

การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียอะซิติก และยีสต์จากการหมักน้ำส้มสายชู
เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำส้มสายชูหมัก

ISOLATION AND SELECTION OF ACETIC ACID BACTERIA AND
YEAST FROM VINEGAR FERMENTATION FOR QUALITY
IMPROVEMENT OF VINEGAR

รุจิรา ทองเหลือดี
RUJIRA THONGLUEDEE

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2563

KMITL-2020-SC-M-020-033

การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียอะซิติก และยีสต์จากการหมักน้ำส้มสายชู
เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำส้มสายชูหมัก

ISOLATION AND SELECTION OF ACETIC ACID BACTERIA AND
YEAST FROM VINEGAR FERMENTATION FOR QUALITY
IMPROVEMENT OF VINEGAR

รุจิรา ทองเหลือดี

RUJIRA THONGLUEDEE

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2563

KMITL-2020-SC-M-020-033

ISOLATION AND SELECTION OF ACETIC ACID BACTERIA AND
YEAST FROM VINEGAR FERMENTATION FOR QUALITY
IMPROVEMENT OF VINEGAR

RUJIRA THONGLUEDEE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2020

KMITL-2020-SC-M-020-033

COPYRIGHT 2020

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียอะซิติกและยีสต์จากการหมักน้ำส้มสายชูเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำส้มสายชูหมัก	
ชื่อนักศึกษา	รุจิรา ทองเหลือดี	
รหัสประจำตัว	59605051	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
พ.ศ.	2563	
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดวงใจ โอชัยกุล	
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์	

บทคัดย่อ

น้ำส้มุนไพรหมักลูกแอปเปิ้ลแม่เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทน้ำส้มสายชูที่หมักด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ต้องใช้เวลาในการหมักนานและควบคุมคุณภาพให้สม่ำเสมอได้ยาก อีกทั้งผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณแอลกอฮอล์เกินมาตรฐาน ในงานวิจัยนี้ได้สนใจคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมัก คือ ยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักผลิตผลิตภัณฑ์น้ำส้มุนไพรหมักลูกแอปเปิ้ลแม่ จากการคัดแยกเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกจากกระบวนการหมักน้ำส้มุนไพรหมักลูกแอปเปิ้ลแม่ สามารถคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกได้ 72 และ 112 ไอโซเลต ตามลำดับ ยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* ไอโซเลต YM1-19 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 1.30 ± 0.31 โดยปริมาตรต่อปริมาตร สำหรับแบคทีเรียอะซิติก พบว่า *Acetobacter pasteurianus* ไอโซเลต EM2-03 สามารถผลิตกรดทั้งหมดได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 3.67 ± 0.34 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นนำยีสต์และแบคทีเรียทั้งสองชนิดมาหมักน้ำส้มุนไพรด้วยกระบวนการหมักแบบร่วมขั้นตอนเดียว (ระยะเวลาหมัก 32 วัน) และสองขั้นตอน (ระยะเวลาหมัก 22 วัน) พบว่าน้ำหมักส้มุนไพรที่ได้มีค่า pH เท่ากับ 3.04-3.07 ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) เท่ากับร้อยละ 4.91-5.12 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด $1,908-1,954.94 \mu\text{gGAE/mL}$ และค่า IC_{50} ของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ $0.017 \pm 0.001 \mu\text{L/mL}$ กระบวนการหมักทั้งสองกระบวนการมีปริมาณแอลกอฮอล์ตกค้างในผลิตภัณฑ์ร้อยละ $0.23 \pm 0.16-0.30 \pm 0.06$ โดยปริมาตรต่อปริมาตร เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักน้ำส้มุนไพรทางการค้า พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์มีคุณภาพทางเคมีใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างทางสถิติและใช้เวลาในการหมักน้อยกว่า 5 เดือน จากระยะเวลาของน้ำส้มุนไพรหมักที่ได้จากกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนมีคะแนนความชอบโดยรวมสูงสุดเท่ากับ 6.65 ± 1.04 คะแนน ซึ่งหมายถึงผู้บริโภคมีความชอบผลิตภัณฑ์ในระดับปานกลาง

คำสำคัญ : เครื่องดื่มน้ำส้มุนไพรหมักลูกแอปเปิ้ลแม่ น้ำส้มสายชูหมัก ยีสต์ แบคทีเรียอะซิติก

Thesis Title	Isolation and selection of acetic acid bacteria and yeast from vinegar fermentation for quality improvement of vinegar
Student Name	Rujira Thongluedee
Student ID	59605051
Degree	Master degree of science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2020
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul
Thesis Co-advisor	Asst. Prof. Dr. Tipachai Vatanavicharn

Abstract

Look Plaag Mea is a traditional drinking vinegar produced by spontaneous fermentation process which was difficult to maintain of the product quality and taking a long fermentation time. Furthermore, the residual alcohol content was higher than standard vinegar. The object of this research was to isolate yeast and acetic acid bacteria which were the important microorganisms in vinegar production and preparation of a starter culture. Seventy-two and 112 isolates of yeast and acetic acid bacteria were found. *Schizosaccharomyces pombe* YM1-19 and *Acetobacter pasteurianus* EM2-03 showed the highest ethanol content and total acid content at $1.30\pm 0.31\%$ (v/v) and $3.67\pm 0.34\%$ (w/v), respectively. *S. pombe* YM1-12 and *A. pasteurianus* EM2-03 were utilized to produce herbal vinegar using one-stage (32 fermentation days) and two-stage (22 fermentation days) fermentation. In these cases, the pH values, total acidity content, total phenolic content and IC_{50} value of DPPH radical scavenging ranged from 3.04 to 3.07, 4.91 to 5.12., 1,908 to 1,954.94 $\mu\text{gGAE/mL}$ and 0.017 ± 0.001 $\mu\text{L/mL}$, respectively. The residual alcohol was $0.23\pm 0.16\%$ to $0.30\pm 0.06\%$. The physiochemical properties of vinegar with pure-culture vinegar was not significantly difference between the commercial vinegar but it is less fermentation time than 5 months. Sensory evaluation showed that the beverage produced from two-stage fermentation displayed the highest overall acceptability with an average score of 6.65 ± 1.04 , which indicated the moderately pleasant levels of the vinegar preference of the consumers.

Keywords : Loog Plaag Mea beverage, fermented vinegar, yeast, acetic acid bacteria

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โดยได้รับความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข ประธานกรรมการ และรองศาสตราจารย์ ดร.สร้อยญา พันธุ์พฤษ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง งบประมาณรายได้ ประจำปี 2562 จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรจน์ประสานมิตรที่กรุณาให้ใช้สถานที่ในการวิจัย

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่ได้ให้กำลังใจช่วยเหลือสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางสาวรุจิรา ทองเหลือดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 น้ำส้มสายชู.....	3
2.2 น้ำส้มสายชูหมัก.....	3
2.3 กระบวนการหมักน้ำส้มสายชู.....	4
2.3.1 กระบวนการหมักเอทานอล.....	5
2.3.2 กระบวนการผลิตกรดอะซิติก	7
2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก	8
2.4.1 ยีสต์	8
2.4.2 แบคทีเรียอะซิติก	10
2.5 เครื่องดื่มหมักสมุนไพรลูกแปลกแม่.....	11
2.6 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำหมักสมุนไพรลูกแปลกแม่.....	14
2.6.1 กลัวยน้ำว่า.....	14
2.6.2 พริกไทยดำ.....	17
2.6.3 มะตูม.....	21
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	22
2.7.1 การคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก	22
2.7.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชู.....	23
2.7.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำส้มสายชู.....	24
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน	27

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการทดลอง	27
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	27
3.3 สารเคมี.....	27
3.4 วัสดุและอุปกรณ์	28
3.5 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	29
3.5.1 กระบวนการผลิตน้ำหมักสมุนไพรลูกแมลง.....	29
3.5.2 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของน้ำหมักสมุนไพรลูกแมลงในแต่ละ ช่วงการหมัก.....	30
3.5.3 การคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกจากน้ำหมักในแต่ละ ช่วงการหมัก.....	30
3.5.4 การศึกษาความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ที่คัดแยกได้	30
3.5.4.1 อาหาร YPD	30
3.5.4.2 อาหารน้ำหมัก.....	31
3.5.5 การจัดจำแนกยีสต์	31
3.5.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์	31
3.5.5.2 การทดสอบทางชีวเคมีของยีสต์.....	31
3.5.5.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดแยกได้	32
3.5.6 การศึกษาความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกของแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	36
3.5.6.1 อาหาร YEC	36
3.5.6.2 อาหารน้ำหมัก.....	37
3.5.7 การจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติก.....	37
3.5.7.1 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียอะซิติก	37
3.5.7.2 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียอะซิติก.....	37
3.5.7.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียอะซิติกที่คัดแยกได้	38
3.5.8 ศึกษากระบวนการหมักน้ำหมักสมุนไพรลูกแมลงด้วยเชื้อบริสุทธิ์ ที่คัดแยกได้	40
3.5.8.1 การเตรียมวัตถุดิบในการหมัก.....	40
3.5.8.2 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก.....	40
3.5.8.3 กระบวนการหมักน้ำหมักสมุนไพรลูกแมลง	40
3.5.8.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำหมักสมุนไพรลูกแมลง.....	41

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.9 การทดสอบทางประสาทสัมผัส.....	42
3.5.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	42
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	43
4.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำหมักสมุนไพรในแต่ละช่วงการหมัก	43
4.2 การคัดแยกและการศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ที่คัดแยกได้จากน้ำหมักสมุนไพร	45
4.2.1 การคัดแยกยีสต์จากน้ำหมักสมุนไพร.....	45
4.2.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์	45
4.2.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์	47
4.3 การแยกและการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียอะซิติกที่คัดแยกได้จากน้ำหมัก สมุนไพร.....	53
4.3.1 การคัดแยกแบคทีเรียอะซิติกจากน้ำหมักสมุนไพร.....	53
4.3.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกของแบคทีเรียที่คัดแยกได้	53
4.3.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียอะซิติก	55
4.4 การศึกษาความสามารถของยีสต์และแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการหมักน้ำสมุนไพร	60
4.4.1 ผลการศึกษากระบวนการหมักน้ำสมุนไพรด้วยกระบวนการหมักร่วม ขั้นตอนเดียว (One-stage fermentation).....	60
4.4.2 การศึกษากระบวนการหมักน้ำสมุนไพรด้วยกระบวนการหมักแยก สองขั้นตอน (Two-stage fermentation).....	66
4.5 การเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำหมักสมุนไพรที่ได้จากกระบวนการหมักร่วม ขั้นตอนเดียวและกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ กับน้ำหมักสมุนไพรทางการค้า	72
4.6 การปรับปรุงรสชาติผลิตภัณฑ์และการทดสอบทางประสาทสัมผัส	73
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	76
5.1 สรุปผลการวิจัย	76
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	76
บรรณานุกรม.....	78
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	91
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี.....	96
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน.....	102
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	105

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก จ ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 204) พ.ศ.2543 เรื่อง น้ำส้มสายชู	117
ภาคผนวก ฉ มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน เรื่อง น้ำส้มสายชูหมัก	120
ภาคผนวก ช การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	125
ประวัติผู้เขียน.....	161

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในน้ำส้มสายชูหมัก.....	5
2.2 การจัดจำแนกยีสต์ใน Class <i>Saccharomycetes</i>	9
2.3 ลักษณะความแตกต่างของแบคทีเรียอะซิติกในจีโนม <i>Acetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Gluconacetobacter</i> และ <i>Komagataeibacter</i>	10
2.4 วิตามิน แร่ธาตุ และกรดอินทรีย์ในผลกล้วยน้ำว้าดิบและสุก	15
3.1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ของยีสต์ปริมาตร 25 ไมโครลิตร.....	33
3.2 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจากยีสต์เป็นต้นแบบ	33
3.3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Ligation ปริมาตร 5 ไมโครลิตร	34
3.4 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา colony PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร.....	35
3.5 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจาก Colony เป็นต้นแบบ.....	35
3.6 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียเป็นต้นแบบ	39
4.1 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรหมักในระยะเวลาหมักต่างๆ.....	44
4.2 การจัดจำแนกยีสต์ 5 ไอโซเลตบริเวณ ITS region.....	49
4.3 ผลทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อยีสต์ 5 ไอโซเลต	51
4.4 ปริมาณแบคทีเรียอะซิติกที่เจริญในอาหารที่มีเอทานอลร้อยละ 5 และ 10 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน	56
4.5 ผลทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียอะซิติกสายพันธุ์ EM2-03, EM3-01, EM3-03 และ EM3-06.....	56
4.6 การจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติก 4 ไอโซเลตบริเวณ 16S rDNA	58
4.7 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวด้วย <i>S. pombe</i> YM1-12 และ <i>A. pasteurianus</i> EM2-03 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน.....	63
4.8 การเปลี่ยนแปลงของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, IC ₅₀ ของอนุมูลอิสระ DPPH และ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวด้วยเชื้อ <i>S. pombe</i> YM1-19 และ <i>A. pasteurianus</i> EM2-03 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 32 วัน	66
4.9 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนด้วย เชื้อ <i>S. pombe</i> YM1-19 และ <i>A. pasteurianus</i> EM2-03 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน.....	69

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
<p>4.10 การเปลี่ยนแปลงของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, IC₅₀ ของอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอน ด้วยเชื้อ <i>S. pombe</i> และ <i>A. pasteurianus</i> ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน.....</p>	71
<p>4.11 คุณภาพทางเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอน และการหมักทางการค้า</p>	73
<p>4.12 คุณภาพทางเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอนและการหมักทางการค้าภายหลังการปรับปรุงรสชาติ</p>	74
<p>4.13 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์น้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอนและการหมักทางการค้าภายหลังการปรับปรุงรสชาติด้วยน้ำผึ้ง</p>	75

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 วัฏจักรการสังเคราะห์เอทานอลจากสารตั้งต้นที่เป็นน้ำตาลกลูโคส.....	6
2.2 การออกซิเดชันของเอทานอลเป็นกรดอะซิติก.....	7
2.3 แผนภาพการผลิตเครื่องดื่มน้ำสมุนไพรหมักลูกปลอกแม่.....	13
2.4 กล้วยน้ำว่า.....	14
2.5 โครงสร้างสามมิติของแบนแลค (BanLac) ที่แยกได้จากกล้วย.....	16
2.6 พริกไทยดำ.....	17
2.7 โครงสร้างของสารตัวอย่างที่พบในพริกไทยดำ.....	20
2.8 มะตูม.....	21
4.1 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมัก.....	44
4.2 ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากเชื้อยีสต์ที่แยกได้ในอาหารเหลว YPD และอาหาร น้ำสมุนไพรในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง.....	47
4.3 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง Malt medium (ก.) และรูปร่างเซลล์ <i>Schizosac-</i> <i>charomyces pombe</i> YM1-19 (ข.) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด (SEM) ที่ กำลังขยาย 2,500 เท่า.....	48
4.4 Gel electrophoresis ของ PCR product บริเวณ Internal transcribed spacer region (ITS region) ของยีสต์ไอโซเลต YM1-12, YM1-19, YM5-02, YM5-03 และ YM6-03.....	48
4.5 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีสต์ 5 ไอโซเลต ได้แก่ YM1-12, YM1-19, YM5-02, YM5-03 และ YM6-03 ที่สร้างด้วยวิธี Neighbor-Joining ด้วยโปรแกรม MEGAX.....	50
4.6 ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ของแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอาหาร YEC และอาหารน้ำสมุนไพร บ่มในสถานะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศา- เซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง.....	54
4.7 รูปร่างเซลล์ของ <i>Acetobacter pasteurianus</i> EM2-03 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า (ก.) ลักษณะโคโลนี บนอาหาร GYC agar (ข.) และการผลการศึกษากาเกิด Overoxidation ของ เอทานอลบนอาหาร Carr medium บ่มที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียสนาน 7 วัน (ค.) และ 14 วัน (ง.).....	55
4.8 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียอะซิติก 4 ไอโซเลต ได้แก่ EM2-03, EM3-01, EM3-03 และ EM3-07 ที่สร้างด้วยวิธี Neighbor-Joining ด้วย โปรแกรม MEGAX.....	57

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.10 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวด้วยเชื้อ <i>S. pombe</i> YM1-19 และ <i>A. pasteurianus</i> EM2-03 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน.....	64
4.11 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวด้วยเชื้อ <i>S. pombe</i> YM1-19 และ <i>A. pasteurianus</i> EM2-03 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน.....	65
4.12 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและค่า IC ₅₀ ของอนุมูลอิสระ DPPH ระหว่างการหมักร่วมขั้นตอนเดียวด้วยเชื้อ <i>S. pombe</i> YM1-19 และ <i>A. pasteurianus</i> EM2-03 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง นาน 32 วัน.....	65
4.13 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนด้วยเชื้อ <i>S. pombe</i> YM1-19 และ <i>A. pasteurianus</i> EM2-03 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน.....	70
4.14 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนด้วยเชื้อ <i>S. pombe</i> YM1-19 และ <i>A. pasteurianus</i> EM2-03 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน.....	70
4.15 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและค่า IC ₅₀ ของอนุมูลอิสระ DPPH ระหว่างกระบวนการหมักแบบสองขั้นตอนด้วยเชื้อ <i>S. pombe</i> YM1-12 และ <i>A. pasteurianus</i> EM2-03 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 22 วัน.....	71

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ในปัจจุบันกระแสความนิยมของผู้บริโภคที่หันมาใส่ใจสุขภาพมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ผู้ประกอบการริเริ่มและคิดค้นผลิตภัณฑ์ใหม่ๆที่ใช้ประโยชน์จากสมุนไพร ซึ่งเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ สารพฤกษเคมี และวิตามินต่างๆที่มีส่วนช่วยส่งเสริมการดูแลสุขภาพ

น้ำส้มสายชูหมัก (Fermented vinegar) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการบริโภคกันอย่างแพร่หลายมานานกว่า 3,000 ปี ได้จากกระบวนการหมัก 2 ขั้นตอนคือ Alcoholic fermentation และ Acetous fermentation โดยใช้วัตถุดิบทางการเกษตรจำพวกแป้งและน้ำตาลในการผลิต นอกจากนี้ น้ำส้มสายชูจะถูกใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร สารปรุงรส และสารช่วยในการถนอมอาหารแล้ว ยังมีการบริโภคน้ำส้มสายชูหมักในรูปของเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ โดยมีส่วนช่วยลดระดับน้ำตาลกลูโคสและอินซูลินที่เพิ่มขึ้นภายหลังการรับประทานอาหาร ทำให้ความเสี่ยงในการเกิดโรคเบาหวานลดลง ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดโดยการยับยั้งอนุมูลอิสระของไขมันชนิด LDLs (Low density lipoproteins) รวมทั้งมีผลต่อการลดน้ำหนัก เนื่องจากน้ำส้มสายชูช่วยลดความอยากอาหารลงและยับยั้งปัจจัยที่ทำให้เกิดการอักเสบได้ (Laranjinha *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007)

เครื่องดื่มน้ำสมุนไพรหมักลูกแอปเปิ้ล เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักชนิดหนึ่งที่ผลิตและจัดจำหน่ายโดยผู้ประกอบการในจังหวัดศรีสะเกษ โดยพัฒนารูปแบบการผลิตจากยาลูกกลอนตามตำหรับยาสมุนไพรมะตูมในพระราชบัญญัติของสมเด็จพระมหากษัตริย์ กรมพระยา-ปวเรศวริยาลงกรณ์ โดยใช้พริกไทยดำ มะตูม และกล้วยน้ำว้าหรือกล้วยน้ำไทที่มีสรรพคุณใกล้เคียงกันมาเป็นวัตถุดิบ มีสรรพคุณกระตุ้นกำลัง ทำให้ร่างกายสดชื่น บำรุงผิวพรรณ ช่วยชะลอวัย บำรุงโลหิต แก้ปวดเมื่อย และยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง (ขวัญเรือน และคณะ, 2554)

การผลิตเครื่องดื่มน้ำหมักสมุนไพรหมักลูกแอปเปิ้ล เป็นกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูตามธรรมชาติ โดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบ จึงต้องใช้ระยะเวลาหมักนานประมาณ 1 ปี ส่งผลให้ผู้ประกอบการไม่สามารถควบคุมคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์สุดท้ายให้มีรสชาติและปริมาณกรดอะซิติกให้คงที่ รวมถึงปริมาณแอลกอฮอล์ให้เป็นไปตามมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขและฮาลาล (Halal) ดังนั้นเพื่อให้การหมักมีประสิทธิภาพ และได้ผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานที่กำหนด การเลือกใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์จึงเป็นสิ่งสำคัญในการพัฒนากระบวนการผลิตและนำมาใช้ในการขยายขนาดการผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรม (จุฑามาศ, 2551) อีกทั้งการใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ยังเป็นการลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในผลิตภัณฑ์และความล้มเหลวของการหมัก (ศิริพร, 2558)

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักน้ำส้มสายชู ได้แก่ ยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยพัฒนากระบวนการผลิตและลดระยะเวลาในผลิต รวมถึงควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้คงที่ การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก รวมทั้งคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการหมักผลิตภัณฑ์ และนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาใช้ในการหมัก เพื่อให้กระบวนการหมักมีประสิทธิภาพ ลดระยะเวลาในการหมัก และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน รวมทั้งสามารถพัฒนาและนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. คัดแยกและคัดเลือกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกจากกระบวนการหมักน้ำสุมุนไพร่ลูกแปลกแม่
2. จัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่คัดแยกได้ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี และเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลในการจัดจำแนก
3. ศึกษากระบวนการหมักน้ำสุมุนไพร่หมักลูกแปลกแม่ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยใช้ยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่คัดแยกได้ และศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมัก
4. ศึกษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์น้ำสุมุนไพร่หมักภายหลังการปรับปรุงรสชาติ รวมทั้งทดสอบทางประสาทสัมผัส

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. คัดแยกและจัดจำแนกจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในระหว่างกระบวนการหมักสุมุนไพร่ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี และใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลในการจัดจำแนก
2. ศึกษากระบวนการหมักเครื่องดื่มน้ำสุมุนไพร่หมักลูกแปลกแม่ โดยใช้เชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่คัดเลือกได้ด้วยกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวและการหมักแยกสองขั้นตอน และศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมัก ได้แก่ pH ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด รวมทั้งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักด้วยวิธีดั้งเดิมของผู้ประกอบการ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักน้ำสุมุนไพร่ลูกแปลกแม่ ทำให้ควบคุมกระบวนการหมักให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพเป็นไปตามมาตรฐาน และลดระยะเวลาในการหมักลง สามารถนำไปพัฒนาและขยายการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำส้มสายชู

น้ำส้มสายชูเป็นเครื่องปรุงรสชนิดหนึ่งที่มีการใช้มาอย่างยาวนาน ถูกใช้เป็นสารปรุงรสและสารถนอมอาหาร ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก. 83-2527) น้ำส้มสายชูหมายถึงผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส ทำจากวัตถุดิบที่เหมาะสมตามกรรมวิธีการผลิตน้ำส้มสายชูแต่ละประเภท คำว่า Vinegar มาจากภาษาฝรั่งเศส 2 คำ คือ Vin และ Aigre ที่แปลว่า ไวน์ที่มีรสเปรี้ยว ตามที่มาของน้ำส้มสายชู ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการหมักไวน์ในสภาวะที่มีอากาศ (Solieri and Giudici, 2009)

น้ำส้มสายชูสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ดังต่อไปนี้ (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2556)

1. น้ำส้มสายชูหมัก หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำธัญพืช ผลไม้ หรือน้ำตาลมาหมักกับสาเหล้ม จากนั้นหมักต่อด้วยเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีธรรมชาติ
2. น้ำส้มสายชูกลั่น หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำแอลกอฮอล์กลั่นเจือจาง (Dilute distilled alcohol) มาหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชู หรือเมื่อหมักแล้วนำไปกลั่นอีก หรือได้จากการนำน้ำส้มสายชูหมักมากลั่น
3. น้ำส้มสายชูเทียม หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำกรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติก (Acetic acid) มาเจือจาง

2.2 น้ำส้มสายชูหมัก

น้ำส้มสายชูหมักเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากกระบวนการหมักวัตถุดิบทางการเกษตร จำพวกน้ำตาลและคาร์โบไฮเดรตจนได้กรดอะซิติกเป็นองค์ประกอบหลัก โดยสามารถแบ่งชนิดของน้ำส้มสายชูหมักได้ 2 ประเภทตามชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ ได้แก่ น้ำส้มสายชูผลไม้ (Fruit vinegar) และน้ำส้มสายชูธัญพืช (Grain vinegar) การหมักน้ำส้มสายชูสามารถหมักได้ทั้งแบบ Solid-state และ Liquid-state น้ำส้มสายชูส่วนใหญ่ในแถบยุโรปจะใช้การหมักแบบ Liquid-state เช่น น้ำส้มสายชูบัลซามิก น้ำส้มสายชูเชอร์รี่ และน้ำส้มสายชูแอปเปิ้ล โดยวัตถุดิบที่นิยมใช้หมักจะเป็นผลไม้ เช่น องุ่น แอปเปิ้ล พลับ สับปะรด และมะเขือเทศ ส่วนประเทศแถบเอเชียการหมักน้ำส้มสายชูส่วนใหญ่จะเป็นการหมักแบบ Solid state เช่น น้ำส้มสายชูโคโรซุ Shanxi aged vinegar และ Zhenjiang aromatic vinegar เป็นต้น โดยใช้ข้าวฟ่าง รำข้าวสาลี ถั่ว ข้าว และข้าวเปลือกเป็นวัตถุดิบ (Xia et al., 2020)

น้ำส้มสายชูถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ตั้งแต่ปลายศตวรรษที่ 18 ในการบำบัดผู้ป่วยที่ติดเชื้อเสฟติด แต่การบริโภคน้ำส้มสายชูเป็นเวลานานกลับช่วยดูแลสุขภาพและบำรุงร่างกาย ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงเริ่มศึกษาประโยชน์ของการบริโภคน้ำส้มสายชูต่อการส่งเสริมสุขภาพ โดยมีงานวิจัยจำนวนมากที่รายงานว่า กรดอะซิติกจัดเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดหนึ่งที่พบมากในน้ำส้มสายชู และมีส่วนในการช่วยป้องกันโรคต่างๆ (Petsiou *et al.*, 2014)

น้ำส้มสายชูหมักอุดมไปด้วยสารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ กรดอะมิโน น้ำตาล กรดอินทรีย์ Polyphenols Melanoidins และ Tetramethylpyrazine (Ho *et al.*, 2016; Salbe *et al.*, 2009) โดยสารสำคัญเหล่านี้จะมีความใกล้เคียงกับวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก ทั้งนี้จะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับเทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิต ปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และการเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างขั้นตอนการหมัก (Cho *et al.*, 2007) น้ำส้มสายชูหมักจัดเป็นน้ำส้มสายชูที่มีกลิ่นหอมและรสชาติดี ซึ่งกลิ่นและรสที่เกิดขึ้นเกิดจากน้ำตาลและกลิ่นของวัตถุดิบที่ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ สำหรับสีของน้ำส้มสายชูจะมีความแตกต่างกันตามชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ โดยสารต่างๆเหล่านี้ไม่เพียงเป็นตัวให้กลิ่นและรสแก่น้ำส้มสายชูเท่านั้น แต่ยังมีบทบาทสำคัญในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ในมนุษย์ เช่น ช่วยยับยั้งการอักเสบ ต้านต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย ป้องกันโรคมะเร็ง (Xia *al.*, 2020) และจากการศึกษาของ Cho *et al.*, (2010) พบว่าสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ Chlorogenic acid, Gallic acid และ Caffeic acid ในน้ำส้มสายชูมีส่วนช่วยในการกระตุ้นระบบเผาผลาญไขมันและมีผลต่อการลดน้ำหนักของหนูทดลอง และมีรายงานว่าน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ Arabinose, Xylose, Glucose และ Mannose ใน Buckwheat vinegar มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและช่วยเสริมภูมิคุ้มกัน (Sun *et al.*, 2011)

ตามประกาศมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน เรื่องน้ำส้มสายชูหมัก (มพข. 326/2547) ได้กำหนดมาตรฐานของน้ำส้มสายชูหมักคือ จะต้องเป็นของเหลวใส อาจตกตะกอนได้เมื่อวางทิ้งไว้ มีสีที่ติดตามธรรมชาติของน้ำส้มสายชูหมัก ต้องมีกลิ่นของกรดอะซิติกและอาจมีกลิ่นของวัตถุดิบที่ใช้หมักอยู่ด้วยได้ ต้องไม่มีสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ ห้ามใช้สีสังเคราะห์ ต้องมีกรดอะซิติกไม่น้อยกว่าร้อยละ 4 และเมทานอลไม่เกิน 420 มิลลิกรัมต่อลิตร (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2556)

2.3 กระบวนการหมักน้ำส้มสายชู

กระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจะประกอบด้วยกระบวนการทางชีวภาพ 2 ขั้นตอนหลัก คือ กระบวนการหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ (Alcoholic Fermentation) ซึ่งเป็นกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกาศ และการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก (Acetous Fermentation) ด้วยแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียอะซิติก (Acetic acid bacteria) ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ โดยแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการผลิต ได้แก่ *Acetobacter aceti* และ *A. pasteurianus*

ตารางที่ 2.1 ความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในน้ำส้มสายชูหมัก

น้ำส้มสายชู	รา	ยีสต์	แบคทีเรียแลคติก	แบคทีเรียอะซิติก
Beer/malt vinegar	-	<i>Saccharomyces sensu stricto</i>	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>P. damnosus</i>	<i>Ac. cerevisiae</i> , <i>Ga. sacchari</i>
Honey vinegar	-	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> spp., <i>Torulopsis</i> spp	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> spp.	<i>Acetobacter</i> spp., <i>Gluconacetobacter</i> spp.
Rice vinegar	<i>A. oryzae</i> , <i>A. soyae</i> , <i>Rhizopus</i> sp.	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Lb. casei</i> var. <i>rhamnisus</i>	<i>Acetobacter</i> spp.,
Kurosu	<i>A. awamori</i> <i>A. usami</i> <i>A. oryzae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. lactis</i> , <i>Lb. acetotolerans</i> ,	<i>A. pasteurianus</i>
Kombucha vinegar	-	<i>Z. kombuchaensis</i> <i>Z. rouxii</i> <i>Candida</i> spp. <i>Sc. pombe</i> <i>B. bruxellensis</i> <i>Saccharomyces</i> spp. <i>P. membranaefaciens</i>	-	<i>Ga. xylinum</i> <i>Ga. intermedius</i> <i>Ga. kombuchae</i>

หมายเหตุ A.= *Aspergillus*; Ac.= *Acetobacter*; Ga. = *Gluconacetobacter*, Lb. = *Lactobacillus*;
Lc = *Leuconostoc*, S. = *Saccharomyces*, Sc. = *Schizosaccharomyces*

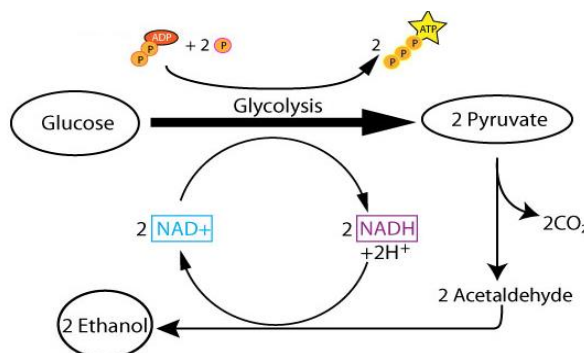
ที่มา : Solieri and Giudici (2009)

ในขณะที่เชื้อจุลินทรีย์อื่น ได้แก่ รา และแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) สามารถพบได้ในน้ำส้มสายชูบางชนิดเท่านั้น ดังตัวอย่างจุลินทรีย์ที่พบในน้ำส้มสายชูที่แสดงในตารางที่ 2.1 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตน้ำส้มสายชูจะแตกต่างกันตามชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ แหล่งน้ำตาล และกระบวนการหมัก รวมถึงสภาวะที่ใช้ในการหมัก เป็นต้น (Mas et al., 2015)

2.3.1 กระบวนการหมักเอทานอล เป็นกระบวนการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ (Anaerobic) ด้วยยีสต์ที่ปนเปื้อนมาจากวัตถุดิบหรือหัวเชื้อยีสต์ที่เติมลงไปในการหมัก น้ำตาลจะถูกออกซิไดส์เปลี่ยนไปตามวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) หรือกระบวนการเอมป์เดนเมเยอร์ฮอฟพาร์นาส (Embden-Mayerhof-Parnas (EMP) pathway) โดยน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล จะให้ไพรูเวท 2 โมเลกุลดังสมการที่ 1

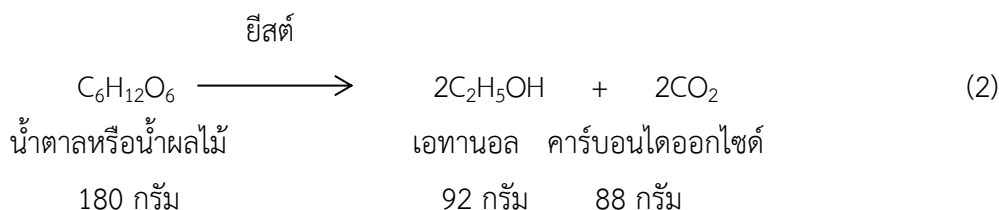


จากนั้นไพรูเวทเกิดปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชัน (Decarboxylation) แยกเอาคาร์บอนไดออกไซด์ออก โดยมีเอนไซม์ไพรูเวทดีคาร์บอกซิเลส (Pyruvate decarboxylase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไพรูเวทเป็นอะซีทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) และถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase) ได้เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ แสดงดังรูปที่ 2.1 ซึ่งการหมักน้ำตาลของยีสต์สามารถคำนวณได้ด้วยสมการ Gay-Lussac (สมการที่ 2)



รูปที่ 2.1 วัฏจักรการสังเคราะห์เอทานอลจากสารตั้งต้นที่เป็นน้ำตาลกลูโคส

ที่มา : ดุษณี (2555)



ตามทฤษฎีการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส 1 กรัม จะให้ปริมาณเอทานอล 0.511 กรัม และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.489 กรัม แต่ในการหมักทั่วไป กลูโคส 1 กรัมจะให้ผลผลิตเอทานอลเพียงร้อยละ 90 ของผลได้ทางทฤษฎี เนื่องจากกลูโคสบางส่วนถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ และบางส่วนถูกเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้ของปฏิกิริยา เช่น กลีเซอรอล และซักซิเนต นอกจากนี้กระบวนการหมักเอทานอลยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น เช่น ความเข้มข้นสารตั้งต้น สารอาหาร และสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช ปริมาณออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ (สาวิตรี, 2549)

ความสามารถในการหมักน้ำตาลของยีสต์เป็นหนึ่งในคุณสมบัติเด่นที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ยีสต์สามารถหมักน้ำตาลได้เฉพาะน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดเฮกโซส (Hexose) หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตสและแมนโนสได้ โดยยีสต์จะหมักน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสในอัตราเร็วที่สูงกว่าน้ำตาลแมนโนส มียีสต์เพียงบางชนิดเท่านั้นที่สามารถหมักน้ำตาลกาแลคโตสได้ เช่น *Kluyveromyces marxianus* สำหรับน้ำตาลซูโครส มอลโตส แลคโตส และเมลลิโบสที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ยีสต์จะสร้างเอนไซม์ย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อน

เอทานอลบางส่วนจะถูกสะสมอยู่ภายในเซลล์ มีผลทำให้เซลล์แตกได้ ยีสต์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลสูงส่งผลให้ได้ผลผลิตเอทานอลที่สูงขึ้น

4. ทนอุณหภูมิสูง เพราะในกระบวนการหมักเอทานอลจะมีการปลดปล่อยพลังงานความร้อนออกมาทำให้อุณหภูมิในถังหมักสูงขึ้น มีผลต่อการอยู่รอดและกิจกรรมการทำงานของยีสต์

5. ทนพีเอชต่ำหรือทนกรด ในกระบวนการหมักจะเกิดกรดที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการหมัก ทำให้ให้พีเอชของอาหารลดลง ยีสต์ที่สามารถทนพีเอชต่ำได้จะช่วยให้มีผลผลิตเอทานอลที่สูงขึ้น

6. ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายในสภาวะต่างๆ ของการหมักและไม่เกิดกลายพันธุ์ ส่งผลให้ประสิทธิภาพและคุณภาพในการผลิตเอทานอลสม่ำเสมอ

7. มีความสามารถในการตกตะกอน ทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ และสามารถนำเซลล์ยีสต์กลับมาใช้ใหม่ได้

8. ทนต่อแรงดันออสโมซิส ทำให้สามารถใช้อาหารที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นสูงๆ และช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ทนต่อแรงดันออสโมซิส ทำให้ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลมากขึ้น

ตารางที่ 2.2 การจัดจำแนกยีสต์ใน class *Saccharomycetes*

Subphylum	Order	Family	Genera
<i>Saccharomycotina</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Ascoideaceae</i>	1
		<i>Cephaloascaceae</i>	2
		<i>Dipodascaceae</i>	4
		<i>Endomycetaceae</i>	4
		<i>Eremotheciaceae</i>	5
		<i>Lipomycetaceae</i>	9
		<i>Metschnikowiaceae</i>	6
		<i>Phaffomycetaceae</i>	3
		<i>Saccharomycetaceae</i>	53
		<i>Saccharomycodaceae</i>	9
	<i>Saccharomycopsidaceae</i>	7	

ที่มา : Solieri and Giudici (2009)

2.4.2 แบคทีเรียอะซิติก

แบคทีเรียอะซิติกเป็นแบคทีเรียที่มีการใช้ประโยชน์ในกระบวนการหมักต่างๆ มาอย่างยาวนาน ในขณะที่เดียวกันก็มีการนำแบคทีเรียชนิดนี้มาประยุกต์ใช้ทางชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการสังเคราะห์สารทางชีวภาพที่มีประโยชน์ทางเศรษฐกิจ และในทางอุตสาหกรรมอาหาร แบคทีเรียอะซิติกถือว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์พื้นฐานสำหรับกระบวนการหมักทางชีวภาพ ทั้งในอุตสาหกรรมน้ำส้มสายชูและเครื่องดื่มที่ผ่านการหมัก

ตารางที่ 2.3 ลักษณะความแตกต่างของแบคทีเรียอะซิติกในส *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* และ *Komagataeibacter*

การทดสอบ	Ac.	G.	Ga.	K.
Oxidation of ethanol to acetic acid	+	+	+	+
Oxidation of acetic acid to CO ₂ and H ₂ O	+	-	+	+
Oxidation of lactate to CO ₂ and H ₂ O	+	-	+	+
Growth in the presence of 30 % D-glucose	-	+ or -	+ or -	n/d
Production of cellulose	-	-	+ or -	+ or -
Ketogenesis (Dihydroxyacetone) from glycerol	+ or -	+	+ or -	+ or -
Acid production from:				
Glycerol	+ or -	+	+	n/d
D-Mannitol	+ or -	+	+ or -	-
Raffinose	-	-	-	n/d
Production of water-soluble brown pigment	-	+ or -	+ or -	-
Production from glucose of:				
2-keto-D-gluconic acid	+ or -	+	+ or -	+ or -
5-keto-D-gluconic acid	+ or -	+ or -	+ or -	+ or -
2,5-keto-d-gluconic acid	+ or -	+ or -	+ or -	-
Ubiquinone type	Q9	Q10	Q10	Q10

หมายเหตุ n/d=ไม่ได้ทดสอบ A.=*Acetobacter*, G.=*Gluconobacter*, Ga.=*Gluconacetobacter*, K.= *Komagataeibacter*

ที่มา: Gomes *et al.*, (2018)

แบคทีเรียอะซิติกเป็นแบคทีเรียแกรมลบหรือ Gram-variable เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศ ไม่สร้างสปอร์ มีเซลล์รูปร่างเป็นท่อนหรือทรงรี สามารถพบได้ทั้งเซลล์เดี่ยว คู่ หรือเป็นสาย

เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา (Flagella) มีทั้งแบบ Peritrichously และ Polarly flagellated (Sengun and Karabiyikli, 2011) ให้ผลในการทดสอบคะตะเลส (Catalase test) เป็นบวก และการทดสอบออกซิเดส (Oxidase test) เป็นลบ โดยค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญจะอยู่ในช่วง 5.0-6.5 และสามารถเจริญได้ใน pH ต่ำ ประมาณ 3-4 (De Ley *et al.*, 1984) ในบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารสีและผลิต Exo-polysaccharide ได้

ในอดีตแบคทีเรียอะซิติกถูกจัดจำแนกเป็น 2 genera คือ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* โดยใช้ลักษณะทางชีวเคมี 5 อย่างในการจัดจำแนก ได้แก่ การทดสอบคะตะเลส การออกซิโดซ์และ Overoxidation แอลกอฮอล์ การออกซิโดซ์แลคเตรท การออกซิโดซ์กลีเซอรอล และการผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคส แต่ในปัจจุบัน AAB ถูกจัดให้อยู่ในไฟลัม Alphaproteobacteria แฟมิลี Acetobacteraceae ที่ประกอบด้วยสมาชิก 18 จินัส ได้แก่ *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Ameyamaea*, *Asaia*, *Bombella*, *Endobacter*, *Granulibacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Kozakia*, *Komagataeibacter*, *Neokomagataea*, *Nguyenibacter*, *Neoasaia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Swingsia* และ *Tanticharoenia* โดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ตามลำดับวิวัฒนาการบริเวณ 16S rDNA รวมไปถึงลักษณะฟีโนไทป์ของแบคทีเรียอะซิติกเป็นสำคัญ (Malimus *et al.*, 2017)

แบคทีเรียอะซิติกที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูระดับอุตสาหกรรมจะต้องมีคุณสมบัติในการทนต่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกและแอลกอฮอล์ในน้ำหมักได้สูง ต้องการสารอาหารเพียงเล็กน้อยและไม่ก่อให้เกิด Overoxidation เปลี่ยนกรดอะซิติกให้กลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยปฏิกิริยาการออกซิเดชันเอทิลแอลกอฮอล์ไปเป็นกรดอะซิติกจะเกิดขึ้นในช่วงเวลาหนึ่งเท่านั้น คือหลังจากที่เซลล์แบคทีเรียมีการเจริญเต็มที่และหยุดการเจริญแล้ว เซลล์จะมีการผลิตกรดอะซิติกขึ้นจนกระทั่งน้ำหมักมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงสุด เซลล์จะค่อยๆ ตายลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันยุติลง แบคทีเรียอะซิติกสปีชีส์ที่มีบทบาทในการผลิตน้ำส้มสายชู ได้แก่ *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* และ *Komagataeibacter* (วราวุฒิ และ รุ่งนภา, 2532) โดยความแตกต่างของแบคทีเรียทั้ง 4 จินัสแสดงในตารางที่ 2.3

2.5 เครื่องดื่มน้ำหมักสมุนไพรลูกแอปเปิ้ล

เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพชนิดหนึ่งที่มีส่วนผสมของน้ำส้มสายชูหมักผลไม้ น้ำผลไม้ และน้ำผึ้ง มีรสชาติเปรี้ยวและหวานเล็กน้อย มีกลิ่นหอมของน้ำผึ้ง และมีกลิ่นรสเฉพาะของน้ำส้มสายชูและน้ำผลไม้ที่นำมาเป็นส่วนประกอบ (ชนกภัทร และคณะ, 2561) เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพน้ำส้มสายชูหมัก สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภทย่อยตามวิธีการบริโภค ได้แก่

1. Shrub คือ เครื่องดื่มที่มีการผสมระหว่างน้ำส้มสายชูหมักกับน้ำเชื่อม ผลไม้ และผลไม้สด
2. Switchel คือ เครื่องดื่มที่มีการผสมระหว่างน้ำส้มสายชูหมัก น้ำดื่ม และซิง
3. Oxymel คือ เครื่องดื่มที่มีการผสมระหว่างน้ำส้มสายชูหมัก น้ำผึ้ง และสมุนไพร

การบริโภคน้ำส้มสายชูหมักเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งมีหลักฐานว่ามีการบริโภคเพื่อลดอาการติดเชื้อ นอกจากนี้ยังมีการใช้ Oxymel เป็นยารักษาอาการเจ็บคอ สำหรับในยุคปัจจุบันเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำส้มสายชูหมักมีการปรับปรุงและพัฒนาสูตรให้มีความหลากหลาย มีการผสมน้ำส้มสายชูหมักกับสมุนไพรและผลไม้สดเพื่อให้มีการออกฤทธิ์โดยเฉพาะ เช่น ผสมขิงและมะนาวเพื่อคุณสมบัติในการดีท็อกซ์ ผสมชาเขียวและรากชะเอมเทศเพื่อเพิ่มพลังงาน ผสมราสเบอร์รี่และวนิลาเพื่อคุณสมบัติในการช่วยย่อยอาหาร เป็นต้น (Turner, 2015)

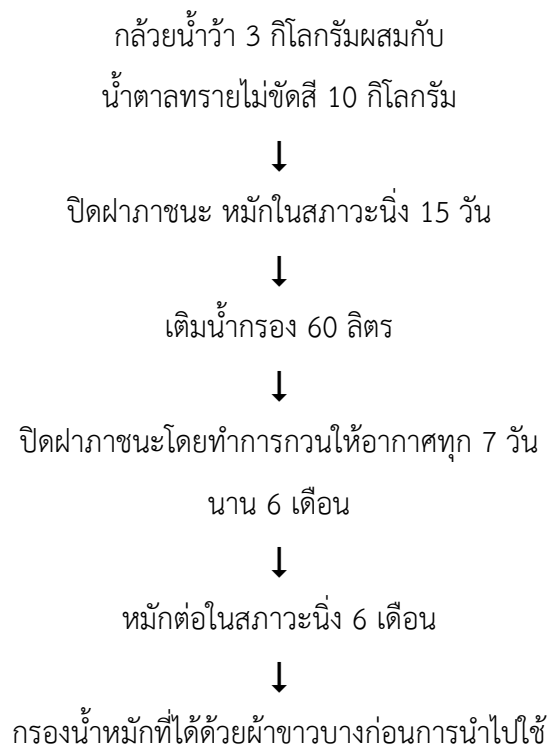
เครื่องดื่มน้ำหมักสมุนไพรลูกแพร์ถูกแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักพริกไทยดำแห้ง มะตูมแห้ง และกล้วยน้ำว้าสุก ร่วมกับน้ำตาลทรายไม่ขัดสี และน้ำหมักกล้วยน้ำว้านาน 1 ปี โดยพัฒนารูปแบบจากการผลิตยาลูกกลอน ตามตำรับยาสมุนไพรมะตูมในพระราชนิพนธ์ของสมเด็จพระมหาสมณเจ้า กรมพระยาปวเรศวริยาลงกรณ์ สามารถสรุปขั้นตอนการผลิตได้ 3 ขั้นตอน ได้แก่

