การพัฒนาการผลิตไซเดอร์จากสาโทข้าวลืมผัว (*Oryza sativa* Linn.) ด้วยเชื้อบริสุทธิ์

วิทยานิพนธ์
ของ
พิกุลทอง ผิวเหลือง

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤศจิกายน 2562
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

การพัฒนาการผลิตไซเดอร์จากสาโทข้าวลืมผัว (*Oryza sativa* Linn.) ด้วยเชื้อบริสุทธิ์

วิทยานิพนธ์
ของ
พิกุลทอง ผิวเหลือง

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤศจิกายน 2562
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Development of Cider from Leum Pua Rice (*Oryza sativa* Linn.) Sato by Pure Starter Culture

Pikulthong Paewlueng

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Biotechnology)
November 2019

Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวพิกุลทอง ผิวเหลือง แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ
(ผศ. ดร. วิจิตรา หลวงอินทร์)
....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผศ. ดร. ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม)
....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผศ. ดร. สุรชัย รัตนสุข)
....กรรมการ
(ผศ. ดร. บุษกร ทองใบ)
....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผศ. ดร. อรอนงค์ ภูสีฤทธิ์)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

....	....
(รศ. ดร. อนุชิตา มุ่งงาม)	(ผศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีคณะเทคโนโลยี	คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง การพัฒนาการผลิตไซเดอร์จากสาโทข้าวลืมผัว (*Oryza sativa* Linn.) ด้วยเชื้อบริสุทธิ์
ผู้วิจัย พิกุลทอง ผิวเหลือง
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย รัตนสุข
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** เทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2562

บทคัดย่อ

ไซเดอร์ข้าวลืมผัวเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพในแถบเอเชีย และมีส่วนผสมที่หลากหลายที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ กรดอะมิโน และกรดอินทรีย์ที่สูง จากการพัฒนาลูกแป้งสาโทด้วยเชื้อบริสุทธิ์โดยการแปรผันอัตราส่วนรา (*Aspergillus oryzae* LPP3) ต่อยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae* TISTR5013) (กรัมต่อมิลลิลิตร) เป็น 1:1 (สูตร 1) 2:1 (สูตร 2) และ 3:1 (สูตร 3) เพื่อหมักสาโทเป็นเวลา 15 วันเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไซเดอร์ข้าวลืมผัว พบว่าสาโทหมักด้วยลูกแป้งสูตร 3 ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดเท่ากับ 12.05±0.06 เปอร์เซ็นต์ จากการผลิตไซเดอร์โดยเติมเชื้อแบคทีเรียผลิตกรด *Acetobacter aceti* TISTR102 (~10 เปอร์เซ็นต์) ในสาโททั้ง 3 สูตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพ เคมี และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของไซเดอร์ที่ผลิต พบว่าไซเดอร์สูตร 3 มีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุด 5.57±0.15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแอลกอฮอล์ 2.11±0.02 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด 5.15±0.02 องศาบริกซ์ pH 3.39±0.02 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 54.92±1.01 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์สารระเหยด้วยเครื่อง GC-MS สารที่พบได้แก่ กรดคาร์บอมิก กรดโพรพิโอลิก เอทานอล เอทิลอะซิเตท 2,3-บิวเทนไดออล กรดโพรพาโนอิก และกลีเซอรอล ซึ่งมีผลต่อกลิ่นและรสชาติ และวิเคราะห์กรดอินทรีย์ต่าง ๆ ด้วยเครื่อง HPLC ได้แก่ กรดซิติก ทาร์ทาริก กรดแลคติก กรดซักซินิก กรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก จากการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของไซเดอร์ข้าวลืมผัว พบว่าไซเดอร์สูตรที่ 2 มีค่ากิจกรรมสูงสุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH มีค่า 0.49±0.01 กรัมโทรลอกต่อลิตร FRAB มีค่า 1.46±0.01 กรัมเฟอรัสซัลเฟตต่อลิตร ปริมาณฟีนอลิก 9.47±0.02 กรัมแกลลิกต่อลิตร ปริมาณฟลาโวนอยด์ 0.69±0.01 กรัมรูทีนต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณสูงในวันที่ 4 ของการหมัก และปริมาณแอนโทไซยานินมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ เมื่อหมักเป็นระยะเวลา 7 วัน มีค่า 3.01±0.04 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 7-points hedonic scale test โดยใช้ผู้

ทดสอบจำนวน 30 คน พบว่าไซเดอร์สูตรที่ 2 มีระดับความพึงพอใจโดยรวมมากที่สุด

คำสำคัญ : ข้าวเหนียวลืมผัว, ลูกแป้ง, จุลินทรีย์, สาโท, ไซเดอร์

TITLE Development of Cider from Leum Pua Rice (*Oryza sativa* Linn.) Sato by Pure Starter Culture
AUTHOR Pikulthong Paewlueng
ADVISORS Assistant Professor Sirirat Deeseenthum , Ph.D.
Assistant Professor Surachai Rattanasuk , Ph.D.
DEGREE Master of Science **MAJOR** Biotechnology
UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2019

