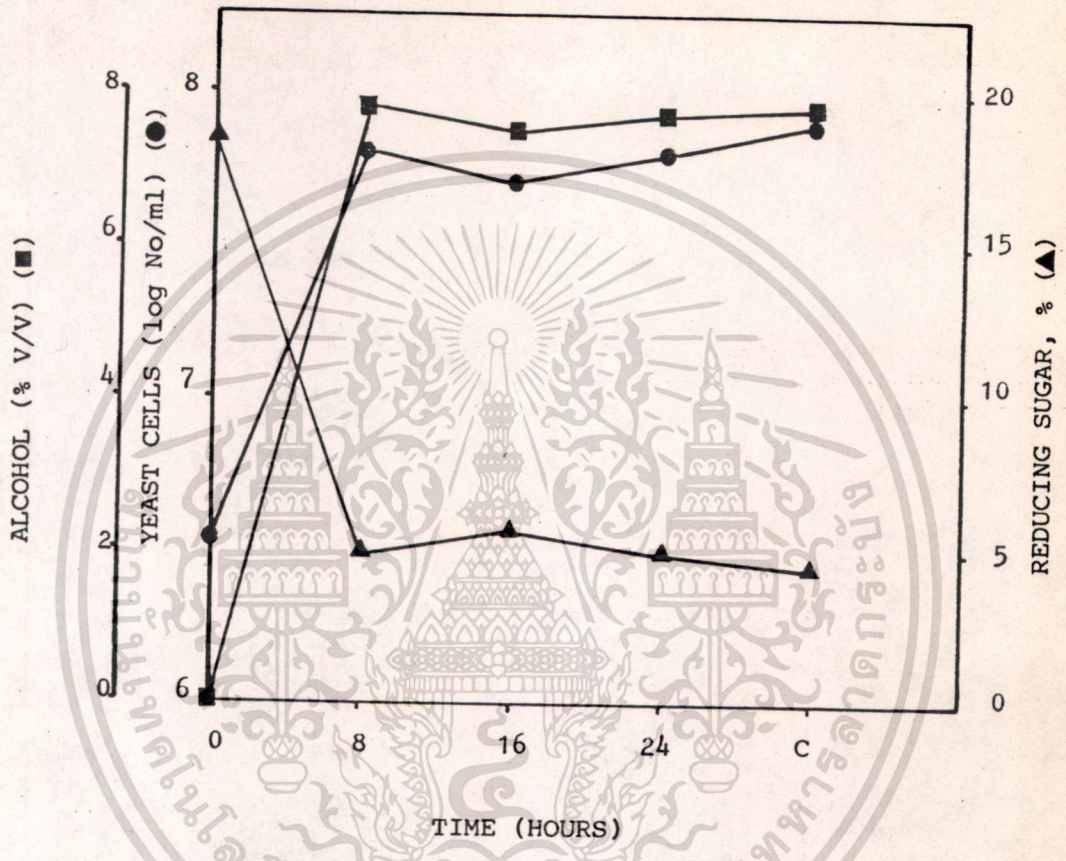
ส่วนในกรณีเติมสารสกัดลงในน้ำหมัก พบว่าการเติมสารสกัดลงในน้ำหมักในชั่วโมงที่ 8 ทำให้เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ชั่วโมงที่ 32 แล้วได้ปริมาณเซลยีสต์สูงสุด 8.0×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และได้แอลกอฮอล์สูงสุด 7.8 เปอร์เซนต์ ซึ่งสูงกว่าการเติมสารสกัดลงในน้ำหมัก ในชั่วโมงที่ 24 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนี้แล้วในน้ำหมักที่เติมสารสกัดในชั่วโมงที่ 8 ให้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ เมื่อสิ้นสุดการหมักเท่ากับในน้ำหมักที่ไม่ได้เติมสารสกัดลงไป ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณเซลยีสต์ต่ำกว่าในน้ำหมักที่ไม่ได้เติมสารสกัดเลยก็ตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 เวลาที่เหมาะสมในการเติมเปลือกไม้เคี่ยม ปริมาณ 5 เปอร์เซนต์ของน้ำหมักต่อการหมักแอลกอฮอล์จากกาก น้ำตาลด้วยเชื้อ *S.cerevisiae* Sc-90 ในชั่วโมงที่ 32 โดยเปรียบเทียบกับน้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เคี่ยม (C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 เวลาที่เหมาะสมในการเติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม ปริมาณ 1.5 เปอร์เซนต์ของน้ำหมักต่อการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ *S.cerevisiae* Sc-90 ในชั่วโมงที่ 32 โดยเปรียบเทียบกับน้ำหมักที่ไม่เติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม (C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