ขั้นตอนที่ 1 การหมักกล้วยน้ำว้านาน 1 ปี นำกล้วยน้ำว้าปอกเปลือก 3 กิโลกรัมผสมกับน้ำตาลทรายไม่ขัดสี 10 กิโลกรัม หมักในภาชนะหมักและปิดฝาให้สนิทนาน 15 วัน จากนั้นเติมน้ำสะอาดปริมาตร 60 ลิตร กวนน้ำหมักทุก 7 วันนาน 6 เดือน และหมักต่อในสภาวะนิ่งปราศจากการกวนจนครบระยะเวลาหมัก 1 ปี จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อนำแผ่นเซลลูโลสและตะกอนของวัตถุดิบออกจากน้ำหมัก จะได้น้ำกล้วยน้ำว้าหมัก 1 ปีที่มีค่า pH ประมาณ 3 และมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับ 5 องศาบริกซ์

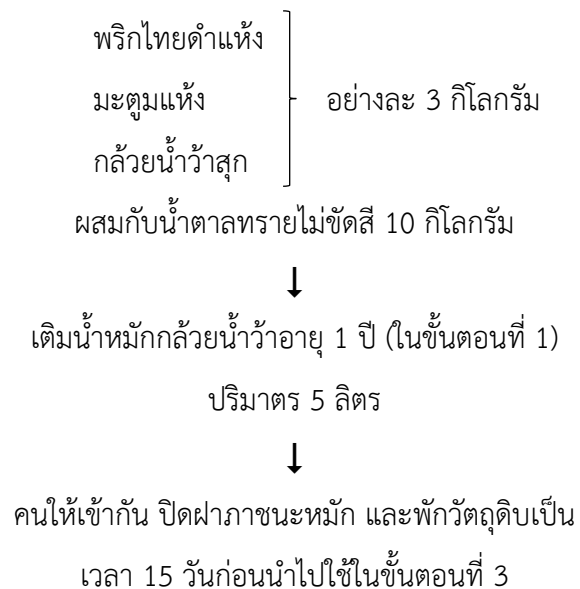
ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมวัตถุดิบหมัก นำพริกไทยดำแห้ง มะตูมแห้ง และกล้วยน้ำว้าปอกเปลือกอย่างละ 3 กิโลกรัม ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากับน้ำตาลทรายไม่ขัดสี 10 กิโลกรัม และเติมน้ำหมักกล้วยน้ำว้าหมัก 1 ปีในขั้นตอนที่ 1 ปริมาตร 5 ลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันและหมักในสภาวะนิ่งในภาชนะปิด เป็นเวลา 15 วัน

ขั้นตอนที่ 3 การหมักน้ำหมักสมุนไพรลูกแพร์ถูกแปรรูป นำน้ำหมักกล้วยน้ำว้าปริมาตร 55 ลิตร ในขั้นตอนที่ 1 เติมลงในวัตถุดิบที่หมักครบเวลา 15 วันในขั้นตอนที่ 2 จากนั้นหมักต่อในสภาวะนิ่ง โดยทำการกวนเพื่อให้อากาศทุกสัปดาห์เป็นเวลา 6 เดือน จะได้ผลิตน้ำสมุนไพรหมักลูกแพร์ถูกแปรรูป กรองน้ำสมุนไพรหมักด้วยผ้าขาวบางเพื่อนำวัตถุดิบที่เป็นของแข็งออก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีค่า pH เท่ากับ 3 และปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้เท่ากับ 5 องศาบริกซ์ จากนั้นฆ่าเชื้อน้ำสมุนไพรหมักด้วยการเติมสารโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (Potassium metabisulphite, KMS) ความเข้มข้น 500 ppm (0.5 กรัมต่อลิตร) และเติมน้ำผึ้งต่อน้ำสมุนไพรหมักในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เพื่อปรับปรุงรสชาติก่อนการบรรจุขวดออกจำหน่าย โดยสามารถสรุปขั้นตอนการผลิต ได้ดังรูปที่ 2.3

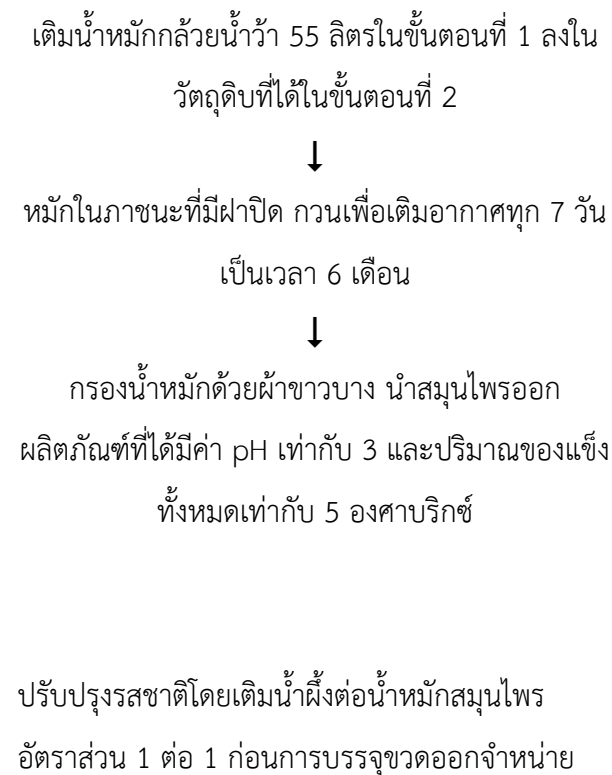
ขั้นตอนที่ 1 การหมักกล้วยน้ำว้านาน 1 ปี



ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมวัตถุดิบหมัก



ขั้นตอนที่ 3 การหมักน้ำสมุนไพรหมักลูกแปลกแม่



รูปที่ 2.3 แผนภาพการผลิตเครื่องดื่มน้ำสมุนไพรหมักลูกแปลกแม่

2.6 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการผลิตน้ำหมักสมุนไพรลูกแปลกแม่

2.6.1 กล้วยน้ำว่า



รูปที่ 2.4 กล้วยน้ำว่า

ที่มา : Nimisha and Pradeep (2017)

ชื่อวิทยาศาสตร์	:	<i>Musa sapientum</i>
ชื่อสามัญ	:	กล้วยน้ำว่า
Kingdom	:	Plantae
Family	:	Musaceae
Genus	:	<i>Musa</i>
Species	:	<i>sapientum</i>

กล้วยเป็นไม้ล้มลุกขนาดใหญ่ มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สามารถพบได้ในประเทศเขตร้อน เช่น ไทย จีน อินเดีย โคลัมเบีย และเอกวาดอร์ เป็นต้น โดยมนุษย์มีการนำส่วนต่างๆ ของกล้วยมาใช้ประโยชน์ ไม่เพียงแต่เป็นอาหารเท่านั้น กล้วยยังถูกใช้เป็นอาหารเสริมและยารักษาโรค เช่น ไข้หวัด หลอดลมอักเสบ บิด อาการแพ้ โรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์และโรคไม่ติดต่อบางชนิด จากรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางยาของกล้วยในจีนัส *Musa sapientum* พบว่ากล้วยมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณมาก สามารถป้องกันการเกิดโรคเบาหวาน (Antidiabetic) และมะเร็ง (Anticancer) ช่วยเสริมภูมิคุ้มกัน (Immunomodulatory) และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Antimicrobial) โดยเฉพาะเชื้อ HIV

กล้วยเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีลำต้นที่แท้จริงเป็นเหง้า (Rhizome) อยู่ใต้ดิน และมีลำต้นเทียม (Pseudostem) ซึ่งเป็นที่ยึดตัวของหน่อ เกิดจากการทับซ้อนและอัดกันแน่นของใบกล้วย โดยลำต้นเทียมของกล้วยมีความสูงประมาณ 3.5 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร กาบลำต้นด้านนอกมีสีเขียวอ่อนมีประดำบ้างเล็กน้อย ก้านใบมีร่องค่อนข้างแคบ เส้นกลางใบสีเขียว ก้านช่อดอก

ไม่มีขน ปลีรูปไข่ค่อนข้างป้อม ปลายแบน ด้านนอกสีแดงอมม่วง ด้านในสีแดงเข้ม เครือหนึ่งมีประมาณ 7-10 หวี หวีหนึ่งมี 10-16 ผล ก้านผลยาว เปลือกหนา ผลสุกมีสีเหลืองเนื้อสีขาว รสหวานไส้กลางมีสีเหลือง ชมพูหรือขาว (สุจิตต์, 2558)

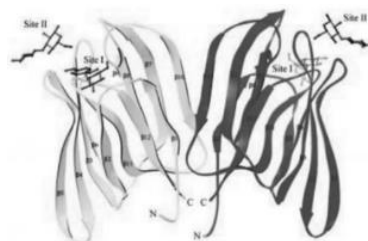
กล้วยเป็นแหล่งของพลังงาน วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ ซึ่งมีปริมาณแตกต่างกันเล็กน้อยตามระดับความสุกของผลกล้วยและพื้นที่ในการเพาะปลูก โดยผลกล้วยน้ำว่าดิบจะให้พลังงานสูงกว่ากล้วยน้ำว่าสุกเท่ากับ 435 kJ g/100 g และ 315 kJ g/100 g ตามลำดับ กล้วยจะมีปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นและปริมาณแป้งลดลงระหว่างกระบวนการสุก ความแตกต่างของปริมาณวิตามิน แร่ธาตุ และกรดอินทรีย์ในผลกล้วยน้ำว่าดิบและสุกแสดงดังตารางที่ 2.4 (Nimisha and Pradeep, 2017) โดย Wills *et al.*, (1984) ได้รายงานไว้ในผลกล้วยดิบมีวิตามินสูงกว่าผลกล้วยสุก โดยเฉพาะวิตามินซี สำหรับแร่ธาตุต่างๆ ผลกล้วยสุกจะมีปริมาณสูงกว่าผลกล้วยดิบ และปริมาณโพแทสเซียมจะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตลอดระยะการสุก

ตารางที่ 2.4 วิตามิน แร่ธาตุ และกรดอินทรีย์ในผลกล้วยน้ำว่าดิบและสุก (mg/ 100g DW)

องค์ประกอบ	ผลกล้วยน้ำว่าดิบ	ผลกล้วยน้ำว่าสุก
Vitamin C	18.0	6.0
Thiamine	0.08	0.04
Riboflavin	0.09	0.10
Niacin	0.8	0.4
β -Carotene	0.125	0.07
α -Carotene	0.185	0.075
Cryptoxanthin	ND	0.015
Total Ash	0.4	0.5
Sodium	0.7	0.6–20
Potassium	320.0	334.0–524
Calcium	5.0	5.0–26
Iron	0.6	0.49–2.62
Magnesium	22.0	20.0–54.0
Zinc	0.3	0.2–0.36
Malic acid	0.19	0.25
Oxalic acid	0.23	0.15
Citric acid	0.007	0.004

ที่มา : Nimisha and Pradeep, (2017)

จากการวิเคราะห์สารสำคัญทางพฤกษเคมีจากส่วนต่างๆของกล้วยน้ำว้า ได้แก่ เนื้อผล เปลือก ปลี ใบ ลำต้น และราก พบว่าในทุกส่วนของกล้วยมีสารพฤกษเคมีหลายชนิด ได้แก่ Saponins, Terpenoids, Steroids, Anthocyanins, Fatty acids, Tannins, Phenols และ Alkaloids โดยจะมีปริมาณแตกต่างกันตามชนิดของตัวทำละลาย และส่วนของกล้วยน้ำว้าที่นำมาสกัด แทนนินเป็นสารที่พบมากในผลกล้วยดิบ ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาอาการท้องเสีย บิด และมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร เนื่องจากแทนนินจะช่วยในการกระตุ้นให้กระเพาะอาหารมีการหลั่งเมือก และสร้างเนื้อเยื่อเพิ่มเติมเพื่อสมานแผล นอกจากนี้ยังมี Saponin ถึง IV ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านแผลในกระเพาะ โดยเฉพาะ Saponin IV ที่มีฤทธิ์มากที่สุด โดย Saponin ในผลกล้วยสุกมีสรรพคุณเป็นยาระบายสำหรับผู้ที่เป็นริดสีดวงทวารหรือผู้มีอุจจาระแข็ง BanLec (Banana Lectin) เป็นสารพฤกษเคมีที่มีบทบาทสำคัญทางการแพทย์ และได้รับความสนใจในการศึกษาเป็นอย่างมาก BanLec เป็นสารประกอบประเภทเลคติน (Lectin) ซึ่งเป็นชื่อเรียกกลุ่มของโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรตอย่างจำเพาะ โดยจะจับกันอย่างหลวมๆ และสามารถแยกออกจากกันได้แสดงดังรูปที่ 2.5 BanLec มีประโยชน์ในการช่วยเสริมภูมิคุ้มกัน กระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดขาว และป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง (Cheung *et al.*, 2009; Peumans *et al.*, 2000) และจากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์พบว่า BanLec มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่างๆที่ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อ โดยเฉพาะเชื้อ HIV ได้เป็นอย่างดี (Nimisha and Pradeep, 2017; คมกริช, 2553) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกล้วยน้ำว้าจะเกิดขึ้นผ่านกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระการยับยั้งเปอร์ออกซิเดชัน และการจับกับไอออนของโลหะ Thaiphanit and Anprung, (2010) ได้ศึกษาสารสกัดเอทานอลจากผลกล้วยน้ำว้าในระยะเวลาสุกต่างๆ พบว่าเนื้อกล้วยน้ำว้ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC₅₀) เท่ากับ 2.25–3.06 µg/mL และ ABTS มีค่าระหว่าง 23.29–33.64 µM TE/g โดยฤทธิ์จะดีที่สุดเมื่อกล้วยน้ำว้าอยู่ในระยะสุกจัด



รูปที่ 2.5 โครงสร้างสามมิติของแบนแลค (BanLec) ที่แยกได้จากกล้วย

ที่มา : http://www.satriwit3.ac.th/files/1107091616590962_1206100005822.pdf

สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤศจิกายน 2560

2.6.2 พริกไทยดำ



รูปที่ 2.6 พริกไทยดำ

- ก. ต้นพริกไทยดำ ข. ซอเมล็ดพริกไทยดำ
 ค. เมล็ดพริกไทยดำและพริกไทยขาวที่ผ่านกระบวนการผลิต
 ที่มา : http://citeseer_x.ist.psu.edu
 สอบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤศจิกายน 2560

ชื่อวิทยาศาสตร์	:	<i>Piper nigrum</i> L.
ชื่ออื่นๆ	:	พริกน้อย, โส่วเจีย, Black pepper
Family	:	Piperaceae
Genus	:	<i>Piper</i>
Species	:	<i>nigrum</i>

พริกไทยดำ (black pepper) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Piper nigrum* Linn. อยู่ในคลาส Piperaceae จินัส *Piper* อาณาจักร Plantae พริกไทยดำเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่นิยมใช้กันมาอย่างยาวนานและแพร่หลาย จึงได้รับการขนานนามว่าเป็น “ราชาแห่งเครื่องเทศ” (The King of spices) ผลของพริกไทยดำมีรสเผ็ดร้อน นิยมนำมาใช้ในการปรุงอาหารเพื่อเพิ่มรสชาติและใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาโรคบางชนิด โดยเฉพาะประเทศศรีลังกา บราซิล มาเลเซีย ไทย อินโดนีเซีย และอินเดีย เป็นต้น (อารยา, 2560) โดยมีรายงานว่าพริกไทยสามารถพบได้มากกว่า 51 สายพันธุ์ในพื้นที่เขตร้อน (Tropical region) และกึ่งร้อน (Subtropical region) และเมื่อนำผลสุกของพริกไทยดำมากำจัดเปลือกออกจะได้พริกไทยขาว ซึ่งมีกลิ่นหอมน้อยกว่า เนื่องจากเปลือกสีดำที่มีน้ำมันหอมระเหยถูกกำจัดออกไป (Damanhour, 2014) โดยลักษณะของพริกไทยดำที่ดีควรมีปริมาณน้ำไม่เกินร้อยละ 14 ปริมาณสิ่งแปลกปลอมไม่เกินร้อยละ 2 ปริมาณเถ้ารวมไม่เกินร้อยละ 7 ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดไม่เกินร้อยละ 1.5 ปริมาณน้ำมันระเหยง่ายไม่น้อยกว่าร้อยละ 1 ปริมาณสารอัลคาลอยด์ โดยคำนวณเทียบกับ Piperine ไม่น้อยกว่าร้อยละ 5 (สุภารัตน์, 2563, อารยา, 2560)

ลักษณะทางพฤกษเคมี

พริกไทยดำเป็นพืชล้มลุก ลำต้นที่เจริญเต็มที่มีความสูงประมาณ 4 เมตร ใบมีรูปไข่ โคนใบใหญ่ ปลายใบแหลม ยาวประมาณ 7-15 เซนติเมตร หากมีแกนยึดเกาะ ลำต้นจะโตเป็นพุ่ม ผลของพริกไทยดำมีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ผลอ่อนจะมีสีเขียวเป็นพวง รูปร่างกลม ผิวเรียบ สำหรับผลสุกจะมีสีดำ ผิวขรุขระ ในผลพริกไทย 100 กรัมจะประกอบด้วยน้ำ 9.5-12.0 กรัม แป้ง 25.8-44.8 กรัม เส้นใย 9.7-17.2 กรัม โปรตีน 10.9-12.7 กรัม และน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 1.0-1.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่ม Monoterpenes และ Sesquiterpenes (อารยา, 2560)

พริกไทยดำประกอบด้วยสารพฤกษเคมีหลายชนิด เช่น อัลคาลอยด์ (Alkaloids) ฟลาโวน (Flavones) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) สเตียรอยด์ (Steroids) แทนนิน (Tannins) ซาโปนิน (Saponins) ฟีนอล (Phenols) ไกลโคไซด์ (Glycosides) เทอร์ปีน (Terpenes) และลิกแนน (Lignans) เป็นต้น โดยจะพบสารอัลคาลอยด์ได้มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าพืชสกุลอื่นๆที่อยู่ในตระกูล *Piper* มีสารพฤกษเคมีเหล่านี้อยู่เช่นเดียวกัน แต่อาจมีปริมาณแตกต่างกัน (Parmar *et al.*, 1997) โดยมีสารอัลคาลอยด์ที่สามารถพบได้มากในพริกไทยดำ คือ Piperidine และ Piperanine มีปริมาณประมาณร้อยละ 5-9 ของน้ำมันหอมระเหยทั้งหมด ซึ่งเป็นสารที่ทำให้พริกไทยมีกลิ่นฉุนและรสชาติเผ็ดร้อน อีกทั้งสารเหล่านี้ยังเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ทำให้พริกไทยดำมีฤทธิ์ในการป้องกันหรือรักษาอาการของโรคบางชนิด เช่น ป้องกันอาการท้องเสีย ด้านอาการหอบหืด ด้านการอักเสบ ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด ด้านอาการไข้ ด้านภาวะซึมเศร้า และยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งหลายชนิด สาร Piperine มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยมีรายงานว่า Piperine สามารถลดปวดและต้านอาการชักในหนูทดลอง รวมถึงสามารถป้องกันความเสื่อมของระบบประสาทในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคอัลไซเมอร์ (Chonpathompikunlert *et al.*, 2010; Tasleem *et al.*, 2014) สำหรับสาร Piperamide มีฤทธิ์ทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเต้านม (Souza, *et al.*, 2016) โดยวัชรินทร์ และคณะ (2559) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลจากสมุนไพรไทย 10 ชนิด พบว่าสารสกัดเอทานอลจากพริกไทยดำมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida albicans* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดเชื้อรา (Takooree, 2019) ส่วนสารสกัดน้ำจากพริกไทยดำมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในเนื้อสัตว์ (Ahmad *et al.*, 2012; สุนทร, 2557) สารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic contents) ที่พบในพริกไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีรายงานว่าสารสกัดจากพริกไทยดำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงกว่าพริกไทยขาว มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 94.92 และ 82.36 µg/mL ตามลำดับ (Olalere *et al.*, 2018) และมีรายงานว่าสารสกัดน้ำจากพริกไทยดำมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าการสกัดพริกไทยดำด้วยเอทานอลและอะซิโตน มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเท่ากับร้อยละ 82.10, 71.78 และ 26.30 ตามลำดับ (นิวัติ และนิติกาญจน์, 2543)

การออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพฤษเคมีในพริกไทยดำ

ฤทธิ์ต้านอาการท้องเสีย (Antidiarrheal activity)

อาการท้องเสียเกิดจากการบีบตัวของลำไส้ และการหลั่งของน้ำ รวมถึงอิเล็กโตรไลต์ ออกมาสู่ภายในท่อลำไส้มากกว่าปกติ จากการศึกษาสารสกัดหยาบจากพริกไทยดำ พบว่าสาร อัลคาลอยด์ คาร์โบไฮเดรตบางชนิด และสารอื่นๆ มีส่วนช่วยลดการหลั่งน้ำและอิเล็กโตรไลต์ และการบีบตัวของลำไส้ ขณะเดียวกันสารในพริกไทยดำยังช่วยเพิ่มการดูดน้ำและอิเล็กโตรไลต์กลับเข้าสู่ร่างกาย นอกจากนี้ยังยับยั้งการสังเคราะห์พรอสตาแกลนดิน (Prostaglandin) ซึ่งเป็นอีกสาเหตุของการเกิดท้องเสีย (Shamkuwar *et al.*, 2012; Dubreuil, 2013)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

อนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดมะเร็ง การหนาและแข็งตัวของหลอดเลือดแดง (Atherosclerosis) และอื่นๆ อีกมากมาย มีการศึกษาพบว่าสารประกอบ Phenolic acids และ Flavonoids ที่เป็นองค์ประกอบในพริกไทยดำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยออกฤทธิ์ผ่านหลายกลไก เช่น กระตุ้นการดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging activity) เพิ่มกระบวนการ Transition metal chelating activity ยับยั้งกระบวนการ Lipid peroxidation ที่เยื่อหุ้มเซลล์ และป้องกันการเกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ (Damanhour, 2014; Sruti and Zachariah, 2017)

ฤทธิ์การต้านจุลชีพ (Antimicrobial activity)

สารสกัดจากพริกไทยดำมีความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (Zhang *et al.*, 2015) โดยพบว่าสารสกัดจากพริกไทยดำจะไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการแพร่สารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Membrane permeability) ทำให้เกิดการแตกหรือฉีกขาดของเยื่อหุ้มเซลล์จนไซโทพลาซึมเกิดการรั่วไหล (Cytoplasmic content) ออกมาภายนอกเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากพริกไทยดำจะไปรบกวนกระบวนการหายใจระดับเซลล์โดยยับยั้ง Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) ส่งผลให้ปริมาณของ Pyruvic acid เพิ่มขึ้นและ ATP ซึ่งเป็นพลังงานภายในเซลล์ลดลง (Zou *et al.*, 2015)

ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ (Anti-cancer activity)

ปัจจุบันได้มีการนำสารสกัดจากพริกไทยดำมาศึกษาฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิด และพบว่าโดยส่วนใหญ่สารสกัดสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ผ่านกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลที่ค่อนข้างละเอียดและแตกต่างกันในเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด เนื่องจากเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดมีลักษณะเฉพาะและสาเหตุการเกิดแตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆอย่างที่น่าจะก่อให้เกิดมะเร็ง ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดพริกไทยดำ เช่น สารพิเพอรินมีฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อมลูกหมาก (Prostate cancer) โดยจะเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งและลดระดับโปรตีนที่กระตุ้นการเจริญของเซลล์มะเร็ง (อารยา, 2560)

ฤทธิ์การลดความดันโลหิต (Antihypertensive activity)

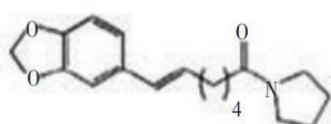
ความดันโลหิตสูงเกิดจากความผิดปกติของหลอดเลือด และมีกลไกการเกิดโรคที่แตกต่างกัน ได้มีการนำสารจากพริกไทยดำมาศึกษาฤทธิ์ในการลดความดันโลหิตของหนูและกระต่าย พบว่าสารสกัดจากพริกไทยดำสามารถลดความดันโลหิตได้ผ่านกลไกของ Ca^{2+} movement ซึ่งกลไกนี้จะมีผลต่อการหดตัวของหลอดเลือด ในภาวะปกติของร่างกาย Ca^{2+} ภายนอกเซลล์จะเข้าสู่ภายในเซลล์และจะไปกระตุ้นให้มีการหลั่ง Ca^{2+} จากภายในเซลล์ (Intracellular Ca^{2+}) เมื่อมีตัวกระตุ้นต่างๆ มารบกวน Ca^{2+} movement ของเซลล์ อาจส่งผลให้ปริมาณของ Ca^{2+} ภายในเซลล์สูงขึ้น ทำให้เกิดการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่หลอดเลือด จึงเกิดการหดตัวตีบแคบของหลอดเลือด (Vasoconstriction) ซึ่งสารจากพริกไทยดำสามารถลดความดันโลหิตโดยการยับยั้งผ่านกลไกนี้ (Taqvi *et al.*, 2008)

ฤทธิ์ในการลดไข้ (Anti-pyretic activity)

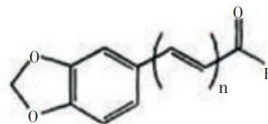
พบว่าสารสกัดหยาบจากพริกไทยดำที่ประกอบด้วยสารพฤษเคมีหลายกลุ่ม เช่น อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ และสเตียรอยด์ เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะมีฤทธิ์ในการลดอุณหภูมิร่างกาย (Body temperature) โดยสารสกัดจะไปยับยั้งการหลั่งสารสื่อกลางที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (Inflammatory mediators) รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Cyclooxygenase (COX-2) จึงมีการสร้าง PGE2 ลดลง ซึ่ง PGE2 จะมีผลต่อสมองส่วนไฮโปทาลามัส (Hypothalamus) ที่เป็นศูนย์ควบคุมอุณหภูมิร่างกาย หากปริมาณ PGE2 เพิ่มสูงขึ้นจะไปกระตุ้นไฮโปทาลามัสให้เพิ่ม Set point ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอาการไข้

ฤทธิ์ในการลดปวดและต้านการอักเสบ (Analgesic และ Anti-inflammatory activity)

ได้มีการศึกษาทดลองโดยเหนียวนำให้หนูทดลองเกิดโรคข้ออักเสบ (Arthritis) จากนั้นจึงให้สาร Piperin พบว่าสามารถช่วยลดอาการปวดและการรับรู้ความเจ็บปวดในหนูทดลองลง โดย Piperin จะยับยั้งการสร้างสารสื่อกลางที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (Pro-inflammatory mediators) ได้แก่ Interleukin-6 (IL-6) และ Prostaglandin E2 (PGE2) ซึ่งเป็นสารกระตุ้นให้เกิดการปวดและการอักเสบ (Bang *et al.*, 2009) และมีรายงานอีกว่าสารจากพริกไทยดำอาจไปยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 โดยตรงส่งผลให้ PGE2 ถูกสร้างลดลง (Tasleem *et al.*, 2014)



Piperamide



Piperin

รูปที่ 2.7 โครงสร้างของสารตัวอย่างที่พบในพริกไทยดำ

ที่มา : Ahmad *et al.*, (2012)

2.6.3 มะตูม



รูปที่ 2.8 มะตูม

ที่มา : <https://commons.wikimedia.org>

สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤศจิกายน 2560

ชื่อวิทยาศาสตร์	:	<i>Aegle marmelos</i> (L.) Corr.
ชื่ออื่นๆ	:	มะปิ่น(เหนื่อ), กะทันตาเถร, ตูม(ใต้), บักตูม (อีสาน), ตุ่มตั้ง
Family	:	Rutaceae
Genus	:	<i>Aegle</i>
Species	:	<i>marmelos</i>

มะตูม หรือ *Aegle marmelos* (L.) Correa เป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในแฟมิลี Rutaceae ที่มีการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์อย่างแพร่หลายในตำรายาสมุนไพรอินเดีย โดยมีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย และมีการแพร่กระจายในประเทศศรีลังกา ไทย และประเทศในแถบคาบสมุทรอินโดจีน (Rahman and Parvin, 2014) การบริโภคผลมะตูมสุกจะมีส่วนช่วยในการส่งเสริมการทำงานของระบบทางเดินอาหารและช่วยรักษาอาการลำไส้อักเสบ ป้องกันการติดเชื้ออหิวาต์ ช่วยรักษาอาการท้องเสีย ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ป้องกันรังสีและการเกิดมะเร็ง มีฤทธิ์ในการสมานแผล และช่วยลดการอักเสบของเนื้อเยื่อ (รักษเกียรติ, 2549; Atul *et al.*, 2012)

ลักษณะทางพฤกษเคมี

มะตูมเป็นต้นไม้ยืนต้นขนาดกลาง มีความสูงเมื่อโตเต็มที่ประมาณ 10 เมตร ตามลำต้นและกิ่งมีหนามขนาดใหญ่ แข็ง ตรง ใบเป็นชนิดใบประกอบ มีใบย่อย 3 ใบ มีผลรูปไข่ หรือรูปกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8-10 ซม. ยาว 12-18 ซม. เปลือกหนา แข็งมาก สีเขียวอมน้ำตาล ผิวเปลือกเรียบ เมื่อยังดิบเปลือกสีเขียวแต่เมื่อสุกมีสีเหลืองอมน้ำตาล ภายในผลมีเนื้อหนาสีเหลืองส้ม และมีน้ำเหนียวๆอยู่รอบเมล็ด มีเมล็ดจำนวนมากฝังอยู่ในเนื้อ (สุดารัตน์, 2553) โดยเนื้อมะตูมและน้ำมะตูมมีคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกัน อุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรต วิตามิน (Riboflavin) แร่ธาตุ (Potassium, Calcium และ Phosphorus) กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน เส้นใย และ

สารประกอบฟีนอลิก (Carotenoid) ซึ่งมีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระ (Abdullakassim *et al.*, 2007) Dhankhar *et al.*, (2011) ได้ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกจากผลมะตูม พบว่าในผลมะตูมมีสาร Chlorogenic acid (136.8 µg/g), Ellagic acid (248.5 µg/g), Ferulic acid (98.3 µg/g), Gallic acid (873.6 µg/g), Protocatechuic acid (47.9 µg/g) และ Quercetin (56.9 µg/g) จากการเปรียบเทียบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของชาขงสำเร็จรูป 4 ชนิด พบว่าชามะตูมมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุด มีฤทธิ์สูงกว่าชาขงจากตะไคร้ กระจับ และแก้ฮวย (ชมพูนุท และคณะ, 2559) Bansal *et al.*, 2012 และ Prakash *et al.*, 2011 ได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของมะตูม พบว่ามะตูมมีสาร Marmenol, Marmin, Marmelosin, Marmelide, Psoralen, Alloimperatorin, Rutaretin, Scopoletin, Aegelin, Marmelin, Fagarine, Anhydromarmelin, Limonene, α -phellandrene, Betulinic acid, Marmesin, Imperatorin, Marmelosin, Luvangentin และ Auroptene เป็นองค์ประกอบหลัก และพบกรดอินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ Oxalic acid, Tartaric acid, Malic acid และ Ascorbic acid จากการศึกษาฤทธิ์ทางพฤกษเคมีของผลมะตูม พบว่าสารสกัดเมทานอลสามารถรักษาอาการท้องเสียและ Pectin ในผลดิบมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อในลำไส้ โดย Venkatesan *et al.*, (2009) ได้รายงานว่สารสกัดหยาบจากมะตูมที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* และจากการศึกษาของ Jyothi and Rao, (2010) ได้รายงานว่สารสกัดมะตูมที่ได้จากตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน เมทานอลร้อน และเมทานอลเย็น สามารถต้านต่อเชื้อ *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* และ *Streptococcus faecalis*

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.7.1 การคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก

Artnarong *et al.*, (2016) ศึกษาการคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกจากผลตาล (*Borassus flabellifer* Linn.) จากยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลตด้วยอาหารแข็ง YPD ที่มี Chloramphenicol 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทดสอบความสามารถการเจริญในอาหารที่น้ำตาลกลูโคสและเอทานอลความเข้มข้นสูง พบว่ายีสต์ไอโซเลต Y15 สามารถเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และ 15 และทนต่อเอทานอลร้อยละ 10 และ 15 ได้ นำมาจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลพบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีสต์ *Candida stellimalicola* สำหรับการคัดแยกแบคทีเรียอะซิติกด้วยอาหารแข็ง Glucose-Yeast extract-Calcium carbonate (GYC) สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 250 ไอโซเลต ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียอะซิติกมาทดสอบความสามารถการเจริญในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 6 และ 8 พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต A10 มีความสามารถในการ

ทนต่อเอทานอลและเมื่อนำมาจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีชีวโมเลกุล พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Acetobacter ghanesi*

Song *et al.*, (2016) ได้คัดแยกแบคทีเรียอะซิติกจากผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักแบบลิกราสเบอร์รี่ของประเทศเกาหลี จากการคัดแยกแบคทีเรียอะซิติก พบว่ามีเชื้อจำนวน 147 ไอโซเลตที่มีบริเวณไฮโรบโคโลนิบนอาหาร GYC และมีเพียง 15 ไอโซเลตที่สามารถผลิตกรดได้สูง โดยไอโซเลตที่ผลิตกรดได้สูงสุดคือ MBA-77 เมื่อนำมาจัดจำแนกด้วยการทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมีพบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับ *Acetobacter aceti*

Sharafi *et al.*, (2010) ได้คัดแยกและระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียอะซิติกจากผลไม้ 10 ชนิดในประเทศอิหร่านด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ GYC และ Carr medium จากการศึกษาทางชีวเคมีและการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ทั้งหมด 37 ไอโซเลต มี 4 ไอโซเลตที่ผลิตกรดอะซิติกได้สูงร้อยละ 10.03 เมื่อนำมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rDNA เพื่อจัดจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ โดยผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความใกล้เคียงกับ *Acetobacter pasteurianus*

Valles *et al.*, (2005) ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่พบในการผลิตน้ำส้มสายชูจากแอปเปิ้ลที่หมักตามธรรมชาติของประเทศสเปน พบว่าในช่วงของการหมักแอลกอฮอล์สามารถคัดแยกและจัดจำแนกยีสต์เป็น 2 กลุ่มคือ ยีสต์ชนิด *Saccharomyces* ได้แก่ *S. cerevisiae* และ *S. bayanus* และยีสต์ชนิด *Non-Saccharomyces* ได้แก่ *Haseniaspora valbyensis* และ *Metchnikowia pulcherrima* โดยเชื้อ *S. bayanus* พบมากในช่วงกลางของกระบวนการหมัก ในขณะที่ *S. cerevisiae* และ *H. valbyensis* จะพบมากในช่วงท้ายของการหมัก

Wu *et al.*, (2012) ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียอะซิติกจากผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักในประเทศจีนที่ผลิตจากกระบวนการหมักธัญพืชตามธรรมชาติ (Shanxi aged vinegar) สามารถคัดแยกยีสต์ได้จำนวน 47 ไอโซเลต แบคทีเรียแลคติก 28 ไอโซเลต และแบคทีเรียอะซิติก 58 ไอโซเลต เมื่อนำมาจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะสัญญาณ-วิทยาและเทคนิคด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลที่ตำแหน่ง 16S rRNA สำหรับแบคทีเรียและตำแหน่ง 26S rRNA สำหรับยีสต์ พบว่ามีการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, *L. casei*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus* และ *Weissella confuse* ในช่วงแรกของการหมักแอลกอฮอล์ และพบ *Acetobacter pasteurianus* เป็นเชื้อจุลินทรีย์หลักในช่วงการหมักกรดอะซิติก

2.7.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชู

นิสา (2562) ศึกษาการปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูหมักด้วยเทคนิคการหมักร่วมระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5279 และ *Gluconobacter oxydans* TRBC 4013 เมื่อทำการเปรียบเทียบวิธีหมักร่วมขั้นตอนเดียวกับการหมักร่วมตามลำดับเป็นระยะเวลา 14 วัน โดยใช้อัตราส่วนเชื้อยีสต์ต่อแบคทีเรีย 1 ต่อ 1 พบว่าการหมักร่วมขั้นตอนเดียวให้ปริมาณ

กรดอะซิติกสูงกว่าการหมักร่วมตามลำดับเท่ากับร้อยละ 4.46 ± 2.85 และ 2.24 ± 0.05 ตามลำดับ ซึ่งสัดส่วนของเชื้อยีสต์ต่อแบคทีเรียที่เหมาะสมในการหมักแบบหมักร่วมคือ 1 ต่อ 3 มีกรดอะซิติกสูงสุดร้อยละ 5.97 ± 0.13 ค่า pH 2.9 มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ $1,135.72 \text{ mgGAE/L}$ ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีค่าเท่ากับ $90.69 \pm 0.03 \text{ mg/mL}$ และค่าการดับจับอนุมูลอิสระ DPPH มีค่าร้อยละ 17.5 ± 1.63

Chakraborty *et al.*, (2017) เปรียบเทียบการผลิตน้ำส้มสายชูจากมะตูมโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* กับ *Acetobacter aceti* ด้วยกระบวนการหมักร่วม ขั้นตอนเดียวกับการหมักสองขั้นตอน พบว่าการหมักสองขั้นตอนโดยใช้ยีสต์และแบคทีเรียในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (10^7 CFU/mL) และแคลเซียมคาร์บอเนต 0.8 กรัมต่อลิตรให้ผลที่ดีกว่าการหมักร่วมแบบขั้นตอนเดียว โดยมีปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดในวันที่ 4 ของการหมักเท่ากับ 63.3 กรัมต่อลิตรและปริมาณกรดอะซิติกเท่ากับ 47.5 กรัมต่อลิตรในวันที่ 8 ของการหมัก ส่วนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวมีแอลกอฮอล์สูงสุดในวันที่ 4 ของการหมักเช่นกัน มีค่าเท่ากับ 47.5 กรัมต่อลิตรและได้กรดอะซิติกเท่ากับ 47.5 กรัมต่อลิตรในวันที่ 10 ของการหมัก

Ukwo *et al.*, (2010) ศึกษาผลของ pH และความเข้มข้นของกรดอะซิติกในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูทุเรียนเทศต่อการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala* และ *Candida tropicalis* โดยเปรียบเทียบการเจริญกับ *Saccharomyces pastorianus* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้ผลิตไวน์ทางการค้า พบว่ายีสต์ในกลุ่ม non-*Saccharomyces yeast* มีอัตราการเจริญและจำนวนเซลล์ลดต่ำลงเมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* แต่ไม่มีผลต่อ *S. cerevisiae* และที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติกร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร มีผลทำให้ยีสต์ที่คัดแยกได้มีจำนวนลดลงและไม่สามารถเจริญได้เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร ส่วนที่ pH เท่ากับ 3.7 และ 4.1 เป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อการเจริญของยีสต์เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีค่า pH เท่ากับ 6.8

2.7.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำส้มสายชู

ขวัญเรือนและคณะ (2554) ศึกษาฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดสมุนไพรสำหรับยาลูกแพลงแม่ โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin Ciocalteu assay และฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay รวมถึงการทดสอบความสามารถของสารสกัดในการจับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH⁻) ด้วยวิธี Deoxyribose assay พบว่า สารสกัดจากพริกไทยดำมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงสุด รองลงมาคือสารสกัดจากมะตูมและสารสกัดจากกล้วยน้ำไท ตามลำดับ

พรธิดา และคณะ (2557) ศึกษาการเพิ่มขึ้นของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและกรดอะซิติกของน้ำส้มสายชูดอกกระเจียวที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *Acetobacter aceti* TISTR 102 และ *Acetobacter cerevisiae* TN4497 ในสภาวะที่เหมาะสมจากเอทานอลเริ่มต้น 63.47 กรัมต่อลิตร โดยตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แอนโทไซยานินทั้งหมด และ

คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของน้ำกระเจี๊ยบ ไวน์กระเจี๊ยบ และน้ำส้มสายชูกระเจี๊ยบ พบว่ากระบวนการหมักกรดอะซิติกมีผลทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แอนโทไซยานิน ทั้งหมดและคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของกระเจี๊ยบเพิ่มขึ้น โดยไวน์และน้ำส้มสายชูกระเจี๊ยบ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.28 และ 11.89 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

วิลาวลัย และคณะ (2560) ศึกษาคุณสมบัติทางเคมี สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำส้มสายชูที่ผลิตจากไวน์สับปะรด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์หอมสุวรรณ พันธุ์ห้วยมุ่น พันธุ์ปัดดาเวีย และพันธุ์ตราดสีทอง เริ่มจากการหมักไวน์สับปะรดด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยปรับแอลกอฮอล์ของไวน์สับปะรดให้มีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ ร้อยละ 10 จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Acetobacter pasteurianus* ร้อยละ 10 โดยปริมาตร หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน พบว่าน้ำส้มสายชูที่หมักจากสับปะรดสายพันธุ์ตราดสีทองมี ปริมาณกรดสูงสุดร้อยละ 3.09 ± 0.04 และรองลงไปคือน้ำส้มสายชูจากสับปะรดพันธุ์ห้วยมุ่น (ร้อยละ 2.82 ± 0.26) จากการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระพบว่าน้ำส้มสายชูที่หมักจากสับปะรดสายพันธุ์ ปัดดาเวียมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดร้อยละ 89.82 ± 0.83 รองลงมาคือน้ำส้มสายชูจาก สับปะรดพันธุ์ห้วยมุ่น สำหรับการทดสอบทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างน้ำส้มสายชูพร้อมดื่มพบว่า น้ำส้มสายชูที่หมักจากสับปะรดสายพันธุ์ห้วยมุ่นได้รับคะแนนเฉลี่ยความชอบรวมสูงสุดเป็น 6.20 ± 1.69 ซึ่งจัดอยู่ในเกณฑ์ชอบเล็กน้อยตามหลักเกณฑ์ 9-Point Hedonic Scale

Boonsopa *et al.*, (2019) ศึกษาคุณสมบัติทางเคมี ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำส้มสายชูที่หมักจากกล้วย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ กล้วยไข่พระตะบอง กล้วยนาก กล้วยหิน และกล้วยพม่าแหกคุก โดยปรับปริมาณของแข็งทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 25 องศาบริกซ์ก่อนการหมักแบบแยก (Two-step fermentation) ด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และแบคทีเรีย *Acetobacter pasteurianus* พบว่าในช่วงการหมักแอลกอฮอล์ ปริมาณของแข็งทั้งหมดลดลง รวดเร็วและมีปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มสูงขึ้นตลอดช่วงของการหมัก โดยเฉพาะไวน์กล้วยพม่าแหกคุกที่มี ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดร้อยละ 9.54 และมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดด้วยเช่นกัน (ร้อยละ 87.04) สำหรับช่วงของการหมักกรดอะซิติก ปริมาณแอลกอฮอล์มีแนวโน้มลดต่ำลง ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มของกรดอะซิติก โดยน้ำส้มสายชูที่ผลิตจากไวน์กล้วยพม่าแหกคุกให้ปริมาณกรดอะซิติกสูงสุด ร้อยละ 3.49 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและน้ำส้มสายชูกล้วยไข่พระตะบองมีกิจกรรมการต้านต่อ อนุมูลอิสระสูงสุด (ร้อยละ 80.59) การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic scales พบว่าน้ำส้มสายชูกล้วยไข่พระตะบองได้ระดับความชอบเท่ากับ 9 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าผู้บริโภคมีความพอใจ ในระดับความชอบที่สูง

Coelho *et al.*, (2017) ได้ศึกษาคุณสมบัติของน้ำส้มสายชูที่ผลิตจากไวน์ผลไม้ 4 ชนิด ได้แก่ ส้ม มะม่วง เชอร์รี่ และกล้วย โดยน้ำส้มสายชูที่ผลิตจากกล้วยมีปริมาณกรดอะซิติก ร้อยละ 5.40 ± 0.40 และพบการเปลี่ยนแปลงของเอสเทอร์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ระเหยได้ในปริมาณ

เล็กน้อยในระหว่างกระบวนการหมัก สำหรับการศึกษาศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay พบว่าน้ำส้มสายชูจากไวน์กัลลี่ยามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 3.7 ± 0.3 mmol/L

Kim *et al.*, (2012) ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูพร้อมดื่มในประเทศเกาหลี 7 ชนิดได้แก่ น้ำส้มสายชูทับทิม น้ำส้มสายชูแบล็กเบอร์รี่ น้ำส้มสายชูบลูเบอร์รี่ น้ำส้มสายชูหม่อน น้ำส้มสายชูโสมแดง น้ำส้มสายชูเชอร์รี่ และน้ำส้มสายชูกระบองเพชร พบว่ามีค่า pH และกรดอะซิติกอยู่ระหว่าง 2.81-3.20 และร้อยละ 1.95-2.34 ตามลำดับ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้อยู่ในช่วง 31.63-38.75 องศาบริกซ์ และมีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดระหว่าง 781-982 mg/L โดยน้ำส้มสายชูแบล็กเบอร์รี่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุดร้อยละ 13.21 โดยน้ำหนักและพบว่าในน้ำส้มสายชูโสมแดงมีปริมาณแอนโทไซยานินน้อยสุดร้อยละ 0.06 โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ น้ำส้มสายชูแบล็กเบอร์รี่ยังมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้ง DPPH และ ABTS รวมถึงปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลสูงสุด

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

- 3.3.1 กล้วยน้ำว้าสุก
- 3.3.2 พริกไทยดำ
- 3.3.3 มะตูมแห้ง
- 3.3.4 น้ำหมักกล้วยน้ำว้าอายุ 1 ปี
- 3.3.5 น้ำตาลทรายไม่ขัดสี (วังขนาย)

กล้วยน้ำว้า พริกไทยดำแห้ง มะตูมแห้ง และน้ำหมักกล้วยน้ำว้าอายุ 1 ปีได้รับ
อนุเคราะห์จากผู้ประกอบการผลิตเครื่องดื่มน้ำสมุนไพรหมักลูกแปลกแม่ในจังหวัดศรีสะเกษ

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.2.1 Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC agar; Himedia, India)
- 3.2.2 Glucose Yeast extract Calcium carbonate agar (GYC agar)
- 3.2.3 Glucose Yeast extract Ethanol Calcium carbonate agar (GYEC agar)
- 3.2.4 Yeast extract Ethanol Calcium carbonate broth (YEC broth)
- 3.2.5 Yeast extract Peptone Dextrose agar (YPD agar)
- 3.2.6 Malt agar
- 3.2.7 Fermentation basal medium
- 3.2.8 Glucose Peptone Yeast extract agar (GPY agar)
- 3.2.9 Carr medium

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 สารเคมีที่ใช้ย้อมและทดสอบเซลล์ยีสต์และแบคทีเรีย
 - 3.3.1.1 Methylene blue
 - 3.3.1.2 Crystal violet
 - 3.3.1.3 Gram-Iodine
 - 3.3.1.4 Safranin-O
 - 3.3.1.5 Hydrogen peroxide
 - 3.3.1.6 Oxidase reagent
 - 3.3.1.7 ชุดทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล API 20 C AUX (Biomerieux, France)

- 3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
 - 3.3.2.1 Taq DNA polymerase (Apsalagen, Thailand)
 - 3.3.2.2 Favoprep Gel/PCR purification kit (Flavogen, Taiwan)
 - 3.3.2.3 T&A cloning kit (Yeastern Biotech, Taiwan)
 - 3.3.2.4 Favoprep Plasmid extraction mini kit (Flavogen, Taiwan)
 - 3.3.2.5 CCMB80 buffer
- 3.3.3 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กรด
 - 3.3.3.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N
 - 3.3.3.2 โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (KHP)
 - 3.3.3.3 น้ำกลั่นปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์
- 3.3.4 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด
 - 3.3.4.1 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน
 - 3.3.4.2 สารละลายฟีนอล 5%
 - 3.3.4.3 กรดซัลฟูริก 98%
- 3.3.5 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล
 - 3.3.5.1 สารละลายมาตรฐานเอทานอล
 - 3.3.5.2 โพรพานอล 10%
- 3.3.6 สารเคมีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
 - 3.3.6.1 DPPH
 - 3.3.6.2 สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิก
- 3.3.7 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก
 - 3.3.7.1 สารละลาย Foline-Ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10
 - 3.3.7.2 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 75 กรัมต่อลิตร
 - 3.3.7.3 สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

3.4 วัสดุและอุปกรณ์

- 3.4.1 อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่น จานเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ปีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ ปิเปตแก้ว บิวเรต โหลแก้วพร้อมฝา เป็นต้น
- 3.4.2 อุปกรณ์เขี่ยเชื้อ
- 3.4.3 อุปกรณ์ Spread plate
- 3.4.4 อุปกรณ์ไตเตรท
- 3.4.5 ชุดกรองสุญญากาศ
- 3.4.6 ผ้าขาวบาง

- 3.4.7 กระจกทรงขนาด 0.45 ไมครอน
- 3.4.8 หลอดเซนติฟิวลัดติกขนาด 50 มิลลิลิตร
- 3.4.9 ขวดไวแอล (vials)
- 3.4.10 ตู้ปลอดเชื้อ Laminar air flow (Tekstar, Bioll Avance, Germany)
- 3.4.11 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) (Nikon, E100-LED, Japan)
- 3.4.12 เครื่อง pH meter (Mettler Toledo, S220 Seven Compact pH/Ion, Switzerland)
- 3.4.13 เครื่อง Refractometer (Atago, MASTER-M, Japan)
- 3.4.14 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (HERMLE, Z383K, Germany)
- 3.4.15 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatography) (Shimadzu, GC-2010 Plus, Japan)
- 3.4.16 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate Reader) (BMG LABtech GmbH, FLUO Star Omega, Germany)
- 3.4.17 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Contherm scientific, Polar 1000, New Zealand)
- 3.4.18 เครื่อง Spectrophotometer (Shimadzu, UV-1800, Japan)
- 3.4.19 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Memmert, INB 500, Germany)
- 3.4.20 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) (HIRAYAMA, HV-25/50/85/110, Japan)

3.5 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.5.1 กระบวนการผลิตน้ำหมักสมุนไพรลูกแพลงก์ตอน

การผลิตเครื่องดื่มสมุนไพรหมักลูกแพลงก์ตอนของผู้ประกอบการในจังหวัดศรีสะเกษ มีกระบวนการหมัก 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การหมักกล้วยน้ำว้าอายุ 1 ปี นำกล้วยน้ำว้าปอกเปลือก 3 กิโลกรัม ผสมกับน้ำตาลทรายไม่ขัดสี 10 กิโลกรัม หมักในภาชนะพลาสติกและปิดฝาให้สนิทนาน 15 วัน เติมน้ำดื่มปริมาตร 60 ลิตร กวนน้ำหมักทุก 7 วันในช่วง 6 เดือนแรกของการหมัก จากนั้นหมักต่อในสภาวะนิ่งปราศจากการกวนจนครบระยะเวลาหมัก 1 ปีและกรองน้ำสมุนไพรหมักที่ได้ด้วยผ้าขาวบาง เพื่อนำแผ่นเซลล์และตะกอนของวัตถุดิบออกจากน้ำหมัก จะได้น้ำหมักกล้วยน้ำว้า 1 ปีที่มีค่า pH เท่ากับ 3 และมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับ 5 องศาบริกซ์

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมวัตถุดิบหมัก นำพริกไทยดำแห้ง มะตูมแห้ง และกล้วยน้ำว้าสุกปอกเปลือกแล้ว อย่างละ 3 กิโลกรัม ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากับน้ำตาลทรายไม่ขัดสี 10 กิโลกรัม และน้ำหมักกล้วยน้ำว้าอายุ 1 ปี (ขั้นตอนที่ 1) ปริมาตร 5 ลิตร จากนั้นหมักในสภาวะนิ่ง ในภาชนะพลาสติกที่ปิดฝามิดชิด เป็นเวลา 15 วัน

ขั้นตอนที่ 3 การหมักน้ำหมักสมุนไพรลูกแพลงก์ตอน นำน้ำหมักกล้วยน้ำว้าอายุ 1 ปี ปริมาตร 55 ลิตรในขั้นตอนที่ 1 เติมลงในวัตถุดิบหมักในขั้นตอนที่ 2 ที่หมักครบ 15 วัน จากนั้นหมัก

ต่อที่สภาวะนิ่งในภาชนะที่มีฝาปิด โดยทำการกวนเพื่อให้อากาศทุกสัปดาห์เป็นเวลา 6 เดือนจะได้ผลิตภัณฑ์น้ำสมุนไพรหมักที่มีค่า pH เท่ากับ 3 และปริมาณของแข็งทั้งหมดเท่ากับ 5 องศาบริกซ์

จากนั้นทำการกรองน้ำสมุนไพรหมักด้วยผ้าขาวบางเพื่อนำวัตถุดิบที่เป็นของแข็งออก และฆ่าเชื้อน้ำสมุนไพรหมักที่ได้ด้วยสารโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (Potassium metabisulfite, KMS) ความเข้มข้น 200 ppm (0.2 กรัมต่อลิตร) และเติมน้ำผึ้งในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ก่อนการบรรจุขวดออกจำหน่าย

3.5.2 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของน้ำหมักสมุนไพรลูกแพลงแม่แต่ละช่วงการหมัก

เก็บตัวอย่างน้ำหมักสมุนไพรลูกแพลงแม่ที่ระยะเวลาหมัก 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน โดยเก็บตัวอย่างลงในภาชนะพลาสติกที่ผ่านการเชื้อแล้ว วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ pH ด้วยเครื่อง pH meter, ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง Refractometer, ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC), ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติก (Total acidity) และการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก

3.5.3 การคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกจากน้ำหมักสมุนไพรในแต่ละช่วงการหมัก

นำตัวอย่างน้ำหมักที่เก็บตัวอย่างในข้อที่ 3.5.2 มาคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกด้วยเทคนิค Spread plate ลงบนอาหาร Selective media 3 ชนิด ได้แก่ อาหารแข็ง Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar (DRBC) ที่มียาปฏิชีวนะ Chloramphenicol 100 µg/mL สำหรับคัดแยกยีสต์ อาหารแข็ง Glucose Yeast extract Calcium carbonate agar (GYC) และ Glucose Yeast extract Ethanol Calcium carbonate agar (GYEC) สำหรับคัดแยกแบคทีเรียอะซิติก โดยสังเกตจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำหมักในแต่ละช่วงการหมักด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 แบบ serial 10 fold dilution ปิเปิดตัวอย่างที่มีความเจือจางเหมาะสม 3 ระดับ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารแข็งและใช้แท่งแก้วอเกลียสารละลายตัวอย่างให้กระจายทั่วทั้งจาน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการสุ่มเก็บโคโลนีของเชื้อที่มีลักษณะแตกต่างกันจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนี 30-300 โคโลนี จำนวน 20 โคโลนีจากน้ำหมักแต่ละเดือน นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการ Streak ลงบนอาหารแข็งที่ใช้คัดแยกอย่างน้อย 2 ครั้ง เก็บโคโลนีของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอาหารเลี้ยง Yeast extract Peptone Dextrose agar (YPD) และ GYC ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสตามลำดับ และเก็บรักษาที่ไนกลีเซอรอลร้อยละ 15 และ 25 ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3.5.4 การศึกษาความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ที่คัดแยกได้

3.5.4.1 อาหาร YPD

นำยีสต์ที่คัดแยกได้จำนวน 120 ไอโซเลตมาศึกษาการรูปร่างเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นศึกษาความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ด้วยอาหารเหลว YPD

เตรียมหัวเชื้อโดยเลี้ยงเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสง

ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ให้ได้ 0.5 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตรลงในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 หมักในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาทีนาน 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใส วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง GC ใช้คอลัมน์ DB-1 และตัวตรวจวัดชนิด FID จากนั้นคัดเลือกไอโซเลตของยีสต์ที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงมาศึกษาการผลิตแอลกอฮอล์ในน้ำหมักสมุนไพรต่อไป

3.5.4.2 อาหารน้ำสมุนไพร

เตรียมหัวเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YPD เช่นเดียวจากการทดลองก่อนหน้านี้ โดยปิเปตหัวเชื้อ ($OD_{600}=0.5$) ร้อยละ 10 โดยปริมาตรลงในอาหารน้ำสมุนไพร ประกอบด้วยน้ำหมักกล้วยน้ำว้าที่มีมะตูมแห้ง 50 กรัมต่อลิตร พริกไทยดำแห้ง 50 กรัมต่อลิตร กล้วยน้ำว้าสุก 50 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทรายไม่ขัดสี 167 กรัมต่อลิตร หมักในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างและปั่นเหวี่ยงน้ำหมักที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใส วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง GC และคัดเลือกไอโซเลตของยีสต์ที่ผลิตแอลกอฮอล์ในน้ำสมุนไพรหมักได้สูงมาใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์

3.5.5 การจัดจำแนกยีสต์

3.5.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์

ตรวจสอบลักษณะรูปร่างโคโลนีของยีสต์บนอาหารแข็ง Malt medium ที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 1 เดือน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยสังเกต สี ลักษณะขอบ พื้นผิว การยกตัวของโคโลนี และรูปร่างเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในอาหารเหลว YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (Wu *et al.*, 2012)

3.5.5.2 การทดสอบทางชีวเคมีของยีสต์

การทดสอบทางชีวเคมีได้ทำการศึกษาตามวิธีของ Kurtzman *et al.*, (2011) โดยมีการทดสอบดังนี้

1. ความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน ด้วยชุด API 20 C AUX Kit แหล่งคาร์บอนที่ใช้ ได้แก่ Glucose, Glycerol, 2-Keto-D-gluconate, L-Arabinose, D-Xylose, D-Galactose, Sorbitol, Inositol, Methyl- α -D-Glucopyranoside, N-Acetyl-Glucosamine, D-Cellobiose, D-Lactose, D-Maltose, Sucrose, D-Trehalose, D-Melezitose, Adonitol และ D-Raffinose โดยเลี้ยงยีสต์บนอาหารแข็ง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการละลายเซลล์ด้วย API C medium ให้สารละลายเซลล์มีความเข้มข้นเท่ากับ Mcfarland standard หมายเลข 3 ปิเปตสารละลายเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงใน API 20 C AUX strip แต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง บันทึกผลโดยสังเกตการเจริญของยีสต์จากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. ความสามารถในการหมักน้ำตาล เจือจางยีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยง YPD เป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยน้ำกลั่น และวัดความขุ่นของสารละลายเซลล์ให้มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ($OD_{600}=0.5$) จากนั้นปิเปตสารละลายเซลล์ 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหาร Fermentation basal medium ที่มี Durham tube โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ Glucose, Galactose, Lactose, Maltose, Sucrose, Raffinose, Melibiose และ Trehalose บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 28 วัน สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 7 วัน ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลืองและมีแก๊สเกิดขึ้นใน Durham tube แสดงว่าเชื้อมีความสามารถในการหมักน้ำตาล โดยใช้อาหาร Fermentation basal medium ที่ปราศจากน้ำตาลเป็นชุดควบคุม

3. การศึกษาความสามารถในการเจริญได้ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เชื้อยีสต์บนอาหาร GPY agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 30 37 และ 45 องศาเซลเซียสนาน 4 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งและบันทึกผล

3.5.5.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดแยกได้

จัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (Molecular taxonomy) เปรียบเทียบลำดับของเบสบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS region) กับฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI)

1. การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Colony PCR

นำไอโซเลตของยีสต์ที่ศึกษามา Cross streak บนอาหารแข็ง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่อบฆ่าเชื้อแล้วเช็ดโคลนทีเดียวลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 20 mM ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (Murray *et al.*, 2016) นำสารละลายเซลล์ที่ได้มาใช้เป็น Template ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณที่บริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1: 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' และ ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR แสดงดังตารางที่ 3.1 ทำปฏิกิริยา PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycle) จำนวน 30 รอบ โดยมีการตั้งโปรแกรมการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิดังตารางที่ 3.2

ตรวจสอบผลของการทำ Colony PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.2% Agarose gel ใน 0.5X TBE buffer และ 100 bp DNA Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน และตรวจสอบคุณภาพ PCR product โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อพิจารณาคุณภาพของดีเอ็นเอจากค่า A_{260}/A_{280} โดยดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.8-2.0

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจากยีสต์เป็นต้นแบบปริมาณรวม 25 ไมโครลิตร

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
10x buffer	2.5
0.2 mM dNTP	0.25
0.25 mM Forward primer	0.500
0.25 mM Reverse primer	0.500
RBC Taq DNA Polymerase	0.125
ดีเอ็นเอต้นแบบ	1.000
H ₂ O	20.125

ตารางที่ 3.2 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจากยีสต์เป็นต้นแบบ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	95	5 นาที	1 รอบ
Denaturation	95	30 วินาที	30 รอบ
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final-extension	72	5 นาที	1 รอบ

2. การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ PCR purification kit

(FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit)

ทำการเพิ่มปริมาณ PCR Product เป็น 200 ไมโครลิตร จากนั้นตัดแถบ PCR product บน 1.2% Agarose gel ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย FADF buffer 500 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที จน Agarose gel ละลายหมด โดยทำการพลิกหลอดทุก 2-3 นาที กรองสารละลายที่ได้ผ่าน FADF column โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที ที่ซึ่งสารละลายส่วนใหญ่ เติม Wash buffer 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งและทิ้งสารละลายส่วนใหญ่ ทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 3 นาที เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอบน Column แห้ง ย้าย Column วางบนหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 หลอดใหม่ เติมสารละลาย Elution Buffer 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เก็บสารละลายส่วนใหญ่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

3. การโคลน PCR product และการคัดเลือก Competent cell

ในการทดลองนี้จะใช้เชื้อ *E. coli* XL-Blue1 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เตรียม Competent cell สำหรับการ Transformation ด้วยวิธี CCMB80 Method (Sombrook *et al.*, 2001) โดยเลี้ยงเชื้อ *E. coli* จาก Stock ในอาหารเหลว LB Broth เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ไม่เกิน 0.25 จากนั้นแบ่งสารละลายเซลล์ใส่หลอด 40 มิลลิลิตร นำสารละลายเซลล์มาวางบนน้ำแข็ง ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์และละลายตะกอนเซลล์ด้วย CCMB80 Buffer ที่เย็นปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมเบาๆ ปั่นเหวี่ยงและเก็บตะกอนเซลล์ ละลายตะกอนเซลล์และเจือจางสารละลายเซลล์ด้วย CCMB80 Buffer ที่เย็นปริมาตร 8 มิลลิลิตรและปรับความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ให้อยู่ระหว่าง 1-1.5 บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแบ่งใส่หลอด Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 50 ไมโครลิตรและเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การโคลนชิ้น PCR product เข้าพลาสมิด นำสารละลาย PCR product ที่ได้ในข้อที่ 1 มา Ligation เข้า T&A vector ด้วย T&A cloning kit (Yeastern biotech, ประเทศไต้หวัน) โดยการเตรียม Ligation Mixer ตามตารางที่ 3.3 และทำการผสมส่วนประกอบให้เข้ากันด้วยปิเปตและบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 14-16 ชั่วโมงก่อนการ Transformation

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Ligation ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
Ligation Buffer A	0.5
Ligation Buffer B	0.5
T&A cloning vector	1
PCR product	2.5
T4 DNA ligase	0.5

การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ปิเปตพลาสมิดที่ Ligation ไว้ ปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงใน Competent cell ที่เตรียมไว้ จากนั้นนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ด้วย Heat shock สารละลายเซลล์ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสนาน 1 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็ง นาน 2 นาทีและเติมอาหารเหลว LB Broth ลงในหลอด Competent cell ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยง Competent cell ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาทีและเก็บตะกอนเซลล์ นำตะกอนเซลล์ที่ได้มา Spread plate บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, X-gal 50

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG 0.5 mM เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับ Recombination plasmid พลาสมิดที่ต้องการด้วยวิธี Blue/White selection โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง และให้ความเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่ามีการ Recombination plasmid มาใช้ศึกษาต่อ

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา colony PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
10x buffer	2.5 ไมโครลิตร
0.2 mM dNTP	0.25 ไมโครลิตร
0.25 mM Forward primer - (M13F: 5' - GTTTTCCCAGTCACGAC -3')	0.5 ไมโครลิตร
0.25 mM Reverse primer - (M13: 5' - CAGGAAACAGCTATGAC -3')	0.5 ไมโครลิตร
RBC Taq DNA Polymerase	0.125 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอต้นแบบ	0.5 ไมโครลิตร
H ₂ O	20.625 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.5 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจาก Colony เป็นต้นแบบ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	94	5 นาที	1 รอบ
Denaturation	94	30 วินาที	25 รอบ
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final-extension	72	7 นาที	1 รอบ

ตรวจสอบ Recombination plasmid ด้วยเทคนิค Colony PCR โดยการเจือจางโคโลนีของเชื้อที่ทำการตรวจสอบด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น Template จากนั้นผสมส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.4 และตั้งโปรแกรมการทำปฏิกิริยา 25 รอบ ดังตารางที่ 3.5

สกัด Plasmid ออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วยชุด FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit (Flavogen, ประเทศไต้หวัน) โดยนำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียมาเลี้ยงใน

อาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตสารละลายเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 3-5 รอบจนสารละลายเซลล์หมด ละลายตะกอนเซลล์ด้วย FAPD1 Buffer 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต และเติม FAPD2 Buffer 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ 5-10 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2-5 นาที เติม FAPD3 Buffer 300 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ 5-10 รอบ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสลง FAPD Column และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ที่มีส่วนใส เติม W1 Buffer 400 ไมโครลิตรลงใน Column และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่สารละลายส่วนใสออกให้หมด เติม Wash Buffer 700 ไมโครลิตรลงใน Column และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบเท่าเดิม ที่สารละลายส่วนใสและปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อนำบัฟเฟอร์ออกให้หมด ย้าย Column ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์หลอดใหม่ ล้าง DNA ออกจาก Column โดยเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บพลาสมิดที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis และตรวจวัดความบริสุทธิ์ของ DNA ที่ค่าการดูดกลืนแสง A_{260} และ A_{280}

4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ

นำสารละลายพลาสมิดบริสุทธิ์ที่ได้ในข้อที่ 3 มาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 50-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและส่งตัวอย่างไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

3.5.6 การศึกษาความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.5.6.1 อาหาร YEC

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยคัดเลือกไอโซเลตของเชื้อที่ติดสีแกรมลบ ให้ผลการทดสอบ Catalase เป็นบวกและการทดสอบ Oxidase เป็นลบ ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียอะซิติก นำมาศึกษาความสามารถในการผลิตกรดทั้งหมด

เตรียมหัวเชื้อโดยเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว GYC ที่ปราศจาก Calcium carbonate เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ได้ 0.5 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตรลงในอาหารเหลว Yeast extract Ethanol Calcium carbonate broth (YEC) ที่มีเอทานอลร้อยละ 4 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างและปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกด้วยการไตเตรท จากนั้นคัดเลือกไอโซเลตของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกได้สูงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.5.6.2 อาหารน้ำสมุนไพร

เตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวจากการทดลองในหัวข้อ 3.5.6.1 ปีเปิดหัวเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตร ($OD_{600}=0.5$) ลงในอาหารน้ำสมุนไพรที่ประกอบด้วยน้ำหมักกล้วยน้ำว้าที่เติมมะตูมแห้ง 50 กรัมต่อลิตร พริกไทยดำ 50 กรัมต่อลิตร กล้วยน้ำว้า 50 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทรายไม่ขัดสี 167 กรัมต่อลิตร หมักในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ดัดแปลงจากวิธีของ Lee *et al.*, 2017) จากนั้นปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกด้วยวิธีการไตเตรท คัดเลือกไอโซเลตของแบคทีเรียอะซิติกที่ผลิตกรดได้สูงมาใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์

3.5.7 การจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติก

3.5.7.1 การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของแบคทีเรียอะซิติก

นำแบคทีเรียอะซิติกที่ทำการแยกได้เลี้ยงบนอาหารแข็ง GYC และ GYEC เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรียโดยการย้อมแกรม ตรวจสอบรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5.7.2 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียอะซิติก

การศึกษาทางชีวเคมีได้ทำการศึกษาตามวิธีของ Wu *et al.*, (2012) โดยมี การทดสอบดังนี้

1. การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase test)

หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนสไลด์ จากนั้น เขย่าโคลนของเชื้อผสมเข้าด้วยกัน และสังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่ามีการ สร้างเอนไซม์คะตาเลส (Gelman *et al.*, 2001)

2. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test)

เขี่ยเชื้อลงบนสไลด์ จากนั้นหยด Oxidase reagent ลงไปผสมกับเชื้อ สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีการเปลี่ยนสีเป็นสีม่วง แสดงว่ามีการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Gelman *et al.*, 2001)

3. การทดสอบการออกซิไดซ์เอทานอลเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ (Overoxidation of ethanol)

เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง Carr medium บ่มเป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ โดยแบคทีเรียอะซิติกในจีนัส *Acetobacter* จะเปลี่ยนสีอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง และเปลี่ยนต่อจากสีเหลืองเป็นสีเขียวได้ ส่วนจีนัส *Gluconobacter* จะเปลี่ยนสีอาหารจากเขียวเป็นเหลือง (Karin and Kain, 2006)

4. การทดสอบการออกซิไดซ์อะซิเตท

ตามวิธีของ Leifson method ทำการเขี่ยเชื้อที่คัดแยกได้ลงในอาหาร เหลวที่ใช้ในการทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเปลี่ยนสีของ

อินดิเคเตอร์ อ่านและบันทึกผล : + หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง, - หมายถึงอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน (Asai *et al.*, 1964)

5. การทดสอบความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน

โดยสารประกอบคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ Glucose, Ethanol, Sucrose, Mannitol, Arabinose, Inositol, Fructose, Erythritol, Glycerol, Maltose, Ribose และ Xylose เจือจางแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ 1 ลูกบาศก์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารละลายเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในอาหารที่ใช้ในการทดสอบ 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ ซึ่งถ้าเชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนนั้นๆ ได้ สีอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ให้ผลการทดสอบเป็นบวก (Asai *et al.*, 1964)

6 การทดสอบการสร้างสีน้ำตาล (Water soluble brown pigment)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยง Glucose Yeast Calcium carbonate agar เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร + หมายถึงอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล, - หมายถึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (Nanba and Kato, 1985)

7 การศึกษาความสามารถในการทนต่อเอทานอล

วิเคราะห์ผลโดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร HS broth ที่มีแอลกอฮอล์ร้อยละ 5 และร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเปิดสารละลายเซลล์ ($OD_{600} = 0.5$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่ใช้ทดสอบ 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้น Spread plate ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตบนอาหาร GYC บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง คำนวณหาการมีชีวิตรอดของเซลล์ดังสมการ

$$\text{การมีชีวิตรอด} = \text{Log}N_0 - \text{Log}N_1$$

$$\text{Log } N_0 = \text{จำนวนเชื้อที่มีชีวิตเริ่มต้นก่อนการ Treatment}$$

$$\text{Log } N_1 = \text{จำนวนเชื้อที่มีชีวิตหลังการ Treatment}$$

ถ้า $\text{Log}N_0 - \text{Log}N_1$ มีค่า ≤ 5 แสดงว่าเชื้อสามารถทนต่อสภาวะนั้นได้ (Moussa *et al.*, 2015)

3.5.7.3 การจัดทำแผนกสายพันธุ์แบคทีเรียอะซิติกที่คัดแยกได้

จัดทำแผนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (Molecular taxonomy) โดยการเทียบลำดับของเบสบริเวณ 16S rDNA กับฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI)

1. การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ลงในอาหาร GYC broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สกัด DNA ด้วยชุด Favorprep Plant Genomic DNA extraction mini kit (Favorgen, ประเทศไต้หวัน) โดยปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ในหลอด

ไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 7,500 rpm นาน 10 นาที เติมน้ำละลาย FATG1 buffer 200 ไมโครลิตรและ Proteinase K 20 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงโดยพลิกหลอดทุก 10 นาที พักสารละลายให้เย็น เติมน้ำ FATG2 buffer 200 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมน้ำ Absolute ethanol 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและถ่ายสายละลายที่ได้ลงใน FATG column บ่มที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส เติมน้ำ W1 buffer 400 ไมโครลิตร บ่มที่ 13,000 รอบต่อนาทีด้วยความเร็วสูงสุดและทิ้งสารละลายส่วนใส เติมน้ำ Wash buffer 750 ไมโครลิตร บ่มที่ 13,000 รอบต่อนาทีและทิ้งสารละลายส่วนใส บ่มที่ 13,000 รอบต่อนาทีให้ Column แห่งซ้ำอีกครั้ง นาน 3 นาที ย้าย Column ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์หลอดใหม่ เติมน้ำ Preheated Elution Buffer 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 13,000 รอบต่อนาทีด้วยความเร็วสูงสุดนาน 2 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณที่บริเวณ 16S rDNA ด้วยไพรเมอร์ 16SF (5'-CCCGGGAACGTATTCACCG-3') และ 16SR (5'-GCYTAAYACATGCAAGTCGA-3') เตรียมสารละลายในปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.1 นำมาทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 25 รอบ โดยมีการตั้งโปรแกรมการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิดังตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียเป็นต้นแบบ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	94	3 นาที	1 รอบ
Denaturation	94	30 วินาที	25 รอบ
Annealing	58	30 วินาที	
Extension	72	1.30 นาที	
Final-extension	72	5 นาที	1 รอบ

ตรวจสอบผลของการทำ Colony PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) ด้วย 1.2% Agarose gel ใน 0.5X TBE buffer และตรวจสอบคุณภาพ PCR product โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จากนั้นทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์โดยใช้ PCR purification kit เช่นเดียวกับยีสต์และนำสารละลายดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้มาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 50-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งตัวอย่างไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

3.5.8 ศึกษากระบวนการหมักน้ำหมักสมุนไพรลูกแมด้วยเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้

ในการศึกษานี้จะทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการหมัก 2 แบบได้แก่ การหมักพร้อมขั้นตอนเดียวกับการหมักแยกสองขั้นตอน โดยใช้ยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* YM1-19 (*S. pombe* YM1-19) และแบคทีเรีย *Acetobacter pasteurianus* EM2-03 (*A. pasteurianus* EM2-03) ที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักเครื่องดื่มสมุนไพรลูกแม

3.5.8.1 การเตรียมวัตถุดิบในการหมัก

วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักจะประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 สมุนไพรที่ใช้เป็นวัตถุดิบ นำมาต้มแห้ง พริกไทยดำแห้ง และกล้วยน้ำว้าสุกอย่างละ 25 กรัม ฆ่าเชื้อด้วยความดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนที่ 2 น้ำหมักกล้วยน้ำว้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำน้ำหมักกล้วยน้ำว้าอายุ 1 ปีเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 1 ลิตรผสมกับน้ำตาลทรายไม่ขัดสี 167 กรัมคนให้เข้ากัน และฆ่าเชื้อด้วยความดันไ้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำวัตถุดิบทั้งสองส่วนผสมกันเพื่อใช้เป็นอาหารหมัก

3.5.8.2 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก

การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ เชื้อยีสต์จากอาหารแข็ง YPD บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ลงในน้ำหมักกล้วยน้ำว้าร้อยละ 50 โดยปริมาตรที่มีน้ำตาล 16.7 กรัมต่อลิตร บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้ สำหรับแบคทีเรียอะซิติกเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง GYC บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเชื้อเชื้อ 1-2 ลูปล้างในน้ำหมักกล้วยน้ำว้าบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้เช่นกัน

3.5.8.3 กระบวนการหมักน้ำสมุนไพรลูกแม

1. การหมักพร้อมขั้นตอนเดียว นำสมุนไพรอย่างละ 25 กรัมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาผสมกับน้ำหมักกล้วยน้ำว้าปริมาตร 400 มิลลิลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อยีสต์และแบคทีเรียที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 ชนิดละ 10% (50 มิลลิลิตร) ลงในภาชนะหมักและปิดฝาภาชนะด้วยผ้าขาวบาง หมักในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน โดยวิเคราะห์ค่า pH ปริมาณแอลกอฮอล์และกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Phenol sulfuric method) การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก หยุดกระบวนการหมักด้วยการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 15 นาที เมื่อมีปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 4-5 โดยน้ำหมักต่อปริมาตร

2. การหมักแยกสองขั้นตอน นำสมุนไพรอย่างละ 25 กรัมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาผสมกับน้ำหมักกล้วยน้ำว้าปริมาตร 450 มิลลิลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อยีสต์ ($OD_{600}=0.5$) ร้อยละ 10 โดยปริมาตร (50 มิลลิลิตร) ปิดฝาภาชนะให้สนิท หมักในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนได้ปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ระหว่างร้อยละ 5-6 โดยปริมาตร หยุดการหมักของยีสต์ด้วยการฆ่าเชื้อน้ำหมักที่ได้ด้วยการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้น

เติมหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติกที่คัดเลือกได้ร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร ($OD_{600}=0.5$) หมักที่อุณหภูมิห้องในสภาวะนิ่งและปิดฝาภาชนะหมักด้วยผ้าขาวบาง เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับการหมักร่วมขั้นตอนเดียว หยุดการหมักเมื่อน้ำหมักมีปริมาณกรดทั้งหมดประมาณร้อยละ 4-5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

3.4.8.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำหมักสมุนไพรลูกแพลงแม่

1 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก)

นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตรเจือจางกับน้ำปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์และปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่และหยดฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด ไทเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ โดยสารละลายมีสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเตรท นำมาคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก (ร้อยละ) ตามสมการ ดังนี้

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก)} = \frac{N_1 \times V_1 \times M.W. \times 100}{1000 \times V_2}$$

N_1 = ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (mol/L)

V_1 = ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ (mL)

M.W. = มวลโมเลกุลของกรดอะซิติก (60.05 g/mol)

V_2 = ปริมาตรตัวอย่างที่วิเคราะห์ (mL)

2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-Sulfuric method

ทำการเจือจางตัวอย่างให้อยู่ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองเติมสารละลายฟีนอลเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 98 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีและผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร การวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักสมุนไพรด้วยวิธี di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminozanium (DPPH)

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์ตามวิธีของ Herald *et al.*, (2012) โดยนำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมกับ 0.2 mM DPPH ที่ละลายในเอทานอล 150 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการลดลงของอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรเทียบกับ Blank (ไม่มีการเติม DPPH) และชุดควบคุม (เอทานอลกับ DPPH) และใช้กรดแอสคอบิกที่มีความเข้มข้น 15 25 35 45 และ 55 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตรเป็นสารมาตรฐาน ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ คำนวณฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันตามสมการ

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = \left(\frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \right) \times 100$$

โดยที่ A_{Control} = สารละลาย DPPH ที่ไม่เติมน้ำส้มสายชู

โดยที่ A_{Sample} = สารละลาย DPPH ที่เติมน้ำส้มสายชู

4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ด้วยวิธี Folin-ciocalteu colorimetric

ตามวิธีการของ Zhang *et al.*, (2006) นำส่วนใสของน้ำหมักปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติม Folin-Ciocalteu reagent ร้อยละ 50 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 75 กรัมต่อลิตรปริมาตร 80 ไมโครลิตร บ่ม 30 นาทีในที่มืด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader) เทียบกับชุดควบคุมโดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ โดยแสดงผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร ตัวอย่าง ($\mu\text{g GAE/mL sample}$)

3.5.9 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

นำน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวและน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากการหมักแยกสองขั้นตอนมาเติมน้ำผึ้งเพื่อปรับปรุงรสชาติ โดยใช้อัตราส่วนน้ำหมักสมุนไพรต่อ น้ำผึ้งเท่ากับ 1:1

การทดสอบทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มน้ำสมุนไพรลูกแอปเปิ้ลแม่ เปรียบเทียบเครื่องดื่มน้ำสมุนไพรหมักจากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวและการหมักแยกสองขั้นตอนกับผลิตภัณฑ์ลูกแอปเปิ้ลแม่ทางการค้า นำเครื่องดื่มน้ำหมักสมุนไพรที่ได้ไปทดสอบทางประสาทสัมผัส ทดสอบแบบ 9 Point Hedonic Scale คะแนน 1 (ไม่ชอบมากที่สุด) ถึง 9 (ชอบมากที่สุด) ใช้ผู้ทดสอบชิมที่ไม่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 30 คน ให้คะแนนความชอบในด้านสี กลิ่นสมุนไพร ความเปรี้ยว ความหวาน และความชอบโดยรวม

3.5.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการทดลองวางแผนการทดลองแบบสุ่ม (Completely Randomized Design, CRD) มีจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

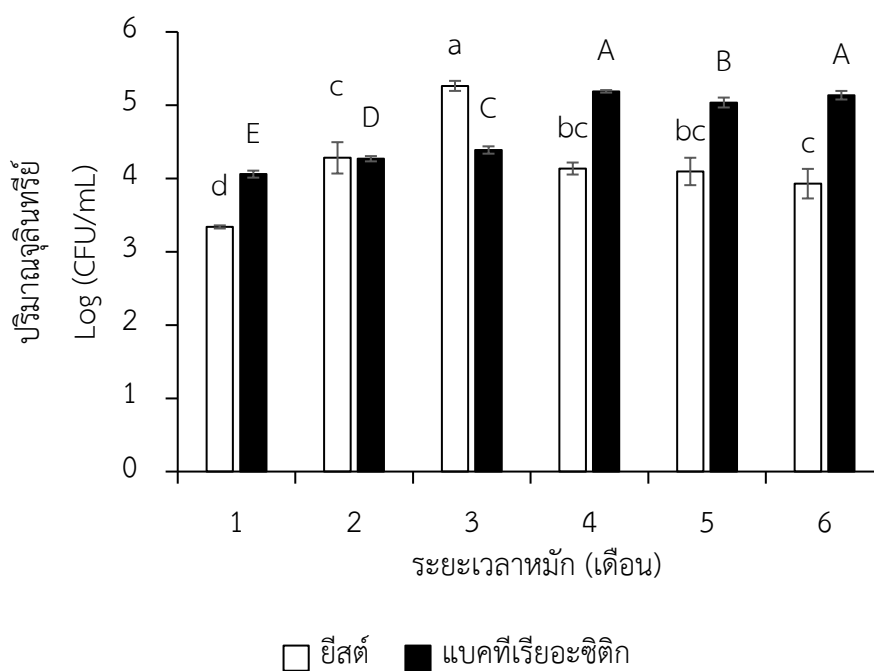
4.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำหมักสมุนไพรในแต่ละช่วงเวลาของการหมัก

จากการเก็บตัวอย่างน้ำหมักสมุนไพรที่ระยะเวลาหมัก 1 ถึง 6 เดือน วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี พบว่า pH ของน้ำหมักสมุนไพรมีค่าลดลงตามระยะเวลาหมักจาก 3.38 ± 0.03 ในเดือนที่ 1 และมี pH เท่ากับ 3.12 ± 0.01 ในเดือนที่ 6 สำหรับปริมาณของแข็งทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงจาก 19.23 ± 0.06 องศาบริกซ์เป็น 12.23 ± 0.06 องศาบริกซ์ภายหลังการหมัก 6 เดือน สำหรับปริมาณแอลกอฮอล์จะค่อยๆเพิ่มขึ้นและมีปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดในเดือนที่ 3 เท่ากับร้อยละ 7.99 ± 0.08 โดยปริมาตร หลังจากนั้นปริมาณแอลกอฮอล์จะลดลง ในขณะที่ปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2.22 ± 0.08 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นร้อยละ 5.04 ± 0.02 แสดงดังตารางที่ 4.1 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกระหว่างกระบวนการหมัก โดยพบว่ายีสต์มีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วง 3 เดือนแรกมีค่าเท่ากับ 5.26 ± 0.07 Log CFU/mL หลังจากนั้นยีสต์มีปริมาณลง สำหรับแบคทีเรียอะซิติกพบมากในช่วงเดือนที่ 4 ของการหมักมีปริมาณเท่ากับ 5.19 ± 0.02 Log CFU/mL หลังจากนั้นแบคทีเรียอะซิติกมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยแสดงดังรูปที่ 4.1 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกับการทดลองของ Song *et al.*, (2016) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าทางเคมีและจุลินทรีย์ในน้ำส้มสายชูหมักจากแบล็กกราสเบอร์รี่หมักด้วยวิธีการหมักแบบดั้งเดิมเป็นเวลา 144 วัน ในระหว่างกระบวนการหมัก แอลกอฮอล์มีการผลิตอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรก ซึ่งเกิดจากยีสต์ที่ติดมากับวัตถุดิบ มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดเท่ากับร้อยละ 12 โดยปริมาตร สำหรับปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 1.06 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรภายหลังการหมักเป็นเวลา 45 วันและเพิ่มขึ้นจนถึงร้อยละ 4.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในวันที่ 144 ของการหมัก โดยจำนวนแบคทีเรียอะซิติกในวันสุดท้ายของการหมักมีปริมาณใกล้เคียงกับจำนวนของแบคทีเรียอะซิติกในน้ำหมักสมุนไพรลูกแปลกแม่ มีค่าเท่ากับ 5.8 LogCFU/mL และ 5.14 LogCFU/mL ตามลำดับ และจากการศึกษาของ Wu *et al.*, (2012) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมักธัญพืชในประเทศจีน พบว่า pH มีค่าลดลงเล็กน้อยตลอดการหมักจาก 4.18 เป็น 3.85 ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของกรดอะซิติกร้อยละ 4.91 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 27) และมีแอลกอฮอล์สูงสุดในวันที่ 18 เท่ากับร้อยละ 5.5 โดยปริมาตร สำหรับปริมาณของแข็งทั้งหมดมีค่าลดลงจาก 14.1 องศาบริกซ์เป็น 4.9 องศาบริกซ์ในช่วง 18 วันแรก ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของแอลกอฮอล์ จากนั้นมีค่าคงที่ตลอดการหมัก (Wu *et al.*, 2012)

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรหมักในระยะเวลาหมัก 6 เดือน

ตัวอย่าง น้ำหมัก	pH	ของแข็งทั้งหมด ที่ละลายได้ (องศาบริกซ์)	แอลกอฮอล์ (ร้อยละ)	กรดทั้งหมด (ร้อยละของ กรดอะซิติก)
เดือนที่ 1	3.38±0.03 ^a	19.23±0.06 ^a	0.43±0.11 ^f	2.22±0.08 ^f
เดือนที่ 2	3.28±0.01 ^b	16.77±0.15 ^c	1.54±0.30 ^e	3.10±0.07 ^e
เดือนที่ 3	3.28±0.00 ^b	15.17±0.15 ^e	7.99±0.08 ^a	3.19±0.17 ^d
เดือนที่ 4	3.15±0.01 ^c	17.57±0.06 ^b	6.19±0.09 ^b	4.35±0.11 ^c
เดือนที่ 5	3.14±0.00 ^{cd}	16.47±0.10 ^d	4.32±0.01 ^c	4.67±0.05 ^b
เดือนที่ 6	3.12±0.01 ^d	12.23±0.06 ^f	2.59±0.00 ^d	5.04±0.02 ^a

หมายเหตุ ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมัก

หมายเหตุ ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณยีสต์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

^{ABC} ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณแบคทีเรียอะซิติก ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

4.2 การคัดแยกและการศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ที่คัดแยกได้จากน้ำหมักสมุนไพโร

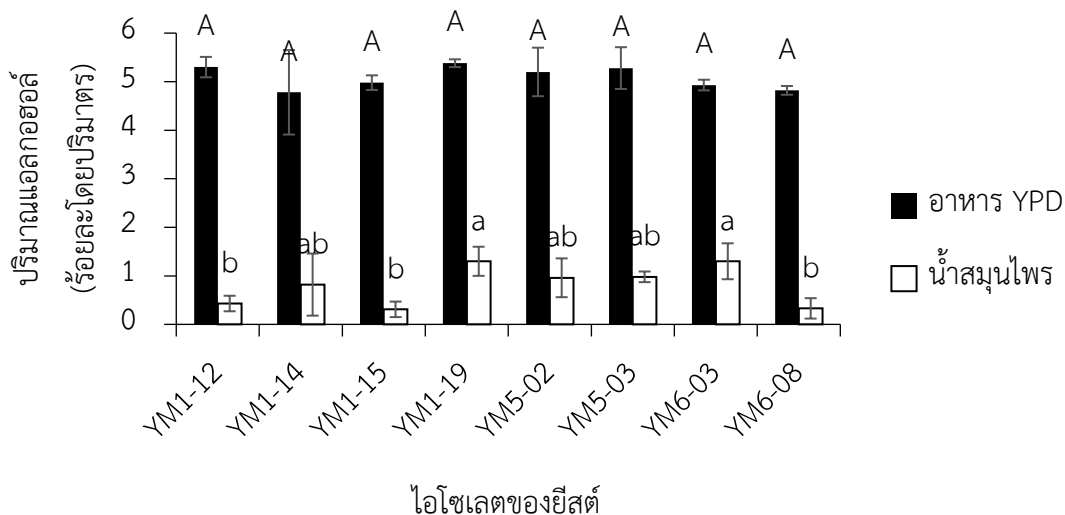
4.2.1 การคัดแยกยีสต์จากน้ำหมักสมุนไพโร

ในการคัดแยกเชื้อยีสต์จากน้ำหมักสมุนไพโรด้วยอาหารแข็ง DRBC จากน้ำหมัก 6 ตัวอย่างสามารถคัดแยกเชื้อได้จำนวน 120 ไอโซเลต ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยย้อมด้วยสี Methylene blue พบว่ามีเชื้อจำนวน 72 ไอโซเลตที่มีเซลล์ขนาดใหญ่เห็นได้ชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยพบรูปร่างเซลล์ 4 ลักษณะ ได้แก่ เซลล์รูปร่างไข่ (Oval) และเซลล์กลม (Round) ที่มีการสืบพันธุ์แบบแตกหน่อจำนวน 48 ไอโซเลต เซลล์แบบกระสวยที่มีสืบพันธุ์แบบการแตกหน่อจำนวน 2 ไอโซเลต และเซลล์รูปร่างท่อนที่มีการสืบพันธุ์แบบ Fission จำนวน 22 ไอโซเลต สำหรับอีก 48 ไอโซเลตเซลล์ขนาดเล็กไม่สามารถมองเห็นได้ชัดที่กำลังขยาย 400 เท่าและไม่พบการสืบพันธุ์แบบแตกหน่อหรือแบ่งเซลล์ ยีสต์ส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้จะมาจากตัวอย่างน้ำหมักในเดือนที่ 1 2 และ 3 จำนวน 19 ไอโซเลต (ร้อยละ 26.34), 18 ไอโซเลต (ร้อยละ 25) และ 20 ไอโซเลต (ร้อยละ 27.78) ตามลำดับ