ABSTRACT

Leum Pua rice cider is used as a health beverage in Asia and contains various active ingredients with antioxidant activity and high levels of amino acids including organic acids. Fermentation of Loog-pang to produce Thai traditional alcohol (sato) at ratio of fungi (*Aspergillus oryzae* LPP3) to yeast (*Saccharomyces cerevisiae* TISTR5013) (g/mL) of 1:1 (Formula 1) 2:1 (Formula 2) and 3:1 (Formula 3) were conducted for 15 days. The highest of alcoholic content (12.05 ± 0.06%) was found in rice sato (Formula 2). All 3 sato were used as the starter for acetic acid fermentation. The liquids were inoculated with *Acetobacter aceti* TISTR102 (~10%) and cultured at 150 rpm, 30 °C for 7 days. After fermentation, Formula 3 provided the highest of acetic acid and ethanol contents (5.57±0.15% and 2.11±0.02%, respectively). Total dissolved solid was 5.15±0.02 °Brix, pH = 3.39±0.02, and reducing sugar content was 54.92±1.01 g/L. Volatile compounds were analyzed by GC-MS. The results contained carbonic acid, propiolic acid, ethanol, ethyl acetate, 2,3-butanediol, propanoic acid and glycerol. These compounds affected the smell and taste of the product. Six organic acids determined by HPLC included citric acid, tartaric acid, lactic acid, succinic acid, propionic acid and acetic acid. The highest antioxidant activities of Leum Pua rice vinegar were found in Formula 2 (0.49±0.01g TE/L by DPPH assay and 1.46±0.01 g $FeSO_4$/L by FRAP assay), whereas phenolic content was 9.47±0.02 g GAE/L and flavonoid was 0.69±0.01 g RE/L after 4 days of fermentation. The anthocyanin content decreased continuously until 7 days of fermentation at

3.01±0.04 g/L. Results indicated that the vinegar gave overall satisfaction as ‘mostly like’ when surveyed by 30 volunteers using a 7-point hedonic scale sensory test.

Keyword : Leum Pua rice, Loog-pang, Microorganism, Sato, Cider

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย รัตนสุข อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา หลวงอินทร์ ประธานกรรมการคุมสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษกร ทองใบ กรรมการคุมสอบ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ ภูสีฤทธิ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูง

ขอขอบคุณบุคลากรภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อนๆ พี่น้อง ที่ให้คำปรึกษา และศูนย์เครื่องมือกลาง ที่อนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณบิดา-มารดา ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนให้การทำวิทยานิพนธ์นี้ลุล่วงด้วยดี

ประโยชน์และคุณค่าจากงานวิจัยนี้ ขอมอบบูชาพระคุณบิดามารดา ครูอาจารย์ ที่ให้การช่วยเหลือ อบรมสั่งสอนให้ผู้วิจัยเป็นคนที่มีคุณธรรม ให้กำลังใจและสนับสนุนให้การทำวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รับทุนจากโครงการพัฒนาศักยภาพบุคคลากร STEM (Science Technology Engineering and Mathematics) เพื่อการวิจัยและพัฒนาสำหรับภาคอุตสาหกรรม ประจำปี 2560 และขอขอบคุณวิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทรีย์อีสาน จังหวัดร้อยเอ็ด ดร.รณวริทธ์ ปริยฉัตรตระกูล ที่เอื้อเฟื้อวัตถุดิบในการศึกษาครั้งนี้

พิกุลทอง ผิวเหลือง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ฉ

กิตติกรรมประกาศ ซ

สารบัญ ฌ

สารบัญตาราง ฑ

สารบัญรูปภาพ ณ

อภิธานศัพท์ ด

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะรับ 2

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 สาโท 4

2.2 ลูกแป้งสาโท 5

2.2.1. ความสำคัญขององค์ประกอบต่าง ๆ ของลูกแป้ง 5

2.3 กระบวนการผลิตลูกแป้ง 6

2.4.ข้าวเหนียวลืมผัว 7

2.4.1 ประวัติความเป็นมาของข้าวเหนียวลืมผัว 7

2.4.2 ลักษณะประจำพันธุ์ 9

2.4.3 สรรพคุณของข้าวเหนียวลืมผัว 10
2.4.4 พื้นที่แนะนำในการปลูก 10
2.4.5 ข้อควรระวังในการปลูกข้าว 10
2.4.6 ขั้นตอนการนึ่งข้าวเหนียวลืมผัว 11
2.5 กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ 11
2.6 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักสาโท 11
2.6.1 เชื้อรา 11
2.6.2 เชื้อยีสต์ 12
2.7 เอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการหมักสาโท 12
2.8 ไซเดอร์ 12
2.8.1 ประเภทของไซเดอร์ 13
2.8.2 กระบวนการผลิตไซเดอร์ 13
2.9 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไซเดอร์ 13
2.9.1 ยีสต์ 13
2.9.1.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล 14
2.9.1.2 กระบวนการหมักเอทานอล 15
2.9.2 แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก 16
2.9.2.1 ความสามารถในการทนกรดอะซิติก 17
2.9.2.2 ความสามารถในการผลิตกรดอะซิติก 17
2.10 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 18
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 24
3.1 สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย 24
3.2 วิธีการทดลอง 26
3.2.1. การเก็บตัวอย่างลูกแป้งสาโท 26