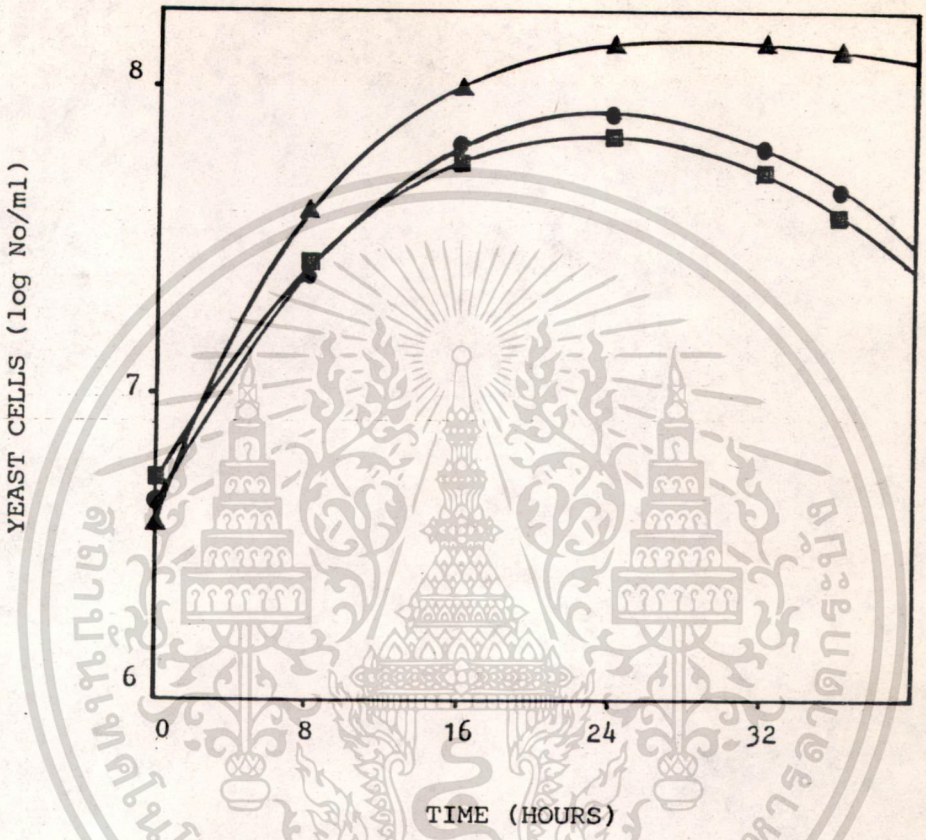
4.3 ผลของการเปรียบเทียบผลการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลที่เติมเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดในปริมาณและเวลาที่เหมาะสม

น้ำหมักที่ใช้เตรียมโดยละลายกากน้ำตาลให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 18.7 เบอร์เซนต์ ปรับพีเอช 5.2 และมีปริมาณเซลยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 6.8×10^7 เซลต่อมิลลิลิตร ผลของการหมักในน้ำหมักที่เติมเปลือกไม้เคี่ยมปริมาณ 5 เปอร์เซนต์ของน้ำหมักที่ชั่วโมงที่ 8 และในน้ำหมักที่เติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมปริมาณ 1.5 เปอร์เซนต์ของน้ำหมักที่ชั่วโมงที่ 8 เปรียบเทียบกับผลการหมักในน้ำหมักที่ไม่เติมทั้งเปลือกไม้เคี่ยมหรือสารสกัด แสดงอยู่ในภาพที่ 8, 9,และ 10

ปริมาณเซลยีสต์ (แสดงในภาพที่ 8) ในน้ำหมักของถังหมักทั้งสาม พบว่าภายใน 8 ชั่วโมงแรก เซลยีสต์เพิ่มจำนวนขึ้นมากอย่างเห็นได้ชัด แต่หลังจากที่เติมเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดลงไปในชั่วโมงที่ 8 แล้ว จำนวนเซลยีสต์ในถังหมักทั้งสองเพิ่มจำนวนขึ้นในอัตราที่ต่ำกว่าเซลยีสต์ในถังหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เคี่ยมหรือสารสกัด จนกระทั่งการหมักสิ้นสุดลง ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งถูกใช้ไปในระหว่างการหมัก (แสดงในภาพที่ 9) ในถังหมักทั้งสามอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามสำหรับปริมาณแอลกอฮอล์ในถังหมักทั้งสาม (แสดงอยู่ในภาพที่ 10) พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ในถังหมักที่เติมสารสกัดสูงกว่าในน้ำหมักที่เติมเปลือกไม้เคี่ยม แต่ปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักทั้งสองต่ำกว่าในน้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้และสารสกัดเพียงเล็กน้อย ทั้งที่ปริมาณเซลยีสต์ในน้ำหมักทั้งสองต่ำกว่าในน้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดมากก็ตาม

สำหรับแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำหมักแสดงอยู่ในภาพที่ 11 พบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 8 ในน้ำหมักที่เติมสารสกัด 1.5 เปอร์เซนต์ มีแบคทีเรียปนเปื้อนต่ำกว่าในน้ำหมักที่เติมเปลือกไม้เคี่ยม นั่นแสดงว่าสารสกัดที่เติมลงไปให้ผลยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าเปลือกไม้เคี่ยม อย่างไรก็ตามภายหลังจากชั่วโมงที่ 16 ขึ้นไป กลับมีแบคทีเรียเพิ่มจำนวนขึ้นมา จนกระทั่งในที่สุดการหมักปริมาณของแบคทีเรียสูงใกล้เคียงกับในน้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เคี่ยมหรือสารสกัดเลย ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าการยับยั้งแบคทีเรียด้วยสารสกัดหรือเปลือกไม้ให้ผลในช่วงระยะเวลาจำกัด ประกอบกับจากที่ศึกษามาพบว่าแบคทีเรียที่เจริญขึ้นในแต่ละช่วงของการหมักมีหลายชนิดและเจริญเด่นขึ้นมาในแต่ละช่วงจึงทำให้จำนวนแบคทีเรียในช่วงชั่วโมงที่ 16 ขึ้นไป จึงกลับมีจำนวนเพิ่มสูงอีกครั้ง อย่างไรก็ตามแบคทีเรียดังกล่าวให้ผลเสียต่อการหมักไม่มากนักจึงทำให้การหมักดำเนินไปตามปกติจนสิ้นสุดการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



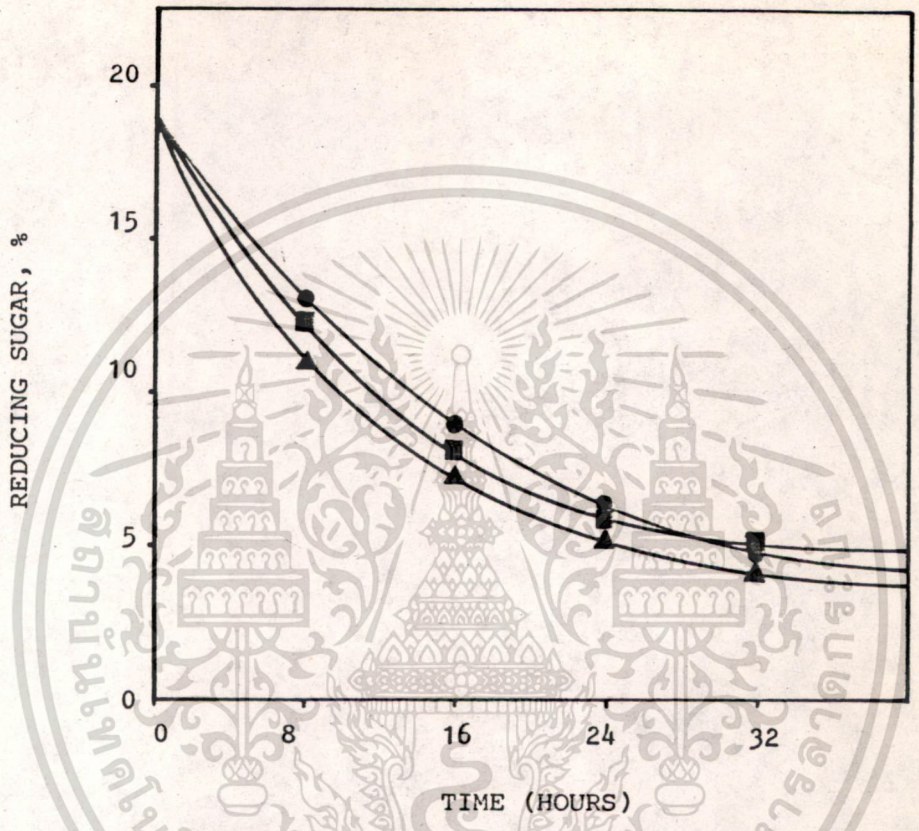
ภาพที่ 8 ปริมาณเซลยีสต์ *S.cerevisiae* Sc-90 ในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล

●—● น้ำหมักที่เติมสารสกัด 1.5 เปอร์เซนต์ ในชั่วโมงที่ 8

■—■ น้ำหมักที่เติมเปลือกไม้เคี่ยม 5.0 เปอร์เซนต์ ในชั่วโมงที่ 8

▲—▲ น้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เคี่ยมหรือสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