4.2.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์

จากยีสต์ทั้งหมด 72 ไอโซเลตที่คัดแยกได้ พบว่าทุกไอโซเลตของยีสต์สามารถผลิตแอลกอฮอล์ในอาหาร YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ในช่วงร้อยละ 0.43 ± 0.19 - 5.38 ± 0.08 และมียีสต์ 8 ไอโซเลต ได้แก่ YM1-19, YM1-12, YM1-14, YM1-15, YM5-02, YM5-03, YM6-03 และ YM6-08 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงในช่วงร้อยละ 4.78 ± 0.87 - 5.38 ± 0.08 และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยไอโซเลต YM1-19 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงสุดร้อยละ 5.38 ± 0.08 โดยปริมาตรแสดงผลดังรูปที่ 4.2 ซึ่งมีปริมาณแอลกอฮอล์ใกล้เคียงกับยีสต์ที่คัดแยกจากผลตาลโตนด สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 5 โดยปริมาตรในอาหาร YPD ที่มีกลูโคสร้อยละ 10 หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาวะเดียวกับที่ใช้ในการศึกษานี้ (Artnarong *et al.*, 2016) ขณะที่ Nwachukwu *et al.*, (2006) หมักยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหาร YPD นาน 48 ชั่วโมงพบปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 6.2 โดยปริมาตร จากนั้นนำยีสต์ 8 ไอโซเลตที่มีความสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงในอาหาร YPD หมักในน้ำสมุนไพโรในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ทั้ง 8 ไอโซเลตสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้น้อยลงเมื่อเทียบกับอาหารเหลว YPD มีปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้อยู่ในช่วงร้อยละ 0.33 ± 0.21 - 1.30 ± 0.31 ยีสต์ไอโซเลต YM6-03 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงร้อยละ 1.30 ± 0.31 รองลงมาเป็นไอโซเลต YM1-19 โดยมีความแตกต่างทางสถิติกับไอโซเลต YM1-12 YM1-15 และ YM6-08 ($p \leq 0.05$) แสดงดังรูปที่ 4.2 ทั้งนี้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ยีสต์ผลิตได้น้อยลงอาจมีสาเหตุมาจากความเข้มข้นและชนิดของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด โดยในอาหารเหลว YPD มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 และน้ำสมุนไพโรมีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 16.7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก ยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ในอัตราที่สูงกว่าการใช้น้ำตาลซูโครสที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ส่งผลให้สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงกว่าในระยะเวลา

หมักที่เท่ากัน โดยมีรายงานว่าน้ำตาลที่มีความเข้มข้นไม่เกินร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญ และไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์ (Ciftci *et al.*, 1983) และเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้นถึงร้อยละ 14 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่งผลให้ยีสต์เกิดการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ (Plasmolysis) เซลล์ยีสต์จึงเหี่ยวและตายในที่สุด ซึ่งความสามารถในการทนต่อแรงดันออสโมติกนี้จะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของเชื้อ (Jones *et al.*, 1987) และ D'Amore *et al.*, (1988) ได้รายงานว่าเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงกว่าร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลลดลงและรบกวนการเพิ่มจำนวนของยีสต์ นอกจากนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงเกินไปยังมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ภายในเชื้อยีสต์และส่งผลต่อการส่งผ่านสารอาหารที่ผนังเซลล์ของยีสต์ ทำให้การผลิตเอทานอลของยีสต์ชะงักหรือผลิตได้ต่ำกว่าค่าทางทฤษฎี (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2560) รวมทั้งสมุนไพร ได้แก่ พริกไทยดำ มะตูม และกล้วยน้ำว้า ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราและยีสต์ โดย Piperine ที่เป็นสารออกฤทธิ์หลักในสารสกัดหยาบเอทานอลจากพริกไทยดำ มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ได้เล็กน้อยที่ระดับความเข้มข้น 50 µg/mL (Krishna *et al.*, 2019; Takooree, 2019) สำหรับสารสกัดเอทานอลจากกล้วยน้ำว้าพบว่ามีสาร Terpene และ Anthraquinones ในปริมาณที่สูง มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida lipolytica* (Mohamed *et al.*, 1994; Okon *et al.*, 2013) และจากการศึกษาของ Pena-Sarne *et al.*, (2012) เปรียบเทียบความสามารถของ *S. cerevisiae* ในการผลิตเอทานอลโดยใช้กากน้ำตาลและน้ำกล้วยเป็นวัตถุดิบ ได้ระบุว่าสาเหตุที่ *S. cerevisiae* ผลิตแอลกอฮอล์จากน้ำกล้วยได้น้อยกว่ากากน้ำตาลอาจเกิดจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดในน้ำกล้วยที่มีผลต่อการใช้น้ำตาลและการแบ่งเซลล์ของยีสต์ สำหรับสารสกัดน้ำจากมะตูมมีรายงานว่าสามารถควบคุมการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida albicans* ได้ (Suwanmanee *et al.*, 2014) ซึ่งสมุนไพรเหล่านี้ อาจมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมัก โดยปริมาณแอลกอฮอล์ที่ยีสต์ YM1-19 ผลิตได้ในน้ำสมุนไพร (ร้อยละ 1.30±0.31) มีปริมาณน้อยกว่าแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักไวน์สับปะรดด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดแยกได้จากไวน์มะพร้าวและ *S. cerevisiae* ทางการค้าที่มีแอลกอฮอล์ร้อยละ 10.2 และ 7.4 โดยปริมาตร ตามลำดับ (Ayogu, 1999) และมีปริมาณแอลกอฮอล์น้อยกว่าแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักกล้วยหอมทองนาน 3 วันด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งมีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 12.04±0.02 โดยปริมาตร (Boonsupa *et al.*, 2019b)



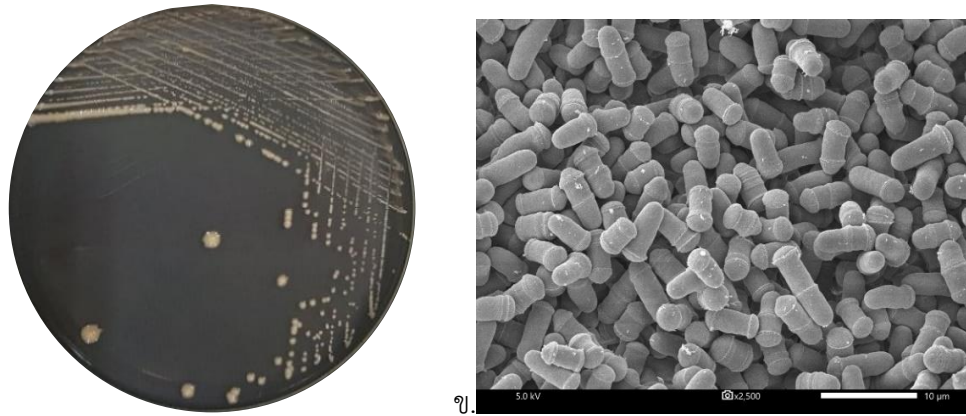
รูปที่ 4.2 ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากเชื้อยีสต์ที่แยกได้ในอาหารเหลว YPD และอาหารน้ำสมุนไพรมันในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

หมายเหตุ ^{ABC} ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้จากอาหาร YPD ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้จากน้ำสมุนไพรมัน ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.2.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์

ยีสต์ไอโซเลตที่นำมาจัดจำแนก ได้แก่ YM1-12, YM1-19, YM5-02, YM5-03 และ YM6-03 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์สูงในอาหารเหลว YPD และอาหารน้ำสมุนไพรมัน โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี พบว่ายีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลตที่นำมาจัดจำแนกมีลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Malt medium ลักษณะเดียวกันคือ โคโลนีกลม สีขาว ขอบเรียบ มีความโค้งนูนจากผิวอาหารเล็กน้อย (Convex) และเมื่อศึกษารูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแบบ Fission ไม่พบการแตกหน่อ และมีการสร้าง Ascus ที่มี 4 Ascospores แสดงในรูปที่ 4.3 ซึ่งลักษณะรูปร่างเซลล์ที่เป็นท่อนและมีการสืบพันธุ์แบบ Fission เป็นลักษณะเด่นของยีสต์ในจีนัส *Schizosaccharomyces*

สำหรับผลการทดสอบทางชีวเคมีแสดงดังตารางที่ 4.3 ยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลตมีความสามารถในการใช้และหมักแหล่งคาร์บอนไม่แตกต่างกันคือ สามารถใช้ Glucose, Glycerol, 2-Keto-D-gluconate, Methyl- α -D-Glucopyranoside, D-Maltose, Sucrose และ D-Raffinose เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถหมักน้ำตาล D-Glucose, Sucrose, Maltose และ Raffinose เป็นแอลกอฮอล์ และเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส โดยมีผลการทดสอบทางชีวเคมีใกล้เคียงกับยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* (Kurtzman *et al.*, 2011)

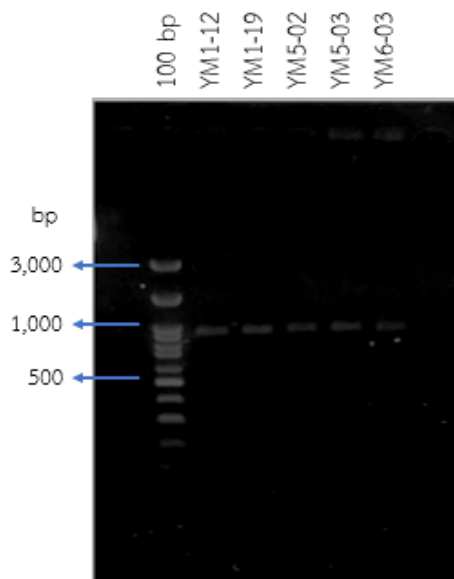


รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง Malt medium (ก.) และรูปร่างเซลล์ *S. pombe* YM1-19 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 2,500 เท่า (ข.)

ตารางที่ 4.2 การจัดจำแนกยีสต์ 5 ไอโซเลตบริเวณ ITS region

ไอโซเลต	ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับฐานข้อมูล NCBI	Per. Ident	Accession number ^a
YM1-12	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> UCDFST:04-213	98.86%	MH595429.1
YM1-19	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> UCDFST:04-213	98.76%	MH595429.1
YM5-02	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> UCDFST:04-213	98.43%	MH595429.1
YM5-03	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> UCDFST:04-213	98.43%	MH595429.1
YM6-03	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> UCDFST:04-213	98.42%	MH595429.1

หมายเหตุ ^aAccession number บริเวณ ITS1-ITS2



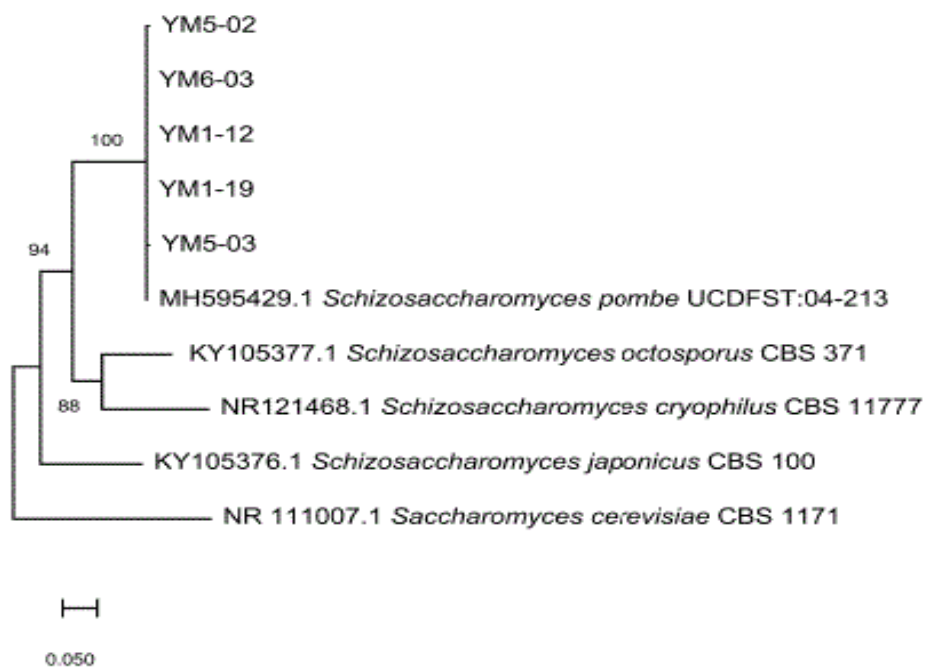
รูปที่ 4.4 Gel electrophoresis ของ PCR product บริเวณ Internal transcribed spacer region (ITS region) ของยีสต์ไอโซเลต YM1-12, YM1-19, YM5-02, YM5-03 และ YM6-03

เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS region ของยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลตด้วยโปรแกรม ITS1 และ ITS4 และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTN เพื่อระบุชนิดของยีสต์ให้ละเอียดมากขึ้นโดยเปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ายีสต์ 5 ไอโซเลตมีความคล้ายคลึงกับ *Schizosaccharomyces pombe* UCDFST:04-213 (*S. pombe*) ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี โดยมีความเหมือน (Percent Identity) กับ Type strain อยู่ในช่วงร้อยละ 98.42-98.86 ดังตารางที่ 4.2 *S. pombe* จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota คลาส *Schizosaccharomycetes* ในการเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีสต์ที่คัดแยกได้ 5 ไอโซเลตกับยีสต์ในจีนัส *Schizosaccharomyces* 4 สปีชีส์ โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* (Class Saccharomycetes) เป็น Outgroup แสดงความสัมพันธ์ของยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลตนี้ในรูปที่ 4.5 จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS region ด้วยโปรแกรม MEGAX โดยใช้แบบจำลองแผนภูมิ Neighbor-joining และวิเคราะห์แผนภูมิด้วยวิธี Kimura 2-parameter พบว่าที่ระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.050 ยีสต์ในจีนัส *Schizosaccharomyces* สามารถแยกความแตกต่างกันของพันธุกรรมได้อย่างชัดเจน ยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลตมีค่า Bootstrap value กับยีสต์ *S. pombe* เท่ากับ 100% โดยมี *Schizosaccharomyces octosporus* และ *Saccharomyces japonicus* เป็น Sister taxa มีค่า Bootstrap value เท่ากับ 94%

ยีสต์ *Schizosaccharomyces* มีการจัดจำแนกเป็น 4 สปีชีส์ ได้แก่ *S. octosporus*, *S. japonicus*, *S. pombe* และ *S. cryophilus* โดยเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์นี้มีขนาดของ Genomic DNA และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Telomere-repeats ที่แตกต่างกัน และถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการจัดจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ ยีสต์ *S. japonicus* มีขนาด Genomic DNA ประมาณ 11.5 Mb โดยมี %G+C content เท่ากับ 44%mol และมี GTCTTA เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Telomere-repeats สำหรับ *S. octosporus* และ *S. cryophilus* ที่เป็น Sister taxa มีขนาด Genomic DNA ประมาณ 11.5 Mb เช่นเดียวกัน โดยมีปริมาณ %G+C content เท่ากับ 38%mol และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Telomere-repeats ไม่แตกต่างกันคือ GGGTTACTT และยีสต์ *S. pombe* มีขนาด Genomic DNA ประมาณ 12.5 Mb ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่ายีสต์สปีชีส์อื่นเล็กน้อย โดยมี %G+C content เท่ากับ 36%mol และมี GGTTAC เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Telomere-repeats (Rhind *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังสามารถอาศัยลักษณะทาง Phenotype ได้แก่ ความแตกต่างของการสร้าง True hyphae จำนวนสปอร์ใน Ascus และความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครส แรฟฟิโนส และ D-gluconate เป็นแหล่งคาร์บอนในการจำแนกเชื้อระดับสปีชีส์ โดย *S. japonicus* มี 6-8 Ascospores ไม่สามารถใช้ D-gluconate เป็นแหล่งคาร์บอน และพบการสร้าง True hyphae ซึ่งไม่พบในสปีชีส์อื่น สำหรับ *S. octosporus* และ *S. cryophilus* ที่มีวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน ยีสต์ทั้ง 2 สปีชีส์ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครส แรฟฟิโนส และ D-gluconate ได้ โดย *S. octosporus* มี 6-8 Ascospores สำหรับ *S. cryophilus* มี 4-8 Ascospores และสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ไม่พบการเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 32 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างกับยีสต์สปีชีส์อื่นในจีนัส

นี้ที่เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 18-36 องศาเซลเซียส *S. pombe* สามารถใช้และหมักน้ำตาลซูโครส แรฟฟิโนส และ D-gluconate และมี 4 Ascospores ใน 1 Ascus (Vaughan-Martini and Martini, 2011; Helston *et al.*, 2010)

เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะทาง Phenotype ระหว่างยีสต์ *S. pombe* ที่คัดแยกได้กับยีสต์ *S. cerevisiae* ที่เป็น Outgroup พบว่ายีสต์ทั้ง 2 จินัสมีรูปร่างของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร 5% Malt medium ที่บ่มในอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือนแตกต่างกัน โดยยีสต์ *S. pombe* จะมีโคโลนีสีขาว มีการยกตัวสูงจากอาหารเล็กน้อย (Convex) ผิวหน้ามันวาว และมีขอบเรียบ สำหรับ *S. cerevisiae* โคโลนีที่เจริญมีสีครีม ผิวหน้าเรียบ มีการยกตัวแบบ Flat หรือ Raised และโคโลนีทึบแสง (Opaque) และนอกจากนี้ยีสต์ทั้ง 2 จินัสนี้ยังมีความสามารถในการเจริญและการใช้น้ำตาลที่แตกต่างกัน ยีสต์ *S. pombe* สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส มอลโตส ซูโครส และแรฟฟิโนส เจริญได้ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส ซูโครส มอลโตส แรฟฟิโนส D-Gluconate และกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับ *S. cerevisiae* สามารถหมักและใช้น้ำตาลในการเจริญได้เช่นเดียวกับ *S. pombe* นอกจากนี้ *S. cerevisiae* ยังสามารถหมักน้ำตาล Galactose และสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีน้ำตาลกาแล็กโทส Trehalose Melezitose Ethanol Lactate เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญพบว่ายีสต์ทั้ง 2 จินัสสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส แต่ในกลุ่มของ *S. cerevisiae* ที่ก่อโรคสามารถพบการเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Helston *et al.*, 2010; Vaughan-Martini and Martini, 2011a; Vaughan-Martini and Martini, 2011b)



รูปที่ 4.5 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีสต์ 5 ไอโซเลต ได้แก่ YM1-12, YM1-19, YM5-02, YM5-3 และ YM6-3 ที่สร้างด้วยวิธี Neighbor-Joining ด้วยโปรแกรม MEGAX

ตารางที่ 4.3 ผลทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อยีสต์ 5 ไอโซเลต

Biochemical test	Isolate no.					S. <i>pombe</i> ^a
	YM1-12	YM1-19	YM5-2	YM5-3	YM6-3	
Fermentation of carbohydrate						
D-Glucose	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	V
Lactose	-	-	-	-	-	-
Raffinose	+	+	+	+	+	V
Trehalose	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-
Growth on Carbohydrate compound						
Glycerol	+	+	+	+	+	V
2-Keto-D-gluconate	+	+	+	+	+	V ^b
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	-	-
Adonitol (Ribitol)	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	- ^c
Inositol	-	-	-	-	-	- ^c
Methyl- α -D-Glucopyranoside	+	+	+	+	+	+ ^c
N-Acetyl-Glucosamine	-	-	-	-	-	-
Growth at other temperature						
Growth at 25°C	+	+	+	+	+	+
Growth at 30°C	+	+	+	+	+	+
Growth at 37°C	+	+	+	+	+	-
Growth at 40°C	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ +=ผลบวก; -=ผลลบ; V=Variable; n/d=ไม่ได้ทดสอบ

ที่มา: ^a Vaughan-Martini *et al.*, (2011); ^b Choi *et al.*, (2010); ^c Helston *et al.*, (2010)

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ผลทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อยีสต์ 5 ไอโซเลต

Biochemical test	Isolate no.					S. <i>pombe</i> ^a
	YM1-12	YM1-19	YM5-2	YM5-3	YM6-3	
Growth on Carbohydrate compound						
D-Cellubiose	-	-	-	-	-	-
D-Lactose	-	-	-	-	-	-
D-Maltose	+	+	+	+	+	V
Sucrose	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	-	-	-	-	-	-
D-Melezitose	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ +=ผลบวก; -=ผลลบ; V=Variable; n/d=ไม่ได้ทดสอบ

ที่มา: ^a Vaughan-Martini *et al.*, (2011); ^b Choi *et al.*, (2010); ^c Helston *et al.*, (2010)

ยีสต์ *Schizosaccharomyce* สามารถทนต่อสภาวะ Osmotic pressure สูงได้ดี เจริญได้ในน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและเอทานอลร้อยละ 10 โดยปริมาตร ซึ่งแหล่งที่สามารถคัดแยก *S. pombe* ได้แก่ ผลไม้ เช่น มะละกอ องุ่น อ้อย เครื่องดื่ม เช่น คอมบูชา (Kombucha) เบียร์ และสามารถคัดแยกได้จากน้ำส้มสายชู Shanxi aged ในประเทศจีน รวมถึงน้ำตาลสดมะพร้าวในประเทศไทย โดยยีสต์ในจีนนี้จะมีรูปร่างเซลล์แตกต่างจากจีนอื่น (นิชานันท์, 2559; Jeffares, 2018; Maragatham *et al.*, 2011; Shehata *et al.*, 1960)

S. pombe มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ขนาดประมาณ 2×6-4×20 ไมโครเมตร มีการจัดเรียงตัวแบบเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ สามารถสร้างสปอร์ได้ และมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแบบ Fission โดยสร้าง Septum บริเวณกลางเซลล์ก่อนการแบ่งตัว โคลินีมีขาว ผิวมันวาว ขอบเรียบ (Entire) หรือ Sinuous ความสามารถในการหมักเอทานอลของ *S. pombe* มีรายงานว่าสามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึงร้อยละ 15 โดยปริมาตร ซึ่งใกล้เคียงกับ *Saccharomyces cerevisiae* (Benito *et al.*, 2019; Vaughan-Martini *et al.*, 2011b) จากการศึกษาของ Benito *et al.*, (2019) ที่ได้วิเคราะห์หาความแตกต่างของสารประกอบทางเคมีในไวน์องุ่นที่ผลิตจากยีสต์ต่างชนิดกัน ได้แก่ *S. cerevisiae*, *Lachancea thermotolerans* และ *S. pombe* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง พบว่าไวน์ที่ผลิตจากยีสต์ทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ในช่วงร้อยละ 13.55-13.80 โดยปริมาตร โดยยีสต์ *S. pombe* ผลิตแอลกอฮอล์ได้ต่ำสุดเท่ากับร้อยละ 13.55 ซึ่งมีปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำกว่าไวน์ที่หมักจาก *S. cerevisiae* เล็กน้อย (ร้อยละ 0.23 โดยปริมาตร) โดยปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้จาก *S. pombe* YM1-19 ร้อยละ 1.30±0.21 โดยปริมาตร มีปริมาณแอลกอฮอล์น้อยกว่าการทดลองของ Jayaraman *et al.*, (2018) ซึ่งหมักไวน์ผลไม้ชนิดต่างๆ ด้วยยีสต์

Schizosaccharomyces pombe ที่คัดแยกได้จากมะละกอสุก พบว่าไวน์องุ่น ไวน์บริทรูท และไวน์น้ำตาลโตนดให้ปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 2.57 3.29 และ 6.22 โดยปริมาตร ตามลำดับ ในขณะที่การหมักไวน์ส้มด้วยเชื้อสายพันธุ์นี้ให้ปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำสุดเท่ากับร้อยละ 1.05 โดยปริมาตร

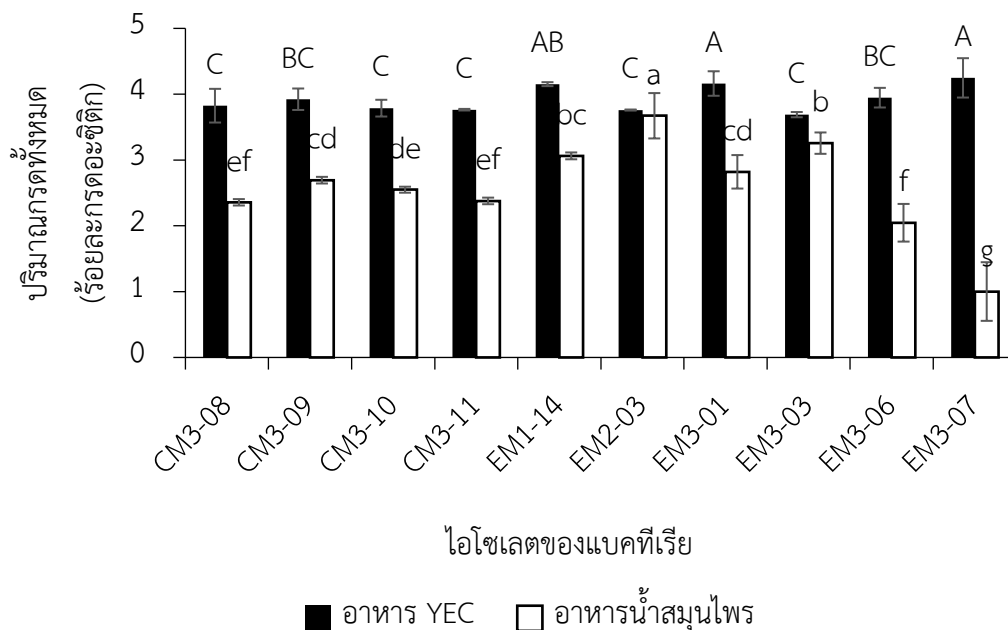
4.3 การแยกและการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียอะซิติกที่คัดแยกได้จากน้ำหมักสมุนไพร

4.3.1 การคัดแยกแบคทีเรียอะซิติกจากน้ำหมักสมุนไพร

ในการคัดแยกแบคทีเรียอะซิติกในน้ำหมักสมุนไพรด้วยอาหาร GYC และ GYEC agar โดยทำการเก็บโคโลนีของเชื้อที่เกิดบริเวณวงใสบนอาหารทั้ง 2 ชนิด จำนวน 120 ไอโซเลตจากแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้ มีเชื้อจำนวน 115 ไอโซเลตที่มีลักษณะเป็นแบคทีเรียรูปท่อน หรือท่อนสั้น ย้อมติดสีแกรมลบ เซลล์มีการจัดเรียงตัวแบบเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์เดี่ยวต่อกันเป็นเส้นสาย โดยสามารถคัดแยกได้จากอาหาร GYC จำนวน 59 ไอโซเลตและ GYEC จำนวน 56 ไอโซเลต มีเชื้อจำนวน 112 ไอโซเลตที่ให้ผลการทดสอบ Oxidase เป็นลบ และ Catalase เป็นบวก ซึ่งลักษณะเหล่านี้เป็นคุณสมบัติของแบคทีเรียอะซิติก

4.3.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

การทดสอบความสามารถในการผลิตกรดของแบคทีเรียอะซิติกที่คัดแยกได้จำนวน 112 ไอโซเลต ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YEC ที่มีเอทานอลร้อยละ 4 โดยปริมาตรเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีแบคทีเรีย 23 ไอโซเลตที่ผลิตกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ได้สูงกว่าร้อยละ 3.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีปริมาณกรดอยู่ในช่วงร้อยละ 3.51 ± 0.07 - 4.25 ± 0.30 ไอโซเลต EM3-07 สามารถผลิตกรดได้สูงสุดร้อยละ 4.25 ± 0.30 ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับไอโซเลต EM1-14 และ EM3-01 ดังรูปที่ 4.6 โดยปริมาณกรดทั้งหมดที่แบคทีเรียไอโซเลต EM3-07 ผลิตได้มีปริมาณสูงกว่าแบคทีเรียอะซิติกที่คัดแยกได้จากไวน์ข้าวของประเทศเกาหลีที่หมักด้วยกรรมวิธีที่บ้าน สามารถผลิตกรดทั้งหมดได้ร้อยละ 3.51 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอาหารเหลวที่มีเอทานอลร้อยละ 4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Lee *et al.*, 2017) แต่มีปริมาณกรดทั้งหมดน้อยกว่า *Acetobacter tropicalis* ที่คัดแยกได้จากส้ม สามารถผลิตกรดทั้งหมดได้ร้อยละ 6.9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Diba *et al.*, 2015) ซึ่งเป็นสถานะเดียวกับที่ใช้ในการทดลองนี้ และจากเชื้อแบคทีเรียอะซิติก 10 ไอโซเลตแรกที่สามารถผลิตกรดได้สูงในอาหารเหลว YEC เมื่อนำมาหมักในน้ำสมุนไพรพบว่าสามารถผลิตกรดอยู่ในช่วงร้อยละ 1.00 ± 0.45 - 3.67 ± 0.34 โดยแบคทีเรียทุกไอโซเลตมีแนวโน้มการผลิตกรดทั้งหมดลดลงเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหาร YEC และพบว่าไอโซเลต EM2-03 สามารถผลิตกรดได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 3.67 ± 0.34 จึงถูกคัดเลือกไปใช้ในการศึกษาต่อไป แสดงดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ของแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอาหาร YEC และ น้ำสมุนไพรม บ่มในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

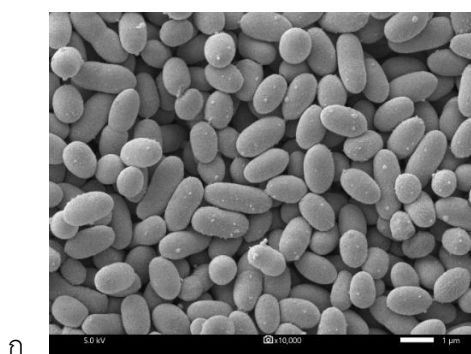
หมายเหตุ ^{ABC} ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณกรด ทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ที่ผลิตได้จากอาหาร YEC ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณกรด ทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ที่ผลิตได้จากน้ำหมักสมุนไพรม ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

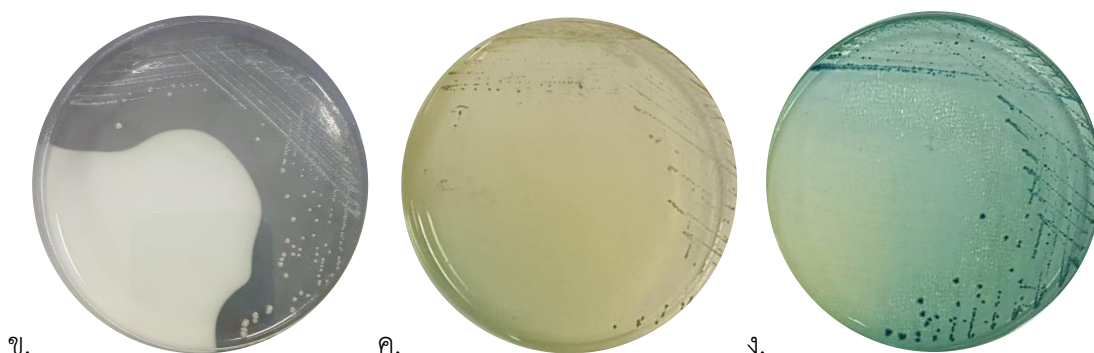
ปริมาณกรดที่ผลิตได้จากไอโซเลต EM2-03 มีปริมาณมากกว่าน้ำส้มสายชูที่หมักจาก มะเขือเทศและมะพริ้ว มีปริมาณกรดร้อยละ 3.53 และ 3.37 ตามลำดับ และมีปริมาณกรดน้อยกว่า น้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผึ้ง เปลือกส้ม และองุ่นที่หมักด้วย *Acetobacter* เป็นเวลา 10 วันมีปริมาณ กรดร้อยละ 5.74 5.37 และ 4.64 ตามลำดับ (Surana *et al.*, 2017) ปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากการ หมักน้ำสมุนไพรมน้อยกว่าในอาหาร YEC อาจเป็นผลมาจากความเป็นกรดของน้ำหมักกล้วยน้ำว่า ที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมัก มีปริมาณกรดทั้งหมดสูงร้อยละ 2.78 ± 0.20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียอะซิติกที่นำมาใช้หมัก และจากการศึกษาของ Zheng *et al.*, (2015) ได้รายงานว่าการเข้มข้นของกรดอะซิติกเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการเจริญของ แบคทีเรียอะซิติก โดยในอาหารที่มีกรดอะซิติกต่ำ (ร้อยละ 1-1.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) กรดอะซิติก จะส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย และเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณกรดอะซิติกสูงขึ้น (ร้อยละ 2.0-4.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) มีผลทำให้แบคทีเรียอะซิติกเจริญช้าลง ช่วง Lag phase ยาวขึ้น ส่งผลให้ การผลิตกรดอะซิติกที่เป็นสารปฐมภูมิ (Primary metabolite) เกิดขึ้นได้ช้า มีผลทำให้ปริมาณกรด ที่ได้ต่ำ สอดคล้องกับการศึกษาของ Kanachanarach *et al.*, (2014) รายงานว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีปริมาณกรดอะซิติกสูงกว่าจะมีผลทำให้ช่วง Lag phase ของ *Acetobacter pasteurianus* ยาวขึ้น

4.3.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียอะซิติก

จากการศึกษาข้างต้นได้คัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลต EM2-03 EM3-01 EM3-03 และ EM3-07 ที่มีความสามารถในการผลิตกรดทั้งหมดได้สูงในอาหาร YEC ที่มีเอทานอลร้อยละ 4 และในน้ำสมุนไพรมาจัดจำแนก การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตมีลักษณะเซลล์เป็นท่อนสั้น ดิคซิสแกรมลบ มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว โคโลนีสีขาว ผิวหน้ามันวาว มีขอบเรียบ และยกตัวแบบ Umbonate ไม่สังเคราะห์แผ่นเซลล์ูโลสในอาหาร HS medium แต่สามารถเกิดปฏิกิริยา Overoxidation กรดที่สร้างขึ้นจะถูกออกซิไดซ์เป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ สังเกตจากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ในอาหาร Carr medium จากสีเขียวเป็นสีเหลืองและจากสีเหลืองกลับมาเป็นสีเขียว ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของแบคทีเรียในจีนัส *Acetobacter* sp. โดยเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลตสามารถผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคส ไซโลส และเอทานอล ออกซิไดซ์อะซิเตรท แต่ไม่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลซูโครส แมนนิทอล อะราบิโนส ฟรุคโตส มอลโตส และกลีเซอรอลได้ แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีดังตารางที่ 4.5 และมีความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ร้อยละ 5 และ 10 โดยปริมาตรดังตารางที่ 4.4



ก.



ข.

ค.

ง.

รูปที่ 4.7 รูปร่างเซลล์ของ *Acetobacter pasteurianus* EM2-03 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า (ก.) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GYC agar (ข.) และการผลการศึกษาการเกิด Overoxidation ethanol บนอาหาร Carr medium ที่ระยะเวลาหมัก 7 วัน (ค.) และ 14 วัน (ง.)

ตารางที่ 4.4 ปริมาณแบคทีเรียอะซิติกที่เจริญในอาหารที่มีเอทานอลร้อยละ 5 และ 10 โดยปริมาตรที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน

ไอโซเลต	ปริมาณแบคทีเรียอะซิติก (Log CFU/mL)			
	เอทานอลร้อยละ 5		เอทานอลร้อยละ 10	
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
EM2-03	7.08±0.021	7.21±0.294	7.14±0.066	7.24±0.112
EM3-01	7.27±0.031	7.02±0.061	7.15±0.051	7.05±0.056
EM3-03	7.11±0.132	7.01±0.106	7.20±0.051	7.21±0.051
EM3-06	7.14±0.036	7.26±0.165	7.17±0.021	7.24±0.056

ตารางที่ 4.5 ผลทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียอะซิติกไอโซเลต EM2-03, EM3-01, EM3-03 และ EM3-06

Biochemical test	Isolate No.				A. <i>pasteurianus</i> ^a
	EM2-03	EM3-01	EM3-03	EM3-07	
Acid produced from					
Glucose	+	+	+	+	+
Ethanol	+	+	+	+	+
Sucrose	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-
Fructose	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	+
Pigment synthesis on GYC medium	-	-	-	-	-
Gram strain	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-

หมายเหตุ +=ผลบวก; -=ผลลบ; V=Variable; n/d=ไม่ได้ทดสอบ

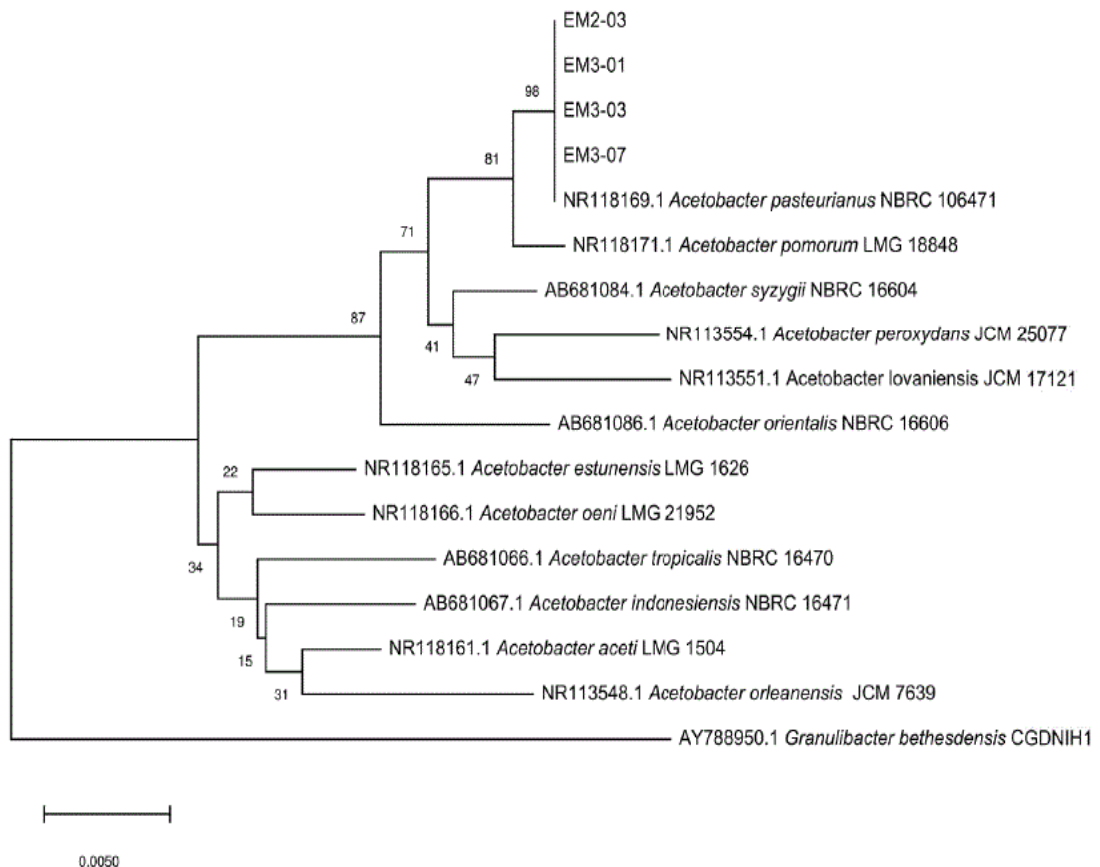
ที่มา: ^a Liu *et al.*, (1996)

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ผลทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียอะซิติกไอโซเลต EM2-03, EM3-01, EM3-03 และ EM3-06

Biochemical test	Isolate No.				A. <i>pasteurianus</i> ^a
	EM2-03	EM3-01	EM3-03	EM3-07	
Overoxidation of ethanol	+	+	+	+	+
Oxidization of Sodium acetate	+	+	+	+	+
Ethanol tolerant					
Growth at 5% Ethanol	+	+	+	+	n/d
Growth at 10% Ethanol	+	+	+	+	n/d

หมายเหตุ +=ผลบวก; -=ผลลบ; V=Variable; n/d=ไม่ได้ทดสอบ

ที่มา: ^a Liu *et al.*, (1996)

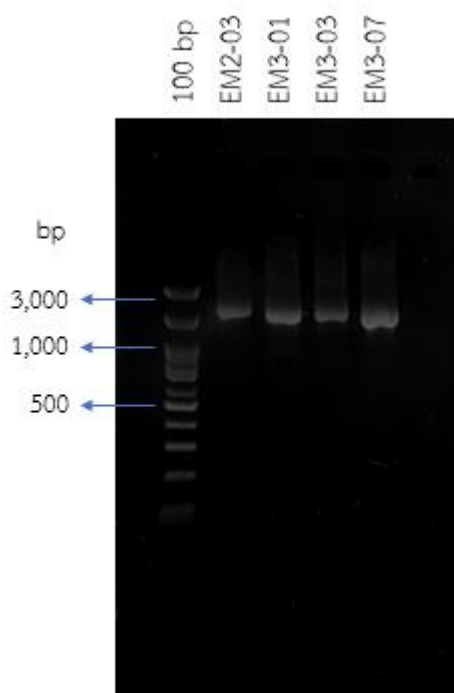


รูปที่ 4.8 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียอะซิติก 4 ไอโซเลต ได้แก่ EM2-03, EM3-01, EM3-03 และ EM3-07 ที่สร้างด้วยวิธี Neighbor-Joining ด้วยโปรแกรม MEGAX

ตารางที่ 4.6 การจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติก 4 ไอโซเลตบริเวณ 16S rDNA

ไอโซเลต	ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับฐานข้อมูล NCBI	Per. Ident	Accession Number ^a
EM2-03	<i>Acetobacter pasteurianus</i> LMG 1262	100.0%	NR118169.1
EM3-01	<i>Acetobacter pasteurianus</i> LMG 1262	100.0%	NR118169.1
EM3-03	<i>Acetobacter pasteurianus</i> LMG 1262	100.0%	NR118169.1
EM3-07	<i>Acetobacter pasteurianus</i> strain DI10SB1	99.90%	KY287771.1

หมายเหตุ ^aAccession number บริเวณ 16S rRNA



รูปที่ 4.9 Gel electrophoresis ของ PCR product บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลต EM2-03, EM3-01, EM3-03 และ EM3-07

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต มาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA จากนั้นวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTN พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตมีความคล้ายคลึงกับ *Acetobacter pasteurianus* strain LMG 1262 โดยมีความเหมือนกันอยู่ในช่วงร้อยละ 99.90-100 ดังตารางที่ 4.6 ในการเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 4 ไอโซเลต กับแบคทีเรียอะซิติกในจีนัส *Acetobacter* ทั้ง 12 สปีชีส์ โดยใช้ *Granulibacter bethesdensis* ที่เป็นแบคทีเรียอะซิติกเป็น Outgroup โดยแสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตในรูปที่ 4.8 พบว่าที่ระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.0050 กับแบคทีเรียในจีนัส *Acetobacter* และสามารถแยกความแตกต่างกันของพันธุกรรมได้อย่างชัดเจน โดยมีความใกล้เคียงกับ *A. pasteurianus* มากที่สุด มีค่า Bootstrap value เท่ากับ 100% และมีแบคทีเรีย *A. pomorum* เป็น Sister taxa มีค่า Bootstrap value เท่ากับ 81% จากแผนภาพวิวัฒนาการในรูปที่ 4.8 จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียในจีนัส *Acetobacter*

ถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม *A. pasteurianus* และกลุ่ม *A. aceti* โดยกลุ่ม *A. pasteurianus* ประกอบด้วยสมาชิกได้แก่ *A. pasteurianus*, *A. pomorum*, *A. syzygii*, *A. peroxydans*, *A. lovaniensis* และ *A. orientalis* สำหรับกลุ่ม *A. aceti* มีสมาชิกได้แก่ *A. aceti*, *A. orleanensis*, *A. indonesiensis*, *A. tropicalis*, *A. oeni*, และ *A. estunensis* โดยแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มมีลักษณะที่แตกต่างกันคือ แบคทีเรียในกลุ่ม *A. aceti* สามารถผลิตกรดได้จากเมทานอล มีการออกซิไดซ์น้ำตาลกลูโคสให้กลายเป็น 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconic acid และ 2,5-diketo-D-gluconic acid ที่เป็นสารตั้งต้นที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์วิตามินซีและตัวทำละลายในอุตสาหกรรม รวมถึงการผลิต Dihydroxyacetone จากกลีเซอรอล ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้จะไม่พบในแบคทีเรียกลุ่ม *A. pasteurianus* (Yamada and Yukphan, 2008)

แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 4 ไอโซเลตถูกจัดให้เป็นสมาชิกในกลุ่มที่ 1 หรือกลุ่ม *A. pasteurianus* โดยแบคทีเรีย *A. pasteurianus* ทั้ง 4 ไอโซเลตที่มี *A. pomorum* เป็น Sister taxa มีลักษณะโคโลนีและรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใกล้เคียงกันคือ มีโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว-ครีม รูปร่างเซลล์เป็นท่อน ไม่พบโครงสร้าง Flagella และให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีที่ใกล้เคียงกันคือ สามารถเกิด Overoxidation of ethanol ซึ่งเป็นคุณสมบัติเด่นของเชื้อในจีนัส *Acetobacter* มีความสามารถผลิต D-Gluconic acid แต่ไม่สังเคราะห์ 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconic acid และ 2,5-diketo-D-gluconic acid จากน้ำตาลกลูโคส ไม่สร้างแผ่นเซลล์และสารสีละลายน้ำ มี Ubiquinone ชนิด Q9 เหมือนกัน แต่มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและปริมาณ %G+C content ที่แตกต่างกันเล็กน้อย กล่าวคือ *A. pasteurianus* สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีเอทานอลร้อยละ 10 มีปริมาณ %G+C content ใน DNA เท่ากับ 60.5%mol สำหรับ *A. pomorum* ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีเอทานอลร้อยละ 10 ได้ แต่สามารถเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 30 และมีปริมาณ %G+C content เท่ากับ 50.5%mol

เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลของผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *A. pasteurianus* กับ *Granulibacter bethesdensis* ที่เป็น Outgroup พบว่ามี *G. bethesdensis* บางสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นเชื้อก่อโรค (Chronic granulomatous disease) โดยมีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ไม่พบโครงสร้างที่เป็น Flagella และมีรูปร่างโคโลนีกลม ขอบเรียบ โดยมีรายงานว่าสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกับ *A. pasteurianus* แต่มีความแตกต่างคือ *G. bethesdensis* สามารถสังเคราะห์สารสีเหลือง ทำให้โคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง GYC มีสีเหลือง ไม่พบความสามารถในการ Overoxidation of ethanol และการผลิตกรดจากน้ำตาล Xylose มี Ubiquinone ชนิด Q10 ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้แบคทีเรีย *A. pasteurianus* และ *G. bethesdensis* มีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจน นอกจากนี้ *G. bethesdensis* สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคสและกลีเซอรอลได้เล็กน้อย และพบการเจริญในอาหาร Frateur modified Hoyer medium ที่มีน้ำตาลกลูโคสและแอมโมเนียเป็นองค์ประกอบ (Lisdiyanti *et al.*, 2001; Greenberg *et al.*, 2006; Mamlouk and Gullo, 2013; Pitiwittayakul *et al.*, 2016)