พหุน ปญฺญา ชีเว

3.2.2. คัดแยกเชื้อราและยีสต์จากลูกแป้งสาโท 26

  3.2.2.1 การคัดแยกเชื้อรา 26

  3.2.2.2 วิธีการแยกยีสต์ 26

3.2.3 การคัดเลือกเชื้อราและยีสต์ 26

  3.2.3.1 การคัดเลือกเชื้อรา 26

  3.2.3.2 การคัดเลือกเชื้อยีสต์ 27

3.2.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อราและยีสต์ 27

  3.2.4.1 การจัดจำแนกจีนัสของเชื้อรา 27

  3.2.4.2 การจัดจำแนกจีนัสของยีสต์ 28

3.2.5 การเตรียมเชื้อยีสต์และราในการผลิตลูกแป้ง 30

  3.2.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ 30

  3.2.5.2 การเตรียมทาเนโคจิ 30

  3.2.5.3 ศึกษาปริมาณส่วนผสมหัวเชื้อในการผลิตลูกแป้งสาโทในระดับห้องปฏิบัติการ 30

3.2.6 การศึกษาการผลิตลูกแป้งสาโทในระดับห้องปฏิบัติการ 30

  3.2.6.1 การเตรียมลูกแป้งตามสูตรต่าง ๆ 30

3.2.7 การทดสอบประสิทธิภาพของลูกแป้ง 31

3.2.8 กระบวนการหมักไซเดอร์ 32

  3.2.8.1 การเตรียมกล้าเชื้อ 32

  3.2.8.2 ขั้นตอนการผลิตไซเดอร์ 32

  3.2.8.3. วิเคราะห์คุณลักษณะต่าง ๆ ของไซเดอร์ 32

3.2.9 ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส 35

3.2.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 35

บทที่ 4 ผลการทดลอง 36

4.1. เก็บตัวอย่างลูกแป้งสาโทเพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ 36

4.2. การคัดแยกเชื้อราและเชื้อยีสต์จากลูกแป้งสาโท 37

4.3. การคัดเลือกเชื้อราและยีสต์.. 38

4.3.1 การคัดเลือกเชื้อราที่มีคุณสมบัติย่อยแป้งที่ดีเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อลูกแป้ง....................... 38

4.3.2 การคัดเลือกเชื้อยีสต์.. 40

4.3.2.1 ทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล 40

4.3.2.2 ทดสอบความสามารถทนต่อแอลกอฮอล์ 41

4.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อราและยีสต์ 42

4.4.1 การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์...................... 42

4.4.2 การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 43

4.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 44

4.6 ขั้นตอนการผลิตลูกแป้งสาโท 45

4.7 คุณลักษณะของสาโทข้าวเหนียวลืมผัวจากลูกแป้งที่ผลิตได้.. 47

4.7.1 การวิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมีของสาโท... 47

4.7.1.1 ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) (total dissolved solid; TDS) 47

4.7.1.2 กรด-เบส (pH).. 48

4.7.1.3 ปริมาณกรดทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) 49

4.7.1.4 ปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์)... 50

4.7.1.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์... 51

4.7.1.6 วิเคราะห์สารระเหยของสาโททั้ง 3 สูตร โดยเครื่อง GC-MS........................ 52

4.8 กระบวนการหมักไซเดอร์จากสาโททั้ง 3 สูตร.. 53

4.8.1 วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ 53

4.8.1.1 วัดสี.. 53

4.8.2 วิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมี ... 54
    4.8.2.1 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ... 54
    4.8.2.2 ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด ... 56
    4.8.2.3 น้ำตาลรีดิวซ์ ... 57
    4.8.2.4 ปริมาณแอลกอฮอล์ ... 59
    4.8.2.5 ปริมาณกรดอะซิติก ... 60
4.8.3 วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระไซเดอร์ ... 63
    4.8.3.1 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ... 64
    4.8.3.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ... 65
    4.8.3.3 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH ... 66
    4.8.3.4 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP ... 67
    4.8.3.5 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ... 69
4.9 ทดสอบทางประสาทสัมผัสของไซเดอร์ ... 70
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง ... 72
บรรณานุกรม ... 74
ภาคผนวก ... 83
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ... 84
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีวิเคราะห์ ... 87
ภาคผนวก ค กราฟ ภาพประกอบ และข้อมูลการทดลอง ... 92
ภาคผนวก ง การเผยแพร่งานวิจัย ... 120
ประวัติผู้เขียน ... 125