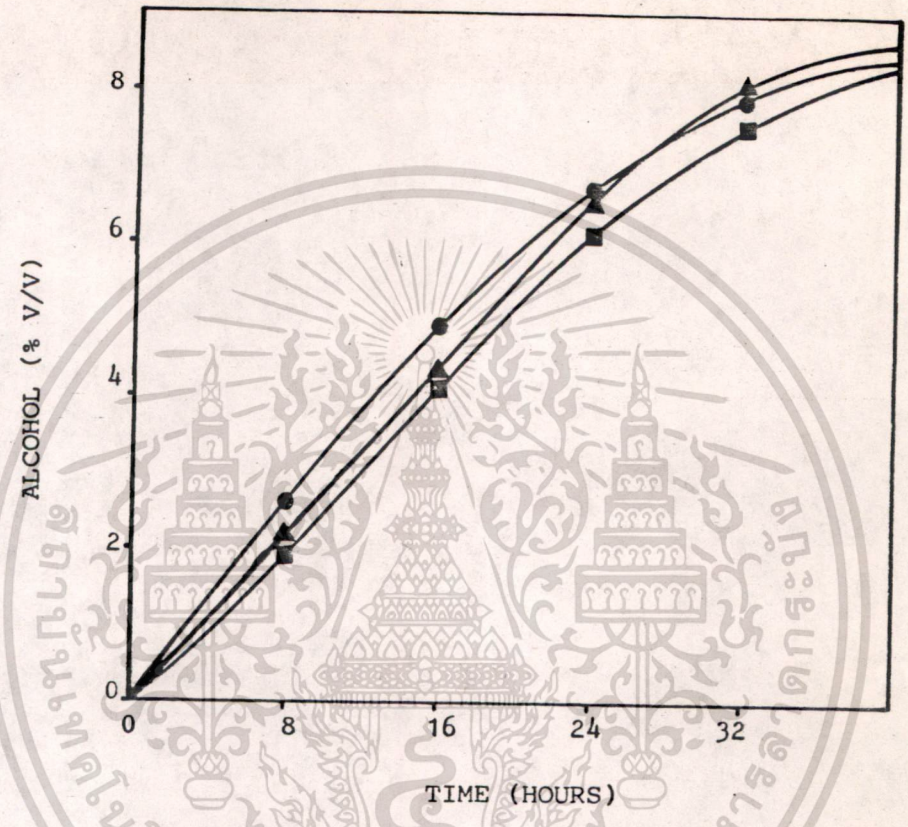
ภาพที่ 9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในน้ำหมักระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ *S.cerevisiae* Sc-90

●—● น้ำหมักที่เติมสารสกัด 1.5 เปอร์เซนต์ในชั่วโมงที่ 8

■—■ น้ำหมักที่เติมเปลือกไม้เคี่ยม 5.0 เปอร์เซนต์ในชั่วโมงที่ 8

▲—▲ น้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เคี่ยมหรือสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



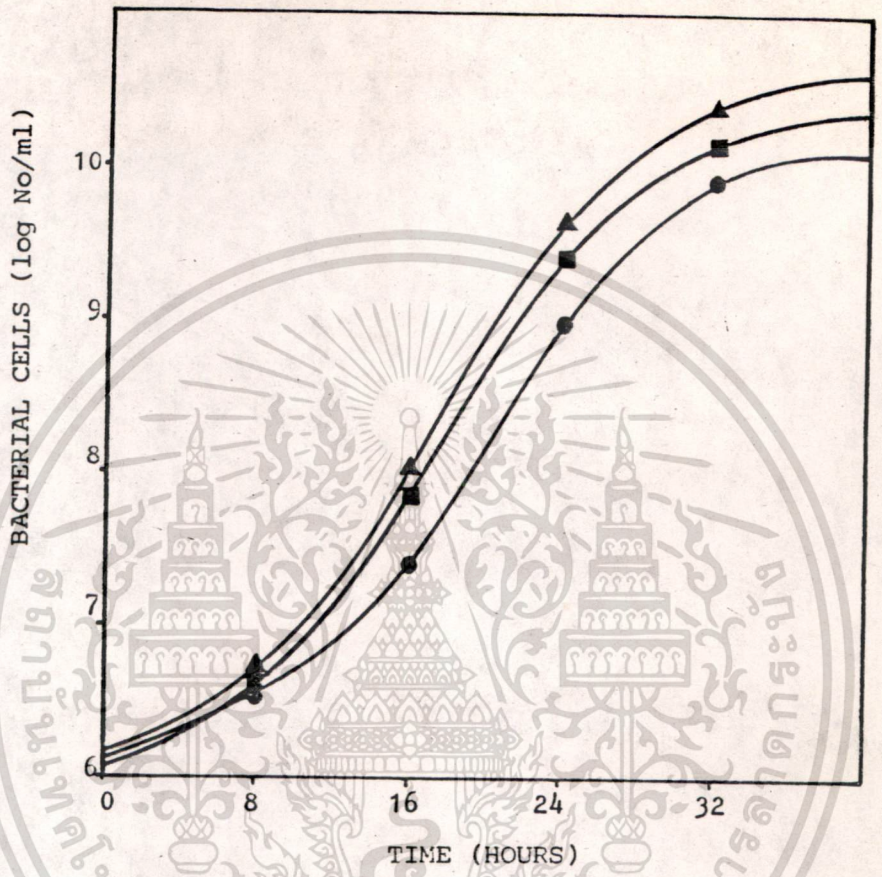
ภาพที่ 10 ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ *S.cerevisiae* Sc-90

●—● น้ำหมักที่เติมสารสกัด 1.5 เปอร์เซนต์ ในชั่วโมงที่ 8

■—■ น้ำหมักที่เติมเปลือกไม้เคี่ยม 5.0 เปอร์เซนต์ ในชั่วโมงที่ 8

▲—▲ น้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เคี่ยมหรือสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 ปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ *S.cerevisiae* Sc-90

