# ใบรับรองปัญหาพิเศษ

**เรื่อง** ผลของสารสกัดจากไม้เคี่ยมต่อจุลินทรีย์ในการหมักไวน์สับปะรด

( Effect of extract of the bark of Cotylelobium lanceolatum on microflora of pineapple wine )

ACC. NO.....
Date Received 19 มี.ย. 2529
Call No.....

โดย นายบุรินทร์ ริมคีรี

ได้รับพิจารณาเห็นชอบจาก...

..... 3/4/86 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ
( นายวราวุฒิ ครูส่ง ) .../.../...

..... 2/4/86 กรรมการของภาควิชา
( นางระติพร ทาเรือนกิจ )

..... 2/4/86 กรรมการของภาควิชา
( นางอนงค์ วรอุไร )

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

.....
( นางระติพร ทาเรือนกิจ )
หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

B.E. S.A. 254

ปพ.
ป64ก1
2529

วันที่ 2 เดือน ..เม.ย..... พ.ศ. 2529

13889

ปัญหาพิเศษ (45497)

เรื่อง

# ผลของสารสกัดจากไม้เคี่ยมต่อจุลินทรีย์ในการหมักไวน์สับปะรด

(Effect of extract of the bark of Cotylelobium lanceolatum on microflora of pineapple wine)

โดย

นายบุรินทร์ ริมคีรี

ปพ.
ป1647ผ
2529

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 97057
วัน,เดือน,ปี.....

เสนอ

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

พ.ศ. 2529

# บทคัดย่อ

## เรื่อง

ผลของสารสกัดจากไม้เคี่ยมต่อจุลินทรีย์ในการหมักไวน์สับปะรด

( Effect of extract of the bark of Cotylelobium lanceolatum on microflora of pineapple wine )


ไม้เคี่ยม เป็นไม้ชนิดหนึ่งที่มีมากในป่าดงดิบทางภาคใต้ของไทย ซึ่งชาวบ้านนิยมนำมาใส่ลงในกระบอกน้ำตาลสด เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้น้ำตาลสดเสีย มีผู้ทำการศึกษา พบว่า สารสกัดจากไม้เคี่ยม มีผลในการยับยั้งยีสต์บางสายพันธุ์ จึงได้นำคุณสมบัติของไม้เคี่ยมมาศึกษาและทดลองใช้ในการหมักไวน์สับปะรด

ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากไม้เคี่ยมที่มีต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ 5 สายพันธุ์ รวมถึงการวิเคราะห์สารที่มีอยู่ในไม้เคี่ยม และสารสกัดจากไม้เคี่ยม ในปริมาณที่ต่างกันในการหมักไวน์สับปะรด ด้วยเชื้อ Saccharomyces cerevisiae Sc.90

พบว่า สารสกัดจากไม้เคี่ยม มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Saccharomyces cerevisiae Sc.90 น้อยที่สุด และการใช้สารสกัด 1 เปอร์เซ็นต์ ในการหมักไวน์สับปะรดด้วยเชื้อ Saccharomyces cerevisiae Sc.90 ได้เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์สูงสุด หลังจากทำการหมักเป็นเวลา 5 วัน

# สารบาญ

หน้า

สารบาญตาราง ..... (2)

สารบาญภาพ ..... (3)

คำนำ ..... 1

การตรวจเอกสาร ..... 2

อุปกรณ์และวิธีการ ..... 10

ผลการทดลอง ..... 15

วิจารณ์ผลการทดลอง ..... 28

สรุป ..... 31

เอกสารอ้างอิง ..... 32

ภาคผนวก ..... 34

# สารบาญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมัก ..... | 8 |
| 2 | ค่าเฉลี่ยผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไวน์สับปะรด..... | 8 |
| 3 | คะแนนเฉลี่ยผลการชิมไวน์ ..... | 9 |
| 4 | การแยกสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยวิธี Paper Chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย isopropanol:formic acid:water = 2:5:5 (v/v) | 16 |
| 5 | การแยกสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยวิธี paper chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย ethylacetate:formic acid:water = 10:2:3(v/v) | 17 |
| 6 | ผลการยับยั้งเชื้อยีสต์ของสารสกัดจากไม้เคี่ยม ..... | 21 |
| 7 | เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักไวน์สับปะรด ในสภาพที่ใช้ และไม่ใช้สารสกัด ชุดที่ 1 ..... | 23 |
| 8 | เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักไวน์สับปะรดในสภาพที่ใช้ และไม่ใช้สารสกัด ชุดที่ 2 ..... | 25 |
| 9 | เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักไวน์สับปะรดในสภาพที่ใช้ และไม่ใช้สารสกัด ชุดที่ 3 ..... | 27 |

# สารบาญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | แนวทางในการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาลกลูโคส ..... | 5 |
| 2 | ขั้นตอนในการหมักไวน์ ..... | 6 |

# คำนำ

ไม้เคี่ยม เป็นไม้ชนิดหนึ่งที่ชาวบ้านนิยมใช้ส่วนของเปลือกไม้ นำไปย่างไฟจนแห้ง แล้วใส่ลงในกระบอกน้ำตาลสด เพื่อป้องกันการเสียของน้ำตาลสด อันมีสาเหตุมาจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่อยู่ในน้ำตาลสด หรือน้ำตาลโตนด แต่จากการตรวจสอบ (ปราโมทย์, 2521) พบว่าเปลือกไม้ที่ใส่ลงในกระบอกน้ำตาลนั้น จะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ อย่างมีนัยสำคัญ

ในการหมักไวน์ทั่วๆไปนั้น นิยมใช้ความร้อนและสารเคมีในการฆ่าและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเสียของไวน์ ดังนั้น คุณสมบัติของไม้เคี่ยมในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีสาเหตุทำให้เกิดการเสียของน้ำตาลสด หรือน้ำตาลโตนด แต่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ จึงน่าที่จะมีประโยชน์ในการนำมาใช้ประยุกต์ในการหมักไวน์ และยังอาจนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์ชนิดอื่นในโอกาสต่อไปอีกด้วย

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากไม้เคี่ยมที่มีต่อจุลินทรีย์
2. เพื่อศึกษาผลของไม้เคี่ยมและสารสกัดในการหมักไวน์สับปะรด

## การตรวจเอกสาร

ไม้เคี่ยม เป็นไม้ยืนต้นชนิดหนึ่ง มีมากในประเทศไทย ตั้งแต่จังหวัดชุมพรลงไป ซึ่งจัดอยู่ในตระกูล Disterocarpaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Cotylelobium lanceolatum craib. (ลัดดาวัลย์, 2524)

### ลักษณะของไม้เคี่ยม

ไม้เคี่ยม เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ถึงใหญ่ มีขนาดความสูง 20-40 เมตร พบได้ในป่าดงดิบทางภาคใต้ของประเทศไทย ลักษณะเปลือกนอกเรียบ มีสีน้ำตาล มีรอยด่างสีเทาสลับเหลือง เปลือกด้านในเป็นสีน้ำตาลอ่อน เมื่อทิ้งไว้นานๆ จะมีสีเป็นสีน้ำตาลแก่ หรือน้ำตาลเกือบดำ ลักษณะของเนื้อไม้ เสี้ยนค่อนข้างสน ละเอียด แข็ง เหนียว หนักและแข็งแรงมาก (จำลอง, 2526) จัดอยู่ในจำพวกไม้เนื้อแข็ง (ณรงค์, 2523)

### ประโยชน์ของไม้เคี่ยม

ใช้เป็นสิ่งก่อสร้าง ส่วนของเปลือกมีสารแทนนิน (tannin) มาก ใช้ในการฟอกหนัง เป็นยาฝาดสมาน และใส่ในกระบอกน้ำตาลสด ป้องกันการหมักของน้ำตาล (ลัดดาวัลย์, 2524)

### จุลินทรีย์ที่พบในน้ำตาลสดและน้ำตาลเมา

จุลินทรีย์ที่พบมีบทบาทมากในการทำน้ำตาลสดและน้ำตาลเมา มีผลทำให้น้ำตาลสดเสีย คือ มีรสเปรี้ยว เป็นเมือก เป็นฟอง และปริมาณน้ำตาลลดลง จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญ มี 2 พวกใหญ่ๆ คือ แบคทีเรีย และยีสต์ (Okafor, 1975b) จากการศึกษาแบคทีเรียในน้ำตาลเมาจากต้นปาล์ม Elaeis sp. และ Raphia sp. ในประเทศไนจีเรียมีรายงานว่า แบคทีเรียที่พบบ่อยๆมี 5 Genus ได้แก่ Micrococcus, Leuconostoc, Streptococcus, Lactobacillus และแบคทีเรียอื่นๆ ได้แก่ Serratia, Aerobacter, Bacillus, Zymomonas และ Gram negative bacteria จะสร้างกรด ทำให้ พีเอช ของน้ำตาลสดลดลง จากผลการทดลองดังกล่าว สอดคล้องกับแบคทีเรียที่พบในน้ำตาลสดจากปาล์ม(Faparusi, 1974)