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ชื่อเรียกของไวน์ข้าวแต่ละประเทศ 4
ตารางที่ 2 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักสาโท 18
ตารางที่ 3 การหมักไซเดอร์และน้ำส้มสายชู 21
ตารางที่ 4 สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย 24
ตารางที่ 5 อัตราส่วนของเชื้อรากับยีสต์ในลูกแป้งสาโท 30
ตารางที่ 6 อัตราส่วนผสมสมุนไพรในการผลิตลูกแป้งสาโท 31
ตารางที่ 7 ตัวแปรในการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP 34
ตารางที่ 8 ตัวอย่างลูกแป้งจากแหล่งต่าง ๆ 36
ตารางที่ 9 แหล่งที่มาของลูกแป้งสาโท จำนวนเชื้อรา และยีสต์ที่คัดแยกได้ 38
ตารางที่ 10 ความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อราที่คัดแยกได้จากลูกแป้งสาโทแหล่งต่าง ๆ 39
ตารางที่ 11 ความสามารถในการหมักน้ำตาลในอาหารที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมด 41
ตารางที่ 12 ความสามารถในการหมักอาหารที่มีแอลกอฮอล์ 10 เปอร์เซ็นต์ และ 15 เปอร์เซ็นต์ 42
ตารางที่ 13 สายพันธุ์เชื้อยีสต์และเชื้อราที่มีความสามารถผลิตน้ำตาลและแอลกอฮอล์ 45
ตารางที่ 14 อัตราส่วนผสมสมุนไพรในการผลิตลูกแป้งสาโท 46
ตารางที่ 15 ลักษณะและอัตราส่วนของเชื้อราต่อยีสต์ของลูกแป้ง 3 สูตร 47
ตารางที่ 16 ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) (total dissolved solid; TDS) 48
ตารางที่ 17 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) สาโทข้าวเหนียวลืมผัว 3 สูตร 49
ตารางที่ 18 ปริมาณกรดทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ของสาโทข้าวเหนียวลืมผัว 3 สูตร 50
ตารางที่ 19 ปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์) ในสาโท 3 สูตร 51
ตารางที่ 20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) สาโทข้าวเหนียวลืมผัว 3 สูตร 52
ตารางที่ 21 วิเคราะห์สารระเหยของสาโททั้ง 3 สูตร โดยเครื่องวิเคราะห์ GC-MS 53

ตารางที่ 22 ค่าสีของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร..54

ตารางที่ 23 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร...55

ตารางที่ 24 ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร...........................56

ตารางที่ 25 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร..58

ตารางที่ 26 ปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร...59

ตารางที่ 27 ปริมาณกรดอะซิติก (เปอร์เซ็นต์) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร 61

ตารางที่ 28 ปริมาณกรดอินทรีย์ (กรัมต่อลิตร) ที่พบในไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร......................................62

ตารางที่ 29 ค่าผลที่ได้ของผลิตภัณฑ์ไซเดอร์ข้าวลืมผัวทั้ง 3 สูตร..63

ตารางที่ 30 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (กรัมแกลลิกต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร 64

ตารางที่ 31 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (กรัมรูทีนต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร 65

ตารางที่ 32 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH (กรัมโทรลอกต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร.....67

ตารางที่ 33 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP (กรัมเฟอรัสซัลเฟตต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร 68

ตารางที่ 34 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ของไซเดอร์ข้าวลืมผัว 69

ตารางที่ 35 ความพึงพอใจต่อไซเดอร์ด้านลักษณะต่าง ๆ ของผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัส จำนวน 30 คน (อายุ 35 ปีขึ้นไป)...71

ตารางที่ 36 ความพึงพอใจต่อไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร ด้านลักษณะต่าง ๆ ของผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัส (อายุ 20-30 ปี) 71

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลูกแป้งสาโท 5

ภาพที่ 2 เมล็ดข้าวเหนียวลืมผัว.. 8

ภาพที่ 3 ลักษณะต้นข้าวลืมผัว 9

ภาพที่ 4 กระบวนการย่อยแป้งของราและการหมักยีสต์ 12

ภาพที่ 5 *Saccharomyces cerevisiae* 14

ภาพที่ 6 กระบวนการผลิตเอทานอลของยีสต์.. 15

ภาพที่ 7 Acetobacteraceae 16

ภาพที่ 8 การสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา 39

ภาพที่ 9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เชื้อรา LPP3 40

ภาพที่ 10 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา LPP3 ที่คัดแยกได้จากตำบลเกาะยาวน้อย อำเภอเกาะยาว........... 43

ภาพที่ 11 ลักษณะเซลล์ยีสต์จากลูกแป้งร้อยเอ็ด.. 43

ภาพที่ 12 แผนภูมิวิวัฒนาการสายพันธุ์ยีสต์ *Wickerhamomyces anomalus* LPR5................ 44

ภาพที่ 13 แผนภูมิวิวัฒนาการสายพันธุ์รา *Aspergillus oryzae* LPP3 45

ภาพที่ 14 ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมดในสาโท 3 สูตร 48