Acetobacter pasteurianus เป็นแบคทีเรียรูปท่อน ติดสีแกรมลบ มีการจัดเรียงตัวแบบเซลล์เดี่ยวหรือคู่ เป็นสมาชิกในไฟลัม Alpha-proteobacteria แฟมิลี *Acetobacteraceae* แบคทีเรียในสปีชีส์นี้ส่วนใหญ่จะให้ผลการทดสอบ Ketogenesis จากกลูโคสเป็นลบ สามารถผลิตกรดอะซิติกได้จากแอลกอฮอล์ เช่น Ethanol Propanol และ Butanol และมีการใช้น้ำตาล D-mannitol เป็น growth factor โดยมีรายงานว่า *A. pasteurianus* สามารถคัดแยกได้จากอาหารหมักดองได้แก่ น้ำส้มสายชู ไวน์ สาโท น้ำหมักวุ้นมะพร้าว มันสำปะหลัง และข้าวหมาก แต่ไม่สามารถคัดแยกได้จากดอกไม้และผลไม้จากตัวอย่างในประเทศไทย อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ (Lisdiyanti *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังสามารถคัดแยกได้จากผลไม้เช่น องุ่นแดง น้ำมะพร้าว โกโก้ เป็นต้น (Arifuzzaman *et al.*, 2014; Perumpuli *et al.*, 2014) โดยปริมาณกรดที่ *A. pasteurianus* EM2-03 ผลิตได้ในอาหารน้ำสมุนไพรร้อยละ 3.67±0.34 มีปริมาณสูงกว่าน้ำส้มสายชูจากกล้วยนาที่หมักด้วย *A. pasteurianus* ในสถานะนิ่งเป็นเวลา 15 วัน ซึ่งมีปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 2.45 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Boonsupa *et al.*, 2019b) *A. pasteurianus* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ค่า pH ระหว่าง 5.0-6.5 และในอาหารที่มี pH ต่ำ 3.0-4.0 ที่ระดับความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 5 และน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 3 สามารถผลิตกรดได้สูงร้อยละ 7.0-7.7 ในระยะเวลาหมัก 6 วัน (Lee *et al.*, 2015)

4.4 การศึกษาความสามารถของยีสต์และแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการหมักน้ำสมุนไพรร้อย

จากการหมักน้ำสมุนไพรร้อยในโหลแก้วขนาด 600 มิลลิลิตร ในสถานะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และหยุดกระบวนการหมักเมื่อมีกรดทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรด้วยการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที ซึ่งปริมาณกรดนี้มีความใกล้เคียงกับปริมาณกรดในน้ำหมักสมุนไพรร้อยทางการค้าที่หมักนาน 6 เดือน ในการศึกษานี้ได้เปรียบเทียบกระบวนการหมัก 2 รูปแบบคือ กระบวนการหมักพร้อมขั้นตอนเดียว (One-stage fermentation) และกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอน (Two-stage fermentation)

4.4.1 ผลการศึกษากระบวนการหมักน้ำสมุนไพรร้อยด้วยกระบวนการหมักพร้อมขั้นตอนเดียว (One-stage fermentation)

การหมักน้ำสมุนไพรร้อยแบบพร้อมขั้นตอนเดียว โดยเติมหัวเชื้อผสมระหว่าง *Schizosaccharomyces pombe* YM1-19 และ *Acetobacter pasteurianus* EM2-03 ที่คัดแยกได้ ร้อยละ 20 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (OD₆₀₀=0.5) ลงในน้ำสมุนไพรร้อยพร้อมกัน ปิดฝาภาชนะหมักให้สนิทด้วยผ้าขาวบาง หมักนาน 32 วัน พบว่าแอลกอฮอล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 6 วันแรกของการหมัก และมีปริมาณสูงสุดร้อยละ 11.63±0.45 โดยปริมาตรในวันที่ 6 จากนั้นปริมาณแอลกอฮอล์ลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ในวันที่ 32 ของการหมักเท่ากับร้อยละ 0.23±0.16 โดยปริมาตร ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลทั้งหมดที่มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วจาก 771.14±14.39 กรัมต่อลิตรจนมีค่า 56.95±2.50 กรัมต่อลิตรในวันที่ 6 ของการหมัก

หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเล็กน้อยจนมีค่าเท่ากับ 45.83 ± 2.15 กรัมต่อลิตรในวันสุดท้ายของการหมักสำหรับกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ในช่วงแรกของการหมักมีปริมาณค่อนข้างคงที่อยู่ในช่วงร้อยละ 1.27 ± 0.03 - 1.45 ± 0.03 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงในวันที่ 18 และมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมีปริมาณสูงสุดเท่ากับร้อยละ 5.12 ± 0.16 ในสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 32) สำหรับค่า pH มีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการหมักแสดงดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.10 จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า *S. pombe* YM1-19 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ในสภาวะที่มีอากาศ ซึ่งโดยปกติแล้วกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์จะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนหรือมีออกซิเจนต่ำ ทั้งนี้เป็นผลมาจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงในน้ำหมักสมุนไพรมะขาม โดยมียางงานว่าในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงมีผลทำให้ความสามารถในการหายใจระดับเซลล์ของยีสต์ในสภาวะที่มีอากาศสูญเสียไปหรือเกิด Crabtree effect ส่งผลให้ยีสต์สามารถหมักน้ำตาลในสภาวะที่มีอากาศได้ (Pfeiffer *et al.*, 2014; Solieri *et al.*, 2009)

การเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์พบว่า *S. pombe* มีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 6.34 ± 0.03 Log CFU/mL เป็น 8.93 ± 0.03 Log CFU/mL ในวันที่ 4 ของการหมัก ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นและน้ำตาลทั้งหมดที่ลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นยีสต์มีการลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 3.38 ± 0.09 Log CFU/mL ในวันที่ 32 อาจเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของกรดอะซิติกในน้ำหมักสมุนไพรมะขาม (Lee *et al.*, 2015) ส่วน *A. pasteurianus* มีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 6.91 ± 0.09 Log CFU/mL และมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 8.42 ± 0.61 Log CFU/mL จากนั้นเชื้อมีจำนวนลดลงและลดต่ำสุดในวันที่ 10 และ 12 เหลือ 2.73 ± 0.12 และ 1.84 ± 0.16 Log CFU/mL หลังจากนั้นแบคทีเรียอะซิติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นเท่ากับ 5.32 ± 0.04 Log CFU/mL ในวันสุดท้ายของการหมักแสดงดังรูปที่ 4.11 ที่เป็นเช่นนี้อาจมีผลมาจากในวันที่ 6 ของการหมักปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (ร้อยละ 11.63 ± 0.45 โดยปริมาตร) โดยความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่สูงขึ้นจะส่งผลให้อัตราการเจริญของแบคทีเรียอะซิติกต่ำลง แอลกอฮอล์จะแพร่เข้าสู่ไซโตพลาสซึมของแบคทีเรียทำให้เกิด Toxic intercellular environment กับระบบเมแทบอลิซึม มีผลให้จำนวนของแบคทีเรียอะซิติกลดลง และที่ระดับความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงกว่าร้อยละ 8 มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase, ADH) ที่เป็นเอนไซม์ควบคุม (Limiting enzyme) การออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ให้เป็นอะซิโธลดีไฮด์ ส่งผลให้แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกได้ต่ำ และมีรายงานว่าแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 12 มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรีย *A. pasteurianus* หยุดการเจริญ (Chen *et al.*, 2017)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ระหว่างกระบวนการหมักร่วมกันขั้นตอนเดียว พบว่าสารประกอบฟีนอลิกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดการหมัก โดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของการหมักจาก 470.84 ± 30.06 μg GAE/mL เป็น $1,424.85 \pm 42.36$ μg GAE/mL ซึ่งเกิดจากการแพร่ของสารต่างๆจากสมุนไพรมะขามที่ใช้เป็นวัตถุดิบผ่านกระบวนการหมัก (Maceration) จากนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตลอดการหมักและมี

ปริมาณสูงสุดเท่ากับ $1,954.54 \pm 70.68$ $\mu\text{g GAE/mL}$ ในวันสุดท้ายของการหมัก Jayabalan และคณะ (2014) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา (Kombucha) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักที่ใช้ชาดำหวานมาเป็นวัตถุดิบ พบว่าน้ำชาที่ผ่านกระบวนการหมักมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดอาจถูกย่อยเป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลเล็กด้วยเอนไซม์ที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียและยีสต์ เช่น เอนไซม์ Tannase α -Galactosidase และ Phytase เป็นต้น (Kaewkod *et al.*, 2019) โดยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้จะมีรายงานว่าสามารถย่อยโครงสร้างของสารประกอบ Hydroxycinnamic และ Proanthocyanidins ได้ Quercetin 3-O rutinoside, Luteolin และ Trans-resveratrol เป็นผลิตภัณฑ์ (Durnas *et al.*, 2007) นอกจากนี้ Arbenz and Avérus, (2015) ได้รายงานว่าสารแทนนิน (Tannin) ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม Polyphenol และสามารถพบได้ในมะตูม พริกไทยดำ และกล้วยน้ำว้า สามารถเกิดการแตกตัวอย่างอิสระในสภาวะที่เป็นกรดสูงได้ Catechin และ Anthocyanidins เป็นผลิตภัณฑ์ (Salamah *et al.*, 2019) โดย Quercetin 3-O rutinoside, Luteolin และ Trans-resveratrol รวมถึง Catechin และ Anthocyanidins ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก ด้วยเหตุนี้จึงเป็นสาเหตุให้สารประกอบฟีนอลิกมีปริมาณเพิ่มขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก สำหรับการเปลี่ยนแปลงของฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มีการเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 89.83 ± 4.41 เป็นร้อยละ 100.34 ± 0.31 ในวันที่ 6 และมีแนวโน้มคงที่ตลอดการหมัก สอดคล้องกับค่า IC_{50} ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.171 ± 0.005 $\mu\text{L/mL}$ ในวันแรกของการหมัก และมีการลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 เท่ากับ 0.034 ± 0.003 $\mu\text{L/mL}$ และในวันสุดท้ายของการหมักมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.017 ± 0.001 $\mu\text{L/mL}$ แสดงในตารางที่ 4.8. และรูปที่ 4.12

ตารางที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักร่วมขึ้นขั้นตอนเดียวด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน

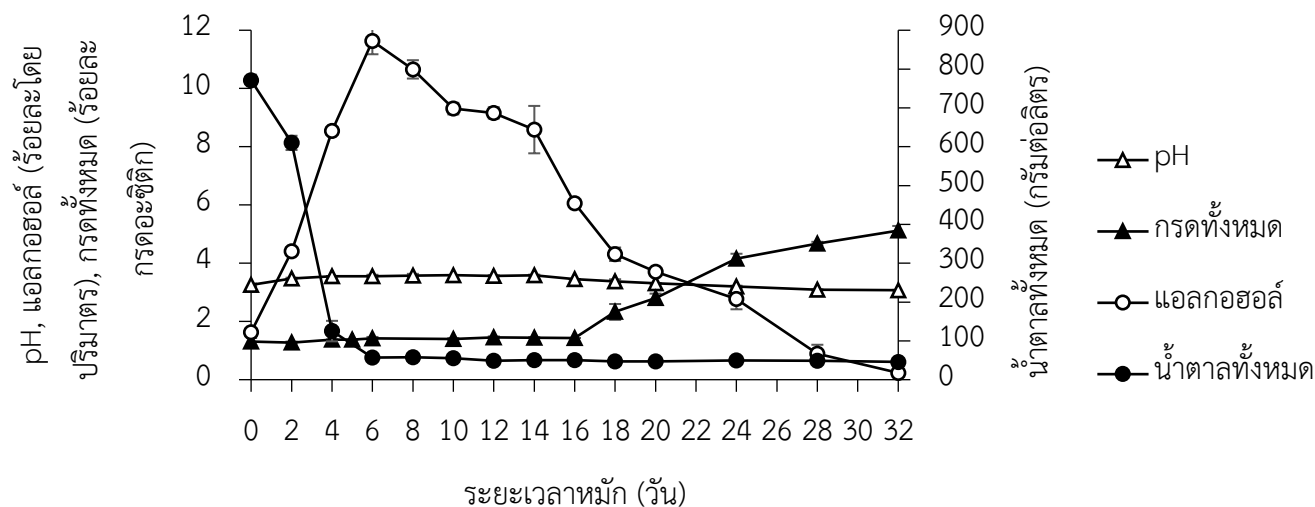
ระยะเวลาหมัก (วัน)	การเปลี่ยนแปลงทางเคมี				การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์	
	pH	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	แอลกอฮอล์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	กรดทั้งหมด (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	<i>S. pombe</i> (Log CFU/mL)	<i>A. pasteurianus</i> (Log CFU/mL)
0	3.26±0.04 ^d	771.14±14.39 ^a	1.62±0.06 ⁱ	1.31±0.12 ^f	6.34±0.03 ^f	6.91±0.09 ^d
2	3.48±0.02 ^b	609.88±18.35 ^b	4.41±0.13 ^f	1.27±0.03 ^f	8.36±0.17 ^b	6.72±0.20 ^{de}
4	3.55±0.01 ^a	125.15±26.42 ^c	8.54±0.11 ^d	1.37±0.00 ^f	8.93±0.03 ^a	8.42±0.61 ^a
6	3.56±0.05 ^a	56.95±2.50 ^d	11.63±0.45 ^a	1.37±0.00 ^f	8.01±0.39 ^c	7.47±0.27 ^c
8	3.58±0.06 ^a	57.41±5.26 ^d	10.66±0.32 ^b	1.42±0.05 ^f	7.38±0.10 ^d	3.61±0.18 ^g
10	3.59±0.00 ^a	55.48±5.03 ^d	9.31±0.20 ^c	1.39±0.03 ^f	6.90±0.33 ^e	2.73±0.12 ^h
12	3.57±0.02 ^a	48.97±3.28 ^d	9.16±0.19 ^c	1.45±0.03 ^f	6.39±0.10 ^f	1.84±0.16 ⁱ
14	3.59±0.02 ^a	50.08±2.94 ^d	8.59±0.81 ^d	1.44±0.02 ^f	5.36±0.09 ^g	3.70±0.42 ^g
16	3.45±0.00 ^b	50.48±0.50 ^d	6.06±0.02 ^e	1.43±0.00 ^f	5.18±0.02 ^{gh}	5.43±0.30 ^f
18	3.37±0.08 ^c	46.68±1.84 ^d	4.31±0.23 ^f	2.33±0.57 ^e	5.03±0.02 ^h	6.48±0.31 ^{de}
20	3.31±0.01 ^d	47.22±4.98 ^d	3.71±0.12 ^g	2.80±0.16 ^d	4.72±0.02 ⁱ	8.38±0.05 ^a
24	3.20±0.03 ^e	49.88±0.12 ^d	2.77±0.35 ^h	4.16±0.17 ^c	3.89±0.20 ^j	7.93±0.18 ^b
28	3.09±0.02 ^f	48.75±1.69 ^d	0.89±0.31 ^j	4.68±0.06 ^b	3.49±0.35 ^k	6.43±0.09 ^e

หมายเหตุ ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05)

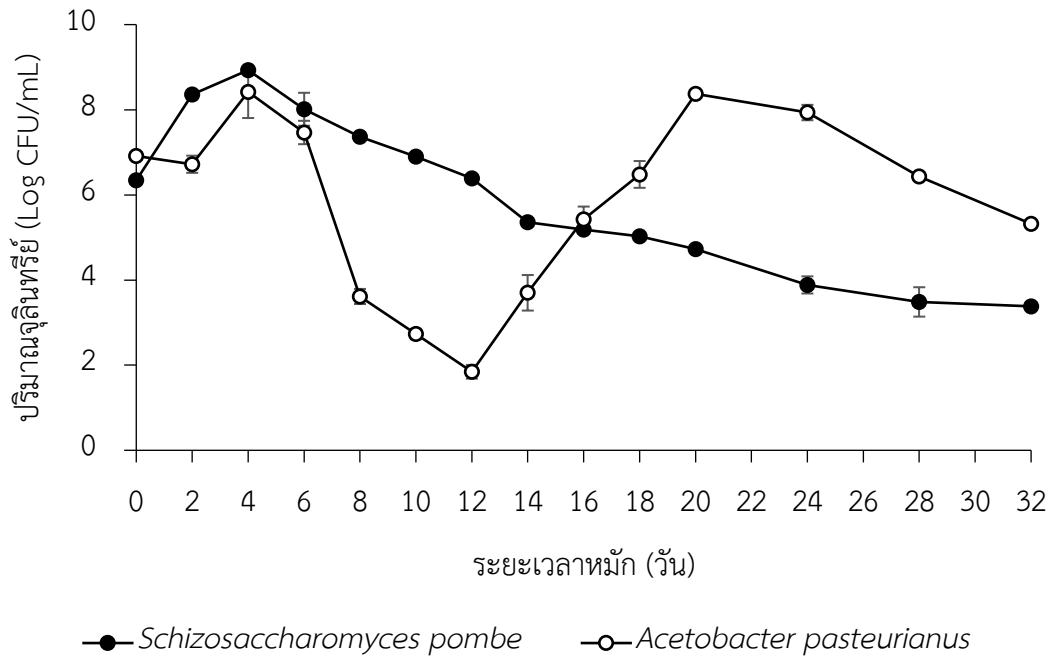
ตารางที่ 4.7 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักร่วมขึ้นตอนเดียวด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	การเปลี่ยนแปลงทางเคมี				การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์	
	pH	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	แอลกอฮอล์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	กรดทั้งหมด (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	<i>S. pombe</i> (Log CFU/mL)	<i>A. pasteurianus</i> (Log CFU/mL)
32	3.07±0.01 ^f	45.83±2.15 ^d	0.23±0.16 ^k	5.12±0.16 ^a	3.38±0.09 ^k	5.32±0.04 ^f

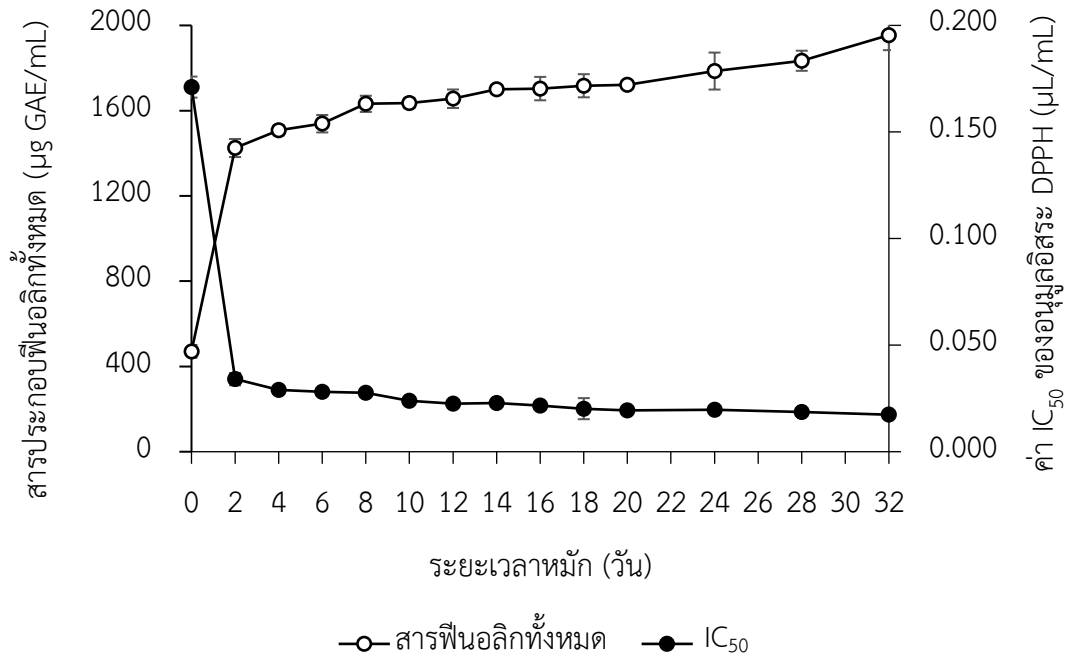
หมายเหตุ ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างกระบวนการหมักร่วมขึ้นตอนเดียวด้วยเชื้อ *S. pombe* YM1-19 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน



รูปที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักร่วมขึ้นตอนเดียวด้วยเชื้อ *S. pombe* YM1-19 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน



รูปที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและค่า IC₅₀ ของอนุมูลอิสระ DPPH ระหว่างการหมักร่วมขึ้นตอนเดียวด้วยเชื้อ *S. pombe* YM1-19 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง นาน 32 วัน

ตารางที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, IC₅₀ ของอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวด้วยเชื้อ *S. pombe* YM1-19 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสถานะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ร้อยละ)	IC ₅₀ ของ DPPH (μL/mL)	สารฟีนอลิกทั้งหมด (μg GAE/mL)
0	89.83±4.41 ^c	0.171±0.005 ^g	470.84±30.06 ^h
2	94.56±0.71 ^b	0.034±0.003 ^f	1424.85±42.36 ^g
4	95.90±3.73 ^b	0.029±0.002 ^e	1,507.96±23.73 ^f
6	100.34±0.31 ^a	0.028±0.001 ^e	1,538.80±40.86 ^f
8	100.06±0.61 ^a	0.028±0.001 ^{de}	1,632.08±37.99 ^e
10	100.19±0.12 ^a	0.024±0.001 ^{cd}	1,635.97±24.04 ^{de}
12	100.18±0.16 ^a	0.023±0.001 ^{bc}	1,655.99±43.32 ^{de}
14	99.81±0.32 ^a	0.023±0.000 ^{bc}	1,699.71±20.04 ^{cde}
16	99.95±0.37 ^a	0.022±0.001 ^{abc}	1,703.54±54.90 ^{cde}
18	99.98±0.11 ^a	0.020±0.005 ^{abc}	1,716.89±54.27 ^{cde}
20	100.03±1.01 ^a	0.019±0.002 ^{ab}	1,721.77±18.99 ^{cd}
24	100.06±0.06 ^a	0.020±0.001 ^{ab}	1,785.82±86.78 ^{b,c}
28	100.02±0.17 ^a	0.019±0.001 ^{ab}	1,834.10±47.15 ^b
32	100.05±0.11 ^a	0.017±0.001 ^a	1,954.54±70.68 ^a

หมายเหตุ ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05)

4.4.2 การศึกษากระบวนการหมักน้ำสุมไพรด้วยกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอน (Two-stage fermentation)

กระบวนการหมักแบบแยกเป็นการหมักสองขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกเป็นการหมักเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ในสภาพไร้อากาศ (Alcoholic fermentation) อาศัยการทำงานของยีสต์ และขั้นตอนที่สองเป็นการเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติกในสภาวะมีอากาศ (Acetous fermentation) โดยอาศัยการทำงานของแบคทีเรียอะซิติก พบว่าในช่วงแรกของการหมักภายหลังการเติมยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* YM1-19 ปริมาณแอลกอฮอล์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีปริมาณสูงสุดร้อยละ 6.18±0.13 โดยปริมาตรในวันที่ 4 ของการหมัก ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ลดลงจาก 724.64±11.38 กรัมต่อลิตรเหลือ 432.33±7.31 กรัมต่อลิตร และยีสต์

เพิ่มปริมาณจาก 6.28 ± 0.01 Log CFU/mL เป็น 8.98 ± 0.09 Log CFU/mL ในวันที่ 4 ของการหมัก ทำการหยุดกระบวนการหมักของยีสต์ด้วยการพลาสมาเจียร์โรส่น้ำสมุนไพรหมักที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter pasteurianus* EM2-03 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร หมักต่อในสภาวะนิ่งในที่มืดโดยปิดฝาภาชนะด้วยผ้าขาวบาง ในช่วงนี้เป็นขั้นตอนของการผลิตกรดอะซิติก ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในช่วงวันที่ 8-14 ของการหมักหลังจากนั้นปริมาณกรดทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมัก โดยมีปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 4.91 ± 0.15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในวันที่ 22 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการหมัก สำหรับปริมาณเอทานอลจะลดลงอย่างรวดเร็วเหลือร้อยละ 0.30 ± 0.06 โดยปริมาตรในวันสุดท้ายของการหมัก ทั้งนี้อาจเกิดจากแบคทีเรียอะซิติกออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก สำหรับแบคทีเรียอะซิติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 7.08 ± 0.10 Log CFU/mL เป็น 8.40 ± 0.15 Log CFU/mL ในช่วงแรกของการหมัก (4-8 วัน) หลังจากนั้นปริมาณแบคทีเรียอะซิติกจะลดลง การลดลงของแบคทีเรียอะซิติกในช่วงท้ายของการหมัก (วันที่ 14-22) มีความสัมพันธ์กับกรดอะซิติกที่เพิ่มขึ้น จากการศึกษาของ Lee *et al.*, (2015) พบว่า *A. pasteurianus* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีกรดอะซิติกเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 3 โดยปริมาตร และเมื่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับร้อยละ 5 และ 7 โดยปริมาตร จะมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอะซิติก ซึ่งจากการทดลองนี้ในช่วงวันที่ 14-22 ปริมาณกรดอะซิติกมีอยู่ในช่วง 3.78 ± 0.07 - 4.91 ± 0.15 จึงอาจส่งผลให้เชื้อเจริญได้น้อยลงจึงมีปริมาณลดลง สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีการลดปริมาณลงเล็กน้อยจาก 423.33 ± 7.31 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 เหลือ 396.22 ± 8.88 กรัมต่อลิตร ในวันสุดท้ายของการหมัก ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียอะซิติกสามารถใช้แอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ดีกว่าการใช้น้ำตาล (ธนขวัญ, 2553) และจากการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ข้างต้นพบว่า *A. pasteurianus* EM2-03 ไม่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลซูโครสได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Arifuzzaman *et al.*, (2014) และ Wu *et al.*, (2010) ได้รายงานไว้ว่า *A. pasteurianus* ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและสารตั้งต้นในการผลิตกรดได้ แต่สามารถใช้และผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคส (Liu *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2015) ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีแนวโน้มลดปริมาณลงเล็กน้อย สำหรับค่า pH ของน้ำหมักมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย จาก 3.23 ± 0.01 เป็น 3.04 ± 0.04 ในวันสุดท้ายของการหมักแสดงดังตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.13-4.14

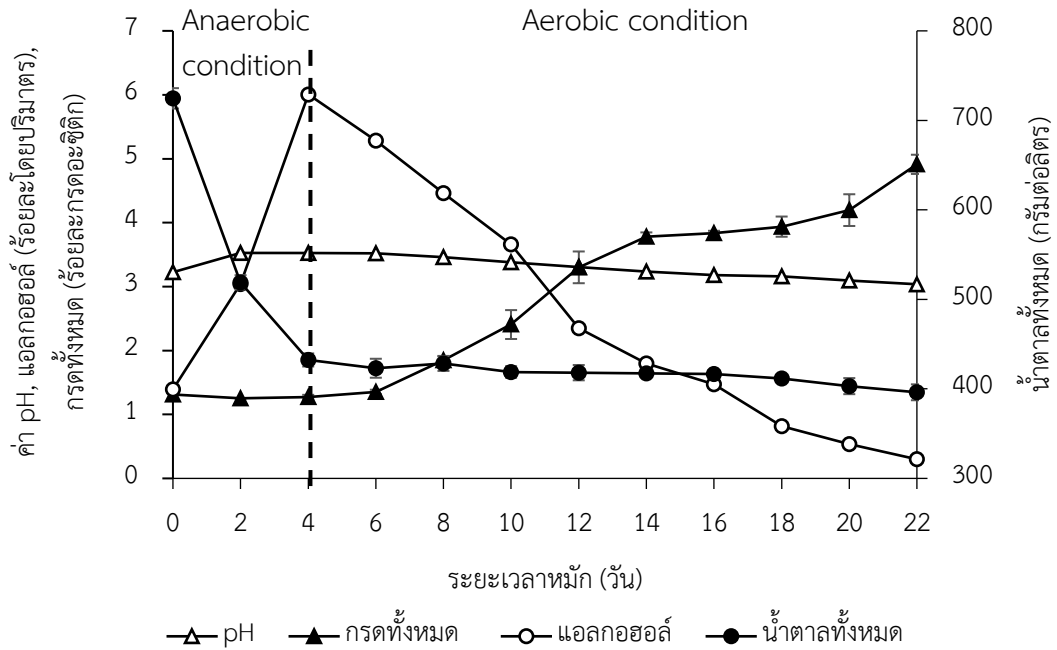
การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตลอดการหมัก พบว่าในวันสุดท้ายของการหมักมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก $1,908.38 \pm 38.75$ μg GAE/mL สำหรับค่า IC_{50} ของ DPPH พบว่ามีค่าลดลงตลอดการหมักจาก 0.102 ± 0.007 μg GAE/mL เหลือ 0.017 ± 0.001 μg GAE/mL แสดงดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.15 จากการศึกษากระบวนการหมักเครื่องดื่มสมุนไพรลูกแอปเปิ้ลด้วยการหมักแยกสองขั้นตอนก่อนหน้านี้ (พรณภัส และพรณภา, 2561) โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 และแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* TISTR

354 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักกับผลการศึกษา^{นี้} พบว่าการใช้ *S. pombe* YM1-19 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ที่คัดแยกได้ในการหมักมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. aceti* TISTR 354 ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ทางการค้า เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาการหมัก แอลกอฮอล์ของยีสต์เพื่อให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ในช่วงร้อยละ 5.0-6.0 พบว่าการใช้ยีสต์ *S. pombe* YM1-19 ที่คัดแยกได้สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 6.18 ± 0.13 โดยปริมาตรในวันที่ 4 ซึ่งเร็วกว่ายีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 5.62 ± 0.04 โดยปริมาตรในวันที่ 5 ของการหมัก สำหรับการหมักกรดอะซิติกพบว่าแบคทีเรีย *A. aceti* TISTR 354 และ *A. pasteurianus* EM2-03 มีความสามารถในการผลิตกรดทั้งหมดใกล้เคียงกันเท่ากับร้อยละ 3.54 ± 0.02 และ 3.89 ± 0.069 ในวันที่ 14 ตามลำดับ สำหรับปริมาณของแข็งทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในช่วงของการหมักแอลกอฮอล์จาก 16.90 ± 0.06 องศาบริกซ์เหลือ 14.20 ± 0.15 องศาบริกซ์ และมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในช่วงของการหมักกรด ซึ่งมีความใกล้เคียงกับการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลทั้งหมดในการศึกษา^{นี้}

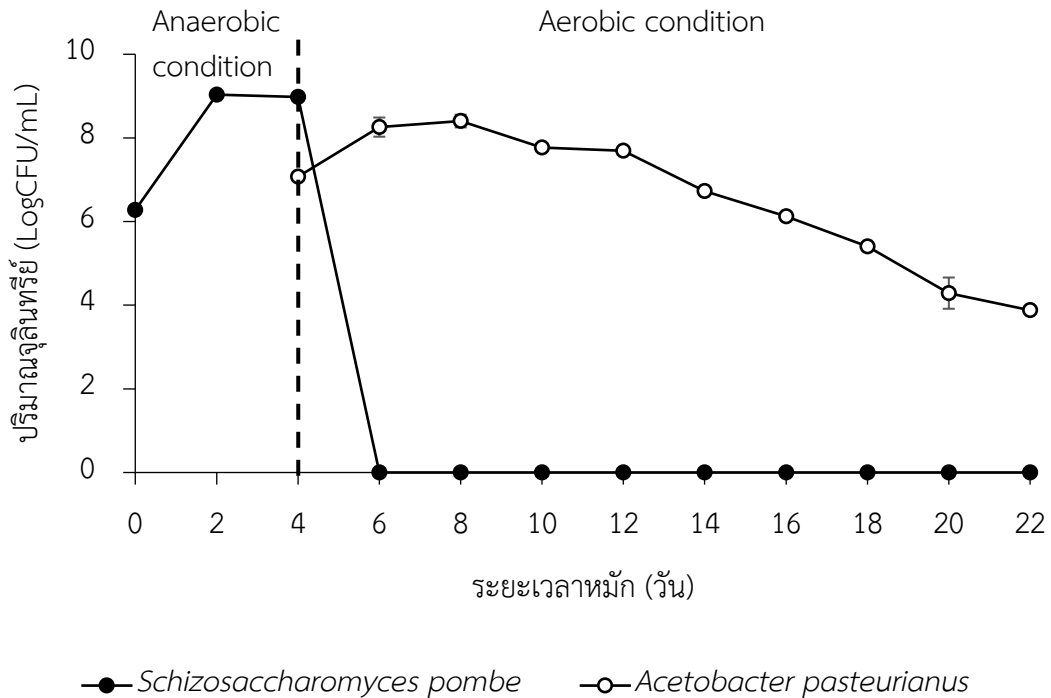
ตารางที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนด้วยเชื้อ *S. pombe* YM1-19 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	การเปลี่ยนแปลงทางเคมี				การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์	
	pH	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	แอลกอฮอล์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	กรดทั้งหมด (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	<i>S. pombe</i> (Log CFU/mL)	<i>A. pasteurianus</i> (Log CFU/mL)
0	3.23±0.01 ^e	724.64±11.38 ^a	1.39±0.08 ^h	1.31±0.00 ^f	6.28±0.01 ^c	-
2	3.53±0.01 ^a	519.06±7.99 ^b	3.04±0.03 ^e	1.25±0.00 ^f	9.00±0.03 ^a	-
4	3.52±0.02 ^a	432.33±7.31 ^c	6.18±0.13 ^a	1.27±0.03 ^f	8.98±0.09 ^b	7.08±0.10 ^c
6	3.52±0.01 ^a	423.07±10.60 ^{cde}	5.28±0.234 ^b	1.35±0.03 ^f	-	8.26±0.23 ^a
8	3.46±0.01 ^b	428.47±8.37 ^{cd}	4.46±0.18 ^c	1.85±0.06 ^e	-	8.40±0.15 ^a
10	3.38±0.00 ^c	418.90±6.43 ^{cde}	3.66±0.11 ^d	2.41±0.23 ^d	-	7.77±0.06 ^b
12	3.30±0.01 ^d	418.13±8.54 ^{cde}	2.35±0.15 ^f	3.30±0.25 ^c	-	7.69±0.02 ^b
14	3.24±0.02 ^a	417.36±2.06 ^{de}	1.80±0.06 ^g	3.78±0.07 ^b	-	6.73±0.09 ^c
16	3.18±0.03 ^f	416.67±3.82 ^{def}	1.47±0.19 ^h	3.84±0.03 ^b	-	6.12±0.10 ^d
18	3.16±0.01 ^f	411.50±2.91 ^{ef}	0.82±0.20 ⁱ	3.94±0.16 ^b	-	5.40±0.09 ^e
20	3.09±0.02 ^g	403.09 ^{fg} ±8.97 ^{fg}	0.54±0.19 ^j	4.20±0.25 ^b	-	4.29±0.37 ^f
22	3.04±0.04 ^h	396.22±8.88 ^g	0.30±0.06 ^j	4.91±0.15 ^a	-	3.88±0.09 ^g

หมายเหตุ ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05)



รูปที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนด้วยเชื้อ *S. pombe* YM1-19 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน

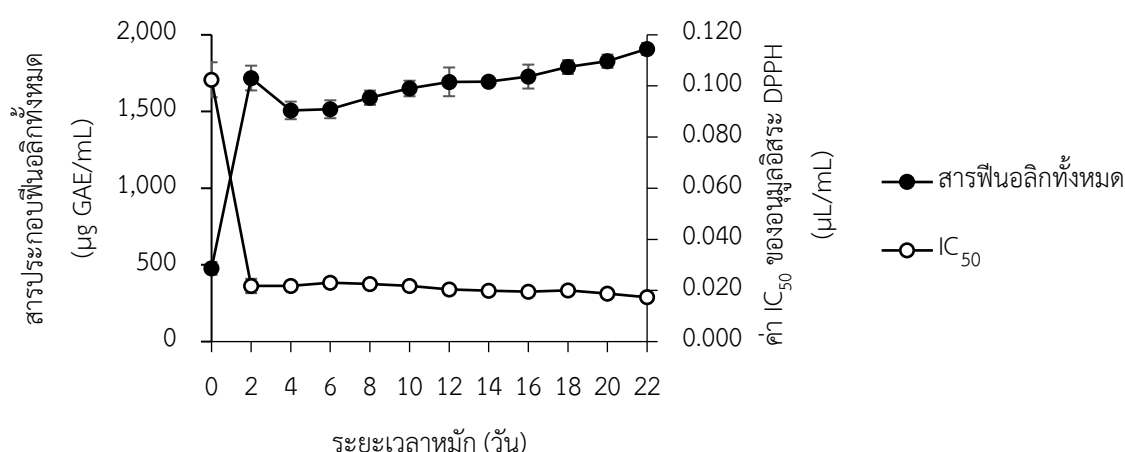


รูปที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนด้วยเชื้อ *S. pombe* YM1-19 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน

ตารางที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, IC₅₀ ของอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนด้วยเชื้อ *S. pombe* และ *A. pasteurianus* ในสถานะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 22 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ร้อยละ)	IC ₅₀ ของ DPPH (μL/mL)	สารฟีนอลิกทั้งหมด (μg GAE/mL)
0	89.05±0.45 ^d	0.102±0.007 ^d	477.53±41.85 ^s
2	96.17±0.15 ^c	0.022±0.003 ^{bcd}	1,718.29±80.71 ^{cd}
4	98.15±0.66 ^b	0.022±0.001 ^b	1,507.41±57.49 ^f
6	98.38±0.57 ^b	0.023±0.002 ^{ab}	1,514.74±58.39 ^f
8	98.07±0.28 ^b	0.023±0.002 ^{ab}	1,589.89±46.62 ^f
10	99.81±0.00 ^a	0.022±0.000 ^{ab}	1,650.18±50.89 ^{ef}
12	100.03±0.34 ^a	0.020±0.002 ^{ab}	1,693.58±93.73 ^{de}
14	100.05±0.20 ^a	0.020±0.001 ^{ab}	1,693.73±19.70 ^{cde}
16	100.72±0.30 ^a	0.020±0.001 ^{ab}	1,727.83±78.07 ^{bcd}
18	100.43±0.45 ^a	0.020±0.002 ^{ab}	1,785.15±45.19 ^{bc}
20	100.53±0.36 ^a	0.019±0.001 ^{ab}	1,827.41±27.32 ^{ab}
22	100.17±0.22 ^a	0.017±0.001 ^a	1,908.38±38.75 ^a

หมายเหตุ ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและค่า IC₅₀ ของอนุมูลอิสระ DPPH ระหว่างกระบวนการหมักแบบสองขั้นตอนด้วยเชื้อ *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 22 วัน

4.5 การเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำหมักสมุนไพรที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวและกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากน้ำหมักสมุนไพรทางการค้า

จากการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำหมักสมุนไพรที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวและการหมักแยกสองขั้นตอน รวมทั้งน้ำสมุนไพรหมักทางการค้า พบว่าน้ำหมักสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมีค่า pH ใกล้เคียงกัน น้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอน และการหมักทางการค้ามีค่า pH เท่ากับ 3.07 ± 0.01 3.04 ± 0.01 และ 3.03 ± 0.01 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากการหมักร่วมขั้นตอนเดียวมีปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) สูงกว่าน้ำสมุนไพรที่ได้จากการหมักแยกสองขั้นตอนและการหมักทางการค้า โดยมีปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 5.12 ± 0.16 , 4.91 ± 0.15 และ 5.05 ± 0.17 ตามลำดับ น้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากการหมักร่วมขั้นตอนเดียวและการหมักแยกสองขั้นตอนมีปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำร้อยละ 0.23 ± 0.16 และ 0.30 ± 0.06 โดยปริมาตร ซึ่งแอลกอฮอล์ที่ตรวจพบมีปริมาณไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานกระทรวงสาธารณสุขที่กำหนดว่าปริมาณแอลกอฮอล์ตกค้างในน้ำส้มสายชูหมักต้องไม่เกินร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร ขณะที่น้ำหมักสมุนไพรทางการค้ามีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 1.54 ± 0.05 โดยปริมาตร ซึ่งเกินมาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูที่กำหนดไว้ สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากการหมักแยกสองขั้นตอนมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 396.22 ± 8.88 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากการหมักร่วมขั้นตอนเดียวและน้ำสมุนไพรหมักทางการค้า สำหรับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าน้ำสมุนไพรหมักทางการค้ามีปริมาณฟีนอลิกสูงสุดเท่ากับ $2,410.71 \pm 11.87$ $\mu\text{g GAE/mL}$ ขณะที่น้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากการหมักร่วมขั้นตอนเดียวและการหมักแยกสองขั้นตอนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด $1,954.94 \pm 70.68$ และ $1,908.38 \pm 38.75$ $\mu\text{g GAE/mL}$ ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับน้ำสมุนไพรหมักทางการค้า ($p \leq 0.05$) จากผลการทดลองนี้พบว่าน้ำสมุนไพรหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงกว่าสารฟีนอลิกในน้ำส้มสายชูหมักที่หมักด้วยกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวเป็นเวลา 18 วัน โดยมีสารฟีนอลิกเท่ากับ $1,103.72$ $\mu\text{g GAE/mL}$ (นิสา, 2556) และมีปริมาณสูงกว่าสารฟีนอลิกในน้ำส้มสายชูแบล็กเบอรี่และน้ำส้มสายชูโรสฮิปทางการค้าที่มีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ 1,162 และ $1,103.50$ $\mu\text{g GAE/mL}$ ตามลำดับ (Sengun *et al.*, 2020) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Boonsopa *et al.*, (2019a) ที่ศึกษาการหมักน้ำส้มสายชูจากกล้วย พบว่ากระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวมีผลทำให้มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงกว่าการหมักแยกสองขั้นตอน โดยมีค่าเท่ากับ 92.67 และ 68.01 $\mu\text{g GAE/mL}$ ตามลำดับ น้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากการหมักร่วมขั้นตอนเดียวและการหมักแยกสองขั้นตอนมีค่า IC_{50} ของ DPPH เท่ากันคือ 0.017 ± 0.001 $\mu\text{L/mL}$ ซึ่งสูงกว่าน้ำสมุนไพรทางการค้าที่มีค่า IC_{50} ของ DPPH เท่ากับ 0.016 ± 0.001 $\mu\text{L/mL}$ ดังนั้นน้ำสมุนไพรหมักทางการค้ามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำสมุนไพรหมักที่หมักด้วย

จูลินทรีย์ที่แยกได้เพียงเล็กน้อย โดยสาเหตุที่น้ำสมุนไพรหมักด้วยจูลินทรีย์ที่แยกได้ผ่านกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวและการหมักแยกสองขั้นตอนมีปริมาณสารฟีนอลิกต่ำกว่าน้ำสมุนไพรหมักทางการค้าเนื่องจากน้ำสมุนไพรหมักทางการค้าหมักเป็นเวลา 6 เดือนซึ่งนานกว่าการหมักด้วยจูลินทรีย์ที่คัดแยกได้ ใช้เวลาหมักประมาณ 22-32 วัน และในกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวและการหมักแยกสองขั้นตอนด้วยจูลินทรีย์ที่แยกได้มีการใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อจูลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบก่อนที่จะนำมาหมัก ซึ่งความร้อนที่ใช้มีผลทำให้ฟีนอลิกบางส่วนสลายตัว โดย Vasil *et al.*, (2018) ได้ศึกษาการฆ่าเชื้อในน้ำแอปเปิ้ลด้วยวิธีการพลาสมาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที พบว่าความร้อนที่ใช้ส่งผลให้ปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมดลดลงเล็กน้อยจาก 77.95 เหลือ 75.54 mg GAE/mL

ตารางที่ 4.11 คุณภาพทางเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว กระบวนการหมักแยกสองขั้นตอน และกระบวนการหมักทางการค้า

คุณลักษณะทางเคมี	ตัวอย่างน้ำหมักสมุนไพร		
	การหมักร่วมขั้นตอนเดียว	การหมักแยกสองขั้นตอน	การหมักทางการค้า
pH	3.07±0.01 ^a	3.04±0.01 ^a	3.03±0.01 ^a
กรดทั้งหมด (%w/v)	5.12±0.16 ^a	4.91±0.15 ^a	5.05±0.04 ^a
น้ำตาลทั้งหมด (g/L)	45.88±2.15 ^b	396.22±8.88 ^a	334.26±7.91 ^a
แอลกอฮอล์ (%v/v)	0.23±0.16 ^b	0.30±0.06 ^b	1.54±0.05 ^a
สารฟีนอลิกทั้งหมด (µg GAE/mL)	1,954.94±70.68 ^b	1,908.38±38.75 ^b	2,410.71±11.87 ^a
IC ₅₀ (µL/mL)	0.017±0.001 ^a	0.017±0.001 ^a	0.016±0.001 ^b
ระยะเวลาหมัก (วัน)	32	22	180

หมายเหตุ ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05)

4.6 การปรับปรุงรสชาติผลิตภัณฑ์และการทดสอบทางประสาทสัมผัส

จากการนำน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวและกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอน รวมทั้งน้ำหมักสมุนไพรทางการค้าของผู้ประกอบการที่หมักเป็นเวลา 6 เดือน มาปรับปรุงรสชาติด้วยการเติมน้ำผึ้งต่อน้ำหมักสมุนไพรในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยการพลาสมาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและ

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าผลิตภัณฑ์น้ำสมุนไพรหมักทั้ง 3 ชนิดมีค่า pH ใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 3.26 ± 0.01 - 3.27 ± 0.01 ปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ในช่วงร้อยละ 2.15 ± 0.06 - 2.72 ± 0.02 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 0.10 ± 0.01 - 0.54 ± 0.01 โดยปริมาตร ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของผลิตภัณฑ์น้ำสมุนไพรหมักทั้งสามชนิดมีปริมาณเพิ่มขึ้นเนื่องจากการเติมน้ำผึ้งซึ่งเป็นสารให้ความหวานชนิดหนึ่ง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของผลิตภัณฑ์น้ำสมุนไพรหมักทั้งสามชนิดอยู่ในช่วง $1,134.28 \pm 6.33$ - $1,749.88 \pm 39.18$ $\mu\text{g GAE/mL}$ และค่า IC_{50} ของ DPPH อยู่ในช่วง 0.027 ± 0.001 - 0.028 ± 0.001 $\mu\text{L/mL}$ จากผลการทดลองพบว่าภายหลังการปรับปรุงรสชาติด้วยการเติมน้ำผึ้งมีผลทำให้น้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากการหมักร่วมขั้นตอนเดียวและการหมักแยกสองขั้นตอน รวมทั้งน้ำหมักสมุนไพรทางการค้า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลง แสดงดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 คุณภาพทางเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอนและทางการค้าภายหลังการปรับปรุงรสชาติ

คุณลักษณะทางเคมี	เครื่องดื่มน้ำสมุนไพรหมัก		
	การหมักร่วมขั้นตอนเดียว	การหมักแยกสองขั้นตอน	การหมักทางการค้า
pH	3.26 ± 0.01^a	3.27 ± 0.01^a	3.26 ± 0.01^a
กรดทั้งหมด (%w/v)	2.72 ± 0.02^a	2.61 ± 0.07^b	2.15 ± 0.06^c
น้ำตาลทั้งหมด (g/L)	241.20 ± 32.88^b	421.17 ± 7.75^a	374.07 ± 35.48^a
แอลกอฮอล์ (%v/v)	0.16 ± 0.06^b	0.10 ± 0.01^c	0.54 ± 0.01^a
สารฟีนอลิกทั้งหมด ($\mu\text{gGAE/mL}$)	$1,248.98 \pm 7.22^b$	$1,134.82 \pm 6.33^c$	$1,749.88 \pm 39.18^a$
IC_{50} ($\mu\text{L/mL}$)	0.028 ± 0.001^a	0.027 ± 0.001^a	0.027 ± 0.001^a

หมายเหตุ ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันแนวนอน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่า ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากการหมักร่วมขั้นตอนเดียวและการหมักแยกสองขั้นตอน รวมทั้งน้ำสมุนไพรหมักทางการค้า มีคะแนนความชอบด้านความใส สี กลิ่น ความหวาน และความเปรี้ยวไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.13 เมื่อพิจารณาความชอบโดยรวมพบว่าน้ำสมุนไพรที่ได้จากการหมักแยกสองขั้นตอนมีคะแนนความชอบโดยรวมสูงสุด 6.65 ± 1.04 สำหรับน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากการหมักร่วมขั้นตอนเดียวและเครื่องดื่มน้ำสมุนไพรหมักทางการค้ามีคะแนนความชอบโดยรวมใกล้เคียงกันเท่ากับ

6.06±1.01 และ 6.06±1.07 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Trinh *et al.*, (2016) ได้ทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูมะพร้าวที่หมักด้วยเชื้อ *Acetobacter aceti* พบว่ามีคะแนนความชอบโดยรวมสูงกว่าน้ำส้มสายชูทางการค้าที่หมักด้วยกระบวนการหมักตามธรรมชาติ โดยมีคะแนนความชอบโดยรวมเท่ากับ 6.48±1.23 และ 6.41±1.72 ตามลำดับ และจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของเครื่องต้มน้ำสมุนไพรหมักทั้ง 3 ชนิด พบว่าคุณลักษณะด้านกลิ่นของสมุนไพร สี และความใส ผู้บริโภคให้คะแนนความพึงพอใจที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบคุณลักษณะทางรสชาติจะพบว่าน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนมีรสชาติที่หวานและกลมกล่อมกว่าน้ำสมุนไพรหมักทางการค้า ทำให้ผู้บริโภคสามารถรับประทานได้ง่ายกว่าสำหรับน้ำสมุนไพรที่ได้จากการหมักร่วมขั้นตอนเดียวมีรสชาติเปรี้ยวและมีรสชาติของพริกไทยดำเด่นชัดกว่าเครื่องต้มน้ำหมักสมุนไพรชนิดอื่น ทั้งนี้ระดับความหวานที่แตกต่างกันมีผลมาจากปริมาณน้ำตาลที่ตกค้างในน้ำสมุนไพรหมัก

ตารางที่ 4.13 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์น้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอนและการหมักทางการค้าภายหลังการปรับปรุงรสชาติด้วยน้ำผึ้ง

คุณลักษณะทางเคมี	เครื่องต้มน้ำสมุนไพรหมัก		
	การหมักร่วมขั้นตอนเดียว	การหมักแยกสองขั้นตอน	การหมักทางการค้า
ความใส	6.65±1.25 ^a	6.88±0.84 ^a	6.53±1.11 ^a
สี	6.35±1.30 ^a	6.76±1.18 ^a	6.18±1.27 ^a
กลิ่น	5.00±1.88 ^a	5.65±1.81 ^a	5.06±1.58 ^a
ความหวาน	6.06±1.46 ^a	6.18±1.49 ^a	5.88±1.34 ^a
ความเปรี้ยว	5.59±1.52 ^{ab}	6.35±0.10 ^a	5.88±1.34 ^{ab}
ความชอบโดยรวม	6.06±1.01 ^b	6.65±1.04 ^a	6.06±1.07 ^b

หมายเหตุ ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกกระบวนการหมักสมุนไพรที่ระยะเวลาหมักแตกต่างกัน สามารถคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกได้จำนวน 72 และ 112 ไอโซเลต ตามลำดับ ยีสต์ไอโซเลต YM1-19 และแบคทีเรียอะซิติกไอโซเลต EM2-03 เป็นยีสต์และแบคทีเรียที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์และกรดทั้งหมดได้สูงในน้ำสมุนไพรที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเครื่องดื่มน้ำสมุนไพรหมักลูกแอปเปิ้ล ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมีและการจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลบริเวณ ITS region ของยีสต์และ 16S rDNA ของแบคทีเรีย พบว่ายีสต์ไอโซเลต YM1-19 มีความใกล้เคียงกับ *Schizosaccharomyces pombe* สำหรับแบคทีเรีย EM2-03 มีความใกล้เคียงกับ *Acetobacter pasteurianus* เมื่อนำ *S. pombe* YM1-19 และ *A. pasteurianus* EM2-03 มาใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ในกระบวนการหมักสองรูปแบบคือ การหมักพร้อมขั้นตอนเดียวและการหมักแยกสองขั้นตอน จากการศึกษาคุณภาพทางเคมีของน้ำสมุนไพรหมักที่ได้เปรียบเทียบกับน้ำสมุนไพรหมักทางการค้า พบว่าน้ำสมุนไพรที่ได้จากกระบวนการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ทั้งการหมักพร้อมขั้นตอนเดียวและการหมักแยกสองขั้นตอน รวมทั้งการหมักทางการค้ามีค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) และค่า IC₅₀ ของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างทางสถิติ น้ำสมุนไพรหมักทางการค้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด 2,410.71±11.87 µgGAE/mL ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับน้ำสมุนไพรหมักจากกระบวนการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ สำหรับการใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในกระบวนการหมักน้ำสมุนไพรลูกแอปเปิ้ลสามารถลดระยะเวลาในการหมักจาก 6 เดือนเหลือ 22-32 วัน และสามารถควบคุมปริมาณแอลกอฮอล์ตกค้างให้มีปริมาณต่ำกว่าร้อยละ 0.5 เป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชู เมื่อนำน้ำสมุนไพรหมักปรับปรุงรสชาติโดยการผสมน้ำสมุนไพรหมักกับน้ำผึ้งในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าน้ำสมุนไพรที่ได้จากการหมักแยกสองขั้นตอนมีคะแนนความชอบโดยรวมสูงสุดเท่ากับ 6.65±1.04 คะแนน ซึ่งจัดอยู่ในเกณฑ์ชอบเล็กน้อยตามหลักเกณฑ์ 9-Point Hedonic scale

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาต่อไปควรควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบที่นำมาใช้ให้มีคุณภาพคงที่ โดยวัตถุดิบที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับการอนุเคราะห์จากโรงงานในแต่ละครั้งมีลักษณะแตกต่างกัน เช่น ชนิดของน้ำตาลที่ ความละเอียดและความหยาบของพริกไทยดำ ความแก่และความอ่อนของมะตูม โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำกล้วยหมักอายุ 1 ปีที่มีปริมาณกรดทั้งหมดและปริมาณแอลกอฮอล์แตกต่างกันอย่างชัดเจน

ทำให้วัตถุดิบในแต่ละรอบการผลิตมีความแปรผันสูงมาก จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การเจริญของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่คัดแยกได้ในแต่ละรอบการหมักมีความแตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้การหมักมีประสิทธิภาพมากขึ้นอาจต้องทำการควบคุมคุณลักษณะของน้ำหมักกล้วยอายุ 1 ปี โดยการควบคุมสภาวะการหมักและใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์แทนการหมักด้วยวิธีดั้งเดิม ซึ่งอาจช่วยลดความแปรผันของวัตถุดิบและลดระยะเวลาในการเตรียมวัตถุดิบลง รวมถึงอาจต้องศึกษาอัตราส่วนของน้ำกล้วยที่เหมาะสมในการหมักเพื่อลดขั้นตอนในการเตรียมวัตถุดิบและเป็นการลดต้นทุนด้านวัตถุดิบทำการศึกษาอัตราส่วนของยีสต์และแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อลดระยะเวลาการหมัก รวมถึงอาจส่งเสริมให้เครื่องต้มน้ำสมุนไพรหมักถูกแปลงแม่มีคุณค่าทางโภชนาการที่สูงขึ้น และจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคจำนวน 30 คน ได้รับข้อเสนอแนะจากผู้บริโภคเพิ่มเติมว่า รสชาติของเครื่องต้มน้ำสมุนไพรหมักถูกแปลงแม่มีรสชาติที่ค่อนข้างเปรี้ยวและหวานที่โดดเด่น ทำให้รับประทานได้ยากในผู้บริโภคบางรายที่ไม่ชอบรสเปรี้ยวและหวานจัด การบริโภคในรูปแบบของไซรัปโดยผสมน้ำหรือโซดาในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จะช่วยให้ผู้บริโภคสามารถดื่มได้ง่ายขึ้น มีรสชาติเปรี้ยวและหวานที่น้อยลง โดยยังคงกลิ่นของสมุนไพรและรสชาติของเครื่องต้มน้ำสมุนไพรหมักถูกแปลงแม่

บรรณานุกรม

- กระทรวงสาธารณสุข. 2558. **เคล็ดลับ กลัวย กลัวย ช่วยสุขภาพ**. กรุงเทพฯ : ชุมชนสหกรณ์
การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด
- ขวัญเรือน เพชรน้อย และวรัณพร สุขคำมี. 2554. "ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดสมุนไพร
ในตำรับยาลูกแปลกแม่." วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์, มหาวิทยาลัย
รังสิต.
- คมกริช หาสิตะพันธ์. 2559. "เลคติน สารประกอบเคมีที่ได้จากกล้วยกับการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV-
1." *วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม*. 17(1) : 12-14.
- จุฬามาศ มณีวงศ์. 2551. **การผลิตน้ำส้มสายชูจากสาโท**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : [http://librae.
mju.ac.th/government/20111119104834_librae/15281.pdf](http://librae.mju.ac.th/government/20111119104834_librae/15281.pdf).
- ชญาน์พิสุทธิ์ แก้วสุวรรณ นรรัตน์ เทียนชัยรัตน์ สุภาวดี มโนรมณ์ และหนึ่งฤทัย ห้าวหาญ. 2555.
การผลิตน้ำส้มสายชูหมักเพื่อสุขภาพจากน้ำเชื่อมสับปะรด. [Online]. เข้าถึงได้จาก :
<http://www.research.rmutt.ac.th/wp-content/uploads/2014/03/127203.pdf>
- ชนกภัทร ผดุงอรุณ สวรรยา ปัญญานันท์ และวรรณรัตน์ เฉลิมแสนยากร. 2561. **การพัฒนา
ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำส้มสายชูหมักสับปะรดเพื่อการใช้ประโยชน์และเพิ่ม
มูลค่าสับปะรดเหลือทิ้ง**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : [http://irdmcrucru.ac.th/file/m-
pineapple/report/06.pdf](http://irdmcrucru.ac.th/file/m-pineapple/report/06.pdf)
- ดุชนิ ธนะบริพัฒน์. 2555. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ธนขวัญ บุษัน. 2553. **ความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียกรดน้ำส้มที่พบในอาหารหมัก
ดองในเขตดุสิต กรุงเทพมหานคร : รายงานวิจัย**. [Online]. เข้าถึงได้จาก :
http://www.ssruii.ssru.ac.th/bitstream/ssruir/860/1/029_53.pdf.
- นฤมล บุญมี นักรบ นาคประสม ชนวัฒน์ นิทัศน์จิตร พัฒนา เฟื่องฟู จริญญาพร สังข์ภิรมย์ และ
กาญจนา นาคประสม. 2562. "การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกในระหว่าง
กระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากเนื้อกาแฟ." *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 27(6) :
1038-1053.
- นฤมล จันทิมา ศศิธร แท่นทอง และเบญจพร ศรีสุวรรณมาศ. 2558. "การผลิตและการตรวจสอบ
คุณภาพน้ำส้มสายชูจากกล้วย." *การประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติเครือข่าย
บัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 15*. มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์. หน้า
248-256.

- นิธิกาญจน์ ชันติวรพงศ์. 2543. "การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพริกไทย." เกษศาตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีเภสัชกรรม, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นิชานันท์ อุดมศักดิ์สกุล. 2559. "การแยกและลักษณะสมบัติของยีสต์จากน้ำตาลสดมะพร้าวและการประยุกต์เพื่อการผลิตขนมปัง ไวน์ และเอทานอล." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษณีบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิตา แซ่หลี่. 2556. "การหมักน้ำส้มสายชูหมักจากเทคนิคการหมักร่วมระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5279 และ *Gluconobacter oxydans* TRBC 4013." การประชุมวิชาการระดับชาติ "วลัยลักษณ์วิจัย" ครั้งที่ 11. มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์. หน้า 248-256.
- รักษเกียรติ จิรันธร. 2549. มะตูม. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://pcog2.pharmacy.psu.ac.th/thi/Article/2549/04-2549/Aegle-marmelos.pdf>
- วัชรินทร์ รังสีภานุรัตน์ พัชรี กัมมารเจษฎากุล และอิสยา จันทรวิธานุชิต. 2559. "ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* ATCC 25922." วารสารมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติวิชาการ. 19(1) : 35-49.
- วัลลภา หน่อเหลี่ยม, ดวงทิพย์ มุลมั่งมี, และ สมพร มุลมั่งมุล. 2551. "ความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียอะซิติกแอซิดทนร้อนและการใช้ประโยชน์." การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 สาขาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 107-114.
- วิลาวัลย์ บุญยศุภา กรรณิการ์ ทองดอนเป็รียง ธนพร ปลุกชาติ ปณิตดา ภูผาดวง ญัฐกานต์ โคตรทิพย์ และนันทกานต์ แสนโสม. 2560. "สมบัติทางเคมี สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำส้มสายชูหมักจากสับปะรด 4 สายพันธุ์." วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ. 11(2) : 26-38.
- พรธิดา วัฒนกุล พีรพล จิรังคสกุลเดช พรรณี รัตนชัยสิทธิ์ ทศนีย์ วัฒนชัยยงค์ และจิรศักดิ์ คงเกียรติขจร. 2557. "การศึกษาเชื้อผสมของ *Acetobacter aceti* TISTR102 และ *Acetobacter cervisiae* TN4497 เพื่อการผลิตกรดอะซิติก และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการหมักน้ำส้มสายชูจากดอกกระเจี๊ยบ." วารสารมหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 10(1) : 635-648.
- พรนภัส จอมพงษ์ และพรนภา พิบาลศิลป์. 2561. "การปรับปรุงกระบวนการหมักเครื่องดื่มสมุนไพรด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 และ *Acetobacter aceti* TISTR 354." โครงการพิเศษสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- วรรณภา ทาบโลกา จินตนา เป็นรัมย์ และนภาลัย ไยบัว. 2556. "ผลของปริมาณแอลกอฮอล์และสภาวะการให้อากาศต่อปริมาณวิตามินซี และการผลิตน้ำส้มสายชูหมักมะขามป้อม." การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51. 51(1) : 439-446.

- วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิตย์. 2532. **เทคโนโลยีการหมักอุตสาหกรรม**. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์
- ศิริพร อัจฉรงค์. 2558. "การคัดแยกยีสต์ แบคทีเรียอะซิติกในน้ำส้มสายชูจากผลตาลเพื่อใช้ในการผลิตน้ำสลัด". วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2560. "โครงการพัฒนาการเพิ่มผลผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลังสด/มันเส้น." กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน.
- สัจจะ ประสงค์ทรัพย์. 2555. **พริกไทย**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://hort.ezathai.org>
- สาวิตรี ลิ้มทอง. 2549. **ยีสต์: ความหลากหลายทางชีวภาพ**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2556. **มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน น้ำส้มสายชูหมัก (มพช. 326/2547)**. กรุงเทพฯ : กระทรวงอุตสาหกรรม.
- สุดาร์ตน์ หอมหวล. 2553. "ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (พริกไทย)." [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.thaicrudedrug.com>
- อารยา ข้อคำ. 2560. "สารพฤกษเคมีจากพริกไทยดำและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา." . 1(1) : 28-39.
- อุดมลักษณ์ อุ้นจิตต์วรรณะ. 2560. "พริกไทย...สมุนไพรที่ใช้ช่วยป้องกันกำจัดแมลง." [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.geocities.ws/apsrdo/peper.pdf>
- Abdullakasim, P., Songchitsomboon, S., Techagumpuch, M., Balee, N., Swatsitang, P., and Sungpuag, P. 2007. "Antioxidant capacity, total phenolics and sugar content of selected Thai health beverages." *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 58(1) : 77-85.
- Abubake, O., Sulieman, A., and Elamin, H. 2012. "Utilization of *Schizosaccharomyces pombe* for production of ethanol from cane molasses." *Journal of Microbiology Research*. 2(2) : 36-40.
- Adams, M. and Moss, M. 2008. **Food Microbiology**. 2nd ed. London : The Royal Society of Chemistry. Cambridge University Press. Akubor, P.I., Obio, S.O., Nwodomere, K.A., and Obiomah, E. 2003. "Production and quality evaluation of banana wine." *Plant Foods for Human Nutrition*. 58(1) : 1-6.
- Arbenz, A., and Averous, L. 2015. " Chemical modification of tannins to elaborate aromatic biobased macromolecular architectures". *Green Chemistry*. 17(1) 2626-2646.

- Arifuzzaman, M., Hasan, Z., Rahman, B., and Pramanik, K. 2014. "Isolation and characterization of *Acetobacter* and *Gluconobacter* from sugarcane and rotten fruits." *Research and Reviews in Biosciences*. 8(9) : 359-365.
- Asai, T.I., and Komagata, K. 1964. "The Flagellation and taxonomy of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter* with reference to the existence of intermediate strains." *Journal of General and Applied Microbiology*. 10(2) : 95-126.
- Ayogu, T. 1999. "Evaluation of the performance of a yeast isolate from Nigerian palm wine in wine production from pineapple fruits." *Bioresource Technology*. 69(2) : 189–190.
- Benito, A., Calderon, F., and Benito, S. 2019. "*Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans*: Joint use as an alternative to the traditional fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* in oenology." 387-417 in Grmezescu, A.M., and Holban, A.M. **Alcohol Beverages**. Cambridge : Woodhead Publishing.
- Bansal, Y. and Bansal, G. 2011. "Analytical methods for standardization of *Aegle marmelos* Corr: a review." *Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2(2) : 37-44.
- Boonsupa, W., Chumchere, S., and Caovarat, M. 2019a. "Physicochemical properties and antioxidant activity of banana vinegar produced using one-stage and two-stage fermentation." *Agriculture and Natural Resources*. 53(1) : 295-305.
- Boonsupa, W., Pimda, W., Sreeninta, K., Yodon, C., Samorthong, N., Bon-on, B., and Henwiohat, O. 2019b. "Development of fermented banana vinegar: chemical characterization and antioxidant activity." *Journal of Food Health and Bioenvironmental Science*, 12(1) : 21-27.
- Chakraborty, K., Saha, S., Raychaudhuri, U., and Chakraborty, R. 2019. "Vinegar from bael (*Aegle marmelos*): A mixed culture approach." *Indian chemical engineer*. 1-12.
- Chen, Y., Bai, Y., Li, D., Wang, C., Xu, N., and Hu, Y. 2017. "Improvement of the flavor and quality of watermelon vinegar by high ethanol fermentation using ethanol-tolerant acetic acid bacteria." *International Journal of Food Engineering*. 13(4) : 1-8.

- Cho, Y., Chang, J., and Chang, H. 2007. "Production of gammaaminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells." *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17(1) : 104-109.
- Cho, A., Jeon, S., Kim, M., Yeo, J., Seo, K., Choi, M., and Lee, M. 2010. "Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice." *Food and Chemical Toxicology*. 48(1) : 937-943.
- Coelho, E., Genisheva, Z., Oliveira, J.M., Teixeira, J.A., and Domingues, L. 2017. " Vinegar production from fruit concentrates: effect on volatile composition and antioxidant activity" *Journal of food science and technology*. 54(2) : 1-11.
- Choi, G.W., UM, H.J., Kim, M., Kang, H.W., Chung, B.W., and Kim, Y.H. 2010. "Isolation and characterization of ethanol producing *Schizosaccharomyces pombe* CHFY0210". *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(4) : 828-834.
- Ciftci, T., Constantinides, A. and Wang, S.S. 1983. "Optimization of conditions and cell feeding procedures for alcohol fermentation." *Biotechnology and Bioengineering*. 25(8) : 2007-2023.
- D'Amore, T., Panchal, C.J., Russell, I. and Stewart, G.G. 1988. "Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation." *Journal of Industrial Microbiology*. 2(1) : 365-372.
- Dhankhar, S., Ruhil, S., Balhara, M., Dhankhar, S., and ChHillar, A.K. 2010. "Aegle marmelos L. Corr: a source of phytomedicine." *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(9) : 1497-1507.
- Diba, F., Alam, F., and Talukder, A. 2015. "Screening of acetic acid producing microorganisms from decomposed fruits for vinegar production." *Advances in Microbiology*. 5(1) : 291-297.
- Dubreuil, J.D. 2013. "Antibacterial and antidiarrheal activities of plant products against enterotoxinogenic *Escherichia coli*." *Toxins*. 5(1) : 2009-2041.
- Duenas, M., Hernandez, T., and Estrella, I. 2007. " Changes in the content of bioactive polyphenolic compounds of lentils by the action of exogenous enzymes. Effect on their antioxidant activity." *Food chemistry*. 101(1) : 90-97.

- Duenas, M., Hernandez, T. and Estrella, I. 2007. "Changes in the content of bioactive polyphenolic compounds of lentils by the action of exogenous enzymes. Effect on their antioxidant activity." *Food chemistry*. 101(1) : 90-97.
- Gelman, A., Drabkin, V., and Glatman, L. 2001. "Evaluation of lactic acid bacteria, isolated from lightly preserved fish product, as starter cultures for new fish-based food product." *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 1(1) : 219-226.
- Ghose, T.K., and Bhadra, A. 1985. Acetic acid. 701–729. In Moo-Young, M. **Comprehensive Biotechnology**. 1st ed. Vol. 3. Oxford : Pergamon Press.
- Gomes, R., Borges, M., Rosa, M., Castro-Gómez, R., and Spinosa, W. 2018. "Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications." *Food Technology and Biotechnology*. 56(2) : 139-151.
- Graves, T., Narendranath, N., Dawson, K., and Power, D. 2006. "Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash." *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 33(6) : 469-474.
- Greenberg, D.E., Porcella, S.F., Stock, F., Wong, A. Conville, P.S., Murray, P.R., Holland, S.M., and Zelazny, A.M. 2006. "*Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family *Acetobacteraceae*". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56(1) : 2609-2616.
- Helston, R.M., Box, J.A., Tang, W., and Baumann, P. 2010. "*Schizosaccharomyces cryophilus* sp. nov., a new species of fission yeast". *Federation of European microbiological societies yeast research*. (10)6: 779-786.
- Herald, T., Gadgil, P., and Tilley, M. 2012. "High-throughput microplate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour." *Journal of the science of food and agriculture*. 92(11) : 2326-2331.
- Ho, C., Lazim, A., Fazry, S., Zaki, U., and Lim, S. 2016. "Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review." *Food Chemistry*. 221(1) : 1621-1630.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.Y., and Williams, S.T. 1994. "Genus *Acetobacter* and *Gluconobacter*. 71-84. in Bergey, D.H., and Holt, J.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 19th ed. Maryland : Williams and Wilkens.

- Jayarman, P., Alex, A.H., and Vinith, S. 2018. "Evaluation of ethanol production using various carbon substrates by *Sacharomyces cerevisiae* and *Schizosacharomyces pombe*." *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 11(3) : 1469-1478.
- Jeffares, D. 2018. "The natural diversity and ecology of fission yeast." *Yeast*. 25(1) : 253-260.
- Johnston, C., Kim, C.M., and Buller, A.J. 2004. "Vinegar improves insulin sensitivity to a high carbohydrate meal in subjects with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus." *Diabetes Care*. 27(1) : 281-282.
- Jones, R.P. and Greenfield, P.F. 1987. "Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane." *Yeast*. 3(1) : 223-232.
- Jyothi, K.S., and Rao, B.S. 2010. "Antibacterial activity of extracts from *Aegle marmelos* against standard pathogenic bacterial strains." *International Journal of PharmTech Research*. 2(3) : 1824-1826.
- Kanchanarach, W., Theeragool, G., Inoue, T., Yakushi, T., Adachi, O., and Matsushit, K. 2014. "Acetic acid fermentation of *Acetobacter pasteurianus*: Relationship between acetic acid resistance and pellicle polysaccharide formation." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 74(8) : 1591-1597.
- Kim, S.H., Cho, H.K., and Shin, H. 2012. " Physicochemical properties and antioxidant activities of commercial vinegar drinks in Korea." *Food science and biotechnology*. 21(6) : 1729-1734.
- Krishna, T., Yashwanti, K., Surendra, U., Ateet, S., and Kumar, K.M. 2019. "Piperin production from endophytic fungi and anti-mycobacterial potential." *International Research Journal; of Biological Sciences*. 8(12) : 8-15.
- Kaewkod, T., Bovonsombut, S. and Tragoolpua, Y. 2019. " Efficacy of Kombucha Obtained from Green, Oolong, and Black Teas on Inhibition of Pathogenic Bacteria, Antioxidation, and Toxicity on Colorectal Cancer Cell Line." *Microorganisms*. 7(12) : 700-718.
- Kurtzman, P. Fell, J., and Boekhout, T. 2011. **The yeast**. 5nd ed. San diego : Elsevier.
- Laranjinha, J.A., Almeida, L.M., and Madeira, V.M. 1994. "Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation." *Biochemical Pharmacology*. 48(3) : 487-494.

- Lee, Y., Choi, Y., Lee, Y., Park, J., Shim, J., Park, K., and Kim, J. 2011. "Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits." *Mycobiology*. 39(1) : 33-39.
- Lee, K., Shim, J., Kim, G., Shin, J., and Kim, J. 2015. "Isolation and characterization of *Acetobacter* species from a traditionally prepared vinegar." *Microbiology and Biotechnology Letters*. 43(3) : 219–226.
- Lee, S., Lee, J.A., Park, G.G., Jang, J.K., and Park, Y.S. 2017. "Semi-continuous fermentation of onion vinegar and its functional properties." *Molecules*. 22(8) : 1313-1329.
- Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R., Yamada, Y., Uchimura, T., and Komagata, K. 2003. "Diversity of acetic acid bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines." *Microbiology and Culture Collections*. 19(2) : 91-99.
- Liu, H., Hsu, W., Lee, F., and Liao, C. 1996. "The Isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their Interactions during Haipao fermentation." *Food Microbiology*. 13(1) : 407-415.
- Malimas, T., Huong, T., Muramatsu, Y., Yukphan, P., Tanasupawat, S., and Yamada, Y. 2017 Systematics of acetic acid bacteria. 3-43 In I. Sengun. **Acetic Acid Bacteria: Fundamentals and Food Applications**. New York : CRC Press.
- Mamlouk, D., and Gullo, M. 2013. "Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation". *Indian Journal Microbiology*. 53(4) : 377-384.
- Maragatham, C., and Panneerselvam, A. 2011. "Isolation, identification and characterization of wine yeast from rotten papaya fruits for wine production." *Pelagia Research Library*. 2(2) : 93-98.
- Mas, A., Troncoso, A., García-Parrilla, M., and Torija, M. 2015. "Vinegar." 418-423 In Caballero, B., Finglas, P., and Toldra, F. **Encyclopedia of Food and Health**. Academic Press, Oxford.
- McCann, A., and Barnett, J. 1986. "The utilization of starch by yeasts." *Yeast*. 2(1) : 109-115.
- Mohamed, S., Hassan, Z., and Hamid, A.A. 1994. "Antimicrobial activity of some tropical fruit wastes (guava, starfruit, banana, papaya, posionfruit, langsat, duku, rambutan and rambai)." *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. 17(3) : 219-227.

- Moussa, K., Eric, E.A., Goualie, G.B., Louis, B.K., Ouattara, G.H., and Sebastien, L.N. 2015. "Banana vinegars production using thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* isolated from Ivorian palm wine." *Journal of Food Research*. 4(2) : 92-103.
- Murray, J.M., Watson, A.T., and Carr, A.M. 2016. "Colony polymerase chain reaction with *Schizosaccharomyces pombe*." 488-500 In Hagan, L., Carr, A., Grallat, A., and Nurse, P. **Fission Yeast: A laboratory Manual**. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nanba, T., and Kato, H. 1985. "Identification of acetic acid bacteria isolated from vinegar mash." *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 32(1) : 331-337.
- Nimisha, S., and Pradeep, S. 2017. "Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of wild banana (*Musa acuminata* Colla) : A review." *Journal of Ethnopharmacology*. 196(1) : 124-140.
- Nwachukwu, I., Ewelike, C., and Ibekwe, V. 2006. "Isolation, identification and screening of local yeast strain for attributes important for industrial ethanol production." *Journal of Raw Materials Research*. 3(1) : 38-45.
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi O.D., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E. and Boll, P.M. 1997. "Phytochemistry of the genus *Piper*." *Phytochemistry*. 46(4) : 597-673.
- Perumpuli, P., Watanabe, T., and Toyama, H. 2014. "Identification and characterization of thermotolerant acetic acid bacteria strains isolated from coconut water vinegar in Sri Lanka." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 78 (3) : 533-541.
- Petsiou, E., Mitrou, P., Raptis, S., and Dimitriadis, G. 2014. "Effect and mechanisms of action of vinegar on glucose metabolism, lipid profile, and body weight." *Nutrition Reviews*. 72(10) : 651-661.
- Pfeiffer, T., and Morley, A. 2014. "An evolutionary perspective on the crabtree effect." *Frontiers in Molecular Biosciences*. 15(1) : 18-22
- Raineri, S., and Pretorius, L. 2000. "Selection and improvement of wine yeast." *Annals of microbiology*. 50(1) : 15-31.
- Karin, S., and Kain, M. 2006. "*Acetobacter tropicalis* in spontaneously fermented Wines with vinegar fermentation in Austria." *Mitteilungen Klosterneuburg*. 56(1) : 102-107.

- Okon, J.E., Esenowo, G.J., Afaha, I.P., and Umoh, N.S. 2013. "Haematopoietic Properties of Ethanolic Fruit Extract of *Musa Acuminata* on Albino Rats." *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. 2(2) : 22-26.
- Olalere, O.A., Nour, A., and Alara, O.R. 2017. "Extraction, radical scavenging activities and physicochemical fingerprints of black pepper (*Piper nigrum*) extract." *Journal of Food Measurement and Characterization*. 11(1) : 2195–2201
- Pena-Serna, C., Castro-Gil, C., and Pelaez-Jaramillo, C.A. 2012. "Evaluation of ethanol production from two recombinant and a commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* (fungi: Ascomycota) in sugar-cane molasses and rejected-banana juice from Uraba (antioquia) Colombia." 34(1) : 183-192.
- Rhind, N., Chen, Z., and Yassour M. 2011. "Comparative functional genomics of the fission yeasts". *Science*. 332(1) : 930–936.
- Rouwenhorst, R.J., Ritmeester, W.S., Scheffers, W.A., and Dijken, J.P. 1990. "Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* species". *Applied and Environmental Microbiology*. 56(1) : 3329–3336
- Salamah, A., Srihardyastutie, A., Prasetyawan, S., and Safitri, A. 2019. "Influence of mixed cultures of *S. cerevisiae* and *Acetobacter aceti* for hydrolysis of tannins in the cabbage fermentation (*Brassica oleracea* L. ver. *capitata*)." *Materials Science and Engineering*. 546(1) : 546-554.
- Salbe, A., Jognston, C., Buyukbese, M., Tsitouras, P., and Harman, S. 2009. "Vinegar lacks antiglycemic action on enteral carbohydrate absorption in human subjects." *Nutrition Research*. 29(1) : 846-849.
- Sambrook, J., and Russel, D. 2011. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York : Cold Spring Harbor.
- Sengun, I.Y., and Karabiyikli, S. 2011. "Importance of acetic acid bacteria in food industry." *Food Control*. 22(1) : 647-656.
- Sengun, I.Y., Kilic, G., and Ozturk, B. 2020. "Screening physicochemical microbiological and bioactive properties of fruit vinegar produced from various raw materials." *Food Science and Biotechnology*. 29(1) : 401-408.
- Shamkuwar, P.B., Shahi, S.R., and Jadhav, S.T. 2012. "Evaluation of antidiarrhoeal effect of black pepper (*Piper nigrum* L.)." *Asian Journal of Plant Science and Research*. 2(1) : 48-53.

- Sharafi, S.M., Rasooli, I., and Beheshti-Maal, K. 2010. "Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods" *Iranian Journal of Microbiology*. 2 : 38-45
- Shehata, A. 1960. "Yeasts isolated from sugar cane and its juice during the production of aguardente de cana." *Applied Microbiology*. 8(2) : 73-75.
- Solieri, L., and Giudici, P. 2009. **Vinegar of the World**. Italy : Springer.
- SomBrook J.F., and Russel, D.W. 2001. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York : Cold spring harbor laboratory press.
- Song, N., Cho, H., and Baik, S. 2016. " Bacteria isolated from korean black raspberry vinegar with low biogenic amine production in wine " *Brazilian Journal of Microbiology*. 47(2) : 452-460
- Souza, V.M.A., Kwiecinski, M.R., Santos Mota, N.S.R., Ourique, F., Porfirio Will Castro, L. S.E., Andregueti, R.R., Correia, J.F., Filho, W., Pich, T.C., and Pedrosa, R. C. 2016. "Piper nigrum ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells." *Journal of Ethnopharmacology*. 189(1) : 139–147.
- Speranza, B., Campaniello, D., Petruzzi, L., Sinigaglia, M., Corbo, M., and Bevilacqua, A. 2019. "Preliminary characterization of yeasts from *Bombino bianco*, a grape variety of Apulian Region, and selection of an isolate as a potential starter." *Fermentation*. 5(1) : 102-112.
- Sruthi, D. and Zachariah, T. 2017. "In vitro antioxidant activity and cytotoxicity of sequential extracts from selected black pepper (*Piper nigrum* L.) varieties and *Piper* species." *International Food Research Journal*. 24(1) : 75-85.
- Sun, Y.L., Shan, F. Li, X.L., and Sun Y.T. 2011. "Antioxidant activities of tartary buckwheat vinegar and its polysaccharide substances." *Science and Technology of Food Industry*. 32(1) : 123-125
- Surana, Y., Shende, P., Suryawanshi, M., Mane, V., and Kumbhar, G. 2017. "A experimental study of vinegar production from different fruit products." *International Journal of Advance Engineering and Research*. 4(4) : 1086-1091.
- Suwanmanee, S., Kitisin, T., and Luplertlop, N. 2014. " In Vitro Screening of 10 Edible Thai Plants for Potential Antifungal Properties." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014(1) : 1-7.

- Takooree, H., Aumeeruddy, Z.M. Rengamy, K.R.R., Venugopala, K.N., Jeewon, R., Zengin, G., and Mahomoodally, M.F. 2019. "A systematic review on black pepper (*Piper nigrum* L.): from folk uses to pharmacological applications." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 59(1) : 1-34.
- Taqvi, S.I.H., Shah, A.J., and Gilani, A.H. 2008. "Blood pressure lowering and vaso modulator effects of piperine." *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 52(1) : 452-458.
- Tasleem, F., Azhar, I., Ali, S.N., Perveen, S., and Mahmood, Z.A. 2014. " Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L." *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 7(1) : S461-S468.
- Turner, L. 2015. "Do-It-Yourself-Healing Elixirs." *Better Nutrition*. 5(1) : 36-42.
- Ukwo, S.P., Ezeama, C.F., and Ndaeyo, N.U. 2010. "Growth of different yeast strain during fermentation of soursop (*Annona muricata*) juice as influenced by acetic acid bacteria (*Acetobacter aceti*)." *Nature and Science*. 8(10) : 285-291
- Valles, B.S., Bedrinana, R.P., Tascon, A.Q., Roberto, S., and Madrea, R. 2005. "Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider". Department of Biotechnology, Institute of Agrochemical and Technology of Alimentos Valencia, Spain
- Vasile, L., Socaci, S., Teusdea, A., Timar, A., Tofana, M., and Vicas, S. 2018. "The effect of pasteurization time on phytochemical composition and antioxidant capacity of two apple cultivars juices." *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Food Science and Technology*. 75(1) : 67-77.
- Vaughan-Martini, A., and Martini, A. 2011a. *Saccharomyces*. 733-745 In Kurtzman, P. Fell, J., and Boekhout, T. 2011. **The yeast**. 5nd ed. San diego : Elsevier.
- Vaughan-Martini, A., and Martini, A. 2011b. *Schizosaccharomyces*. 780-784 In Kurtzman, P. Fell, J., and Boekhout, T. 2011. **The yeast**. 5nd ed. San diego : Elsevier.
- Venkatesan, D. Karunakaran, M. Kumar, S.S. Palaniswamy, P. and Ramesh, G. 2009. "Antimicrobial activity of *Aegle marmelos* against pathogenic organism compared with control drug". *Ethnobotanical Leaflets*. 13(1) : 968-974.
- Vidra, A., and Nemeth, A. 2017. "Bio-produced acetic acid: A review." *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*. 62(30): 245-256

- Wang, Q., Han, P., Zhang, M., Xia, M., Zhu, H., Ma, J., Hou, M., Tang Z., and Ling, W. 2007. "Supplementation of black rice pigment fraction improves antioxidant and antiinflammatory status in patients with coronary heart disease." *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 16(1) : 295-301.
- Wu, J., Gullo, M., Chen, F., and Gludici, P. 2010. "Diversity of *Acetobacter pasteurianus* strains isolated from solid-state fermentation of cereal vinegars." *Current Microbiology*. 60(1) : 280-286.
- Wu, J.J., Ma, Y.K., Zhang, F.F., and Chen, F.S. 2012. "Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of "Shanxi Aged Vinegar", a traditional Chinese vinegar." *Food Microbiology*. 30(1) : 289-297.
- Xia, T., Zhang, B., Duan, W., Zhang, J., and Wang, M. 2020. "Nutrients and bioactive components from vinegar: A fermented and functional food." *Journal of Functional Foods*. 64(1) : 465-479.
- Yamada, Y., and Yukphan, P. 2008. "Genera and species in acetic acid bacteria." *International Journal of Food Microbiology*. 125(1), 15–24.
- Yohannes, A., Eyalarsan, K., Eyob, L., Ghebregus, E., Weldemariam, L., Yohannes, T., and Yemane, A. 2019. "Antibacterial and antifungal activities of easily grown eritrean black pepper." *International Journal of Engineering Research and Technology*. 7(2) : 81-83.
- Zhang, Q., Zhang, J., Silva, J., Dennis, D.A., and Barrow, C.J. 2006. "A Simple 96-Well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds ." *Journal of applied phycology*. 18(1) : 445-450.
- Zhang, L.L., and Xu, J.G. 2015. "Comparative study on antioxidant activity of essentialoil from white and black pepper." *European Journal of Food Science and Technology*. 3(1) : 10-16.
- Zheng, Y.Z., Yin, H., Bia, X., Chang, Y., Xia, M., and Wang, M. 2015. "Global insights into acetic acid resistance mechanisms and genetic stability of *Acetobacter pasteurianus* strains by comparative genomics." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101(18) : 7007-7016.
- Zou, L., Hu, Y.Y., and Chen, W.X. 2015. "Antibacterial mechanism and activities of black pepper chloroform extract." *Journal of Food Science and Technology*. 52(1) : 8196–8203.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1 อาหาร Glucose Yeast extract Calcium carbonate agar (GYC agar)

ส่วนประกอบ

Glucose	100	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Calcium carbonate	20	กรัม
Agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ผสมส่วนผสมทุกชนิดให้เข้ากัน ให้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลาย นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2 อาหาร Glucose Yeast extract Ethanol Calcium carbonate agar (GYEC agar)

ส่วนประกอบ

Glucose	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Calcium carbonate	20	กรัม
Ethanol	30	มิลลิลิตร
Agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	970	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ผสมส่วนผสมทุกชนิดให้เข้ากัน ยกเว้นเอทานอล ให้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลาย นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเอทานอลร้อยละ 95 ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผสมอาหารให้เข้ากันก่อนใช้

3 อาหาร Yeast extract Peptone Dextrose agar (YPD agar)

ส่วนประกอบ

Glucose	20	กรัม
Peptone	20	กรัม

Yeast extract	10	กรัม
Agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ผสมส่วนผสมทุกชนิดให้เข้ากัน ให้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลาย นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4 อาหาร Fermentation basal medium (Wickerham, 1951)

ส่วนประกอบ

Yeast extract	4.5	กรัม
peptone	7.5	กรัม
Bromothymol blue	4	มิลลิลิตร
น้ำตาลเข้มข้นร้อยละ 2	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. เตรียม Bromothymol blue stock โดยละลาย Bromothymol blue 50 มิลลิกรัมด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 75 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายสีเขียวเข้ม (Bromothymol blue stock)

2. ละลาย Yeast extract และ Peptone ด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารสกัด Bromothymol blue stock ปริมาตร 4 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1000 มิลลิลิตร

3. ปิเปตสารละลายในข้อ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี Durham tube นำไป ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. จากนั้นเติมสารละลายน้ำตาลเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ผ่านการกรองฆ่าเชื้อด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

5. อาหาร Glucose Peptone Yeast extract agar (GPY agar)

ส่วนประกอบ

Glucose	40	กรัม
Peptone	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ผสมส่วนผสมทุกชนิดให้เข้ากัน ให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหาร Yeast Ethanol Calcium carbonate ที่ปราศจากแคลเซียมคาร์บอเนต (YEC Broth)

ส่วนประกอบ

Glucose	30	กรัม
Peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Ethanol	40	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	960	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ผสมส่วนผสมทุกชนิดให้เข้ากันยกเว้นเอทานอล นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเอทานอลร้อยละ 95 ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผสมอาหารให้เข้ากันก่อนใช้

7. อาหาร Carr medium

ส่วนประกอบ

Yeast extract	30	กรัม
Bromocresol green	0.02	กรัม
Agar	18	กรัม
Ethanol	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	980	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ผสมส่วนผสมทุกชนิดให้เข้ากันยกเว้นเอทานอลและวุ้น ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 N ให้มีค่าอยู่ในช่วง 5.5-6.0 เติมวุ้นและให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเอทานอลร้อยละ 95 ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผสมอาหารให้เข้ากันก่อนใช้

8. อาหารทดสอบการใช้อะซิเตรต

ส่วนประกอบ

Peptone	3	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
Sodium acetate	2	กรัม
Bromthymol blue	0.02	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ผสมส่วนผสมทุกชนิดให้เข้ากันและปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 N ให้มี pH เท่ากับ 6.4 จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. อาหารทดสอบความสามารถในการผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรต

ส่วนประกอบ

สารประกอบคาร์บอน	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Bromocresol purple	0.02	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ผสมน้ำตาลแต่ละชนิดลงในอาหาร Basal medium ที่ประกอบด้วย Yeast extract, Bromocresol purple และน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 N ให้มี pH เท่ากับ 6.8-7 จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้อาหารเย็นลงอย่างรวดเร็ว

10. อาหารทดสอบความสามารถในการทนต่อเอทานอลร้อยละ 5 และ 10 โดยปริมาตร

ส่วนประกอบ

Glucose	0.5	กรัม
Peptone	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Absolute ethanol	50 หรือ 100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	950 หรือ 900	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ผสมส่วนผสมทุกชนิดให้เข้ากันยกเว้นเอทานอล โดยเติมน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตรและเอทานอล 50 มิลลิลิตรสำหรับอาหารที่มีเอทานอลร้อยละ 5 และเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตรและเอทานอล 100 มิลลิลิตรสำหรับเอทานอลร้อยละ 10 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเอทานอลที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผสมอาหารให้เข้ากันก่อนใช้

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ย้อมและทดสอบจุลินทรีย์

1.1 Methylene blue

ส่วนประกอบ

สารละลาย A

Methylene blue	0.3	กรัม
Ethanol 95%	30	มิลลิลิตร

สารละลาย B

Diluted potassium hydroxide (0.01%)	100	มิลลิลิตร
-------------------------------------	-----	-----------

ผสมสารละลาย A เข้ากับสารละลาย B

1.2 Gram strain solution

ส่วนประกอบ

1.2.1 Hucker's crystal violet

สารละลาย A

Crystal violet	2	กรัม
Ethanol 95%	20	มิลลิลิตร

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน กรองผ่านกระดาษกรองหยาบ

1.2.2 Gram-Iodine

ส่วนประกอบ

Iodine	1	กรัม
Potassium iodide (KI)	2	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม Gram's iodine