ยีสต์ในน้ำตาลสดและน้ำตาลเมา มีผลทำให้น้ำตาลสดและน้ำตาลเมาเกิดกลิ่น รส และเกิดแอลกอฮอล์ ซึ่งมีประโยชน์ในการทำน้ำตาลเมา แต่เป็นข้อเสียในการทำน้ำตาลสด เนื่องจากทำให้เกิดฟอง และมีการสูญเสียปริมาณน้ำตาล

Faparusi และ Bassir (1971) ศึกษาเชื้อที่เกี่ยวข้องในการหมักน้ำตาลเมาในธรรมชาติ พบว่า ในระยะแรกจะมีแบคทีเรีย Lactobacillus, Leuconostoc และยีสต์ Saccharomyces cerevisiae เป็นส่วนใหญ่ หลังจากวันที่ 3 ส่วนใหญ่จะเป็นพวกยีสต์ Schizosaccharomyces pombe, Pichai spp. และ Candida mycoderma สำหรับแบคทีเรีย Acetobacter จะเริ่มพบหลังจาก 24 ชั่วโมงแล้ว

จากการสำรวจยีสต์ในน้ำตาลสดและน้ำตาลเมา โดย Guilliermond พบเชื้อ Saccharomyces chevalieri ในน้ำตาลปาล์มสด Elaeis guineensis และใน Bile wine ซึ่งเป็นไวน์ที่ได้จากน้ำตาลของ Osbeckia grandiflora (Ahmad และคณะ, 1954) นอกจากนี้ Ahmad และคณะ (1954) รายงานว่า Reyne แยกเชื้อ Saccharomyces chevalieri นี้ได้จากน้ำตาลสดของ Arenga palm (Arenga saccharifera) มีรายงานการแยกเชื้อจากน้ำตาลสดในญี่ปุ่น พบ Endomycopsis fibuligera var. monospora, Schizosaccharomyces pombe, Saccharomycodes ludwigii, Pichai membranaefaciens, Pichai farinosa และ Klocckera apiculata

จากการสำรวจยีสต์ในน้ำตาลสดจากต้นปาล์ม Phoenix dactylifera ของประเทศลิเบีย พบว่าน้ำตาลสดที่ปล่อยให้หมักโดยธรรมชาติส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ Saccharomyces laghbi และบางครั้งมีเชื้ออื่นร่วมด้วยได้แก่ Schizosaccharomyces pombe และ Saccharomyces carlsbergensis (Vonossi, 1971)

ชนิดของยีสต์ที่พบในน้ำตาลสดและน้ำตาลเมาในประเทศไทย (ปราโมทย์, 2521) ได้แก่ Kloeckera apiculata และ Saccharomyces chevalieri ที่พบรองลงมาได้แก่ Candida spp , Saccharomyces cerevisiae, Pichia membranaefaciens นอกจากนี้ยังพบยีสต์อื่นๆอีกหลายชนิด แต่ไม่ค่อยมีความสำคัญเพราะพบน้อย ได้แก่ Torulopsis

spp.,Saccharomyces bayanus , Hansenula anomala var.anomala, Rhodotorula aurantiaca , Endomycopsis spp. รวมทั้ง yeast like fungi อีกด้วย

Faparusi และ Bassir (1972 a ) ทดลองปฏิกิริยาของสารที่สกัดจากเปลือกไม้ Saccoglottis gabonensis ต่อจุลินทรีย์ในน้ำตาลสด ได้สรุปผลการทดลองว่า สารที่สกัดจากเปลือกไม้ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดี แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์อย่างมีนัยสำคัญและกล่าวว่า การที่เปลือกไม้ช่วยป้องกันการเสียของน้ำตาลสดได้เพราะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกรด

การทำไวน์

ไวน์(Wine) คือเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ซึ่งเกิดจากการหมักน้ำองุ่นคั้นด้วยเชื้อยีสต์ โดยมีขบวนการควบคุมอย่างเหมาะสม ไวน์ที่เกิดจากผลไม้อื่นเรียกว่าไวน์ผลไม้ นอกจากนี้ไวน์ยังอาจทำได้จากผัก ใบไม้และดอกไม้อีกด้วย (ประดิษฐ์,2525)

การหมักไวน์นั้นยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นเอทธิลแอลกอฮอล์ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงาน ภายใต้สภาพปลอดอากาศ ดังแสดงในสมการ

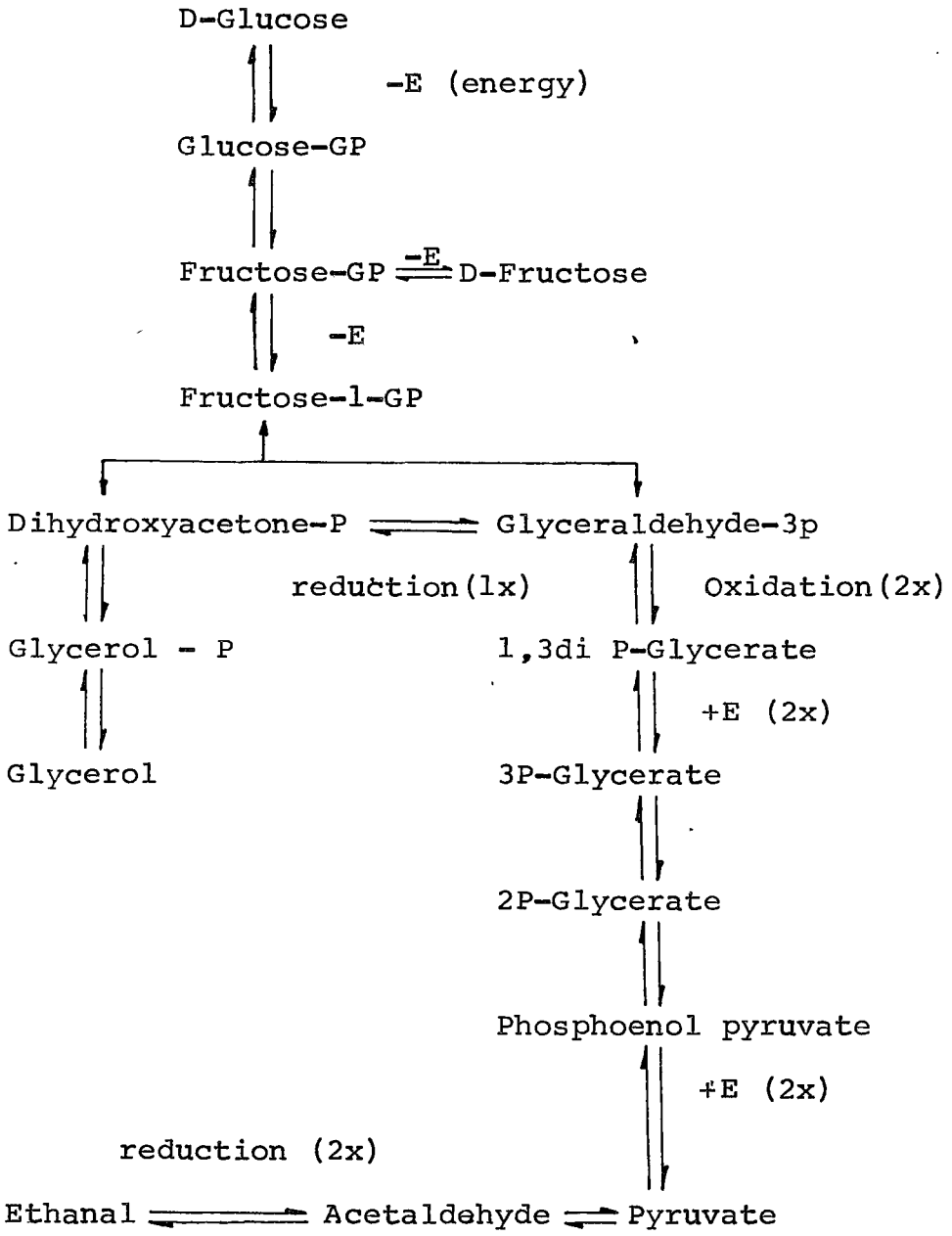
$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{yeast}} 2(C_2H_5OH) + 2CO_2 + \text{Energy}$$

glucose — ethyl alcohol — carbon dioxide

สำหรับแนวทางในการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาลกลูโคส แสดงในภาพที่ 1 (Amerine and Ough, 1980) ส่วนขั้นตอนในการหมักไวน์ แสดงในภาพที่ 2