●—● น้ำหมักที่เติมสารสกัด 1.5 เปอร์เซนต์ ในชั่วโมงที่ 8

■—■ น้ำหมักที่เติมเปลือกไม้เคี่ยม 5.0 เปอร์เซนต์ ในชั่วโมงที่ 8

▲—▲ น้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เคี่ยมหรือสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมโดยใช้วิธี paper chromatography และได้ใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด จะเห็นได้ว่าตัวทำละลายที่ประกอบด้วย isopropanol : formic acid : water อัตราส่วน 2 : 5 : 5 (โดยปริมาตร) สามารถแยกส่วนประกอบของสารสกัดออกชัดเจนกว่าตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งประกอบด้วย ethylacetate : formic acid : water อัตราส่วน 10 : 2 : 3 (โดยปริมาตร) และจากผลการวิเคราะห์โดยใช้ตัวทำละลายชนิดแรก จะเห็นได้ว่าค่า Rf ของสารสกัดมีส่วนหนึ่งใกล้เคียงกับ Rf ของแทนนิน ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน ดังนั้นจึงแสดงว่าภายในสารสกัดมีแทนนินเป็นองค์ประกอบและยังต้องมีสารชนิดอื่นเป็นส่วนประกอบอีกด้วย ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับ Faparusi และ Bassir (1972) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์สารที่มีอยู่สารสกัดจากเปลือกไม้ *Saccoglottis gabonensis* โดยวิธี paper chromatography พบว่านอกจากมีแทนนินแล้วยังอาจมีสารอื่น อาทิเช่น สารปฏิชีวนะ เป็นต้น

ผลของการวิเคราะห์หาปริมาณของแทนนินในเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม พบว่าปริมาณของแทนนินในสารสกัดมากกว่าในเปลือกไม้ประมาณ 1.2 เท่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้เอธานอล 95 เปอร์เซนต์ เป็นตัวทำละลายในการสกัด นอกจากนี้ยังใช้เวลาในการสกัดประมาณ 6 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นอีก ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณสารที่สกัดออกมามีมากขึ้น ซึ่งต่างจากวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ตาม AOAC (1980) ซึ่งใช้เวลาในการสกัดเพียง 2 ชั่วโมง อีกทั้งยังใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด จึงทำให้ปริมาณสารที่ถูกสกัดออกมายิ่งต่างกันมากขึ้น ดังจะเห็นจากที่ Siekel (1964) ได้กล่าวว่าในการสกัดสารพวกสารประกอบฟีนอลออกมาจากพืช ควรใช้ตัวทำละลายพวก แอลกอฮอล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมธานอลหรือเอธานอล

จากการติดตามผลของการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล โดยเฉพาะเชื้อยีสต์และแบคทีเรีย จะเห็นได้ว่าในช่วง 8 ชั่วโมงแรก เซลยีสต์มีการเจริญเพิ่มจำนวนในอัตราสูงและกำลังเจริญอยู่ในช่วง logarithmic phase ในขณะที่ในช่วงเวลาดังกล่าวแบคทีเรียยังมีการเพิ่มจำนวนในอัตราต่ำแสดงว่าแบคทีเรียกำลังอยู่ในช่วงการปรับตัวให้เหมาะสมในการเจริญเติบโตของมัน ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงกำหนดให้มีการเติมเปลือกไม้เคี่ยมหรือสารสกัดในชั่วโมงที่ 8 ของการหมัก ทั้งนี้เพื่อให้มีผลต่อแบคทีเรียมากกว่าเซลยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียที่คัดเลือกได้แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม พบว่าแบคทีเรียในกลุ่มที่มีรูปร่างเป็นรูปไข่ (oval shape) และติดสีแกรมบวก เป็นกลุ่มที่สำรวจพบมากที่สุดทั้งในชั่วโมงที่ 4, 8, 16, 20 และ 32 ดังนั้นจึงแสดงว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถทนต่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ได้ดีพอสมควร อย่างไรก็ตามแบคทีเรียในกลุ่มนี้จัดเป็นกลุ่มที่ไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อการหมักแอลกอฮอล์มากนัก ส่วนเชื้อที่ก่อให้เกิดปัญหาต่อการหมักเป็นเชื้อที่สร้างกรดออกมาสู่น้ำหมักทำให้ระดับพีเอชของน้ำหมักเปลี่ยนแปลงไป และถ้ามีแบคทีเรียกลุ่มนี้มากจะทำให้เชลยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ ทำให้ผลการหมักได้แอลกอฮอล์ต่ำลงไป ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้สารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเหล่านั้นในน้ำหมัก

การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ด้วยสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมเปรียบเทียบกับการยับยั้งด้วยแอลกอฮอล์ (เอธานอล 95 เปอร์เซนต์) เพื่อทดสอบว่าผลของการยับยั้งนั้นเนื่องมาจากสารสกัดหรือจากแอลกอฮอล์ ทั้งนี้เพราะการที่ใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายในการสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมให้ผลยับยั้งแบคทีเรียสูงกว่าแอลกอฮอล์ นั่นแสดงว่าสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมซึ่งมีสารต่าง ๆ เช่นแทนนินให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียได้จริง อย่างไรก็ตามสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมให้ผลในการยับยั้งเชลยีสต์เช่นกัน แต่ผลของการยับยั้งต่ำกว่าเมื่อใช้แอลกอฮอล์ซึ่งแสดงว่าสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมกลับมีส่วนช่วยลดความเป็นพิษของแอลกอฮอล์ต่อเชลยีสต์

จากการเติมเปลือกไม้เคี่ยมและสารสกัดในปริมาณต่าง ๆ ลงในน้ำหมักในชั่วโมงที่ 8 พบว่าในกรณีการเติมเปลือกไม้เคี่ยมจะให้ผลการหมักค่อนข้างใกล้เคียงกันและไม่ค่อยแน่นอน ทั้งนี้อาจเนื่องจากการสกัดสารออกจากเปลือกไม้เคี่ยมด้วยแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักไม่ดีพอและไม่ค่อยแน่นอน อย่างไรก็ตามปริมาณของเปลือกไม้เคี่ยม 5.0 เปอร์เซนต์ เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่จะใช้เติม ส่วนในกรณีของการเติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมพบว่าน้ำหมักที่เติมสารสกัด 1.0 และ 1.5 เปอร์เซนต์ มีจำนวนเชลยีสต์สูงสุด แต่ยังต่ำกว่าจำนวนเชลยีสต์ในน้ำหมักที่ไม่เติมสารสกัด ทั้งนี้เนื่องจากผลของการยับยั้งเชลยีสต์ส่วนหนึ่งด้วยสารสกัดที่เติมลงไปนั่นเอง สำหรับปริมาณแอลกอฮอล์จากการหมักพบว่าในน้ำหมักที่เติมสารสกัด 1.5 เปอร์เซนต์ ให้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สูงกว่าในน้ำหมักที่เติมสารสกัด 1.0 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการใช้สารสกัด 1.5 เปอร์เซนต์ ให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียได้สูงกว่า ในขณะที่ให้ผลยับยั้งเชลยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้แล้วปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักที่เติมสารสกัด 1.5 เปอร์เซนต์ สูงกว่าในน้ำหมักที่ไม่เติมสารสกัด ทั้งที่มีจำนวนเซลยีสต์ต่ำกว่าทั้งนี้อาจเนื่องจากผลของแบคทีเรีย เพราะในน้ำหมักที่ไม่เติมสารสกัดมีแบคทีเรียปนเปื้อนสูงกว่า และแบคทีเรียนั้นใช้น้ำตาลไปบางส่วนสำหรับเมตาบอลิซึมของมัน ทำให้น้ำตาลที่จะใช้ในการหมักต่ำลง จึงทำให้ปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำกว่าถึงแม้จะมีเซลยีสต์มากกว่าก็ตาม สารสกัดในปริมาณที่เกิน 2.5 เปอร์เซนต์ ให้ผลในการยับยั้งยีสต์ในอัตราสูง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้สารสกัดปริมาณ 1.5 เปอร์เซนต์ และเปลือกไม้เกี๋ยมปริมาณ 5.0 เปอร์เซนต์ เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

เวลาที่เหมาะสมในการเติมเปลือกไม้เกี๋ยม 5 เปอร์เซนต์หรือสารสกัด 1.5 เปอร์เซนต์ ลงในน้ำหมักพบว่าในกรณีการเติมเปลือกไม้เกี๋ยมในชั่วโมงที่ 8 ให้ผลการหมักดีที่สุด ทั้งจำนวนเซลยีสต์และปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น ส่วนน้ำหมักที่เติมเปลือกไม้เกี๋ยมในชั่วโมงที่ 16 และ 24 ให้ผลรองลงมา ทั้งนี้เนื่องจากการเติมเปลือกไม้เกี๋ยมในชั่วโมงที่ 8 ทำให้เปลือกไม้เกี๋ยมถูกสกัดสารต่าง ๆ ออกมาเป็นเวลานาน ดังนั้นจึงทำให้มีผลยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าการเติมเปลือกไม้เกี๋ยมในชั่วโมงที่ 16 และ 24 แต่เมื่อเปรียบเทียบผลการหมักกับน้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เกี๋ยมกลับพบว่า ในน้ำหมักที่เติมเปลือกไม้เกี๋ยม 5 เปอร์เซนต์ ในชั่วโมงที่ 8 ยังให้ผลการหมักไม่ดีพอ ส่วนในกรณีของการเติมสารสกัดจากเปลือกไม้เกี๋ยมพบว่าการเติมสารสกัดในชั่วโมงที่ 8 ให้ผลการหมักดีที่สุด รองลงมาได้แก่การเติมในชั่วโมงที่ 24 และ 16 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณแอลกอฮอล์และจำนวนเซลยีสต์ในน้ำหมักที่เติมสารสกัดในชั่วโมงที่ 8, 16, 24 ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกเติมสารสกัด 1.5 เปอร์เซนต์ ในชั่วโมงที่ 8 ทั้งนี้เพราะในชั่วโมงที่ 8 เป็นช่วงที่แบคทีเรียที่สร้างกรดเจริญเติบขึ้นมาและเป็นตัวที่ก่อให้เกิดปัญหาในการหมัก นอกจากนี้ในช่วงนี้เชื้อยีสต์ก็เจริญอยู่ในช่วงต้นของ logarithmic phase ซึ่งเซลกำลังมีความแข็งแรง ดังนั้นถ้าเติมสารสกัดในช่วงเวลานี้จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดปัญหารวมทั้งสารสกัดจะส่งผลกระทบต่อเซลยีสต์ไม่มากนัก