ภาพที่ 15 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในสาโท 3 สูตร.. 49

ภาพที่ 16 ปริมาณกรดทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ในสาโททั้ง 3 สูตร 50

ภาพที่ 17 ปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์) ในสาโท 3 สูตร.. 51

ภาพที่ 18 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ในสาโท 3 สูตร 52

ภาพที่ 19 สีของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร.. 54

ภาพที่ 20 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร 55

ภาพที่ 21 แสดงปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) ไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร 57

ภาพที่ 22 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร 58

ภาพที่ 23 ปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร.. 60

ภาพที่ 24 ปริมาณกรดอะซิติก (เปอร์เซ็นต์) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร 61

ภาพที่ 25 ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด (กรัมแกลลิกต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร 65

ภาพที่ 26 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (กรัมรูทีนต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร 66

ภาพที่ 27 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (กรัมโทรอกต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร....................... 67

ภาพที่ 28 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (กรัมเฟอรัสซัลเฟตต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร............ 68

ภาพที่ 29 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ของไซเดอร์ข้าวลืมผัว 70

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

คำศัพท์	ความหมาย
กระบวนการหมัก (Fermentation)	กระบวนการที่สารอินทรีย์เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ (เช่น ยีสต์ แบคทีเรีย) หรือเอนไซม์ เช่น การหมักแป้ง น้ำตาลโดยใช้ยีสต์จะได้เอทานอล
สาโท (Sato, rice wine)	จัดเป็นสุราแช่ที่ไม่ผ่านการกลั่น โดยใช้ข้าวเหนียวหมักกับเชื้อจุลินทรีย์ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งมีปริมาณแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรี
ไซเดอร์ (Cider/Cyder)	เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทหนึ่งที่เกิดจากกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์แล้วมีปริมาณแอลกอฮอล์ในไซเดอร์ตั้งแต่ 1.2 – 8.5 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่า 4 เปอร์เซ็นต์
ข้าวเหนียวลืมผัว (*Oryza sativa* Linn.)	ข้าวเหนียวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ไวต่อแสง อายุสั้น ลักษณะกอตั้งแข็งแรง ปล้องสีเหลือง กาบใบและใบมีสีเขียว เมื่อถึงระยะน้ำนมกลีบดอกจะเปลี่ยนสีเป็นแถบสีม่วง เมล็ดข้าวลืมผัวจะมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง เช่น แอนโธไซยานิน
ลูกแป้ง (Loog-pang)	กล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในรูปแบบแห้ง ใช้ในการผลิตอาหารหมักหลายชนิด เช่น สาโท ข้าวหมาก น้ำส้มสายชู เป็นต้น
กรัมแกลลิคต่อลิตร (g GAE/L)	หน่วยของค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดในรูปกรัมของแกลลิค
กรัมลูทีนต่อลิตร (g RE/L)	หน่วยของค่าปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมดในรูปกรัมของลูทีน
กรัมโทร็อกต่อลิตร (g TE/L)	หน่วยของค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดของวิธี DPPH ในรูปกรัมของโทร็อก
กรัมเฟอรัสซัลเฟตต่อลิตร (g $FeSO_4$/L)	หน่วยของค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดของวิธี FRAP ในรูปกรัมของเฟอรัสซัลเฟต
แซ็คคาโรไมซิส ซีรีวิซีอี (*Saccharomyces cerevisiae*)	ยีสต์ชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้ดี ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น ไวน์ เบียร์ ใช้เป็นสารให้ขึ้นฟูในขนมปัง และใช้ผลิตสารสกัดจากยีสต์

อภิธานศัพท์ (ต่อ)