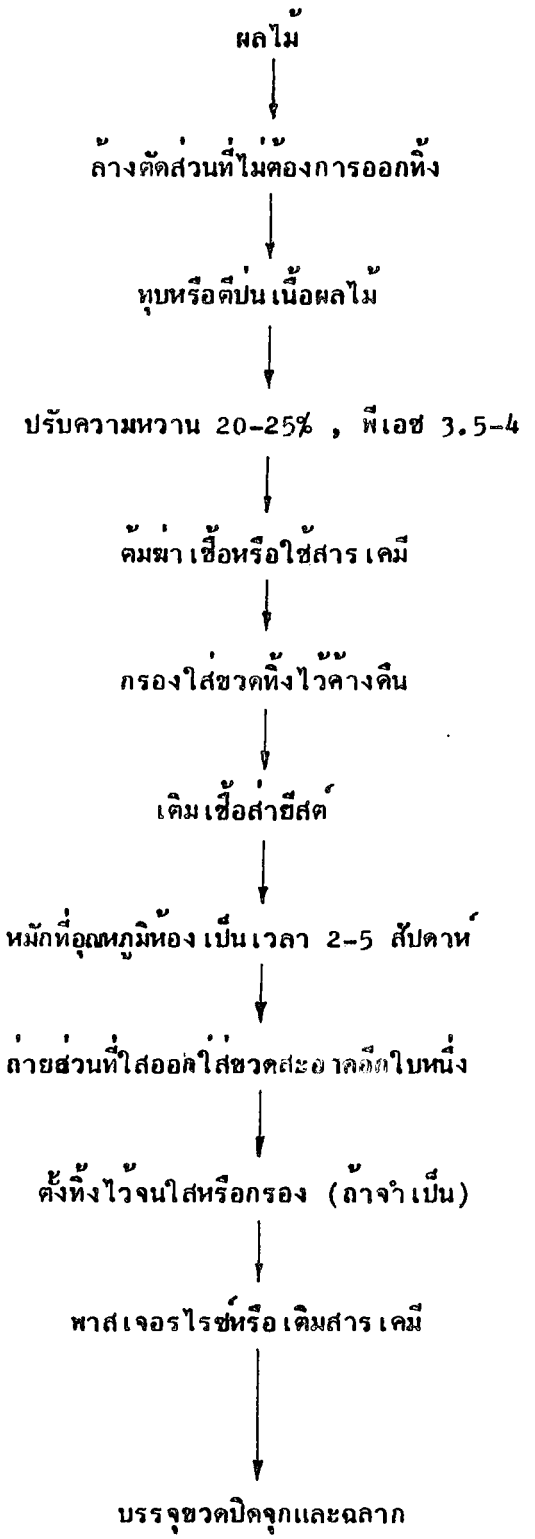
การใส่ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (Sulfuring)

เพื่อที่จะระงับการเจริญเติบโตของ wild yeast เรามักจะใส่ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ($SO_2$) ลงในน้ำผลไม้ อาจจะใส่ในรูปของแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์หรือในรูปของเกลือ เช่น เกลือโซเดียมหรือโปตัสเซี่ยม เช่น Sodium หรือ Postassium metabisulphite ($NaHSO_3$) (ลูกจันทร์,2522)




ภาพที่ 1 แนวทางในการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาลกลูโคส

ที่มา : Amerine and Ough, 1980




ภาพที่ 2 ขั้นตอนในการหมักไวน์

สำหรับฤทธิ์ของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (Sulfur dioxide) ที่มีต่อจุลินทรีย์ ขึ้นอยู่กับ พีเอช ของไวน์ก่อนหมักด้วย พีเอช ควรอยู่ระหว่าง พีเอช 3 ถึง 4 ในช่วง พีเอช ดังกล่าว จะแตกตัว ให้ Bisulphite ion $(HSO_3)^-$ มาก มี $SO_3^{2-}$ และ $SO_2$ เกิดน้อย ทั้งรูป Bisulphite ion $(HSO_3)$, $SO_3^{2-}$ และ $SO_2$ เรียกว่า "Free $SO_2$" หรือซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ ซึ่งเป็นพวกที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์สูง นอกจากนี้ ในต่างประเทศยังมีการใช้ Diethyl pyrocarbonate (DEPC) ในการฆ่ายีสต์ และป้องกันการหมักใหม่ และใช้ Sorbic acid ในการฆ่าเชื้อรา ในการหมักไวน์ (ปทุมพร, 2526)

<u>อิทธิพลของพันธุ์สับปะรดต่ออัตราการหมักและคุณภาพของไวน์</u>

ศิวพรและคณะ (2525) รายงานว่า สับปะรดเป็นผลไม้ที่นับว่า เป็นผลไม้เศรษฐกิจอย่างหนึ่งของไทย เพราะมีการปลูกอย่างแพร่หลาย สับปะรดที่ปลูกในประเทศไทย มีหลายพันธุ์ ส่วนใหญ่จะให้ผลและกลิ่นรสที่แตกต่างกันไป ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยว่า สับปะรดพันธุ์ใดที่ปลูกในประเทศ และมีความเหมาะสมที่จะนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ ต่อมาได้มีการศึกษาการหมักไวน์ โดยใช้น้ำคั้นจากสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย (ศรีราชา), ปัตตาเวีย (น่าน), อินทรชิตขาว, อินทรชิตแดง และภูเก็ต ผลของการหมักไวน์สับปะรด คุณภาพของไวน์สับปะรดที่ได้ และคะแนนการชิม แสดงในตารางที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมัก

| พันธุ์สับปะรด | ปริมาณน้ำตาลที่เหลือวัดวันที่ ( °Brix) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| ปัตตาเวีย (ศรีราชา) | 15.20 | 7.95 | 4.68 | 1.03 | 0.08 | -0.75 | -1.00 |
| ปัตตาเวีย (น่าน) | 17.50 | 14.38 | 11.58 | 7.95 | 6.88 | 5.38 | 3.70 |
| อินทรชิตขาว | 16.03 | 10.63 | 7.40 | 4.05 | 2.88 | 1.05 | -0.05 |
| อินทรชิตแดง | 16.58 | 11.38 | 8.25 | 4.50 | 3.35 | 1.60 | 0.30 |
| ภูเก็ต | 16.70 | 13.55 | 9.43 | 6.03 | 3.13 | 1.41 | 1.40 |

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไวน์สับปะรด

| พันธุ์สับปะรด | pH | Reducing sugar (%) | Total acidity (%Tartaric acid) | Volatile (acidity (%acetic acid) | Ethanol % by vol. |
|---|---|---|---|---|---|
| ปัตตาเวีย(ศรีราชา) | 3.98 | 1.9 | 0.427 | 0.031 | 11.84 |
| ปัตตาเวีย(น่าน) | 3.92 | 0.58 | 0.496 | 0.036 | 12.43 |
| อินทรชิตขาว | 3.95 | 0.25 | 0.431 | 0.032 | 12.06 |
| อินทรชิตแดง | 4.06 | 0.31 | 0.389 | 0.035 | 12.29 |
| ภูเก็ต | 4.02 | 0.44 | 0.429 | 0.032 | 11.88 |

ตารางที่ 3 คะแนนเฉลี่ยผลการชิมไวน์

| พันธุ์สับปะรด | คะแนนเฉลี่ย |
|---|---|
| ปัตตาเวีย (ศรีราชา) | 17.07 |
| ปัตตาเวีย (น่าน) | 16.50 |
| อินทรชิตขาว | 15.67 |
| อินทรชิตแดง | 14.92 |
| ภูเก็ต | 14.67 |

# อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 ไม้เคี่ยม

1.2 สับปะรด

1.3 เชื้อจุลินทรีย์

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextose agar

1.5 กระดาษ whatman No.1

1.6 เครื่องบด (blender)

1.7 เครื่องสกัด (Soxhlet Extraction)

1.8 กล้องส่องแสง Ultraviolet (UV)

1.9 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

1.10 เครื่องแก้วที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.11 สารเคมี Ethanol, isopropanol, formic acid, ethyl acetate, Potassium metabisulphite

2. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง เป็นเชื้อยีสต์ 5 สายพันธุ์

2.1 Saccharomyces cerevisiae Sc. 90

2.2 Saccharomyces sp. burgundy

2.3 Saccharomyces sp. champange

2.4 Saccharomyces sp. montrachet

2.5 Saccharomyces sp. sake

3. วิธีการทดลอง

3.1 การสกัด (Extraction)