บด KI และ Iodine บดให้ละเอียดเป็นเวลา 5-10 วินาที เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรบดต่อ เติมน้ำกลั่นอีก 5 มิลลิลิตรบดต่อ และเติมต่อไปจนครบ 300 มิลลิลิตร

1.2.3 Hucker's counter stain (Stock solution)

ส่วนประกอบ

Safranin O	2.5	กรัม
Ethanol 95%	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียมสารละลาย

เติม Stock solution 10 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร

1.3 Oxidase reagent

ส่วนประกอบ

N,N,N,N-Tetramethyl-p-phenylenediamine 2HCL	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

หมายเหตุ สารนี้ควรเตรียมใหม่ แต่ Reagent ที่เตรียมแล้วสามารถเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเก็บได้นาน 4 วัน

1.4 Mcfarland standard หมายเลข 3

ส่วนประกอบ

สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1% (v/v)	9.7	มิลลิลิตร
สารละลายแบเรียมคลอไรด์ร้อยละ 1% (v/v)	0.3	มิลลิลิตร

2. สารเคมีที่ใช้เตรียม Competent cell

2.1 CCMB80 buffer

ส่วนประกอบ

โพแทสเซียมอะซิเตรต	0.98	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	11.89	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์	4	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์	2	กรัม
กลีเซอรอล	100	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตรต 1 M โดยละลายโพแทสเซียมอะซิเตรต 0.98 กรัมในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตรปรับ pH ให้เท่ากับ 7 จากนั้นละลายแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และกลีเซอรอลด้วยสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตรตที่เตรียมไว้ปรับ pH ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 M ให้มีค่า pH เท่ากับ 6.4 และปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นกรองฆ่าเชื้อด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรก่อนนำไปใช้

3. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

3.1 สารละลายมาตรฐานเอทานอล

เจือจาง Absolute ethanol ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นร้อยละ 8 12 16 20 และ 25 โดยปริมาตร

3.2 โพรพานอลร้อยละ 10 โดยปริมาตร

เจือจางโพรพานอล 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

4. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กรด

4.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N

ส่วนประกอบ

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ขวดปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

4.2 สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต

ส่วนประกอบ

โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต 0.100 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ขวดปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร

4.3 สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน

ส่วนประกอบ

ฟีนอล์ฟทาลีน 1 กรัม

Ethanol 95% 100 มิลลิลิตร

5. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด

5.1 สารละลายฟีนอล 5%

ชั่งฟีนอลหนัก 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตร

5.2 สารละลายมาตรฐานกลูโคส

เตรียม Stock solution โดยการละลายน้ำตาลกลูโคสที่อบไล่ความชื้นแล้ว 10 มิลลิกรัมด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตร (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเจือจางสารละลายน้ำตาลกลูโคสตามตารางที่ ข-1

ตารางที่ ข-1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ความเข้มข้นของสารละลาย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	Stock solution (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0	10
10	1	9
20	2	8
30	3	7
40	4	6
50	5	5
60	6	4
70	7	3
80	8	2
90	9	1
100	10	0

6. สารเคมีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.1 สารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ในเอทานอล ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์

เนื่องจาก DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) มีมวลโมเลกุล 395 g/mol ดังนั้นสาร 1 M จะต้องใช้ $C_{18}H_{12}N_5O_6$ 395 กรัม ละลายในเอทานอล 1,000 มิลลิลิตร ถ้าต้องการสารเข้มข้น 0.2 mM จะต้องใช้สาร $0.2 \times 10^{-3} \times 395$ กรัม = 0.079 กรัม ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

หมายเหตุ ในการเตรียมสาร DPPH จะเตรียมครั้งละ 10 มิลลิลิตร เนื่องจากสาร DPPH ไม่สามารถเก็บไว้ได้หลายวัน จึงจำเป็นต้องใช้ทันทีหลังเตรียมเสร็จและควรเก็บไม่ให้โดนแสง

7. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

7.1 เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ในรูปผงแห้งมา 7.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตร

7.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดแกลลิก 0.01 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร จากนั้นเจือจางสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกตามตารางที่ ข-2

ตารางที่ ข-2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ความเข้มข้นของสารละลาย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	Stock solution (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
0	0	1,000
50	50	950
100	100	900
200	200	800
400	400	600
600	600	400

ภาคผนวก ค

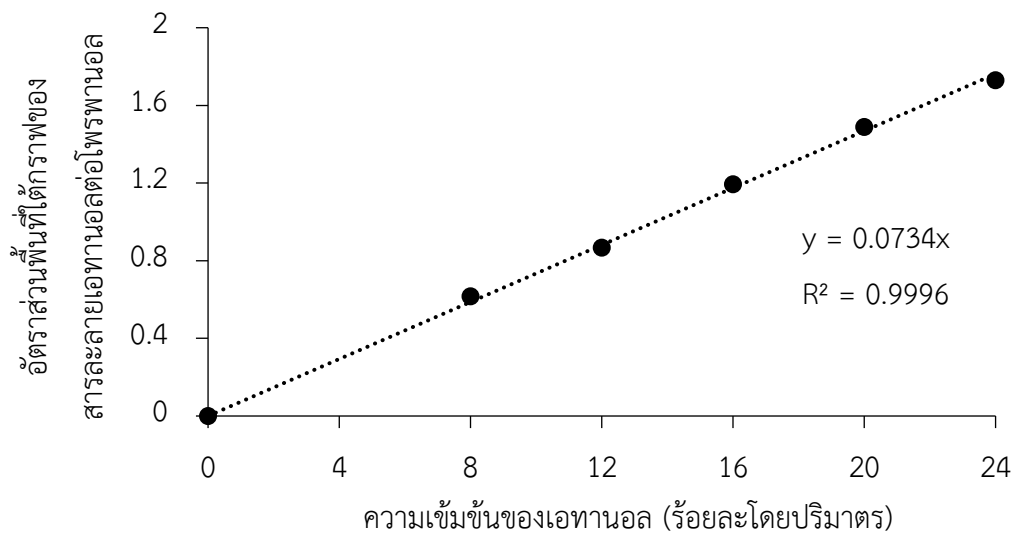
การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานเอทานอล

เตรียมสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 8 16 20 และ 24 โดยปริมาตรผสมกับ Isopropanol ร้อยละ 10 โดยปริมาตรที่เป็น Internal standard ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ทำการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography

ตารางที่ ค-1 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของเอทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)	พื้นที่ใต้กราฟเอทานอล	พื้นที่ใต้กราฟโพรพานอล	อัตราส่วนพื้นที่ของเอทานอลต่อโพรพานอล
0	0	1,321,458	0
8	792,602	1,284,607	0.617
12	1,171,663	1,351,400	0.867
16	1,521,814	1,275,620	1.193
20	1,965,494	1,320,010	1.489
24	22,481,327	1,299,499	1.730



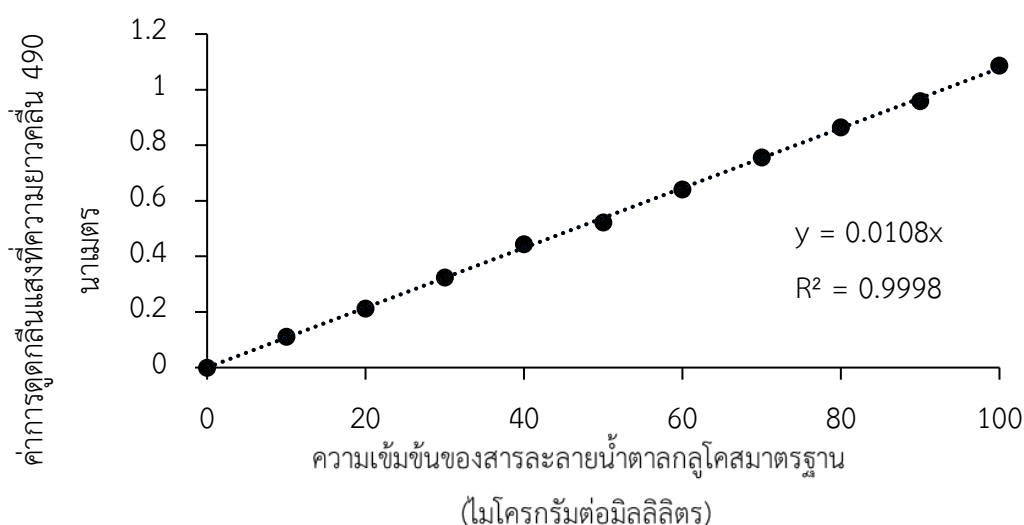
รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

2. กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมด

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ ค-2 จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองเติมสารละลายฟีนอลเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 98 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีและผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ตารางที่ ค-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

สารละลายน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
0	0
10	0.112
20	0.213
30	0.324
40	0.444
50	0.523
60	0.641
70	0.757
80	0.865
90	0.959
100	1.087



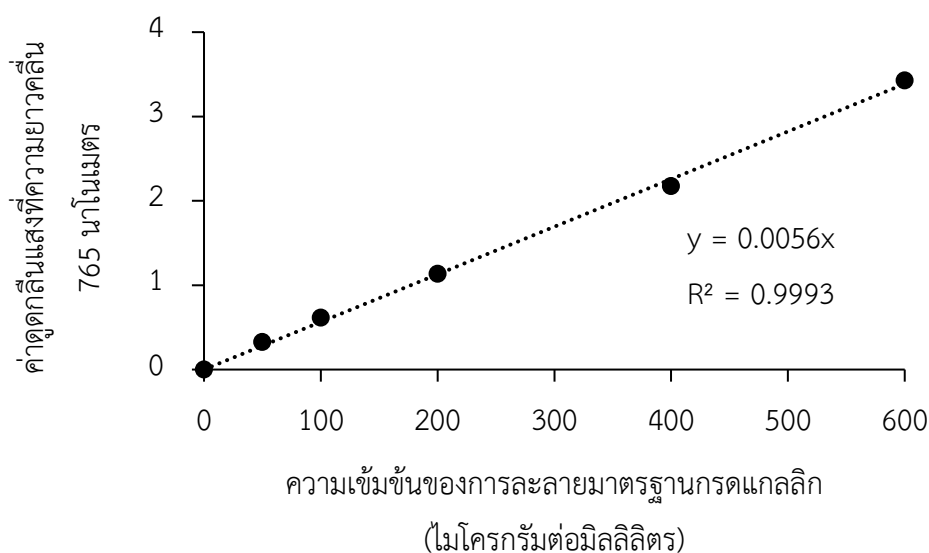
รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ

3. กราฟมาตรฐานสารประกบฟีนอลิก

เจือจางสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกจาก Stock solution ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐาน 20 ไมโครลิตร เติม Folin-Ciocalteu reagent ร้อยละ 50 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 75 กรัมต่อลิตรปริมาตร 80 ไมโครลิตร บ่ม 30 นาทีในที่มืด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแกลลิกและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

ตารางที่ ค-3 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร
0	0
50	0.327
100	0.616
200	1.137
400	2.175
600	3.427



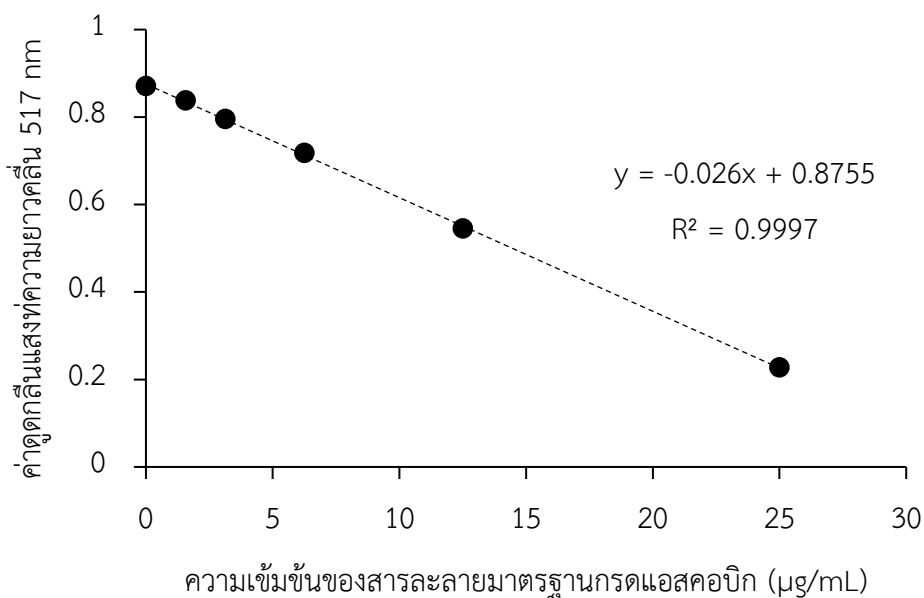
รูปที่ ค-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

4. กราฟมาตรฐานฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH

เจือจางสารมาตรฐานกรดแอสคอบิก (วิตามินซี) ให้มีความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารมาตรฐาน 50 ไมโครลิตรลง 96-well plates จากนั้นปิเปต DPPH 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

ตารางที่ ค-4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานแอสคอบิกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร
0	0
50	0.327
100	0.616
200	1.137
400	2.175
600	3.427



รูปที่ ค-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ง-1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal transcription spacer region (ITS) ของยีสต์

ง-1.1 ไอโซเลต YM1-12 (ขนาด 583 bp)

ACTAAAAAGAAATTGAAAAAGCAAATTAATTATAAACCTTGAAATTTGTTTTGAAGTCTGAA
TTAATTATATTTAATATATAAAATTATTTAAACTTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATC
GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATC
TTTGAACGCACATTGCGCCTTTGGGTTCTACCAAAGGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTACAATC
TTCTCACAAAAATGTTTTTTTTTAAATATTTTGGATGAGGTGTTGAACGAAAATTTGTTTTTTTT
TAAAAATAAATTTAGTTTGAAATCGATTGGTGAAAACAAAAGGAAGATTGGAATTATTTTTCTAT
ACCTTTTTTCATTTTTTTCTATTGAACGTAATAGGTTTTACCACTTTGTTTGATAGAAAAAGAA
ATTAGGAAAGAAAAATAACTAAAGTTTTAATCTCTTTTATATTTGAACCTTAACGAAGAAAAAAT
ATATTTTTTTCACAGCACTCTTTTATTTGACC///

ง-1.2 ไอโซเลต YM1-19 (ขนาด 876 bp)

AAGGATCATTAGAAAAGTTATATGAAAGGGTTAGATTTCCATTTTTAACTTTTTGGAATCTTT
TCCTTTTTCTTCTTTATCCATTTACCTTTCTGTGAAAATGTAAAATATTTCAATTTTGATTTTT
TCTTTTTCTTTTTTTTTAAAAAAAAGTGTTAGAAAGAGAAAGACGAAAAAAGTTGTAAATAT
TTACGAGTGGATGATTTTTGTTTGGTGTGTTTCGGCATGCCAAGCATATCATTACTTTTTTACTT
ATTTTTTTTTATTTTTCTATCTTCTCTCTTTTTTTTTACTAAAAAGAAATTGAAAAGCAAAATT
AAATTATAAACCTTGAAATTTGTTTTTGAAGTCTGAATTAATTATATTTAATATATAAAATTTATTT
AAAATTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG
TAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTTTGGGTTT
TACCAAAGGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTACAATCTTCTCACAAAAATGTTTTTTTTTAAATAT
TTTTGATGAGGTGTTGAACGAAAATTTGTTTTTTTTTAAAAATAAATTTAGTTTGAAATCGATTG
GTGAAAACAAAAGGAGATTGGAATTATTTTTCTATACCTTTTTTTCATTTTTTTCTATTGAACGT
AATAGTTTTTACCACTTTGTTTGATAGAAAAAGAAATTAGGAAAGAAAAATAACTAAAGTTTTTAA
TCTCTTTTATATTTGAACCTTAACGAAAAAATATATTTTTTTCACAGCACTCTTTTATTTGACCT
CAAATCAGGTAGGACTACGCGCTGAACTTAA

///

ง-1.3 ไอโซเลต YM5-02 (ขนาด 876 bp)

AAGGATCATTAGAAAAGTTATATGAAAGGGTTAGATTTCCATTTTTAACTTTTTGAAATCTTT
 TCCTTTTTCTTCTTTATCCATTTACCTTTCTGTGAAAATGTAAAATATTTTCAATTTTGATTTTT
 TCTTTTTCTTTTTTTTTTAAAAAAAGTGTTAGAAAGAGAAAGACGAAAAAAGTTGTAAATAT
 TTACGAGTGGATGATTTTTGTTTGGTGTGTTTCGGCATGCCAAGCATATCATTACTTTTTTACTT
 ATTTTTTTTATTTTTCTATCTTTTCTCTTTTTTTTTACTAAAAAGAAATTGAAAAAGCAAATTA
 AATTATAAACCTTGAAATTTGTTTTGAAGTCTGAATTAATTATATTTAATATATAAAAATTATTTA
 AAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT
 AATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCGCATTGCGCCTTTGGGTTCT
 ACCAAAGGCATGCCTGTTGAGTGTCAATACAATCTTCTCACAAAAATGTTTTTTTTTAAATATT
 TTTGATGAGGTGTTGAACGAAAATTTGTTTTTTTTAAAAATAAATTTAGTTTGAAATCGATTGGT
 GAAAACAAAAGGAGATTGGAATTATTTTTCTATACCTTTTTTTCATTTTTTTTCTATTGAACGTAA
 TAGTTTTTACCACTTTGTTTGATAGAAAAGAAATTAGGAAAGAAAAATAACTAAAGTTTTAATC
 TCTTTTATATTTGAACCTTAACGAAAAAATATATTTTTTTTACAGCACTCTTTTATTTGACCTC
 AAATCAGGTAGGACTACGCGCTGAACTTAA

///

ง-1.4 ไอโซเลต YM5-03 (ขนาด 881 bp)

AAGGATCATTAGAAAAGTTATATGAAAGGGTTAGATTTCCATTTTTAACTTTTTGAAATCTTT
 TCCTTTTTCTTCTTTATCCATTTACCTTTCTGTGAAAATGTAAAATATTTTCAATTTTGATTTTT
 TCTTTTTCTTTTTTTTTTAAAAAAAGTGTTAGAAGGAGAAAGACGAAAAAAGTTGTAAATAT
 TTACGAGTGGATGATTTTTGTTTGGTGTGTTTCGGCATGCCAAGCATATCATTACTTTTTTACTT
 ATTTTTTTTATTTTTCTATCTTTTCTCTTTTTTTTTACTAAAAAGAAATTGAAAAAGCAAATTA
 AATTATAAACCTTGAAATTTGTTTTGAAGTCTGAATTAATTATATTTAATATATAAAAATTATTTA
 AAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT
 AATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTTTGGGTTCT
 ACCAAAGGCATGCCTGTTGAGTGTCAATACAATCTTCTCACAAAAATGTTTTTTTTTAAATAT
 TTTTGATGAGGTGTTGAACGAAAATTTGTTTTTTTTAAAAATAAATTTAGTTTGAAATCGATTG
 GTGAAAACAAAAGGAAGATTGGAATTATTTTTCTATACCTTTTTTTCATTTTTTTTCTATTGAACG
 TAATAGTTTTTACCACTTTGCTTGATAGAAAAGAAATTAGGAAAGAAAAATAACTAAAGTTTTA
 ATCTCTTTTATATTTGAACCTTAACGAAGAAAAAATATATTTTTTTTACAGCACTCTTTTATTTG
 ACCTCAAATCAGGTAGGACTACGCGCTGAACTTAA

///

ง-1.5 ไอโซเลต YM6-03 (ขนาด 876 bp)

AAGGATCATTAGAAAAGTTATATGAAAGGGTTAGATTTCCATTTTTAACTTTTTGAAAATCTTT
 TCCTTTTTCTTCTCTTATCCATTTACCTTTCTGTGAAAATGTAAAATATCTTCAATTTTGATTTTT
 TCTTTTTCTTTTTTTTTAAAAAAGTGTTAGAAAGAGAAAAGACGAAAAAAGTTGTAAATATT
 TACGAGTGGATGATTTTTGTTTGGTGTGTTTCGGCATGCCAAGCATAACCATTACTTTTTTACTTA
 TTTTTTTATTTTTCTATCTTTTCTCTTTTTTTTTACTAAAAAGAAITSTGAAAAAGCAAAATT
 AAATTATAAACCTTGAAATTTGTTTTGAAGTCTGAATTAATTATATTTAATATATAAAAATTATTT
 AAAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG
 TAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTTTGGGTTC
 TACCAAAGGCATGCCTGTTTGTGAGTGTCAATACAATCTTCTCACAAAAATGTTTTTTTTAAATAT
 TTTTGATGAGGTGTTGAACGAAAATTTGTTTTTTTTAAAAATAAATTTAGTTTGAAATCGATTG
 GTGAAAACAAAAGGAGATTGGAATTATTTTTCTATACCTTTTTTTCATTTTTTTCTATTGAACGT
 AATAGTTTTACCACTTTGTTTGATAGAAAAGAAATTAGGAAAGAAAAATAACTAAAGTTTTAA
 TCTCTTTTATATTTGAACCTTAACGAAGAAAATATATTTTTTTCACAGCACTCTTTTATTTGACC
 TCAAATCAGGTAGGACTACGCGCTGAACTTAA///

ง-2 ผลการ Multiple sequence alignment บริเวณ Internal transcription spacer (ITS)
 ของยีสต์เทียบกับ *Schizosaccharomyces pombe* (MH595429.1)

<i>S. pombe</i>	GGTGAACCTGCGGAGGATCATTAGAAAAGTTATATGAAAGGGTTAGATTTCCATTTTTA	60
YM1-12	-----	0
YM1-19	-----AAGGATCATTAGAAAAGTTATATGAAAGGGTTAGATTTCCATTTTTA	48
YM5-02	-----AAGGATCATTAGAAAAGTTATATGAAAGGGTTAGATTTCCATTTTTA	48
YM5-03	-----AAGGATCATTAGAAAAGTTATATGAAAGGGTTAGATTTCCATTTTTA	48
YM6-03	-----AAGGATCATTAGAAAAGTTATATGAAAGGGTTAGATTTCCATTTTTA	48
<i>S. pombe</i>	ACTTTTTGAAAATCTTTTCCTTTTTCTTCTCTTATCCATTTACCTTTCTGTGAAAATGTA	120
YM1-12	-----	0
YM1-19	ACTTTTTGAAAATCTTTTCCTTTTTCTTCTCTTATCCATTTACCTTTCTGTGAAAATGTA	108
YM5-02	ACTTTTTGAAAATCTTTTCCTTTTTCTTCTCTTATCCATTTACCTTTCTGTGAAAATGTA	108
YM5-03	ACTTTTTGAAAATCTTTTCCTTTTTCTTCTCTTATCCATTTACCTTTCTGTGAAAATGTA	108
YM6-03	ACTTTTTGAAAATCTTTTCCTTTTTCTTCTCTTATCCATTTACCTTTCTGTGAAAATGTA	108
<i>S. pombe</i>	AAATATTTTCAATTTTGATTTTTCTTTTTCTTTTTT- TAAAAAAAAGTGTTAGAAA	178
YM1-12	-----	0
YM1-19	AAATATTTTCAATTTTGATTTTTCTTTTTCTTTTTTTTAAAAAAAAGTGTTAGAAG	168

YM5-02	AAATATTTTCAATTTTGATTTTTCTTTTCCTTTTTTTTTAAAAAAAAGTGTTAGAAA	168
YM5-03	AAATATTTTCAATTTTGATTTTTCTTTTCCTTTTTTTTTAAAAAAAAGTGTTAGAAA	168
YM6-03	AAATATTTTCAATTTTGATTTTTCTTTTCCTTTTT- TTTTAAAAAAAAGTGTTAGAAA	167
<i>S. pombe</i>	GAGAAAGACGAAAAAAGTTGTAATATTTACGAGTGGATGATTTTTGTTTGGTGTGTTT	238
YM1-12	-----	0
YM1-19	GAGAAAGACGAAAAAAGTTGTAATATTTACGAGTGGATGATTTTTGTTTGGTGTGTTT	228
YM5-02	GAGAAAGACGAAAAAAGTTGTAATATTTACGAGTGGATGATTTTTGTTTGGTGTGTTT	228
YM5-03	GAGAAAGACGAAAAAAGTTGTAATATTTACGAGTGGATGATTTTTGTTTGGTGTGTTT	228
YM6-03	GAGAAAGACGAAAAAAGTTGTAATATTTACGAGTGGATGATTTTTGTTTGGTGTGTTT	227
<i>S. pombe</i>	CGGCATGCCAAGCATATCATTACTTTTTACTTATTTTTTTTATTTT-TTCTATCTTCTCT	297
YM1-12	-----	0
YM1-19	CGGCATGCCAAGCATATCATTACTTTTTACTTATTTTTTTTATTTTTCTATCTTCTCT	288
YM5-02	CGGCATGCCAAGCATATCATTACTTTTTACTTATTTTT- TTTATTTTTCTATCTTTTCT	287
YM5-03	CGGCATGCCAAGCATATCATTACTTTTTACTTATTTTT- TTTATTTTTCTATCTTTTCT	287
YM6-03	CGGCATGCCAAGCATACCATTACTTTTTACTTATTTTT- TTTATTTTTCTATCTTTTCT	286
<i>S. pombe</i>	C- TTTTTTTTTACTAAAAAGAAATTGAAAAAGCAAATTAATTATAAACCTTGAAATTT	356
YM1-12	----- ACTAAAAAGAAATTGAAAAAGCAAATTAATTATAAACCTTGAAATTT	49
YM1-19	CTTTTTTTTTACTAAAAAGAAATTGAAAAAGCAAATTAATTATAAACCTTGAAATTT	348
YM5-02	CTTTTTTTTTACTAAAAAGAAATTGAAAAAGCAAATTAATTATAAACCTTGAAATTT	347
YM5-03	CTTTTTTTTTACTAAAAAGAAATTGAAAAAGCAAATTAATTATAAACCTTGAAATTT	347
YM6-03	CTTTTTTTTTACTAAAAAGAAATTGAAAAAGCAAATTAATTATAAACCTTGAAATTT	346
<i>S. pombe</i>	GTTTTTGAAGTCTGAATTAATTATATTTAATATATAAAAATTATTTAAAACTTTCAGCAAC	416
YM1-12	GTTTTTGAAGTCTGAATTAATTATATTTAATATATAAAAATTATTTAAAACTTTCAGCAAC	109
YM1-19	GTTTTTGAAGTCTGAATTAATTATATTTAATATATAAAAATTATTTAAAACTTTCAGCAAC	408
YM5-02	GTTTTTGAAGTCTGAATTAATTATATTTAATATATAAAAATTATTTAAAACTTTCAGCAAC	408
YM5-03	GTTTTTGAAGTCTGAATTAATTATATTTAATATATAAAAATTATTTAAAACTTTCAGCAAC	407
YM6-03	GTTTTTGAAGTCTGAATTAATTATATTTAATATATAAAAATTATTTAAAACTTTCAGCAAC	406
<i>S. pombe</i>	GGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATT	476
YM1-12	GGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATT	169
YM1-19	GGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATT	468
YM5-02	GGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATT	467
YM5-03	GGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATT	467
YM6-03	GGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATT	466

<i>S. pombe</i>	GCAGAATTC CGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTTTGGGTTCTACCAAA	536
YM1-12	GCAGAATTC CGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTTTGGGTTCTACCAAA	229
YM1-19	GCAGAATTC CGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTTTGGGTTCTACCAAA	528
YM5-02	GCAGAATTC CGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTTTGGGTTCTACCAAA	527
YM5-03	GCAGAATTC CGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTTTGGGTTCTACCAAA	527
YM6-03	GCAGAATTC CGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTTTGGGTTCTACCAAA	526

<i>S. pombe</i>	GGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATACAATCTTCTCACAAAAATGTTTTTTTTTTAAATATT	596
YM1-12	GGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATACAATCTTCTCACAAAAATGTTTTTTTTTTAAAT- - A	287
YM1-19	GGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATACAATCTTCTCACAAAAATGTTTTTTT- TTTAAAT- - A	585
YM5-02	GGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATACAATCTTCTCACAAAAATGTTTTTTT- TTTAAAT- - A	584
YM5-03	GGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATACAATCTTCTCACAAAAATGTTTTTTTTTTAAAT- - A	585
YM6-03	GGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATACAATCTTCTCACAAAAATGTTTTTTT- TTTAAAT- - A	583

<i>S. pombe</i>	TTTTTGATGAGGTGTTGAACGAAAATTTGTTTTTTTTTTAAATAAATTTAGTTTGAAAT	656
YM1-12	TTTTTGATGAGGTGTTGAACGAAAATTTGTTTTTTTTTTAAATAAATTTAGTTTGAAAT	347
YM1-19	TTTTTGATGAGGTGTTGAACGAAAATTTGTTTTTTTTTTAAATAAATTTAGTTTGAAAT	645
YM5-02	TTTTTGATGAGGTGTTGAACGAAAATTTGTTTTTT- TTTAAATAAATTTAGTTTGAAAT	643
YM5-03	TTTTTGATGAGGTGTTGAACGAAAATTTGTTTTTTTTTTAAATAAATTTAGTTTGAAAT	645
YM6-03	TTTTTGATGAGGTGTTGAACGAAAATTTGTTTTTTTTTTAAATAAATTTAGTTTGAAAT	643

<i>S. pombe</i>	CGATTGGTGAAAACAAAAG -GAGATTGGAATTATTTTTCTATACCTTTTTTCATTTTTTT	715
YM1-12	CGATTGGTGAAAACAAAAGGAAGATTGGAATTATTTTTCTATACCTTTTTTCATTTTTTT	407
YM1-19	CGATTGGTGAAAACAAAAG -GAGATTGGAATTATTTTTCTATACCTTTTTTCATTTTTTT	704
YM5-02	CGATTGGTGAAAACAAAAG -GAGATTGGAATTATTTTTCTATACCTTTTTTCATTTTTTT	702
YM5-03	CGATTGGTGAAAACAAAAGGAAGATTGGAATTATTTTTCTATACCTTTTTTCATTTTTTT	705
YM6-03	CGATTGGTGAAAACAAAAG -GAGATTGGAATTATTTTTCTATACCTTTTTTCATTTTTTT	702

<i>S. pombe</i>	TCTATTGAACGTAATAGGTTTTACCACCTTTGTTTGATAGAAAAAGAAATTAGGAAAGAAA	775
YM1-12	TCTATTGAACGTAATAGGTTTTACCACCTTTGTTTGATAGAAAAAGAAATTAGGAAAGAAA	467
YM1-19	TCTATTGAACGTAATAGGTTTTACCACCTTTGTTTGATAGAAAAAGAAATTAGGAAAGAAA	764
YM5-02	TCTATTGAACGTAATAGGTTTTACCACCTTTGTTTGATAGAAAAAGAAATTAGGAAAGAAA	762
YM5-03	TCTATTGAACGTAATAGGTTTTACCACCTTTGCTTGATAGAAAAAGAAATTAGGAAAGAAA	765
YM6-03	TCTATTGAACGTAATAGGTTTTACCACCTTTGTTTGATAGAAAAAGAAATTAGGAAAGAAA	762
<i>S. pombe</i>	AATAACTAAAGTTTTAATCTCTTTTATATTTGAACCTTAACGAAAAAATATATATTTTT	835
YM1-12	AATAACTAAAGTTTTAATCTCTTTTATATTTGAACCTTAACGAAAGAAAAAATATATTTTT	527

YM1-19	AATAACTAAAGTTTTAATCTCTTTTATATTTGAACCTTAACGAAAAAAT - -ATATTTTT	820
YM5-02	AATAACTAAAGTTTTAATCTCTTTTATATTTGAACCTTAACGAAAAAAT - -ATATTTTT	820
YM5-03	AATAACTAAAGTTTTAATCTCTTTTATATTTGAACCTTAACGAAGAAAAAATATATTTTT	825
YM6-03	AATAACTAAAGTTTTAATCTCTTTTATATTTGAACCTTAACGAAGAAAAAT - -ATATTTTT	820
<i>S. pombe</i>	TTCACAGCACTCTTTTATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACGCGCTGA - - - - -	885
YM1-12	TTCACAGCACTCTTTTATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACGCGCTGAACTTAA - - - -	583
YM1-19	TTCACAGCACTCTTTTATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACGCGCTGAACTTAA - - - -	878
YM5-02	TTCACAGCACTCTTTTATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACGCGCTGAACTTAA - - - -	876
YM5-03	TTCACAGCACTCTTTTATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACGCGCTGAACTTAA - - - -	881
YM6-03	TTCACAGCACTCTTTTATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACGCGCTGAACTTAA - - - -	876

ง-3 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย

ง-3.1 ไอโซเลต EM2-03 (ขนาด 839 bp)

CCATGGGTGGGGATAAACTGGGAACTGGTGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAG
 GCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAGCCTGCGTTTTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCA
 GGCGATGATCAATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGC
 CGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTGACGGGGACGATGATGACGGTACC
 CGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTT
 GCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCG
 GGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTC
 CCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGG
 CTCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
 ACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTAGTCATTCAGTGTGCGAGTTAACGCGT
 TAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG
 CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGAATG
 TAGAGGCTGCAAGC

///

ง-3.2 ไอโซเลต EM3-01 (ขนาด 910 bp)

ATCTATCCATGGGTGGGGATAAACTGGGAACTGGTGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGT
 CAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAGCCTGCGTTTTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC
 TACCAAGGCGATGATCAATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG

CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGC
 AATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGACG
 GTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTA
 GCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGAAATC
 CCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGA
 ATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACC
 TGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
 GTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTAGTCATTAGTGTGCGCAGTTAAC
 GCGTTAAGCACACCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
 CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTG
 AATGTAGAGGCTGCAAGCAGAGATGTTTGTTCCTCCGCAAGGGACCTCTAACACAGGTGCTGCAT
 GGCTGTCGTCAGCTCGTGT

///

ง-3.3 ไอโซเลต EM3-03 (ขนาด 829 bp)

GTATCTATCCATGGGTGGGGGATAACACTGGGAACTGGTGCTAATACCGCATGACACCTGAGG
 GTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAGCCTGCGTTTTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGG
 CCTACCAAGGCGATGATCAATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCA
 GCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGA
 CGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGC
 TAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGAAA
 TCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTG
 GAATCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCA
 ACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
 GTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTAGTCATTAGTGTGCGCAGTT
 AACGCGTTAAGCACACCCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG
 GGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGG
 GCTT

///

ง-3.4 ไอโซเลต EM3-07 (ขนาด 1,017 bp)

AACACATGCAAGTCGCACGAAGGTTTTCGGCCTTAGTGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAT
 CTATCCATGGGTGGGGATAAACTGGGAACTGGTGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCA
 AAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAGCCTGCGTTTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA
 CCAAGGCGATGATCAATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
 CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCA
 ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGACGG
 TACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAG
 CGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGAAATCC
 CCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTGATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAA
 TTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCT
 GGCTCATTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTAGTCATTAGTGTGCGAGTTAACG
 CGTTAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGGCGGGGGC
 CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGA
 ATGTAGAGGCTGCAAGCAGAGATGTTTGTTCGCAAGGGACCTCTAACACAGGTGCTGCATG
 GCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTT
 TAGTTGCCATCA///

ง-4 ผลการ Multiple sequence alignment บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียเทียบกับ *Acetobacter pasteurianus* (NR118169.1)

NR118169.1	-----GTGGCGGAC	9
EM2-03	-----	0
EM3-01	-----	0
EM3-03	-----	0
EM3-07	-- GCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGCACGAAGGTTTTCGGCCTTAGTGGCGGAC	58
NR118169.1	GGGTGAGTAACGCGTAGGTATCTATCCATGGGTGGGGATAAACTGGGAACTGGTGCT	69
EM2-03	-----CCATGGGTGGGGATAAACTGGGAACTGGTGCT	35
EM3-01	-----ATCTATCCATGGGTGGGGATAAACTGGGAACTGGTGCT	41
EM3-03	-----GTATCTATCCATGGGTGGGGATAAACTGGGAACTGGTGCT	43
EM3-07	GGGTGAGTAACGCGTAGGTATCTATCCATGGGTGGGGATAAACTGGGAACTGGTGCT	118

NR118169.1	AATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAGCCTGCGTTTG	129
EM2-03	AATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAGCCTGCGTTTG	95
EM3-01	AATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAGCCTGCGTTTG	101
EM3-03	AATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAGCCTGCGTTTG	103
EM3-07	AATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAGCCTGCGTTTG	178
NR118169.1	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCAATAGCTGGTTTGAGAGG	189
EM2-03	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCAATAGCTGGTTTGAGAGG	155
EM3-01	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCAATAGCTGGTTTGAGAGG	161
EM3-03	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCAATAGCTGGTTTGAGAGG	163
EM3-07	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCAATAGCTGGTTTGAGAGG	238
NR118169.1	ATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG	249
EM2-03	ATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG	215
EM3-01	ATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG	221
EM3-03	ATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG	223
EM3-07	ATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG	298
NR118169.1	AATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC	309
EM2-03	AATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC	275
EM3-01	AATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC	281
EM3-03	AATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC	283
EM3-07	AATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC	358
NR118169.1	GGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGC	369
EM2-03	GGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGC	335
EM3-01	GGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGC	341
EM3-03	GGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGC	343
EM3-07	GGATTGTAAAGCACTTTCGACGGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGC	418
NR118169.1	TAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGG	429
EM2-03	TAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGG	395
EM3-01	TAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGG	401

EM3-03	TAAC TTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGG	403
EM3-07	TAAC TTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGG	478
NR118169.1	GCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGG	489
EM2-03	GCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGG	455
EM3-01	GCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGG	461
EM3-03	GCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGG	463
EM3-07	GCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGG	538
NR118169.1	GAGCTGCATTTGATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAGTGTA	549
EM2-03	GAGCTGCATTTGATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAGTGTA	515
EM3-01	GAGCTGCATTTGATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAGTGTA	521
EM3-03	GAGCTGCATTTGATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAGTGTA	523
EM3-07	GAGCTGCATTTGATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAGTGTA	598
NR118169.1	GAGGTGAAATTCGTAGATATTGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCAT	609
EM2-03	GAGGTGAAATTCGTAGATATTGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCAT	575
EM3-01	GAGGTGAAATTCGTAGATATTGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCAT	581
EM3-03	GAGGTGAAATTCGTAGATATTGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCAT	583
EM3-07	GAGGTGAAATTCGTAGATATTGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCAT	658
NR118169.1	TACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA	669
EM2-03	TACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA	635
EM3-01	TACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA	641
EM3-03	TACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA	643
EM3-07	TACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA	718
NR118169.1	CGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTAGTCATTCAGTGTGCGAGTTAACG	729
EM2-03	CGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTAGTCATTCAGTGTGCGAGTTAACG	695
EM3-01	CGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTAGTCATTCAGTGTGCGAGTTAACG	701
EM3-03	CGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTAGTCATTCAGTGTGCGAGTTAACG	703
EM3-07	CGCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTAGTCATTCAGTGTGCGAGTTAACG	778

NR118169.1	CGTTAAGCACACCGCCTGG- GGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG	788
EM2-03	CGTTAAGCACACCGCCTGG- GGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG	754
EM3-01	CGTTAAGCACACCGCCTGG- GGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG	760
EM3-03	CGTTAAGCACACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG	763
EM3-07	CGTTAAGCACACCGCCTGG- GGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG	837
NR118169.1	GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCA	848
EM2-03	GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCA	814
EM3-01	GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCA	820
EM3-03	GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCA	823
EM3-07	GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCA	897
NR118169.1	GGGCTTGAATGTAGAGGCTGCAAGCAGAGATGTTTGTTCGCCGCAAGGGACCTCTAACAC	908
EM2-03	GGGCTTGAATGTAGAGGCTGCAAGC-----	839
EM3-01	GGGCTTGAATGTAGAGGCTGCAAGCAGAGATGTTTGTTCGCCGCAAGGGACCTCTAACAC	880
EM3-03	GGGCTT-----	829
EM3-07	GGGCTTGAATGTAGAGGCTGCAAGCAGAGATGTTTGTTCGCCGCAAGGGACCTCTAACAC	957
NR118169.1	AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA	968
EM2-03	-----	839
EM3-01	AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT-----	910
EM3-03	-----	829
EM3-07	AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA	1017
NR118169.1	GCGCAACCCCTATCTTTAGTTGCCATCAGGTTGGGCTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGG	1028
EM3-03	-----	829
EM3-07	GCGCAACCCCTATCTTTAGTTGCCATCA-----	1045
EM2-03	-----	839
EM3-01	-----	910
NR118169.1	TGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCT	1088
	ACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCTAGGTGGTGACACCATGCTGATCTC	1148
	TAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCT	1208

AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCG 1268

TCACACCATGGGAGTTGGTTTGACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCGCAAGGACGCAGCCGA 1328

CCACGGTCGGGTCAGCGACTGGG 1351

ภาคผนวก จ

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 204) พ.ศ.2543

เรื่อง น้ำส้มสายชู

โดยที่เป็นการสมควรปรับปรุงประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง น้ำส้มสายชู

อาศัยอำนาจตามความในมาตราที่ 5 และมาตร 6(3)(4)(5)(6)(7) และ (10) แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 อันเป็นพระราชบัญญัติที่มีบทบัญญัติบางประการเกี่ยวกับการจำกัดสิทธิและเสรีภาพของบุคคล ซึ่งมาตรา 29 ประกอบกับมาตรา 35 มาตรา 48 และมาตรา 50 ของรัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทยบัญญัติให้กระทำได้โดยอาศัยอำนาจตามบัญญัติแห่งกฎหมายรัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขออกประกาศไว้ดังนี้

ข้อ 1 ให้ยกเลิกประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 48 (พ.ศ.2523) เรื่อง น้ำส้มสายชู ลงวันที่ 20 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2523

ข้อ 2 ให้น้ำส้มสายชูเป็นอาหารที่กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานให้ถือว่าผลิตภัณฑ์ผลิตขึ้นเพื่อจุดประสงค์ที่จะใช้เป็นผลิตภัณฑ์นั้นในทำนองเดียวกับน้ำส้มสายชูเป็นน้ำส้มสายชู และให้หมายความรวมถึงหัวน้ำส้มด้วย

ข้อ 3 น้ำส้มสายชูแบ่งออกเป็น 3 ชนิดดังต่อไปนี้

(1) น้ำส้มสายชูหมัก หมายความว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำธัญพืช ผลไม้หรือน้ำตาล มาหมักกับส่าเหล้าและหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีธรรมชาติ

(2) น้ำส้มสายชู หมายความว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำแอลกอฮอล์กลั่นเจือจาง (Dilute distilled alcohol) มาหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูหรือเมื่อหมักแล้วนำไปกลั่นอีก หรือได้จากการนำน้ำส้มสายชูหมักตาม (1) มากลั่น

(3) น้ำส้มสายชูเทียม หมายความว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเอากรดน้ำส้ม (Acetic acid)

ข้อ 4 น้ำส้มสายชูหมักหรือน้ำส้มสายชูกลั่น ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

(1) มีกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 27 องศาเซลเซียส

(2) ตรวจพบสารปนเปื้อนได้ไม่เกินปริมาณที่กำหนด ดังต่อไปนี้

(2.1) สารหนู ไม่เกิน 1 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม

(2.2) ตะกั่ว ไม่เกิน 1 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม

(2.3) ทองแดงและสังกะสี ไม่เกิน 10 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม

(2.4) เหล็ก ไม่เกิน 10 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม

(3) ไม่มีกรดน้ำส้มที่ได้มาจากการผลิตน้ำส้มสายชูหมักหรือน้ำส้มสายชูกลั่น

(4) ไม่มีกรดกำมะถัน (Sulfuric acid) หรือกรดเรื่อิสระอย่างอื่น

- (5) ใส่มิมีตะกอน เว้นแต่น้ำส้มสายชูหมักตามธรรมชาติ
- (6) ไม่มีหนอนน้ำส้ม (Vinegar eel)
- (7) ใช้น้ำสะอาดเป็นส่วนผสม
- (8) ให้ใช้วัตถุเจือจางปนอาหาร (Food additives) ได้ดังต่อไปนี้
 - (8.1) ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไม่เกิน 70 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
 - (8.2) กรดแอล-แอสคอร์บิกไม่เกิน 400 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
- (9) มีแอลกอฮอล์ตกค้าง (Residual alcohol) ไม่เกินร้อยละ 0.5
- (10) การแต่งสีให้ใช้น้ำตาลเคี้ยวไหมหรือสีคาราเมล

ขอ 5 น้ำส้มสายชูเทียม ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

(1) มีกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4 กรัม และไม่เกิน 7 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 27 องศาเซลเซียส

- (2) ตรวจพบสารปนเปื้อนได้ไม่เกินปริมาณที่กำหนด ดังต่อไปนี้
 - (2.1) สารหนูไม่เกิน 1 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
 - (2.2) ตะกั่ว ไม่เกิน 1 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
 - (2.3) ทองแดงและสังกะสี ไม่เกิน 10 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
 - (2.4) เหล็ก ไม่เกิน 10 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
- (3) ใส่มิมีตะกอน
- (4) ไม่มีกรดกำมะถันหรือกรดแร่อิสระอย่างอื่น
- (5) ไม่ใช่สี
- (6) ไม่มีการแต่งกลิ่นหรือรส
- (7) ใช้น้ำสะอาดเป็นส่วนผสม

ข้อ 6 ในการจำหน่ายน้ำส้มสายชูหรือผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดน้ำส้ม ห้ามแสดงคำว่า “หัวน้ำส้ม” หรือข้อความอื่นที่มีความหมายในทำนองเดียวกัน

ขอ 7 กรดน้ำส้ม ถ้าจะจำหน่ายเป็นน้ำส้มสายชูเทียมต้องเจือจางให้มีคุณภาพหรือมาตรฐานตามข้อ 5

ขอ 8 ผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าน้ำส้มสายชูเพื่อจำหน่าย ต้องปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง วิธีการผลิต เครื่องมือ เครื่องใช้ในการผลิต และการเก็บรักษาอาหาร

ขอ 9 การใช้ภาชนะบรรจุน้ำส้มสายชูให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง ภาชนะบรรจุ

ขอ 10 การแสดงฉลากของน้ำส้มสายชูให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง ฉลาก

ข้อ 11 ให้ใบสำคัญการขึ้นทะเบียนตำรับอาหารหรือใบสำคัญการใช้ฉลากอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 48 (พ.ศ.2523) เรื่อง น้ำส้มสายชู ลงวันที่ 20 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2523 ซึ่งออกให้ก่อนวันที่ประกาศนี้ใช้บังคับยังคงใช้ต่อไปได้อีกสองปีนับแต่ประกาศนี้ใช้บังคับ

ข้อ 12 ให้ผู้ผลิต ผู้นำเข้า น้ำส้มสายชูที่ได้รับอนุญาตอยู่ก่อนวันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ ยื่นคำขอรับเลขสารบบอาหารภายในหนึ่งปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ และให้คงใช้ฉลากเดิมที่เหลืออยู่ต่อไปจนกว่าจะหมดแต่ต้องไม่เกินสองปีนับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ

ข้อ 13 ประกาศนี้ใช้บังคับเมื่อพ้นกำหนดหนึ่งร้อยแปดสิบวันนับแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 19 กันยายน พ.ศ.2543

กร ทัพพะรังสี

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข

(ราชกิจจานุเบกษาฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 118 ตอนพิเศษ 6 ง. ลงวันที่ 24 มกราคม พ.ศ.2544)

ภาคผนวก ฉ

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน น้ำส้มสายชูหมัก

๑. ขอบข่าย

๑.๑ มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ครอบคลุมเฉพาะน้ำส้มสายชูหมักที่บรรจุในภาชนะบรรจุ

๒. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ มีดังต่อไปนี้

๒.๑ น้ำส้มสายชูหมัก หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำวัตถุดิบที่เหมาะสม เช่น ธัญพืช ผลไม้ น้ำตาล หรือกากน้ำตาล มาหมักกับน้ำแล้วนำมาหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีธรรมชาติ

๓. คุณลักษณะที่ต้องการ

๓.๑ ลักษณะทั่วไป

ต้องเป็นของเหลวใส อาจตกตะกอนเมื่อวางทิ้งไว้

๓.๒ สี

ต้องมีสีที่ติดตามธรรมชาติของน้ำส้มสายชูหมัก

๓.๓ กลิ่น

ต้องมีกลิ่นของกรดอะซิติกและอาจมีกลิ่นของวัตถุดิบที่ใช้หมักอยู่ด้วยก็ได้ เมื่อตรวจสอบโดยวิธีให้คะแนนตามข้อ ๘.๑ แล้ว ต้องได้คะแนนเฉลี่ยของแต่ละลักษณะจากผู้ตรวจสอบทุกคนไม่น้อยกว่า ๓ คะแนน และไม่มีลักษณะใดได้ ๑ คะแนน จากผู้ตรวจสอบคนใดคนหนึ่ง

๓.๔ สิ่งแปลกปลอม

ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น หนองน้ำส้ม เส้นผม ขนสัตว์ ดินทราย กรวด ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์

๓.๕ สารปนเปื้อน

๓.๕.๑ สารหนู ต้องไม่เกิน ๑ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

๓.๕.๒ ตะกั่ว ต้องไม่เกิน ๑ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

๓.๕.๓ ทองแดง ต้องไม่เกิน ๑๐ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

๓.๕.๔ สังกะสี ต้องไม่เกิน ๑๐ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

๓.๕.๕ เหล็ก ต้องไม่เกิน ๑๐ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

๓.๖ วัตถุเจือปนอาหาร

๓.๖.๑ ห้ามใช้สีสังเคราะห์ทุกชนิด หากมีการแต่งสี ให้ใช้น้ำตาลเคี้ยวใหม่เท่านั้น

๓.๖.๒ หากมีการใช้ซิลิโคนไดออกไซด์ ให้ใช้ได้ไม่เกิน ๗๐ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

๓.๗ กรดอะซิติก

ต้องไม่น้อยกว่า ๔ กรัมต่อ ๑๐๐ ลูกบาศก์เซนติเมตร

๓.๘ กรดกำมะถันหรือกรดแอสซอร์

ต้องไม่พบ

๓.๙ เมทานอล

ต้องไม่เกิน ๔๒๐ มิลลิกรัมต่อลิตร

๔. สุขลักษณะ

๔.๑ สุขลักษณะในการทำน้ำส้มสายชูหมัก ให้เป็นไปตามคำแนะนำตามภาคผนวก ก.