จากการเปรียบเทียบผลการหมักแอลกอฮอล์ในน้ำหมักที่เติมเปลือกไม้เกี๋ยม 5.0 เปอร์เซนต์ ในชั่วโมงที่ 8 หรือน้ำหมักที่เติมสารสกัดจากเปลือกไม้เกี๋ยม 1.5 เปอร์เซนต์ ในชั่วโมงที่ 8 กับน้ำหมักที่ไม่เติมเปลือกไม้เกี๋ยมหรือสารสกัด พบว่าภายหลังจากเติมเปลือกไม้เกี๋ยมหรือสารสกัดลงในน้ำหมัก จำนวนเซลยีสต์ในน้ำหมักทั้งสองมีอัตราการเพิ่มจำนวนต่ำลงทั้งนี้เป็นเพราะผลของสารที่ถูกสกัดออกมาจากเปลือกไม้เกี๋ยมในระหว่างการหมักหรือสารสกัดที่เติมลงไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในน้ำหมักยับยั้งการเจริญของเซลยีสต์บางส่วน แต่ในขณะเดียวกันก็มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไปด้วยเช่นกัน นอกจากนี้แล้วปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักที่ไม่เติมสิ่งใดเลยสูงกว่าในน้ำหมักที่เติมสารสกัดและในน้ำหมักที่เติมเปลือกไม้เคี่ยมตามลำดับ แต่ปริมาณแอลกอฮอล์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งที่จำนวนเซลยีสต์ในน้ำหมักที่ไม่เติมสิ่งใดมีปริมาณสูงกว่ามากก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำหมักที่ไม่เติมสิ่งใดมีปริมาณสูงได้ใช้น้ำตาลไปในเมตาบอลิซึมของมันด้วย จึงทำให้น้ำตาลที่ใช้ในการหมักด้วยยีสต์ลดลง ดังนั้นปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักจึงลดลงจากที่ควรจะได้รับ อย่างไรก็ตามปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำหมักมีหลายชนิดและเจริญเด่นในแต่ละช่วงของการหมัก ดังนั้นหลังจากที่เติมสารสกัดหรือเปลือกไม้เคี่ยมลงไปในน้ำหมักจึงมีผลต่อแบคทีเรียที่เจริญในช่วงแรกเท่านั้น พอการหมักถึงช่วงชั่วโมงที่ 20 ขึ้นไป จึงมีแบคทีเรียเจริญขึ้นมาในอัตราสูงอีกเช่นกัน แต่แบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวเป็นกลุ่มที่ก่อให้เกิดผลเสียมากนัก

จากผลการทดลองที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกได้แตกต่างจากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดปัญหาในการหมักดังที่จรูญและคณะ (2525) และณัฐพิฏฐ์ (2528) ซึ่งกล่าวว่าแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดปัญหาการหมักมีลักษณะเป็นท่อนอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* และสร้างกรดในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ก็มีบางสายพันธุ์โดยเฉพาะที่คัดเลือกได้ในชั่วโมงที่ 8 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างกรดได้เช่นกัน และยังถูกยับยั้งด้วยสารสกัดในระดับสูงอีกด้วย นอกจากนี้แล้วสาเหตุหลักที่ทำให้ชนิดและปริมาณของแบคทีเรียแตกต่างกันก็เนื่องจากที่โรงงานสุราอยุธยาใช้กากน้ำตาลใหม่ซึ่งมีแบคทีเรียสะสมอยู่ไม่สูงนักนั่นเอง