นำเนื้อไม้เคี่ยมมาบดด้วยเครื่องบด (Blender) จนเป็นผงละเอียด แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรง ได้ผงไม้เคี่ยมละเอียดที่รอดผ่านตะแกรง จากนั้นนำผงไม้เคี่ยม ปริมาณ 30 กรัม ไปทำการสกัดด้วยเครื่องสกัด (Soxhlet Extraction apparatus)โดยใช้เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย (solvent) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสีของสารสกัดในคอลัมน์ (column) ใส นำสารละลายที่สกัดได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary Evaporator) จนได้สารละลายที่ไม่มีกลิ่นของตัวทำละลาย (solvent) จากนั้น เทสารสกัดใส่ลงในขวดแก้วทึบแสง และทำการรินส์ (Rinse) ด้วยเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ได้เป็นสารสกัดไม้เคี่ยมทั้งหมด

การสกัดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย (solvent) โดยใช้เนื้อไม้ที่มีขนาดชิ้นเล็กๆ ปริมาณ 50 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการกรอง แยกเอาเนื้อไม้ออก ได้เป็นสารสกัดไม้เคี่ยม

3.2 การวิเคราะห์การแยกตัวของสารที่สกัดได้

การวิเคราะห์การแยกตัวของสารที่สกัดได้ ทำโดยวิธี paper chromatographic method โดยให้สารเคลื่อนตัวจากด้านบนลงมาด้านล่าง (One way descending method) โดยใช้กระดาษ whatman No.1 และตัวทำละลาย (solvent)ใช้ 2 ชนิดคือ

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

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

หลังจากผ่านขบวนการ นำกระดาษไปส่องดูด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต (Ultraviolet lamp) จะปรากฏจุดบนกระดาษ ทำเครื่องหมายตำแหน่งของจุดไว้ เพื่อทำการเปรียบเทียบกับสาร

มาตรฐาน

สารมาตรฐาน (standard) ที่ใช้คือ แทนนิน (tannin) ที่มีความเข้มข้น 0.5, 1 , 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3 ทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์

3.3.1 การเตรียมเชื้อ โดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA slant ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที ทำการเขี่ยเชื้อลงบนอาหาร PDA slant บ่มที่อุณหภูมิห้อง 18 - 24 ชั่วโมง

3.3.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี disc plate method โดยการนำอาหาร PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง) นำเชื้อจาก PDA slant จากหัวข้อ 3.3.1 ทำให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอย (suspension) โดยการใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงไป ใช้ปิเปต (pipette) ดูดเชื้อที่อยู่ในรูปของสารแขวนลอย ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการ spread plate โดย เขี่ยเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นแบ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็น 4 ส่วน ส่วนที่ 1 ใช้ disc จุ่มสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ ส่วนที่ 2 ใช้ disc จุ่มสารสกัดด้วยน้ำ ส่วนที่ 3 ใช้ disc จุ่มเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และส่วนที่ 4 ใช้ disc จุ่มน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบบริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone) และบันทึกผลการยับยั้ง

3.4 ทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์จากส่วนที่แยกออกจากสารสกัด

โดยการนำจุดสี จากหัวข้อ 3.2 ใส่ลงในตัวทำละลาย (solvent) คือ isopropanol : formic acid : water ในอัตราส่วน 2 : 5 : 5 โดยปริมาตร และethyl acetate : formic acid : water ในอัตราส่วน 10 : 2 : 3 โดยปริมาตร นำสารละลายที่ได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายออก ได้เป็นสารเข้มข้น นำสารที่ได้นี้ไปทดสอบการยับยั้ง

จุลินทรีย์ โดยวิธี disc plate method เช่นเดียวกับหัวข้อ 3.3

3.5 ผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในการหมักไวน์สับปะรด

3.5.1 การเตรียมน้ำสับปะรดสำหรับหมักไวน์ โดยใช้สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย อัตราส่วน เนื้อ : น้ำ เท่ากับ 1 : 2 กรองกากออก ปรับ พีเอช น้ำสับปะรด เท่ากับ 3.5 ด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ กรดซิตริค (citric acid) และความหวาน 20 องศาบริกซ์ โดยเครื่อง refractometer จากนั้นนำไปต้มให้พอเดือด แล้วเทใส่ในขวดแก้วที่ใช้หมักทันที

3.5.2 การเตรียมกล้าเชื้อ (starter) โดยใช้น้ำสับปะรดที่มี พีเอช 3.5 และความหวานประมาณ 15 องศาบริกซ์ ใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลีและกระดาษฟอยล์ (foil) ตามลำดับ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็น แล้วทำการถ่ายเชื้อยีสต์ อายุ 18 - 24 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในสภาพแขวนลอย (suspension) (โดยใช้น้ำสับปะรดที่เตรียมทำกล้าเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง 18 - 24 ชั่วโมง

3.5.3 การหมัก

3.5.3.1 การเตรียมน้ำสับปะรดในขวดหมัก แบ่งออกเป็น 4 ประเภท

ก. โดยใช้ไม้เคี่ยมที่อยู่ในรูปของชิ้นไม้เล็กๆ ใส่ลงในขวดหมัก ในปริมาตร 0.5 , 1 , 1.5 , 2 , 2.5 , 3 , 5 , 7 , 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์

ข. โดยการใช้สารสกัดของไม้เคี่ยมด้วยแอลกอฮอล์ ใส่ลงในขวดที่เตรียมหมัก ในปริมาณ 0.2 , 0.5 , 0.7 , 1 , 1.2 , 1.5 , 2 , 2.5 , 3 , 5 , 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์

ค. โดยการใช้ KMS (Potassium metabisulphite) ในปริมาณ 100 ppm. และ 200 ppm.

ง. ไม่มีการเติมสารลงในน้ำสับปะรด เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ

3.5.3.2 การถ่ายเชื้อ นำกล้าเชื้อ(starter) อายุ 18 - 24 ชั่วโมง ถ่ายลงในขวดหมัก ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน (ใน

การปฏิบัติการ ทำครั้งละ 3 ซ้ำ ขวดที่ใช้ในการหมักมีปริมาตรประมาณ 200 มิลลิลิตร ใส่น้ำสับปะรด 100 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลี)

3.5.3.3 การตรวจผลการหมักทั้ง 4 ประเภท และทำการเปรียบเทียบผลดังนี้

ก. การสังเกตุผลการหมัก ในช่วงระยะเวลา 5 วัน และลักษณะการยับยั้งจุลินทรีย์

ข. หลังจากครบกำหนดการหมัก เก็บตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่อง EBULLIOMETER

## ผลการทดลอง

สารสกัดจากไม้เคี่ยม ที่นำมาทำการศึกษา แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ สารสกัดไม้เคี่ยม โดยใช้เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย และสารสกัดจากไม้เคี่ยม โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย นำไปศึกษาผลต่างๆที่จะเกิดขึ้น

1. การวิเคราะห์การแยกตัวของสารที่อยู่ในสารสกัด

โดยวิธี paper chromatographic method โดยใช้ตัวทำละลาย 2 พวก คือ isopropanol : formic acid : water อัตราส่วน 2 : 5 : 5 โดยปริมาตร และ ethyl acetate : formic acid : water อัตราส่วน 10 : 2 : 3 โดยปริมาตร

1.1 ใช้ isopropanol : formic acid : water เป็น mobile phase ค่าอัตราการเคลื่อนที่ หรือ $R_f$ (Rate of flow) ของสารสกัดจากไม้เคี่ยมทั้ง 2 ชนิด ที่ปรากฏมีค่าต่างกัน แต่มีความแตกต่างกับค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารละลายมาตรฐาน (Standard substance) ทั้ง 3 ตัว คือ $S_2$; $S_3$ และ $S_4$ ซึ่งมีค่าอัตราการเคลื่อนที่เท่ากัน ส่วนสารละลายมาตรฐาน $S_1$ ไม่ปรากฏ ดังแสดงในตารางที่ 4

1.2 ใช้ ethyl acetate : formic acid : water อัตราส่วน 10 : 2 : 3 โดยปริมาตร เป็น mobile phase ค่าอัตราการเคลื่อนที่ หรือ $R_f$ ของสารสกัดจากไม้เคี่ยมทั้ง 2 ชนิด ที่ปรากฏมีค่าเท่ากัน แต่มีความแตกต่างกับค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารมาตรฐาน เช่นเดียวกันกับการใช้ isopropanol : formic acid : water เป็น mobile phase ดังแสดงในตารางที่ 5

จากผลการแยกตัวของสารที่อยู่ในสารสกัด โดยอาศัยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด จะเห็นได้ว่า ให้ผลสอดคล้องกัน คือ สารที่แยกออกมาจากสารสกัด มีส่วนประกอบเป็นสารแทนนินอยู่บ้าง ในขณะเดียวกัน ควรจะมีสารประกอบอื่นเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ซึ่งทำให้ค่า $R_f$ ที่ออกมาแตกต่างกันบ้าง