คำศัพท์	ความหมาย
อะไมโลไมซิส รอกซิไอ (*Amylomyces rouxii*)	ราชนิดหนึ่งที่พบในลูกแป้ง มีลักษณะเส้นใยสีขาว มีความสามารถเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลสูง สร้างกรดในปริมาณที่เหมาะสม ในการปรับสภาพการหมักข้าวให้เหมาะกับ การเจริญของ ยีสต์ในการหมักช่วงต่อไป แต่ไม่เกิดรสเปรี้ยวมากเกินไป
แอสเพอจิวรัส ออไรเซ่ (*Aspergillus oryzae*)	ราที่มีเส้นใยสีขาว รานี้มีความสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส นิยมใช้เพื่อการหมักอาหารจากถั่วเหลือง เช่น ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว มิโซ โดยเตรียมอยู่ในรูปของโคจิ ซึ่งเป็นหัวเชื้อที่ใช้เพื่อการหมัก
แอซีโตแบคเตอร์ อะซิไต (*Acetobacter aceti*)	แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก แบคทีเรียนี้ไม่ทำให้เกิดโรค เจริญได้ในที่มีอากาศ นิยมใช้ในการหมัก โดยออกซิไดซ์เอทิลแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกในการผลิตน้ำส้มสายชู แต่เป็นเชื้อที่ทำให้เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น ไวน์ เสื่อมเสีย
ไรโซปัส ออไรเซ่ (*Rhizopus oryzae*)	ราก่อโรคในคน เชื้อราชนิดนี้เป็นองค์ประกอบในลูกแป้งเพื่อใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ในทวีปเอเชีย รวมทั้งการทำข้าวหมากของไทยด้วย โดยสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งได้
แซคคาโรไมคอปซิส ฟิบูลิเจอร่า (*Saccharomycopsis fibuligera*)	ยีสต์ชนิดหนึ่งที่พบในลูกแป้งมีความสามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้
วิคเคอฮาโมไมซิส อะโนไมลัส (*Wickerhamomyces anomylus*)	ยีสต์ชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการหมักธัญพืช แต่ให้ผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์น้อยกว่ายีสต์ *Saccharomyces* sp.
กลูโคโนแบคเตอร์ (*Gluconobacter*)	เป็นชื่อสกุลของแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติก ซึ่งใช้ในการหมักให้เกิดกรดอะซิติก ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชู สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดอะซิติกในภาวะที่มีออกซิเจน
อะไมเลส (Amylase)	เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถไฮโดรไลซ์พันธะในโมเลกุลของแป้งให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ทำให้เป็นเดกซ์ทริน และน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ เช่น มอลโทส มอโนแซ็กคาไรด์ เช่น กลูโคส

อภิธานศัพท์ (ต่อ)

คำศัพท์	ความหมาย
การทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, *DPPH*)	เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็น stable radical ในตัวทำละลาย methanol ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลื่นแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 nm ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้องและแม่นยำสูง
การรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูล อิสระ (Ferric reducing antioxidant power, FRAP)	วิธี FRAP สามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวัดค่า absorbance ที่ 595 nm จากนั้นศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันในสารตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบกบสาร มาตรฐาน Ferrous sulfate แล้วรายงานเป็นค่า FRAP value ข้อดีของวิทีนี้ คือเสียค่าใช้จ่ายน้อย สะดวกรวดเร็ว มี ขั้นตอนในการทดลองไม่ยุ่งยาก ซับซ้อนและมี reproducibility ดี
กรัม/ลิตร (g/L)	คือหน่วยแสดงความหนาแน่นและความเข้มข้นของสสาร ใช้ในกรณีที่จะหา มวล หรือ ปริมาตร ของสสารใด ๆ
เครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Gas Chromatograph Mass Spectrometer, GC-MS)	เป็นเครื่องมือสำหรับแยกวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารในสภาวะแก๊ส โดยใช้ตัวตรวจวัด (Detector)เป็นแบบเครื่องวิเคราะห์มวลสาร (Mass Spectrometer) จัดเป็นเครื่องที่ใช้เทคโนโลยี่ขั้นสูง มีความถูกต้องและความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้มากมายหลายชนิด
เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิด เช่น สารอินทรีย์ สารประกอบทางชีวภาพ โพลีเมอร์คู่อิแนนทิโอเมอร์ สารประกอบที่เสียสภาพได้ง่าย สารประกอบที่ระเหยยาก ไอออนขนาดเล็ก ไมโครโมเลกุลตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ต้องเป็นของแข็งหรือของเหลวต้องละลายได้ 100 % (กรองด้วย) การแยกสารจะประสบความสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อสารมีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ โดยมี Mobile Phase เป็นตัวพาไป ตัวอย่างการทดสอบด้วย HPLC เช่น หาปริมาณวิตามินซี ในเลือด น้ำผลไม้ และอื่นๆ

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ไซเดอร์ (Cider หรือ Cyder) เป็นคำที่ใช้เรียกเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่ได้จากการหมักน้ำผลไม้ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ประเภทยีสต์ (yeast) ที่สร้างแอลกอฮอล์ ต้นตำรับไซเดอร์ผลิตในประเทศอเมริกา อังกฤษ และแคนาดา โดยผลิตจากผลไม้และธัญพืชมีความเป็นกรดอ่อน คือมีรสเปรี้ยวเล็กน้อย ซึ่งเกิดจากกรดมาลิกและกรดแลกติก รวมทั้งอุดมไปด้วยสารประกอบฟีโนลิก (phenolic) สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) วิตามิน และเกลือแร่ นอกจากนี้ไซเดอร์ยังช่วยทำให้ระบบขับถ่ายทำงานได้ดีขึ้น ลดความเสี่ยงการเกิดเซลล์มะเร็งในลำไส้ใหญ่ได้ดี และลดปริมาณน้ำตาลกูลโคสในกระแสเลือด (วรรณดี และคณะ, 2560)