๕. การบรรจุ

๕.๑ ให้บรรจุน้ำส้มสายชูหมักในภาชนะบรรจุที่สะอาด ทำด้วยแก้ว พลาสติกทนกรด หรือเครื่องเคลือบดินเผาปิดได้สนิท และสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งสกปรกภายนอกได้ วัสดุที่ใช้บุหรือใช้รองด้านในของฝาปิดหรือฝาชั้นใน ต้องไม่มีสี

๕.๒ ปริมาตรสุทธิของน้ำส้มสายชูหมักในแต่ละภาชนะบรรจุ ต้องไม่น้อยกว่าที่ระบุไว้ที่ฉลาก

๖. เครื่องหมายและฉลาก

๖.๑ ที่ภาชนะบรรจุน้ำส้มสายชูหมักทุกหน่วย อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน

(๑) ชื่อผลิตภัณฑ์

(๒) ปริมาณของกรดแอซิติก

(๓) ปริมาตรสุทธิ

(๔) วัน เดือน ปีที่ทำ และวัน เดือน ปีที่หมดอายุ หรือข้อความว่า “ควรบริโภคก่อน (วัน เดือน ปี)”

(๕) ชื่อผู้ทำ หรือสถานที่ทำ พร้อมสถานที่ตั้ง หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศ ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้ข้างต้น

๗. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

๗.๑ รุ่น ในที่นี้ หมายถึง น้ำส้มสายชูหมักที่มีส่วนประกอบเดียวกัน ทำในระยะเวลาเดียวกัน

๗.๒ การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้

๗.๒.๑ การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบสิ่งแปลกปลอม การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลากให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน ๓ หน่วยภาชนะบรรจุ เมื่อ

ตรวจสอบแล้วทุกตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ ๓.๔ ข้อ ๕. และข้อ ๖. จึงจะถือว่าน้ำส้มสายชูหมักรุ่มนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

๗.๒.๒ การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป สี และกลิ่น ให้ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบตามข้อ ๗.๒.๑ แล้ว จำนวน ๓ หน่วยภาชนะบรรจุ เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ ๓.๑ ถึงข้อ ๓.๓ จึงจะถือว่าน้ำส้มสายชูหมักรุ่มนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

๗.๒.๓ การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบสารปนเปื้อน วัตถุเจือปนอาหาร กรดแอสติคกรดกำมะถันหรือกรดแอสสึระ และเมทานอล ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน ๕ หน่วยภาชนะบรรจุ นำมาทำเป็นตัวอย่างรวม เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ ๓.๕ ถึงข้อ ๓.๙ จึงจะถือว่าน้ำส้มสายชูหมักรุ่มนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

๗.๓ เกณฑ์ตัดสิน

ตัวอย่างน้ำส้มสายชูหมักต้องเป็นไปตามข้อ ๗.๒.๑ ข้อ ๗.๒.๒ และข้อ ๗.๒.๓ ทุกข้อ จึงจะถือว่าน้ำส้มสายชูหมักรุ่มนั้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้

๘. การทดสอบ

๘.๑ การทดสอบลักษณะทั่วไป สี และกลิ่น

๘.๑.๑ ให้แต่งตั้งคณะผู้ตรวจสอบ ประกอบด้วยผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจสอบน้ำส้มสายชูหมักอย่างน้อย ๕ คน แต่ละคนจะแยกกันตรวจและให้คะแนนโดยอิสระ

๘.๑.๒ เทตัวอย่างน้ำส้มสายชูหมักลงในแก้วใสโดยมีกระดาษสีขาวเป็นฉากหลัง ตรวจสอบโดยการตรวจพินิจ

๘.๑.๓ หลักเกณฑ์การให้คะแนน ให้เป็นไปตามตารางที่ ๑

๘.๒ การทดสอบสิ่งแปลกปลอม ภาชนะบรรจุ และเครื่องหมายและฉลากให้ตรวจพินิจ

๘.๓ การทดสอบสารปนเปื้อน วัตถุเจือปนอาหาร กรดแอสติค กรดกำมะถันหรือกรดแอสสึระ และเมทานอลให้ใช้วิธีทดสอบตาม AOAC หรือวิธีทดสอบอื่นที่เป็นที่ยอมรับ

๘.๔ การทดสอบปริมาตรสุทธิให้ใช้เครื่องวัดปริมาตรที่เหมาะสม

ภาคผนวก ก

สัญลักษณ์

(ข้อ ๔.๑)

ก.๑ สถานที่ตั้งและอาคารที่ทำ

ก.๑.๑ สถานที่ตั้งตัวอาคารและที่ใกล้เคียง อยู่ในที่ที่จะไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย โดย

ก.๑.๑.๑ สถานที่ตั้งตัวอาคารและบริเวณโดยรอบ สะอาด ไม่มีน้ำขังและสกปรก

ก.๑.๑.๒ อยู่ห่างจากบริเวณหรือสถานที่ที่มีฝุ่น เขม่า ควัน มากผิดปกติ

ก.๑.๑.๓ ไม่อยู่ใกล้เคียงกับสถานที่น่ารังเกียจ เช่น บริเวณเพาะเลี้ยงสัตว์ แหล่งเก็บหรือกำจัดขยะ

ก.๑.๒ อาคารที่ทำมีขนาดเหมาะสม มีการออกแบบและก่อสร้างในลักษณะที่ง่ายแก่การบำรุงรักษา การทำความสะอาด และสะดวกในการปฏิบัติงาน โดย

ก.๑.๒.๑ พื้น ฝาผนัง และเพดานของอาคารที่ทำ ก่อสร้างด้วยวัสดุที่คงทน เรียบ ทำความสะอาด และซ่อมแซมให้อยู่ในสภาพที่ดีตลอดเวลา

ก.๑.๒.๒ แยกบริเวณที่ทำออกเป็นสัดส่วน ไม่อยู่ใกล้ห้องสุขา ไม่มีสิ่งของที่ไม่ใช้แล้วหรือไม่เกี่ยวข้องกับการทำอยู่ในบริเวณที่ทำ

ก.๑.๒.๓ พื้นที่ใช้ปฏิบัติงานไม่แออัด มีแสงสว่างเพียงพอ และมีการระบายอากาศที่เหมาะสม

ก.๒ เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ในการทำ

ก.๒.๑ ภาชนะหรืออุปกรณ์ในการทำที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ ทำจากวัสดุผิวเรียบ ไม่เป็นสนิม ล้างทำความสะอาดได้ง่าย

ก.๒.๒ เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ที่ใช้ สะอาด เหมาะสมกับการใช้งาน ไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อน ติดตั้งได้ง่าย มีปริมาณเพียงพอ รวมทั้งสามารถทำความสะอาดได้ง่ายและทั่วถึง

ก.๓ การควบคุมกระบวนการทำ

ก.๓.๑ วัตถุดิบและส่วนผสมในการทำ สะอาด มีคุณภาพดี มีการล้างหรือทำความสะอาดก่อนนำไปใช้

ก.๓.๒ การทำ การเก็บรักษา การขนย้าย และการขนส่ง ให้มีการป้องกันการปนเปื้อนและการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์

ก.๔ การสุขาภิบาล การบำรุงรักษา และการทำความสะอาด

ก.๔.๑ น้ำที่ใช้ล้างทำความสะอาดเครื่องมือ เครื่องจักร อุปกรณ์ และมือของผู้ทำ เป็นน้ำสะอาดและมีปริมาณเพียงพอ

ก.๔.๒ มีวิธีการป้องกันและกำจัดสัตว์นำเชื้อ แมลงและฝุ่นผง ไม่ให้เข้าในบริเวณที่ทำตามความเหมาะสม

ก.๔.๓ มีการกำจัดขยะ สิ่งสกปรก และน้ำทิ้ง อย่างเหมาะสม เพื่อไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อน กลับลงสู่ผลิตภัณฑ์

ก.๔.๔ สารเคมีที่ใช้ล้างทำความสะอาด และใช้กำจัดสัตว์นำเชื้อและแมลง ใช้ในปริมาณที่เหมาะสม และเก็บแยกจากบริเวณที่ทำ เพื่อไม่ให้ปนเปื้อนลงสู่ผลิตภัณฑ์ได้

ก.๕ บุคลากรและสุขลักษณะของผู้ทำ

ผู้ทำทุกคน ต้องรักษาความสะอาดส่วนบุคคลให้ดี เช่น สวมเสื้อผ้าที่สะอาด มีผ้าคลุมผมเพื่อป้องกันไม่ให้เส้นผมหล่นลงในผลิตภัณฑ์ ไม่ไว้เล็บยาว ล้างมือให้สะอาดทุกครั้ง ก่อนปฏิบัติงาน หลังการใช้ห้องสุขาและเมื่อมือสกปรก

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่ม (Completely Randomized Design; CRD) โดยใช้โปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างแต่ละตัวอย่างด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

1. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำหมักสมุนไพรในแต่ละช่วงของการหมัก

ตารางที่ ข-1 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรหมักในระยะเวลาหมักต่างๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ค่า pH	Between Groups	0.14	5.00	0.03	194.16	0.00
	Within Groups	0.00	12.00	0.00		
	Total	0.14	17.00			
ของแข็งที่ละลายน้ำได้ (องศาบริกซ์)	Between Groups	84.76	5.00	16.95	2034.31	0.00
	Within Groups	0.10	12.00	0.01		
	Total	84.86	17.00			
แอลกอฮอล์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	Between Groups	124.17	5.00	24.83	5709.17	0.00
	Within Groups	0.05	12.00	0.00		
	Total	124.23	17.00			
กรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก)	Between Groups	17.98	5.00	3.60	1088.71	0.00
	Within Groups	0.04	12.00	0.00		
	Total	18.02	17.00			
ยีสต์ (LogCFU/mL)	Between Groups	5.90	5.00	1.18	51.80	0.00
	Within Groups	0.27	12.00	0.02		
	Total	6.17	17.00			
แบคทีเรีย (LogCFU/mL)	Between Groups	3.70	5.00	0.74	309.74	0.00
	Within Groups	0.03	12.00	0.00		
	Total	3.73	17.00			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความแตกต่างของค่า pH ในสมุนไพรมักที่ระยะเวลาหมักต่างๆ

เดือน	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
6	3	3.12			
5	3	3.14	3.14		
4	3		3.15		
3	3			3.28	
2	3			3.28	
1	3				3.38
Sig.		0.33	0.20	0.74	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสมุนไพรมักที่ระยะเวลาหมักต่างๆ

เดือน	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
6	3	12.23					
3	3		15.17				
5	3			16.47			
2	3				16.77		
4	3					17.57	
1	3						19.23
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของแอลกอฮอล์ในสมุนไพรหมักที่ระยะเวลาหมักต่างๆ

เดือน	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
1	3	0.43					
2	3		1.54				
6	3			2.59			
5	3				4.32		
4	3					6.19	
3	3						7.99
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก)ในสมุนไพรหมักที่ระยะเวลาหมักต่างๆ

เดือน	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	
1	3	2.22					
2	3		3.10				
3	3			3.19			
4	3				4.35		
5	3					4.67	
6	3					5.04	
Sig.		1.00	0.77		1.00	1.00	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของปริมาณยีสต์ในสมุนไพรมักที่ระยะเวลาหมักต่างๆ

เดือน	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	3	3.34			
6	3		3.93		
5	3		4.10	4.10	
4	3		4.14	4.14	
2	3			4.28	
3	3				5.26
Sig.		1.00	0.14	0.18	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียในสมุนไพรมักที่ระยะเวลาหมักต่างๆ

เดือน	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
1	3	4.06				
2	3		4.27			
3	3			4.39		
5	3				5.04	
6	3					5.14
4	3					5.19
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	0.23

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

YM1-05	3	0.96											
YM1-11	3	1.01											
YM6-10	3		1.99										
YM6-06	3		2.54	2.54									
YM6-07	3		2.57	2.57									
YM6-02	3			2.75									
YM1-08	3			2.90	2.90								
YM6-04	3			3.05	3.05								
YM1-10	3			3.12	3.12								
YM6-05	3			3.21	3.21								
YM1-09	3				3.51	3.51							
YM1-16	3					3.87	3.87						
YM1-17	3					4.05	4.05	4.05					
YM6-12	3					4.08	4.08	4.08					
YM6-13	3					4.16	4.16	4.16	4.16				
YM6-20	3					4.17	4.17	4.17	4.17				
YM6-14	3						4.34	4.34	4.34	4.34			
YM6-16	3						4.34	4.34	4.34	4.34			
YM2-13	3						4.38	4.38	4.38	4.38			
YM6-17	3						4.47	4.47	4.47	4.47			
YM1-20	3						4.49	4.49	4.49	4.49	4.49		
YM6-15	3						4.51	4.51	4.51	4.51	4.51		
YM6-11	3						4.53	4.53	4.53	4.53	4.53		
YM6-18	3						4.56	4.56	4.56	4.56	4.56		
YM6-09	3						4.59	4.59	4.59	4.59	4.59	4.59	
YM1-14	3							4.78	4.78	4.78	4.78	4.78	4.78
YM6-08	3								4.82	4.82	4.82	4.82	4.82
YM6-03	3									4.93	4.93	4.93	4.93
YM1-15	3									4.98	4.98	4.98	4.98
YM5-02	3										5.20	5.20	5.20
YM5-03	3											5.28	5.28
YM1-12	3												5.30
YM1-19	3												5.38
Sig.		0.13	0.07	0.06	0.08	0.06	0.05	0.05	0.08	0.08	0.05	0.05	0.09

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตาราง ข-3 ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากยีสต์ที่แยกได้ 8 ไอโซเลตแรกในอาหารเหลว YPD ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.14	7	0.16	1.00	0.47
Within Groups	2.61	16	0.16		
Total	3.75	23			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความแตกต่างของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากยีสต์ที่แยกได้ 8 ไอโซเลตแรกในอาหารเหลว YPD ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

Isolation	N	Subset for alpha = 0.05
		1
YM1-14	3	4.78
YM6-08	3	4.82
YM6-03	3	4.93
YM1-15	3	4.98
YM5-02	3	5.20
YM5-03	3	5.28
YM1-12	3	5.30
YM1-19	3	5.38
Sig.		0.13

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ข-4 ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากยีสต์ที่แยกได้ 8 ไอโซเลตแรกในอาหารน้ำสมุนไพรม ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.25	7	0.46	4.02	0.01
Within Groups	1.85	16	0.12		
Total	5.10	23			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความแตกต่างของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากยีสต์ที่แยกได้ 8 ไอโซเลตแรกในอาหารน้ำสมุนไพรร
ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

Isolation	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
YM6-08	3	0.33	
YM1-15	3	0.38	
YM1-12	3	0.43	
YM1-14	3	0.82	0.82
YM5-02	3	0.96	0.96
YM5-03	3	0.97	0.97
YM1-19	3		1.30
YM6-03	3		1.30
Sig.		0.06	0.13

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

3. การศึกษาความสามารถในการผลิตกรดทั้งหมดของแบคทีเรียอะซิติกที่คัดแยกได้ในอาหาร YPD และอาหารสมุนไพรร

ตารางที่ ข-5 ปริมาณกรดทั้งหมดที่ผลิตจากแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ 50 ไอโซเลตแรกในอาหาร YEC ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	41.10	49	0.84	4.28	0.00
Within Groups	19.63	100	0.20		
Total	60.72	149			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความแตกต่างของปริมาณกรดอะซิดิกที่ผลิตจากยีสต์ที่แยกได้ 50 ไอโซเลตแรกในอาหารเหลว YEC ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

Isolation	N	Subset for alpha = 0.05													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
EM1-04	3	2.33													
CM1-05	3	2.36	2.36												
CM2-11	3	2.39	2.39												
EM6-06	3	2.50	2.50	2.50											
CM1-07	3	2.51	2.51	2.51											
EM4-01	3	2.52	2.52	2.52											
CM4-01	3	2.57	2.57	2.57	2.57										
CM6-01	3	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59									
EM1-03	3	2.59	2.59	2.59	2.59	2.59									
CM6-02	3	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65								
CM4-05	3	2.73	2.73	2.73	2.73	2.73	2.73	2.73							
CM1-11	3	2.73	2.73	2.73	2.73	2.73	2.73	2.73	2.73						
EM3-08	3	2.81	2.81	2.81	2.81	2.81	2.81	2.81	2.81	2.81					
CM5-02	3	2.95	2.95	2.95	2.95	2.95	2.95	2.95	2.95	2.95	2.95				

EM5-08	3	3.04	3.04	3.04	3.04	3.04	3.04	3.04	3.04	3.04	3.04				
CM1-13	3	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13			
EM5-06	3	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14			
CM1-01	3		3.22	3.22	3.22	3.22	3.22	3.22	3.22	3.22	3.22	3.22	3.22		
CM3-02	3			3.27	3.27	3.27	3.27	3.27	3.27	3.27	3.27	3.27	3.27	3.27	
EM3-02	3			3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	
CM1-09	3			3.32	3.32	3.32	3.32	3.32	3.32	3.32	3.32	3.32	3.32	3.32	
CM3-12	3			3.34	3.34	3.34	3.34	3.34	3.34	3.34	3.34	3.34	3.34	3.34	
CM3-03	3				3.40	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40
CM3-04	3				3.41	3.41	3.41	3.41	3.41	3.41	3.41	3.41	3.41	3.41	3.41
EM3-09	3				3.44	3.44	3.44	3.44	3.44	3.44	3.44	3.44	3.44	3.44	3.44
EM1-12	3				3.44	3.44	3.44	3.44	3.44	3.44	3.44	3.44	3.44	3.44	3.44
EM3-10	3					3.47	3.47	3.47	3.47	3.47	3.47	3.47	3.47	3.47	3.47
EM1-15	3						3.51	3.51	3.51	3.51	3.51	3.51	3.51	3.51	3.51
CM1-08	3						3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52	3.52
EM2-04	3						3.54	3.54	3.54	3.54	3.54	3.54	3.54	3.54	3.54
CM2-09	3							3.54	3.54	3.54	3.54	3.54	3.54	3.54	3.54
CM3-06	3							3.56	3.56	3.56	3.56	3.56	3.56	3.56	3.56
CM1-02	3							3.59	3.59	3.59	3.59	3.59	3.59	3.59	3.59

EM1-07	3							3.62	3.62	3.62	3.62	3.62	3.62	3.62	3.62
EM2-02	3								3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63
EM3-11	3								3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63
CM3-13	3								3.64	3.64	3.64	3.64	3.64	3.64	3.64
CM3-05	3								3.64	3.64	3.64	3.64	3.64	3.64	3.64
EM2-01	3								3.67	3.67	3.67	3.67	3.67	3.67	3.67
EM3-05	3								3.69	3.69	3.69	3.69	3.69	3.69	3.69
EM2-03	3									3.76	3.76	3.76	3.76	3.76	3.76
CM3-11	3									3.76	3.76	3.76	3.76	3.76	3.76
CM3-10	3									3.79	3.79	3.79	3.79	3.79	3.79
EM3-03	3										3.90	3.90	3.90	3.90	3.90
CM3-09	3										3.92	3.92	3.92	3.92	3.92
EM3-06	3											3.95	3.95	3.95	3.95
CM3-08	3												4.06	4.06	4.06
EM1-14	3													4.15	4.15
EM3-01	3													4.16	4.16
EM3-07	3														4.25
Sig.		0.07	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.07	0.05	0.08	0.07	0.05	0.07

ตารางที่ ข-6 ปริมาณกรดทั้งหมดผลิตจากแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ 10 ไอโซเลตแรกในอาหารเหลว YEC ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.873	9	0.097	3.783	0.006
Within Groups	0.513	20	0.026		
Total	1.385	29			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความแตกต่างของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากยีสต์ที่แยกได้ 10 ไอโซเลตแรกในอาหารเหลว YPD ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

Isolation	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
EM2-03	3	3.76		
CM3-11	3	3.76		
CM3-10	3	3.79		
CM3-08	3	3.83		
EM3-03	3	3.90	3.90	
CM3-09	3	3.92	3.92	
EM3-06	3	3.95	3.95	
EM1-14	3		4.15	4.15
EM3-01	3		4.16	4.16
EM3-07	3			4.25
Sig.		0.22	0.08	0.50

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ข-7 ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากยีสต์ที่แยกได้ 10 ไอโซเลตแรกในอาหารน้ำสมุนไพรมัน ในสภาวะ
 หนึ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15.21	9	1.69	34.36	0.00
Within Groups	0.98	20	0.05		
Total	16.20	29			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความแตกต่างของปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตจากแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ 10 ไอโซเลตในอาหาร
 น้ำสมุนไพรมัน ในสภาวะหนึ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

Isolation	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
EM3-07	3	1.00						
EM3-06	3		2.05					
CM3-08	3		2.36	2.36				
CM3-11	3		2.38	2.38				
CM3-10	3			2.55	2.55			
CM3-09	3			2.69	2.69	2.69		
EM3-01	3				2.82	2.82		
EM1-14	3					3.06	3.06	
EM3-03	3						3.42	3.42
EM2-03	3							3.67
Sig.		1.00	0.10	0.10	0.17	0.07	0.06	0.18

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4. การศึกษาความสามารถของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่ตัดแยกได้ในการผลิตน้ำสมุนไพร

4.1 การศึกษากระบวนการหมักแบบขั้นตอนเดียว

ตารางที่ ช-8 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสภาวะนี้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
pH	Between Groups	1.38	13	0.11	92.34	0.00
	Within Groups	0.03	28	0.00		
	Total	1.41	41			
น้ำตาลทั้งหมด	Between Groups	2119370.45	13	163028.50	1682.78	0.00
	Within Groups	2712.66	28	96.88		
	Total	2122083.11	41			
แอลกอฮอล์	Between Groups	560.23	13	43.09	434.55	0.00
	Within Groups	2.78	28	0.10		
	Total	563.00	41			
กรดทั้งหมด	Between Groups	74.58	13	5.74	465.05	0.00
	Within Groups	0.35	28	0.01		
	Total	74.92	41			
<i>S. pombe</i>	Between Groups	127.12	13	9.78	377.42	0.00
	Within Groups	0.73	28	0.03		
	Total	127.85	41			
น้ำตาลทั้งหมด	Between Groups	175.20	13	13.48	192.70	0.00
	Within Groups	1.96	28	0.07		
	Total	177.16	41			
สารประกอบฟีนอลิก	Between Groups	4759661.30	13	366127.79	169.13	0.00
	Within Groups	60614.39	28	2164.80		
	Total	4820275.69	41			
	Between Groups	372.36	13	28.64	11.25	0.00

ค่าการดักจับ อนุโมลิสระ DPPH	Within Groups	71.27	28	2.55		
	Total	443.63	41			
ค่า IC ₅₀ ของ DPPH	Between Groups	0.06	13	0.00	986.42	0.00
	Within Groups	0.00	28	0.00		
	Total	0.06	41			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความแตกต่างของค่า pH ระหว่างกระบวนการหมักร่วมขึ้นตอนเดียวด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน

ระยะเวลา หมัก (วัน)	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
32	3	3.07					
28	3	3.09					
24	3		3.20				
0	3			3.26			
20	3			3.31			
18	3				3.37		
16	3					3.45	
2	3					3.48	
4	3						3.55
6	3						3.56
12	3						3.57
8	3						3.58
14	3						3.59
10	3						3.59
Sig.		0.63	1.00	0.10	1.00	0.34	0.20

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของน้ำตาลทั้งหมดระหว่างกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
32	3	45.83			
18	3	46.68			
20	3	47.22			
28	3	48.75			
12	3	48.97			
24	3	49.88			
14	3	50.08			
16	3	50.48			
10	3	55.48			
6	3	56.94			
8	3	57.41			
4	3		125.15		
2	3			609.88	
0	3				771.14
Sig.		0.23	1.00	1.00	1.00

ความแตกต่างของแอลกอฮอล์ระหว่างกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	N	Subset for alpha = 0.05										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
32	3	0.23										
28	3		0.89									
0	3			1.62								
24	3				2.77							
20	3					3.71						
18	3						4.31					
2	3							4.41				
16	3								6.06			

4	3								8.54			
14	3								8.59			
12	3									9.16		
10	3									9.31		
8	3										10.66	
6	3											11.63
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.69	1.00	0.87	0.57	1.00	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ระหว่างกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสภาวะหนึ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
2	3	1.27					
0	3	1.31					
4	3	1.37					
6	3	1.37					
10	3	1.39					
8	3	1.42					
16	3	1.43					
14	3	1.44					
12	3	1.45					
18	3		2.33				
20	3			2.80			
24	3				4.16		
28	3					4.68	
32	3						5.12
Sig.		0.10	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของยีสต์ *S. pombe* ระหว่างกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	N	Subset for alpha = 0.05										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
32	3	3.38										
28	3	3.48										
24	3		3.89									
20	3			4.72								
18	3				5.03							
16	3				5.18	5.18						
14	3					5.36						
0	3						6.34					
12	3						6.39					
10	3							6.90				
8	3								7.38			
6	3									8.01		
2	3										8.36	
4	3											8.93
Sig.		0.45	1.00	1.00	0.25	0.19	0.73	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของแบคทีเรีย *A. pasteurianus* ระหว่างกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
12	3	1.84								
10	3		2.73							
8	3			3.61						
14	3			3.72						
32	3				5.32					
16	3				5.43					
28	3					6.43				

18	3					6.48	6.48			
2	3					6.72	6.72			
0	3						6.91			
6	3							7.47		
24	3								7.93	
20	3									8.38
4	3									8.42
Sig.		1.00	1.00	0.69	0.63	0.22	0.07	1.00	1.00	0.85

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของปริมาณสารประกอบพีนอลิกระหว่างกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสภาวะหนึ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
0	3	470.84							
2	3		1424.85						
4	3			1507.96					
6	3			1538.80					
8	3				1632.08				
10	3				1635.97	1635.97			
12	3				1655.99	1655.99			
14	3				1699.71	1699.71	1699.71		
16	3				1703.54	1703.54	1703.54		
18	3				1716.89	1716.89	1716.89		
20	3					1721.77	1721.77		
24	3						1785.82	1785.82	
28	3							1834.10	
32	3								1954.54
Sig.		1.00	1.00	0.42	0.06	0.05	0.05	0.21	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH (ร้อยละ) ระหว่างกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0	3	89.83		
2	3		94.56	
4	3		95.90	
14	3			99.81
16	3			99.95
18	3			99.98
28	3			100.02
20	3			100.03
32	3			100.05
8	3			100.06
24	3			100.06
12	3			100.18
10	3			100.19
6	3			100.34
Sig.		1.00	0.31	0.73

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของค่า IC_{50} ของ DPPH ($\mu\text{L}/\text{mL}$) ระหว่างกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียวด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
32	3	0.017						
28	3	0.019	0.019					
20	3	0.019	0.019					
24	3	0.020	0.020					

18	3	0.020	0.020	0.020				
16	3	0.022	0.022	0.022				
12	3		0.023	0.023				
14	3		0.023	0.023				
10	3			0.024	0.024			
8	3				0.028	0.028		
6	3					0.028		
4	3					0.029		
2	3						0.034	
0	3							0.171
Sig.		0.057	0.060	0.076	0.050	0.489	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4.2 การศึกษากระบวนการหมักแยกสองขั้นตอน

ตารางที่ ข-9 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน

Anova

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
pH	Between Groups	1.01	11	0.09	295.36	0.00
	Within Groups	0.01	24	0.00		
	Total	1.02	35			
น้ำตาลทั้งหมด	Between Groups	277229.89	11	25202.72	414.15	0.00
	Within Groups	1460.49	24	60.85		
	Total	278690.37	35			
แอลกอฮอล์	Between Groups	119.26	11	10.84	511.92	0.00
	Within Groups	0.51	24	0.02		
	Total	119.77	35			
กรดทั้งหมด	Between Groups	60.34	11	5.49	281.73	0.00

20	3	0.54									
18	3		0.82								
0	3			1.39							
16	3			1.47							
14	3				1.80						
12	3					2.35					
2	3						3.04				
10	3							3.66			
8	3								4.46		
6	3									5.28	
4	3										6.18
Sig.		0.06	1.00	0.51	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของกรดทั้งหมดระหว่างกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
2	3	1.25						
4	3	1.27						
0	3	1.31						
6	3	1.35						
8	3		1.85					
10	3			2.41				
12	3				3.30			
14	3					3.78		
16	3					3.84		
18	3					3.94		
20	3						4.20	
22	3							4.91
Sig.		0.43	1.00	1.00	1.00	0.20	1.00	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของยีสต์ *S. pombe* ระหว่างกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
6	3	0.00			
8	3	0.00			
10	3	0.00			
12	3	0.00			
14	3	0.00			
16	3	0.00			
18	3	0.00			
20	3	0.00			
22	3	0.00			
0	3		6.28		
4	3			8.98	
2	3				9.03
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของแบคทีเรีย *A. pasteurianus* ระหว่างกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	3	0.00								
2	3	0.00								
22	3		3.88							
20	3			4.29						
18	3				5.40					
16	3					6.12				

14	3						6.73			
4	3							7.08		
12	3								7.69	
10	3								7.77	
6	3									8.26
8	3									8.40
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.53	0.24

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของสารประกอบฟีนอลิกระหว่างกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสถานะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
0	3	477.53						
4	3		1507.41					
6	3		1514.74					
8	3		1589.89	1589.89				
10	3			1650.18	1650.18			
12	3			1693.58	1693.58	1693.58		
14	3			1693.73	1693.73	1693.73		
2	3				1718.29	1718.29		
16	3				1727.83	1727.83	1727.83	
18	3					1785.15	1785.15	
20	3						1827.41	1827.41
22	3							1908.38
Sig.		1.00	0.11	0.05	0.15	0.08	0.06	0.10

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ระหว่างกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสภาวะหนึ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	89.05			
2	3		96.17		
8	3			98.07	
4	3			98.15	
6	3			98.38	
10	3				99.81
12	3				100.03
14	3				100.05
22	3				100.17
16	3				100.72
18	3				100.43
20	3				100.53
Sig.		1.00	1.00	0.37	0.05

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของค่า IC_{50} ของ DPPH ระหว่างกระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนด้วย *S. pombe* YM1-12 และ *A. pasteurianus* EM2-03 ในสภาวะหนึ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
22	3	0.017		
20	3	0.019	0.019	
14	3	0.020	0.020	
16	3	0.020	0.020	
18	3	0.020	0.020	
12	3	0.020	0.020	
2	3	0.022	0.022	

4	3	0.022	0.022	
10	3	0.022	0.022	
8	3	0.023	0.023	
6	3		0.023	
0	3			0.102
Sig.		0.050	0.068	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4.5 การเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำหมักสมุนไพรที่ได้จากกระบวนการหมักแบบร่วม ขั้นตอนเดียว กระบวนการหมักแยกสองขั้นตอนของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากน้ำหมัก สมุนไพรทางการค้า

ตารางที่ ข-10 คุณภาพทางเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากกระบวนการ
หมักร่วมขั้นตอนเดียว กระบวนการหมักแยกสองขั้นตอน และกระบวนการหมักทางการ
ค้า

Anova

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
pH	Between Groups	0.00	2	0.00	2.94	0.13
	Within Groups	0.00	6	0.00		
	Total	0.01	8			
น้ำตาลทั้งหมด	Between Groups	221693.14	2	110846.57	253.39	0.00
	Within Groups	2624.76	6	437.46		
	Total	224317.91	8			
แอลกอฮอล์	Between Groups	10.34	2	5.17	506.45	0.00
	Within Groups	0.06	6	0.01		
	Total	10.40	8			
กรดอะซิติก	Between Groups	0.07	2	0.03	2.02	0.21
	Within Groups	0.10	6	0.02		
	Total	0.17	8			
	Between Groups	462338.45	2	231169.23	72.10	0.00

สารประกอบ ฟีนอลิก	Within Groups	19236.93	6	3206.16		
	Total	481575.39	8			
IC50	Between Groups	0.00	2.00	0.00	6.00	0.04
	Within Groups	0.00	6.00	0.00		
	Total	0.00	8.00			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความแตกต่างของค่า pH ระหว่างน้ำสมุนไพรมักที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมชั้นตอนเดียว การหมักแยกสองชั้นตอน และการหมักทางการค้า

น้ำสมุนไพรมัก	N	Subset for alpha = 0.05
		1
การหมักทางการค้า	3	3.03
การหมักแยกสองชั้นตอน	3	3.04
การหมักร่วมชั้นตอนเดียว	3	3.07
Sig.		0.07

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของกรดทั้งหมดระหว่างน้ำสมุนไพรมักที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมชั้นตอนเดียว การหมักแยกสองชั้นตอน และการหมักทางการค้า

น้ำสมุนไพรมัก	N	Subset for alpha = 0.05
		1
การหมักแยกสองชั้นตอน	3	4.91
การหมักทางการค้า	3	5.05
การหมักร่วมชั้นตอนเดียว	3	5.12
Sig.		0.10

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของน้ำตาลทั้งหมดระหว่างน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอน และการหมักทางการค้า

น้ำสมุนไพรหมัก	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
การหมักขั้นตอนเดียว	3	45.88	
การหมักทางการค้า	3		334.26
การหมักสองขั้นตอน	3		396.22
Sig.		1.00	0.07

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของแอลกอฮอล์ระหว่างน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอน และการหมักทางการค้า

น้ำสมุนไพรหมัก	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
การหมักร่วมขั้นตอนเดียว	3	0.23	
การหมักแยกสองขั้นตอน	3	0.30	
การหมักทางการค้า	3		1.54
Sig.		0.45	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของฟีนอลิกระหว่างน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอน และการหมักทางการค้า

น้ำสมุนไพรหมัก	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
การหมักสองขั้นตอน	3	1908.38	
การหมักขั้นตอนเดียว	3	1954.54	
การหมักทางการค้า	3		2410.60
Sig.		0.36	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของค่า IC_{50} ของอนุมูลอิสระ DPPH ระหว่างน้ำสมุนไพรหมักที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอน และการหมักทางการค้า

น้ำสมุนไพรหมัก	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
การหมักทางการค้า	3	0.016	
การหมักขั้นตอนเดียว	3		0.017
การหมักสองขั้นตอน	3		0.017
Sig.		1.000	1.000

5. การปรับปรุงรสชาติผลิตภัณฑ์และการทดสอบทางประสาทสัมผัส

ตารางที่ ข-11 ความแตกต่างคุณลักษณะทางเคมีของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำสมุนไพรจากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอน และการหมักทางการค้าทางการค้า

Anova

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
pH	Between Groups	0.00	2	0.00	0.64	0.56
	Within Groups	0.00	6	0.00		
	Total	0.00	8			
น้ำตาลทั้งหมด	Between Groups	52258.92	2	26129.46	32.67	0.00
	Within Groups	4799.16	6	799.86		
	Total	57058.07	8			
แอลกอฮอล์	Between Groups	0.35	2	0.18	4246.52	0.00
	Within Groups	0.00	6	0.00		
	Total	0.35	8			
กรดอะซิติก	Between Groups	0.55	2	0.28	96.06	0.00
	Within Groups	0.02	6	0.00		
	Total	0.57	8			
สารประกอบฟีนอลิก	Between Groups	642225.47	2	321112.73	592.07	0.00
	Within Groups	3254.15	6	542.36		
	Total	645479.61	8			
ค่า IC_{50} ของ DPPH	Between Groups	0.00	2	0.00	2.53	0.16
	Within Groups	0.00	6	0.00		
	Total	0.00	8			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความแตกต่างของค่า pH ระหว่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมชั้นตอนเดียว การหมักแยกสองชั้นตอน และการหมักทางการค้าทางการค้า

เครื่องดื่มสมุนไพร	N	Subset for alpha = 0.05
		1
การหมักชั้นตอนเดียว	3	3.26
การหมักทางการค้า	3	3.26
การหมักสองชั้นตอน	3	3.27
Sig.		0.32

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ระหว่างผลิตภัณฑ์ระหว่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมชั้นตอนเดียว การหมักแยกสองชั้นตอน และการหมักทางการค้าทางการค้า

เครื่องดื่มสมุนไพร	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
การหมักทางการค้า	3	2.15		
การหมักสองชั้นตอน	3		2.61	
การหมักชั้นตอนเดียว	3			2.73
Sig.		1.00	1.00	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของน้ำตาลทั้งหมดระหว่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมชั้นตอนเดียว การหมักแยกสองชั้นตอน และการหมักทางการค้า

เครื่องดื่มสมุนไพร	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
การหมักชั้นตอนเดียว	3	241.20	
การหมักทางการค้า	3		374.07
การหมักสองชั้นตอน	3		421.17
Sig.		1.00	0.09

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของแอลกอฮอล์ระหว่างผลิตภัณฑ์ระหว่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอน และการหมักทางการค้าทางการค้า

เครื่องดื่มน้ำสมุนไพร	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
การหมักสองขั้นตอน	3	0.10		
การหมักขั้นตอนเดียว	3		0.16	
การหมักทางการค้า	3			0.55
Sig.		1.00	1.00	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของสารประกอบฟีนอลิกระหว่างผลิตภัณฑ์ระหว่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอน และการหมักทางการค้าทางการค้า

เครื่องดื่มน้ำสมุนไพร	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
การหมักขั้นตอนเดียว	3	1134.82		
การหมักสองขั้นตอน	3		1248.99	
การหมักทางการค้า	3			1749.88
Sig.		1.00	1.00	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความแตกต่างของค่า IC₅₀ ของอนุมูลอิสระ DPPH ระหว่างผลิตภัณฑ์ระหว่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอน และการหมักทางการค้าทางการค้า

เครื่องดื่มน้ำสมุนไพร	N	Subset for alpha = 0.05
		1
การหมักทางการค้า	3	0.027
การหมักร่วมขั้นตอนเดียว	3	0.027
การหมักแยกสองขั้นตอน	3	0.028
Sig.		0.075

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

6. การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ตารางที่ ข-12 การทดสอบทางประสาธสัมพันธ์ของผลิตภัณฑ์เครื่องตีมน้ำสมุนไพรที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอน และการหมักทางการค้า

Anova

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความใส	Between Groups	1.75	2	0.87	0.73	0.48
	Within Groups	100.07	84	1.19		
	Total	101.82	86			
สี	Between Groups	5.79	2	2.90	2.04	0.14
	Within Groups	119.31	84	1.42		
	Total	125.10	86			
กลิ่น	Between Groups	7.89	2	3.94	1.28	0.28
	Within Groups	259.03	84	3.08		
	Total	266.92	86			
ความหวาน	Between Groups	2.30	2	1.15	0.59	0.55
	Within Groups	162.55	84	1.94		
	Total	164.85	86			
ความเปรี้ยว	Between Groups	8.44	2	4.22	2.50	0.09
	Within Groups	141.52	84	1.68		
	Total	149.95	86			
ความชอบโดยรวม	Between Groups	8.02	2	4.01	3.74	0.03
	Within Groups	90.21	84	1.07		
	Total	98.23	86			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความแตกต่างของความใสระหว่างเครื่องตีมน้ำสมุนไพรที่ได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอน และการหมักทางการค้า

Sample	N	Subset for alpha = 0.05
		1
การหมักทางการค้า	30	6.53
การหมักร่วมขั้นตอนเดียว	30	6.65
การหมักแยกสองขั้นตอน	30	6.88
Sig.		0.208

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความแตกต่างของสีระหว่างเครื่องตีมน้ำสมุนไพรได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอน และการหมักทางการค้า

Sample	N	Subset for alpha = 0.05
		1
การหมักทางการค้า	30	6.18
การหมักร่วมขั้นตอนเดียว	30	6.35
การหมักแยกสองขั้นตอน	30	6.76
Sig.		0.069

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความแตกต่างของกลิ่นระหว่างเครื่องตีมน้ำสมุนไพรได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอน และการหมักทางการค้า

Sample	N	Subset for alpha = 0.05
		1
การหมักร่วมขั้นตอนเดียว	30	5.00
การหมักทางการค้า	30	5.06
การหมักแยกสองขั้นตอน	30	5.65
Sig.		0.155

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความแตกต่างของความหวานระหว่างเครื่องตีมน้ำสมุนไพรได้จากกระบวนการหมักร่วมขั้นตอนเดียว การหมักแยกสองขั้นตอน และการหมักทางการค้า

Sample	N	Subset for alpha = 0.05
		1
การหมักทางการค้า	30	5.88
การหมักร่วมขั้นตอนเดียว	30	6.06
การหมักแยกสองขั้นตอน	30	6.18
Sig.		0.429

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความแตกต่างของความแปรปรวนระหว่างเครื่องต้มน้ำสมุนไพรได้จากกระบวนการหมักร่วมชั้นตอนเดียว การหมักแยกสองชั้นตอน และการหมักทางการค้า

Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
การหมักร่วมชั้นตอนเดียว	30	5.59	
การหมักทางการค้า	30	5.88	5.88
การหมักแยกสองชั้นตอน	30		6.35
Sig.		0.365	0.148

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 34.000.

ความแตกต่างของความชอบโดยรวมระหว่างเครื่องต้มน้ำสมุนไพรได้จากกระบวนการหมักร่วมชั้นตอนเดียว การหมักแยกสองชั้นตอน และการหมักทางการค้า

Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
การหมักทางการค้า	30	6.06	
การหมักร่วมชั้นตอนเดียว	30	6.06	
การหมักแยกสองชั้นตอน	30		6.65
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวรุจิรา ทองเหลือดี
วัน เดือน ปีเกิด	21 กรกฎาคม 2537
ที่อยู่ปัจจุบัน	234/100 ม.1 ซ.วัดคู่สร้าง ถ.สุขสวัสดิ์ ต.ในคลองบางปลากด อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ 10290
ประวัติการศึกษา	(2558) วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม เกردเฉลี่ย 3.33 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	รุจิรา ทองเหลือดี ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ และดวงใจ โอชัยกุล. 2562. “การคัดแยกและคัดเลือกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกจากกระบวนการหมักลูกแอปเปิ้ลแม่.” 1420-1428. ใน งานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 11. กรุงเทพฯ.