ตารางที่4 การแยกสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยวิธี paper chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย isopropanol : formic acid : water = 2:5:5 (v/v)

| Solvent used(isopropanol : formic acid : water (2:5:5 (v/v)) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $E_1$ | $E_2$ | $S_1$ | $S_2$ | $S_3$ | $S_4$ |
| ระยะทางที่สารเคมีเคลื่อนที่(ซ.ม.) | $3\frac{9}{16}$ | $3\frac{9}{16}$ | - | 3 | 3 | 3 |
| ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่(ซ.ม.) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| $R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่}}$ | 0.89 | 0.89 | - | 0.75 | 0.75 | 0.75 |

$E_1$ : สารสกัดจากไม้เคี่ยม โดยใช้ เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย

$E_2$ : สารสกัดจากไม้เคี่ยม โดยใช้ น้ำ เป็นตัวทำละลาย

$S_1$, $S_2$, $S_3$, $S_4$ : Tannin มีความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 5 การแยกสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยวิธี paper chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย ethyl acetate : formic acid:water =10:2:3 (v/v)

| Solvent used (ethylacetate :formic acid:water 10:2:3 (v/v) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $E_1$ | $E_2$ | $S_1$ | $S_2$ | $S_3$ | $S_4$ |
| ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (ซ.ม.) | 4 | 4 | - | $3\frac{3}{8}$ | $3\frac{3}{8}$ | $3\frac{3}{8}$ |
| ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่(ซ.ม.) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| $R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่}}$ | 1 | 1 | - | 0.84 | 0.84 | 0.84 |

$E_1$ : สารสกัดจากไม้เคี่ยม โดยใช้ แอลกอฮอล์ 95% เป็นตัวทำละลาย

$E_2$ : สารสกัดจากไม้เคี่ยม โดยใช้ water เป็นตัวทำละลาย

$S_1$, $S_2$, $S_3$, $S_4$ : Tannin มีความเข้มข้น 0.5, 1, 5, และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

97057

2. ทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์

โดยใช้วิธี spread plate แล้วแบ่งการทดสอบออกไปเป็น 2 ชนิด คือ การทดสอบทันทีหลังจากทำการ spread plate และการทดสอบหลังจาก spread plate แล้ว 24 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 6

2.1 การทดสอบทันทีหลังจาก spread plate แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงทำการตรวจสอบผลการทดลอง

เชื้อ Saccharomyces cerevisiae Sc.90 ขนาดของโซน (Zone) การยับยั้งของสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำ มีค่าต่ำสุด ส่วนโซนของการยับยั้งด้วยน้ำกลั่น สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยเอทธานอล และเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดของโซนการยับยั้งสูงขึ้น ตามลำดับ

เชื้อ Saccharomyces cerevisiae champange ขนาดของโซนการยับยั้งของน้ำกลั่นมีค่าต่ำสุด ส่วนผลของการยับยั้งด้วยสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำกลั่น , สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยเอทธานอล และเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดของโซนการยับยั้งสูงขึ้นตามลำดับ

เชื้อ Saccharomyces cerevisiae burgundy ขนาดของโซนการยับยั้งด้วยน้ำกลั่นมีค่าต่ำสุด ส่วนผลของการยับยั้งด้วยสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำ , สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยเอทธานอล และเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดของโซนการยับยั้งสูงขึ้นตามลำดับ

เชื้อ Saccharomyces cerevisiae montrachet ขนาดของโซนการยับยั้งด้วยน้ำกลั่นมีค่าต่ำสุด ส่วนผลของการยับยั้งด้วยสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำ , สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยเอทธานอล และเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดของโซนการยับยั้งสูงขึ้นตามลำดับ

เชื้อ Saccharomyces cerevisiae sake ขนาดของโซนการยับยั้งด้วยน้ำกลั่นมีค่าต่ำสุด ส่วนผลของการยับยั้งด้วยสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำ , สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยเอทธานอล และเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดของโซนการยับยั้งสูงขึ้นตามลำดับ

จากการทดลองและเปรียบเทียบผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทันทีหลังจากทำการ spread plate ปรากฏว่า ขนาดของโซนการยับยั้งของน้ำกลั่นมีค่าต่ำสุด ส่วนขนาดของโซนการยับยั้งด้วยสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำ , สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยเอทธานอล และเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์

มีขนาดของโซนการยับยั้งสูงขึ้นตามลำดับ ยกเว้น เชื้อ Saccharomyces cerevisiae Sc. 90 ขนาดของโซนการยับยั้งของสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำ มีค่าต่ำกว่าน้ำกลั่น จากผลการทดลองแสดงว่า สารทุกตัวมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ แต่มีความสามารถในการยับยั้งแตกต่างกัน

2.2 การทดสอบหลังจากspread plate แล้วบ่มไว้ 24 ชั่วโมง จึงวางdisc จุ่มสารที่ใช้ในการทดสอบ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงทำการตรวจสอบผลการทดลอง

เชื้อ Saccharomyces cerevisiae Sc.90 ขนาดของโซนการยับยั้งของสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำมีค่าต่ำสุด ส่วนผลของการยับยั้งด้วยน้ำกลั่น สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยเอทธานอล และเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดของโซนการยับยั้งสูงขึ้นตามลำดับ

เชื้อ Saccharomyces cerevisiae champange ขนาดของโซนการยับยั้งของสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำ มีค่าต่ำสุด ส่วนผลของการยับยั้งด้วยน้ำกลั่น , เอทธานอล และสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดของโซนการยับยั้งสูงขึ้นตามลำดับ

เชื้อ Saccharomyces cerevisiae burgundy ขนาดของโซนการยับยั้งของสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำ มีค่าต่ำสุด ส่วนผลของการยับยั้งด้วยน้ำกลั่น , สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยเอทธานอลและเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดของโซนการยับยั้งสูงขึ้นตามลำดับ

เชื้อ Saccharomyces cerevisiae montrachet ขนาดของโซนการยับยั้งของสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำมีค่าต่ำสุด ส่วนผลของการยับยั้งด้วยน้ำกลั่น , สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยเอทธานอลและเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดของการยับยั้งของโซนสูงขึ้นตามลำดับ

เชื้อ Saccharomyces cerevisiae sake ขนาดของโซนการยับยั้งของสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำมีค่าต่ำสุด ส่วนผลการยับยั้งด้วยน้ำกลั่น , สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยเอทธานอล และเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดของโซนการยับยั้งสูงขึ้นตามลำดับ

จากผลการทดลองและเปรียบเทียบผลการยับยั้งจุลินทรีย์หลังจาก spread plate แล้วบ่มไว้ 24 ชั่วโมง ปรากฏว่า ขนาดของโซนการยับยั้งของสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำมีค่าต่ำสุด ส่วนผลการยับยั้งด้วยน้ำกลั่น , สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยเอทธานอลและเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดของโซนการยับยั้งสูงขึ้นตามลำดับ ยกเว้นเชื้อ Saccharomyces cerevisiae champange

ขนาดของโซนการยับยั้งของสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยเอทธานอล มีค่าสูงกว่า เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองแสดงว่า สารทุกตัวมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ แต่มีความสามารถในการยับยั้งแตกต่างกัน

จากผลการทดลองการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้วิธีการ spread plate ทั้ง 2 ชนิด ปรากฏผลใกล้เคียงกัน คือ ขนาดของโซนการยับยั้งของสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำ มีค่าต่ำสุด ส่วนผลการยับยั้งด้วยน้ำกลั่น , สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยเอทธานอล และเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดของโซนการยับยั้งสูงขึ้นตามลำดับ แต่จากการตรวจสอบการทดสอบหลังจาก spread plate แล้วบ่มไว้ 24 ชั่วโมง จึงทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ จะเห็นลักษณะของโซนการยับยั้งเด่นชัดกว่า วิธีทดสอบทันทีหลังจาก spread plate และสาเหตุที่สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำ มีขนาดของโซนการยับยั้งต่ำกว่าน้ำกลั่น

จากผลการทดลองการยับยั้งเชื้อยีสต์ด้วยสารสกัดที่กล่าวมา ดังแสดงในตารางที่ 6 สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยแอลกอฮอล์ ให้ผลการยับยั้งสูงกว่าสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำกลั่น นั่นแสดงว่า ควรใช้แอลกอฮอล์ในการสกัดสารจากไม้เคี่ยม และการศึกษาต่อไป จะใช้เฉพาะสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยแอลกอฮอล์เท่านั้น และสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยแอลกอฮอล์ ยังช่วยลดผลของการยับยั้งเชื้อยีสต์ด้วยเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นั่นแสดงว่าสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ลดความเป็นพิษของแอลกอฮอล์ต่อเชื้อยีสต์ นอกจากนี้แล้ว จะเห็นได้ว่าหลังจากเชื้อยีสต์มีการเจริญเติบโตแล้ว ประมาณ 24 ชั่วโมง จะมีความทนต่อสารสกัด ทั้งที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์และด้วยน้ำ รวมทั้งเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มมากขึ้น ดังนั้น ในการนำสารสกัดไปใช้ จึงควรเติมลงไปภายหลังจากเชื้อยีสต์มีการเจริญเติบโตแล้วนั่นเอง