การผลิตสาโท เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีการผลิตอย่างแพร่หลายในอดีต โดยอาศัยภูมิปัญญาของชนรุ่นก่อน จากการใช้ลูกแป้งที่มีการผลิตขึ้น ซึ่งลูกแป้งจะประกอบด้วย ราที่ทำหน้าที่ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล และยีสต์ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ (ชูชาติ และคณะ, 2016) สูตรในการทำลูกแป้งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อคุณภาพของสาโท ซึ่งเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่มีมานาน แต่ละท้องถิ่นมีสูตรการทำลูกแป้งที่แตกต่างกันออกไป ปัญหาเหล่านี้จึงนับว่าสำคัญมากในการที่จะผลิตสาโทเป็นอุตสาหกรรม ซึ่งต้องการลูกแป้งหรือกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่ให้คุณภาพของสาโทสม่ำเสมอและได้มาตรฐาน โดยสาโทควรมีคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่สม่ำเสมอ มีเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์แน่นอน มีกลิ่น รสชวนดื่ม และไม่มีรสเปรี้ยว (Dung, 2013)

ข้าวเหนียวลืมผัว เป็นข้าวเหนียวที่กำลังเป็นที่นิยมบริโภคในประเทศไทย เป็นอาหารหลักของประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ ข้าวเหนียวลืมผัวยังมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์ คือ Oligomeric proanthocyanidin หรือ “โอพีซี” (OPC) ซึ่งมีสรรพคุณช่วยชะลอความแก่ก่อนวัย และความเสื่อมถอยของร่างกาย นอกจากนี้ในข้าวเหนียวลืมผัวยังมีกรดธาตุเหล็กและกรดโฟลิค การนำข้าวเหนียวลืมผัวไปสาโท และไซเดอร์จะทำให้ได้วิตามินบี 12 ช่วยป้องกันโรคโลหิตจาง (ชื่นจิตร และคณะ, 2561)

งานวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักไซเดอร์ และวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในการผลิตในระดับชุมชนและภาคอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดแยกเชื้อราที่สามารถย่อยแป้งและเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอทานอลได้สูงจากลูกแป้งสาโทแหล่งต่าง ๆ

2. เพื่อพัฒนาสูตรลูกแป้งสาโทจากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ เพื่อผลิตสาโทให้ได้ปริมาณเอทานอลสูง ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไซเดอร์ข้าวลืมผัว

3. เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพ เคมี และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของไซเดอร์ที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. เก็บตัวอย่างลูกแป้งจากสำนักงานเครือข่ายวิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทรีย์อีสาน อำเภอเสลภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด บ้านนาข่า ตำบลนาข่า อำเภอวาปีปทุม จังหวัดมหาสารคาม และตำบลเกาะยาวน้อย อำเภอเกาะยาว จังหวัดพังงา

2. ข้าวลืมผัวจากสำนักงานเครือข่ายวิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทรีย์อีสาน อำเภอเสลภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด

3. สถานที่ ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะรับ

1. ได้ลูกแป้งในการผลิตสาโทข้าวลืมผัวที่มีปริมาณเอทานอลสูงขึ้น
2. สามารถเพิ่มมูลค่าของสาโทข้าวลืมผัว และใช้ในการเป็นสารตั้งต้นผลิตภัณฑ์ไซเดอร์
3. ได้ไซเดอร์ที่มีปริมาณกรดอะซิติกสูง มีประโยชน์ต่อผู้บริโภค
4. ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ให้กับรัฐวิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทรีย์อีสาน อำเภอเสลภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด เพื่อเสริมรายได้ และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของผู้บริโภค

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

สาโท (Sato) หมายถึง สุราแช่ เป็นสุราที่ไม่ได้ผ่านการกลั่น และสุราแช่ที่ผสมกับสุรากลั่นแล้วมีปริมาณแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรี (พระราชบัญญัติสุรา, 2493) การผลิตสาโททำได้โดยการหมักข้าวเหนียวนึ่งสุกกับลูกแป้งสุรา โดยระยะแรกของการหมักราเส้นใยจะเปลี่ยนแป้งในข้าวให้เป็นน้ำตาล และหลังจากนั้นเชื้อยีสต์จะเริ่มทำการหมักย่อยน้ำตาลเป็นเอทานอล (Remli *et al.*, 2014)

ลูกแป้งสุรา (Loog-pang) หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเมื่อหมักกับวัตถุหรือของเหลวอื่นแล้วสามารถทำให้เกิดแอลกอฮอล์ที่ใช้ทำสุราได้ (พระราชบัญญัติสุรา, 2493)

ข้าวเหนียวลืมผัว หมายถึง ข้าวเหนียวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวกล้องสีดำ ไวต่อช่วงแสง อายุสั้นเก็บเกี่ยวประมาณกลางเดือนตุลาคม ลักษณะทรงกอตั้ง ต้นแข็ง ไม่ล้มง่าย ปล้องสีเหลืองอ่อน กาบใบและใบสีเขียว ลิ้นใบสีน้ำตาลอ่อน หูใบสีเหลืองน้ำตาล ใบธงหักลง คอรวงยาว รวงค่อนข้างแน่น