นอกจากนี้จากผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าการใช้เปลือกไม้เคี่ยมหรือสารสกัดจากเปลือกไม้ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียให้ผลดีในช่วงระยะเวลาจำกัด ดังนั้นเมื่อใช้เติมลงในน้ำหมักจึงให้ผลการหมักที่แตกต่างจากที่ไม่ใช้เปลือกไม้เคี่ยมหรือสารสกัดมากนัก วิธีการนี้จึงน่าจะเหมาะสมสำหรับใส่ในถังกล้าเชื้อเพื่อป้องกันไม่ให้มีแบคทีเรียปนเปื้อนในถังกล้าเชื้อมากกว่าที่จะใช้ในถังหมักใหญ่ อีกทั้งในการใช้ก็ควรใช้ก่อนมีการเติมหัวเชื้อยีสต์ลงไปประมาณ 4-6 ชั่วโมง และควรใช้ในระยะที่มีปัญหาการหมักเกิดขึ้นเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้จัดการและเจ้าหน้าที่ฝ่ายผลิตโรงงานสุรากรมสรรพสามิต จังหวัดอยุธยา ที่ได้ให้ความร่วมมือในการใช้สถานที่ทำการวิจัยและเอื้อเฟื้อกากน้ำตาลที่ใช้ตลอดงานวิจัย และขอขอบคุณแผนกจุลชีววิทยาประยุกต์ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ช่วยเหลือทางด้านเครื่องมือบางอย่าง จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จำลอง เพ็งกล้าย. 2526. ไม้มีค่าทางเศรษฐกิจของไทย. กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ.

จรูญ คำนวนตา. 2525. อุปสรรคบางประการในช่วงการหมักแอลกอฮอล์. วารสารชมรมผู้หมักแอลกอฮอล์แห่งประเทศไทย. 1(1) : 2-4..

จรูญ คำนวนตา, ประดิษฐ์ ครุวัฒนา, ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และวิชุพร วองสุวรรณเลิศ. 2525. รายงานการสำรวจการหมักแอลกอฮอล์ของโรงงานแห่งหนึ่งในช่วงวิกฤตของการหมัก. วารสารชมรมผู้หมักแอลกอฮอล์แห่งประเทศไทย. 1(1) : 6-13.

เธรงค์ โทณานนท์. 2523. ไม้เนื้อแข็งของประเทศไทย. กองวิจัยผลิตผลป่าไม้. กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ.

ผัสพิชญ์ ไทยตระกูล. 2528. บทบาทของเชื้อที่เรียในการหมักแอลกอฮอล์ทางอุตสาหกรรม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ธนิต วิชัยอังคารักษ์. 2510. การผลิตและการจำหน่ายน้ำตาลมะพร้าวของกสิกร ในตำบลปลายโพงพาง อำเภออัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม. วิทยานิพนธ์คณะเศรษฐศาสตร์สหกรณ์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, ประดิษฐ์ ครุวัฒนา, วิเชียร ยงมานิตชัย, จรูญ คำนวนตา, พรทิพย์ เจริญธรรมวัฒน์ และพรทิพย์ สุมนพันธ์. 2529. การศึกษาปัญหาที่เกิดจากการหมักกากน้ำตาลเก่าของโรงงานอุตสาหกรรม. รายงานวิจัยเสนอสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ลดาวัลย์ บุญรัตนกรกิจ. 2521. ชื่อสมุนไพรและประโยชน์. แผนกวิชาเภสัชพฤษศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

วินิจวนันคร, พระยา. 2503. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับพื้นเมืองชื่อพฤกษศาสตร์. กรมป่าไม้. โรงพิมพ์การรถไฟ. กรุงเทพฯ.

AOAC. 1975. Official method of analysis. 12th ed. Washington, D.C. George Banta Co., Inc.

____. 1980. Official method of analysis. 13th ed. Washington, D.C. George Banta Co., Inc.

Carr, J.G. and P.A. Davies. 1972. The ecology and classification of *Lactobacillus collinoides*, a bacterium commonly found in apple juice. J.Appl. Bact. 35 : 463-472.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Faparusi, S.I. and O. Bassir. 1971. Microflora of fermenting palm sap. J. Food Sci. and Tech. 8(4) : 206-208.

_____. 1972 a. Effect of extracts of the bark of *Saccoglottis gabonensis* on the microflora of palm wine. Appl. Microbiol. 24 : 853-856.

Hathway, D.E. 1960. Plant phenols and tannins, p. 324. in I. Smith (ed.), Chromatographic and electrophoretic techniques, vol 1. William Heinemann Medical Books Ltd., London.

Kozaki, M. 1976. Fermented foods and related microorganisms in Southeast Asia. Proc. Jap. Asso. Mycotoxicol. 2 : 1-9.

Okafor, N. 1975 b. Microbiology of Nigerian palm wine with particular reference to bacteria. J. of Appl. Bact. 38 : 81-83.

Paturau, J.M. 1969. By-products of cane sugar industry. Amsterdams : Elsevies Publishing, Co.

Rainbow, C. 1971 a. Physiology and biochemistry of yeasts. The Yeast vol 2. London : Academic Press.

Siekel, M.K. 1964. in J.B. Harborne (ed.) Biochemistry of phenolic compounds, p. 36. Academic Press Inc., New York.

Tajima, K. and H. Yashizumi. 1975. Mechanism of abnormal fermentation of distiller's yeast in salted media (such as molasses media) from the point of NAD (P) redox balance. J. Ferment. Technol. 53(12) : 841-853.

Venkataramu, K., J.D. Patel and M.S. Subba Rao. 1983. Fractionation of wood phenolics and their use in brandy. J. Food Sci. and Tech. 20 : 16-18.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้