ส่วนการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์จากส่วนที่แยกออกจากสารสกัดจากไม้เคี่ยม ไม่ได้นำมาปฏิบัติการทดลอง เนื่องจากปริมาณสารที่เกิดจุด จากหัวข้อ 3.4 มีปริมาณน้อยมาก จึงไม่สามารถนำมาทำการทดลองยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้

ตารางที่ 6 ผลการยับยั้งเชื้อยีสต์ของสารสกัดจากไม้เคี่ยม

แสดงในรูปของเส้นผ่าศูนย์กลางของการยับยั้ง (มิลลิเมตร) โดยใช้แผ่น disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร

| วิธีการปฏิบัติ | สารที่ใช้ | เชื้อ Saccharomyces สายพันธุ์ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Sc.90 | champange | burgundy | montrachet | sake |
| ปฏิบัติการทดลองทันทีหลังจาก spread เชื้อ | สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ | 14.17 | 13.90 | 13.71 | 14.33 | 13.86 |
| | สารสกัดด้วยน้ำ | 9.17 | 12.10 | 10.42 | 9.67 | 11.59 |
| | เอทธานอล 95 % | 14.83 | 14.64 | 14.21 | 15.56 | 14.18 |
| | น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ | 10.58 | 9.10 | 9.25 | 9.22 | 10.45 |
| ปฏิบัติการทดลองหลังบ่ม 24 ชม. | สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ | 10.21 | 12.33 | 11.41 | 10.21 | 11.77 |
| | สารสกัดด้วยน้ำ | 8.25 | 8.25 | 8.18 | 8.25 | 8.09 |
| | เอทธานอล 95 % | 10.92 | 11.63 | 12.09 | 10.92 | 12.05 |
| | น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ | 8.67 | 8.75 | 8.68 | 8.67 | 8.77 |

* ค่าผลการทดลอง เป็นค่าเฉลี่ยของการยับยั้ง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และในแต่ละซ้ำ ได้ผลการทดลอง 3 ค่า

13889

3. ทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ของเนื้อไม้เคี่ยม และสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยแอลกอฮอล์ในการหมักไวน์สับปะรด

การหมักไวน์สับปะรด โดยการเตรียมน้ำสับปะรดให้มีความหวาน 20 องศาบริกซ์ ( °Brix) ค่า พีเอช 3.5 โดยทำการหมักด้วยเชื้อ Saccharomyces cerevisiae Sc.90 เป็นเวลา 5 วัน ผลของการหมัก แสดงในตารางที่ 7 , 8 และ 9 ตามลำดับ

3.1 ผลการหมักชุดที่ 1 ทดลองใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 1 , 3 , 5 , 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร

การใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยม ในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำสับปะรด มีค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์สูงสุด ส่วนผลการใช้ 1 , 7 , 5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ลดลงตามลำดับ แต่จากการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมในปริมาณ 3 , 5 , 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรากฏลักษณะการหมักในช่วงระยะเวลา 5 วัน ดังได้แสดงในตารางที่ 7 ดังนั้นปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจากการใช้สารสกัด 10 เปอร์เซ็นต์ จึงอาจมีผลจากแอลกอฮอล์ที่มีอยู่ในสารสกัดที่ใช้นั่นเอง ดังนั้นจึงเลือกใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำสับปะรดในการทดลองต่อไป

การใช้เนื้อไม้เคี่ยมในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำสับปะรด มีค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์สูงสุด ส่วนการใช้เนื้อไม้เคี่ยมในปริมาณ 5 , 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ปรากฏลักษณะการหมักแต่เมื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ ปรากฏว่ามีค่าเท่ากับ 0 และในช่วงของการหมัก มีการเจริญเติบโตของราที่ผิวหน้าของน้ำสับปะรด

ในการหมักแอลกอฮอล์โดยไม่เติมสารใดเลย ปรากฏว่ามีเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์สูงกว่าการหมักโดยวิธีใดๆทั้งสิ้น

การหมักโดยการใช้ KMS (Potassium metabisulphite) ในปริมาณ 200 ppm. ไม่ปรากฏลักษณะของการหมัก เมื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ มีค่าเท่ากับ 0 ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณ KMS ที่ใช้สูงเกินไปจึงทำให้มีผลในการทำลายเซลของเชื้อยีสต์ได้

3.2 ผลการหมัก ชุดที่ 2

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักไวน์สับปะรดในสภาพที่ใช้และไม่ใช้สารสกัด ชุดที่ 1

| ชนิดของสารที่ใช้ | ปริมาณสารที่ใช้ (% ) | แอลกอฮอล์ ( % by volume) |
|---|---|---|
| WOOD | 1 | 6.85 |
| | 5 | 0** |
| | 10 | 0** |
| | 12 | 0** |
| Extract | 1 | 7.27 |
| | 3 | 2.17 * |
| | 5 | 3.67 * |
| | 7 | 5.39 * |
| | 10 | 7.48 * |
| KMS | 200 ppm. | 0 |
| NO | 0 | 8.23 |

* ไม่เกิดการหมัก

** มีเชื้อราเจริญบนผิวหน้า

NO การหมักโดยไม่เติมสารเคมี

เนื่องจากผลการหมักชุดที่ 1 ซึ่งใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมในปริมาณ 1 , 3 , 5 , 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ นำมาทำการปรับปรุงปริมาณการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมเป็น 0.5 , 1 , 2 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณการใช้เนื้อไม้เคี่ยม 0.5 , 1 , 2 , 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อความเหมาะสมในการหมัก ผลของการหมักแสดงในตารางที่ 8

การใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยม ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำสับปะรด มีค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์สูงสุด ส่วนผลการใช้ 0.5 , 2 , 3 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ลดลงตามลำดับ ซึ่งในการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยม ในปริมาณ 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรากฏลักษณะของการหมักในช่วงระยะเวลา 5 วัน

การใช้เนื้อไม้เคี่ยมในปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำสับปะรด มีค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์สูงสุด ส่วนผลการใช้ 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ลดลงตามลำดับ แต่การใช้เนื้อไม้เคี่ยมในปริมาณ 2.5 , 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ปรากฏลักษณะคล้ายลักษณะการหมัก แต่เมื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ มีค่าเท่ากับ 0 แสดงว่าลักษณะที่คล้ายการหมักนั้น เกิดจากการลอยตัว หรือการทำให้เกิดฟองอากาศของชิ้นไม้นั่นเอง และในการใช้เนื้อไม้เคี่ยม ในปริมาณ 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตของราที่ผิวหน้าน้ำสับปะรดในช่วงระยะเวลา 5 วันด้วย

ในการหมักโดยไม่เติมสารใดเลย ปรากฏว่ามีเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ต่ำกว่าการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมในปริมาณ 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ และการใช้เนื้อไม้เคี่ยมในปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์

การหมักโดยการใช้ KMS (Potassium metabisulphite) ในปริมาณ 200ppm. ไม่ปรากฏลักษณะของการหมัก เมื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ มีค่าเท่ากับ 0 เช่นเดียวกับการหมัก ชุดที่ 1

3.3 ผลการหมัก ชุดที่ 3

เนื่องจากผลการหมัก ชุดที่ 1 และ 2 จากการใช้ปริมาณสารสกัดจากไม้เคี่ยม เนื้อไม้เคี่ยมและ KMS นำมาทำการปรับปรุงปริมาณการใช้อีกครั้งหนึ่ง โดยปริมาณการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมเป็น 0.2 , 0.5 , 0.7 , 1 , 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณการใช้เนื้อไม้เคี่ยม 0.5 , 1 , 1.5 , และ 2 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณ KMS เท่ากับ 100ppm. เพื่อความเหมาะ

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักไวน์สับปะรดในสภาพที่ใช้และไม่ใช้สารสกัด ชุดที่ 2

| ชนิดของสารที่ใช้ | ปริมาณของสารที่ใช้ (% ) | แอลกอฮอล์ (% by volume) |
|---|---|---|
| WOOD | 0.5 | 6.22 |
| | 1 | 5.9 |
| | 2 | 2.7 |
| | 2.5 | 0 |
| | 3 | 0 ** |
| | 5 | 0 ** |
| Extract | 0.5 | 6.4 |
| | 1 | 6.83 |
| | 2 | 3.47 |
| | 2.5 | 1.91* |
| | 3 | 2.22* |
| KMS | 200 ppm | 0 |
| NO | 0 | 6.12 |

* ไม่เกิดการหมัก

** มีเชื้อราเจริญบนผิวหน้า

NO การหมักโดยไม่เติมสารเคมี

สมในการหมัก ผลการหมักแสดงในตารางที่ 9

การใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมในปริมาณ 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำสับปะรด มีค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์สูงสุด รองลงมาคือ 0.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ในการหมักโดยไม่เติมสารใดเลย ปรากฏว่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ได้ ต่ำกว่าการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมในปริมาณ 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์

ส่วนการหมักโดยใช้ KMS (Potassium metabisulphite) ในปริมาณ 100 ppm. ปรากฏว่า มีเปอร์เซนต์แอลกอฮอล์ต่ำ

จากการทดลองทั้ง 3 ชุด จะเห็นได้ว่าการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยแอลกอฮอล์ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมาะสมที่สุดในการที่จะนำมาใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในการหมักไวน์สับปะรด เพราะเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ได้สูงสุด แต่ในอีกกรณีหนึ่ง การหมักโดยไม่เติมสารใดเลย ก็อาจจะมีความเหมาะสมที่สุดเช่นกัน เพราะเป็นการลดขั้นตอน และลดค่าใช้จ่ายในการหมัก เนื่องจากไม่ต้องใช้สารใดเลย แต่เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นมีปริมาณต่ำกว่าการหมักโดยใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์เพียงเล็กน้อย และการหมักโดยไม่ใช้สารใดเลย จะต้องทำการฆ่าเชื้อน้ำผลไม้อย่างดีก่อนทำการหมัก เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อที่ไม่ต้องการ

ในการหมักโดยการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยม และการใช้ส่วนเนื้อของไม้เคี่ยมนั้น การหมักโดยการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยม จะให้ผลในการหมักที่ดีกว่า เมื่อมีการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมในปริมาณที่เหมาะสม และในสภาพเช่นนี้ สารสกัดจะช่วยลดความเป็นพิษของแอลกอฮอล์ต่อเชื้อยีสต์ ทำให้สามารถหมักแอลกอฮอล์ได้สูงขึ้นด้วย

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักไวน์สับปะรดในสภาพที่ใช้และไม่ใช้สารสกัด ชุดที่ 3

| ชนิดของสารที่ใช้ | ปริมาณสารที่ใช้ (% ) | แอลกอฮอล์ (% by volume) |
|---|---|---|
| WOOD | 0.5 | 7.82 |
| | 1 | 7.87 |
| | 1.5 | 7.87 |
| | 2 | 6.6 |
| Extract | 0.2 | 7.4 |
| | 0.5 | 8.02 |
| | 0.7 | 8.13 |
| | 1 | 8.9 |
| | 1.2 | 8.7 |
| | 1.5 | 7.92 |
| | 2 | 5.3 |
| KMS | 100 ppm. | 4.43 |
| NO | 0 | 8.63 |

NO : การหมักโดยไม่เติมสารเคมี

## วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์การแยกตัวของสารที่มีอยู่ในสารสกัด

1.1 ใช้ isopropanol : formic acid : water อัตราส่วนที่ใช้ 2 : 5 : 5 โดยปริมาตร เป็น mobile phase ปรากฏว่าอัตราการเคลื่อนที่ หรือ $R_f$ ของสารสกัดและสารแทนนิน (tannin) ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน มีค่าต่ำกว่า 1 เนื่องจากระยะทางการเคลื่อนที่ของสารต่ำกว่าระยะทางการเคลื่อนที่ของ mobile phase และค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารสกัดจากไม้เคี่ยมมีค่าสูงกว่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารแทนนิน ส่วนสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรากฏการเคลื่อนที่ของสาร ซึ่งอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารต่ำเกินไป ปริมาณสารที่มีอยู่น้อยมาก จึงไม่ปรากฏจุดหรือลักษณะการเคลื่อนที่ให้เห็น

1.2 ใช้ ethyl acetate : formic acid : water อัตราส่วนที่ใช้ 10 : 2 : 3 โดยปริมาตร เป็น mobile phase ปรากฏว่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารสกัดมีค่าเท่ากับ 1 เนื่องมาจากระยะทางการเคลื่อนที่ของสารสกัด เท่ากับระยะทางการเคลื่อนที่ของ mobile phase ส่วนอัตราการเคลื่อนที่ของสารมาตรฐาน มีค่าต่ำกว่า 1 และสารมาตรฐานมีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่ปรากฏการเคลื่อนที่เช่นเดียวกับการใช้ isopropanol : formic acid : water เป็น mobile phase

จากการใช้ mobile phase ทั้ง 2 ตัว จะเห็นได้ว่า ethylacetate : formic acid : water มีคุณสมบัติการพาสารได้ดีกว่า isopropanol : formic acid : water และค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารสกัดจากไม้เคี่ยมและสารมาตรฐาน มีความแตกต่างกันบ้าง แสดงว่าในไม้เคี่ยมมีสารแทนนินอยู่บ้าง และยังมีสารชนิดอื่นปนอยู่ด้วย ส่วนความเข้มข้นของสารที่แตกต่างกัน ไม่มีผลต่อค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารแต่อย่างใด

2. ทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

สารสกัดจากไม้เคี่ยมที่ใช้ในการทดลองทั้ง 2 ชนิด มีผลต่อเชื้อ Saccharomyces cerevisiae Sc. 90, champange, burgundy, montrachet และ sake

โดยที่สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำ จะมีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่าสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยแอลกอฮอล์ ซึ่งอาจเนื่องมาจากปริมาณแอลกอฮอล์ที่มีอยู่ในสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยแอลกอฮอล์ จึงทำให้มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์สูงกว่า แต่จากการเปรียบเทียบผลการยับยั้งเชื้อยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ สารสกัดจากไม้เคี่ยม มีผลในการยับยั้งเชื้อยีสต์ Sc.90 น้อยที่สุด ส่วนเชื้อสายพันธุ์ montrachet, burgundy, sake และ champange ถูกยับยั้งสูงขึ้นตามลำดับ นั่นแสดงว่า เชื้อ S. cerevisiae Sc.90 มีความคงทนต่อการยับยั้งของสารสกัดจากไม้เคี่ยมได้ดีที่สุด

จากผลการทดลองยับยั้งเชื้อยีสต์ด้วยสารสกัดที่กล่าวมา สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยแอลกอฮอล์ ให้ผลในการยับยั้งสูงกว่าสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยน้ำกลั่น นั่นแสดงว่าควรใช้แอลกอฮอล์ในการสกัดสารจากไม้เคี่ยม และทำการศึกษาต่อเฉพาะสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยแอลกอฮอล์เท่านั้น และสารสกัดจากไม้เคี่ยมด้วยแอลกอฮอล์ ยังช่วยลดผลการยับยั้งเชื้อยีสต์ด้วยเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นั่นแสดงว่า สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ ลดความเป็นพิษของแอลกอฮอล์ต่อเชื้อยีสต์ลงบ้าง นอกจากนี้แล้ว จะเห็นได้ว่า หลังจากเชื้อยีสต์มีการเจริญเติบโตแล้วประมาณ 24 ชั่วโมง จะมีความคงทนต่อสารสกัด ทั้งที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์และด้วยน้ำ รวมทั้งเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นในการนำสารสกัดไปใช้ จึงควรเติมลงไปภายหลังจากเชื้อยีสต์มีการเจริญเติบโตแล้วนั่นเอง

3. ทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ของเนื้อไม้เคี่ยมและสารสกัดจากไม้เคี่ยมในการหมักไวน์สับปะรด

ในการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยม ในปริมาณ 0.2 , 0.5 , 0.7 , 1 , 1.2 , 1.5 , 2 , 2.5 , 3 , 5 , 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำสับปะรด ในการใช้ปริมาณตั้งแต่ 2.5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ไม่ปรากฏลักษณะการหมัก แต่ปรากฏว่า มีเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์สูงขึ้นตามปริมาณที่ใช้ ปริมาณแอลกอฮอล์ที่มีอยู่นี้ จะเป็นปริมาณแอลกอฮอล์ที่มีอยู่ในสารสกัดจากไม้เคี่ยม และปริมาณแอลกอฮอล์นี้ เป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ที่ใช้ในการหมัก ส่วนสารสกัดจากไม้เคี่ยม ที่มีปริมาณการใช้ต่ำกว่า 2.5 เปอร์เซ็นต์ ปรากฏลักษณะของการหมัก และการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์สูงสุด จึงเป็นค่าที่มีความเหมาะสมในการใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่ไม่ต้องการ

ในการใช้เนื้อไม้เคี่ยมในปริมาณ 0.5 , 1 , 1.5 , 2 , 2.5 , 3 , 5 , 7 , 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ของน้ำสับปะรด ปรากฏว่าการใช้เนื้อไม้เคี่ยมในปริมาณตั้งแต่ 3 เปอร์เซ็นต์ขึ้น

ไป มีราเจริญเติบโตบนผิวหน้าของน้ำสับปะรด และปรากฏลักษณะของการหมักด้วย เมื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ ปรากฏว่ามีค่าเท่ากับ 0 จึงน่าจะเป็นไปได้ว่า ฟองที่เกิดขึ้น เป็นฟองอากาศจากเนื้อไม้ และสารจากเนื้อไม้ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ส่วนการใช้เนื้อไม้ในปริมาณที่ต่ำกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ลงมา ปรากฏว่าการใช้เนื้อไม้ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด จึงเป็นค่าที่มีความเหมาะสมในการใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในการหมักไวน์สับปะรดมากกว่าปริมาณเนื้อไม้ในปริมาณอื่น

ในการหมักโดยการใช้ KMS (Potassium metabisulphite) ในปริมาณ 200 ppm. ไม่ปรากฏลักษณะของการหมัก และไม่เกิดแอลกอฮอล์ ส่วนการใช้ KMS ในปริมาณ 100 ppm. ปรากฏลักษณะการหมัก แต่เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นต่ำมาก ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากปริมาณ KMS ที่ใช้มากเกินไป จึงมีผลในการยับยั้ง และทำลายเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมัก หรือปริมาณเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการ มีปริมาณน้อย หรือไม่มีเลย

ในการหมักโดยไม่เติมสารใดเลย เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ได้ จะสูงกว่าหรือต่ำกว่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ได้จากการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์น้อยมาก หรือไม่มีเลย ซึ่งเป็นผลให้การหมักเกิดขึ้นด้วยดี และการปรับ พีเอช ของน้ำสับปะรดที่ใช้ เท่ากับ พีเอช 3.5 จะช่วยให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดียิ่งขึ้น

## สรุปผล

จากผลการทดลองการแยกสารที่มีอยู่ในสารสกัดจากไม้เคี่ยม ปรากฏว่า อัตราการเคลื่อนที่ของสารสกัดจากไม้เคี่ยม มีค่าแตกต่างกับค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารแทนนิน พอสมควร ดังนั้นสารที่มีอยู่ในสารสกัดจากไม้เคี่ยม จึงมีสารแทนนินเพียงบางส่วน และยังมีสารประกอบชนิดอื่นรวมอยู่ด้วย

ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ปรากฏว่าสารสกัดจากไม้เคี่ยมมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่มีผลในการยับยั้งมากน้อยต่างกัน ซึ่งมีผลในการยับยั้งต่อเชื้อ Saccharomyces cerevisiae Sc.90 น้อยที่สุด ส่วนผลการยับยั้ง สายพันธุ์ montrachet, burgundy, sake และ champange สูงขึ้นตามลำดับ

ในการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักไวน์สับปะรดด้วยเชื้อ Saccharomyces cerevisiae Sc.90 ปรากฏว่า การหมักโดยการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำสับปะรด จะให้เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์สูงสุด รองลงมาคือ การหมักโดยไม่เติมสารใดเลย แต่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อให้เดือดประมาณ 10 นาที ซึ่งเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์จะต่ำกว่าเพียงเล็กน้อย และการหมักโดยการใช้เนื้อไม้เคี่ยมในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดในการหมัก โดยใช้เนื้อไม้เคี่ยม แต่ไม่ได้มีความเหมาะสมที่สุดในการหมักไวน์สับปะรด เพราะเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ได้ ยังต่ำกว่าการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณใกล้เคียง รวมทั้งปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ ต่ำกว่าการหมักโดยไม่เติมสารใดเลยด้วย ส่วนการหมักโดยการใช้ KMS (Potassium metabisulphite) มีปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ต่ำมาก หลังจากทำการหมักในระยะเวลา 5 วัน

# เอกสารอ้างอิง


จำลอง เพ็งคล้าย. 2526. ไม้มีค่าทางเศรษฐกิจของไทย. กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ

ณรงค์ โชณานนท์. 2523. ไม้เนื้อแข็งของประเทศไทย. กองวิจัยผลิตผลป่าไม้. กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ

นิรนาม. 2491. ไม้และของป่าบางชนิดในประเทศไทย. ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. กรมป่าไม้. โรงพิมพ์สมัยนิยม.

ปทุมพร ฉิมเอนก. 2526. การใช้สารกันบูดในไวน์. วารสารชมรมผู้หมักแอลกอฮอล์แห่งประเทศไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 217 - 219.

ประดิษฐ์ ครุวัฒนา. 2525. ไวน์ผลไม้เกษตร. วารสารชมรมผู้หมักแอลกอฮอล์แห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 24 - 32.

ปราโมทย์ ธรรมรัตน์. 2521. การศึกษายีสต์ในน้ำตาลสด น้ำตาลเมาและการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อการหมักแอลกอฮอล์. กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์. 2522. อุตสาหกรรมอาหารหมักดอง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลัดดาวัลย์ บุญรัตนกรกิจ. 2521. ชื่อพืชสมุนไพรและประโยชน์. แผนกวิชาเภสัชพฤกษศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิวพร จินตนาวงศ์ และคณะ. 2525. อิทธิพลของพันธุ์สับปะรดต่ออัตราการหมักและคุณภาพของไวน์. วารสารชมรมผู้หมักแอลกอฮอล์แห่งประเทศไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 108-112.

Ahmad, M.,A.R. Chaudhury and K.U. Ahmad. 1954. Studies on Toddy yeast. Mycologia. 46:708-720.

Amerine M.A. and C.S. Ough. 1980. Methods for analysis of musts and wine, University of California. p. 74.

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

Faparusi, S.I. and O. Bassir. 1972 a. Effect of extracts of the bark of Saccoglottis gabonensis on the microflora of palm wine. Appl. Microbiology. 24: 853 - 856.

Faparusi, S.I. 1974. Microorganism from oil palm tree (Elaeis quineensis) tap holes. J. Food Sci. 39: 755-757.

Okafor, N. 1875 b. Microbiology of Nigeria palm wine with particular reference to bacteria, J. of Appl. Bact. 38: 81 - 88.

Vonossi, L. 1971. Palm wines. Industries Alimentari. 10:90-92

ภาคผนวก

การหาปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่องอีบูลิโอมิเตอร์

การใช้เครื่องมือชนิดนี้เหมาะสำหรับหาเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ในสารละลาย ที่มีเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ไม่เกิน 20 ดีกรี

1. หาอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำ โดยตวงน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในเครื่อง เสียบเทอร์โมมิเตอร์ประกอบเข้าเครื่อง ไม่ต้องเติมน้ำหล่อคอนเดนเซอร์ จุดตะเกียงแอลกอฮอล์ ต้มน้ำกลั่นจนเดือด อุณหภูมิของเทอร์โมมิเตอร์จะสูงขึ้นไป และหยุดนิ่งที่จุดหนึ่ง อ่านอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำ เช่น อ่านได้ 100.1 องศาเซลเซียส นำค่าที่ได้ไปปรับแผ่นสเกล เพื่อใช้อ่านค่าแอลกอฮอล์ต่อไป

2. หาอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำหมัก โดยการตวงน้ำหมัก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในเครื่อง เสียบเทอร์โมมิเตอร์ ประกอบเข้าเครื่อง เติมน้ำหล่อคอนเดนเซอร์ จุดตะเกียงแอลกอฮอล์ต้มให้ความร้อน จนอุณหภูมิของน้ำหมักขึ้นไปหยุดนิ่งที่จุดหนึ่ง อุณหภูมิที่อ่านได้คือ จุดเดือดของน้ำหมัก เช่น อ่านค่าได้ 93.05 องศาเซลเซียส นำไปเปรียบเทียบหาดีกรีแอลกอฮอล์จากแผ่นสเกล จากข้อ 1 อ่านดีกรีแอลกอฮอล์ได้ 9 ดีกรี เป็นต้น

ในกรณีหาดีกรีแอลกอฮอล์ในน้ำหมักหลายๆตัวอย่างในเวลาเดียวกัน ให้หาอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำเพื่อปรับแผ่นสเกลครั้งแรก และหาอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำหมักหลายๆตัวอย่างติดต่อกันได้ โดยอ่านค่าดีกรีแอลกอฮอล์จากแผ่นสเกลที่ปรับไว้ครั้งแรก โดยไม่จำเป็นต้องหาอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำ เพื่อปรับแผ่นสเกลทุกๆตัวอย่าง น้ำหมักที่ต้องการหา ส่วนในกรณีที่หาดีกรีแอลกอฮอล์ที่ระยะเวลาต่างกัน จึงต้องหาจุดเดือดของน้ำอีกครั้งหนึ่ง