กลีบดอกระยะออกรวง 50 เปอร์เซ็นต์ มีสีเขียวอ่อน เมื่อถึงระยะน้ำนม กลีบดอกจะเปลี่ยนสีเป็นแถบสีม่วงบนพื้นสีเขียวอ่อน

แบคทีเรียอะซิติก หมายถึง แบคทีเรีย ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติกในกระบวนการหมัก

ไซเดอร์ หมายถึง เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ผ่านกระบวนการหมักของน้ำผลไม้หรือธัญพืชด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างกรดอะซิติก ซึ่งมีกรดอะซิติกมากกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ (Lorenzini *et al.*, 2019)

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาโท

สาโท (rice wine) จัดเป็นสุราแช่ ตามความหมายในพระราชบัญญัติสุรา พ.ศ. 2492 มาตรา 4 ซึ่งให้คำนิยามว่า “สุราแช่” หมายความว่า สุราที่ไม่ได้กลั่น และให้ความหมายรวมถึงสุราแช่ที่ได้ผสมกับสุรากลั่นแล้ว แต่ยังมีแรงแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรีด้วย คำว่าแรงแอลกอฮอล์ (alcohol strength) หมายถึง ดีกรีหรือหน่วยวัดแรงแอลกอฮอล์ในสุราคิดเป็นร้อยละ 15 โดยปริมาตร (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2546) ซึ่งชื่อเรียกไวน์ข้าวจะแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ เช่น ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ อินเดีย เกาหลี จีน เวียดนาม และไทย ต่างก็มีการผลิตไวน์ข้าวที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัว (ตารางที่ 1)

สาโทเป็นเครื่องดื่มที่มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง มีผู้ผลิตและบริโภคมากมาย โดยปกติจะทำจากข้าวเหนียว ในปัจจุบันมีการเพิ่มความแปลกใหม่และความน่าสนใจให้กับผลิตภัณฑ์สาโทไทย จึงมีแนวคิดในการนำข้าวเหนียวลืมผัวมาใช้ในเป็นวัตถุดิบในการผลิตสาโท ข้าวเหนียวลืมผัวจัดเป็นข้าวสีม่วงเข้ม มีสมบัติเด่นทางด้านโภชนาการ คือ มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ แอนโท-ไซยานิน แทนนิน วิตามินอี เบต้าแคโรทีน แกรมมาโอไรซานอล สังกะสี มีไฟเลตสูง และดัชนีน้ำตาลต่ำ (ศูนย์วิทยาศาตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2557) ซึ่งกำลังเป็นที่นิยมในกลุ่มผู้บริโภคที่รักสุขภาพ และอาหารเสริมจากข้าวไรซ์เบอรรี่ยังมีสรรพคุณต่าง ๆ ในการช่วยลดภาวะการเกิดภาวะเครียดจากการที่ร่างกายมีสารต้านอนุมูลอิสระสูงเกินไป (oxidative stress) และอาการอักเสบในหนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวาน (Prangthip *et al.*, 2013)

ตารางที่ 1 ชื่อเรียกของไวน์ข้าวแต่ละประเทศ

ประเทศที่ผลิต	**ชื่อไวน์ข้าว**
ญี่ปุ่น	Sake, amazake
ฟิลิปปินส์	Tapuy
อินเดีย	Shonti, murcha
เกาหลี	Makkari
จีน	Shao-shin-chu
เวียดนาม	Baside
ไทย	กระแช่ น้ำขาว สาโท อุ

ที่มา : Law *et al.*, 2013

2.2 ลูกแป้งสาโท

ลูกแป้ง คือ กล้าเชื้อจุลินทรีย์ (starter) ที่มีเชื้อผสม (mixed culture) ทั้งเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรียเก็บในรูปเชื้อแห้ง เช่นเดียวกับโคจิ แต่ลูกแป้งจะปั้นเป็นลูกกลม หรือกลมแบน (ภาพที่1) ลูกแป้งใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการหมัก (fermentation) ลูกแป้งที่หมักอาหารหมักพื้นบ้านของไทย ลูกแป้งข้าวหมากใช้เพื่อหมักข้าวหมาก ลูกแป้งสุราซึ่งใช้หมักสุราพื้นบ้าน เช่น น้ำตาลเมา สาโท อุ และลูกแป้งที่ใช้เพื่อหมักน้ำส้มสายชู เรียกว่า ส่าน้ำส้ม (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2560)

ภาพที่ 1 ลูกแป้งสาโท

2.2.1. ความสำคัญขององค์ประกอบต่าง ๆ ของลูกแป้ง

2.2.1.1 เครื่องเทศ

เครื่องเทศและสมุนไพรมีหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ไม่ต้องการใน ลูกแป้ง เนื่องจากเครื่องเทศมีน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีองค์ประกอบหลายชนิด ได้แก่ แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ เทอร์ปีน ฟีนอล อัลคาลอยด์ เรซิน กรดอินทรีย์ สารประกอบที่มีกำมะถัน และสารอื่น ๆ น้ำมันหอมระเหยเหล่านี้ มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่าการฆ่า เนื่องจากมีปริมาณไม่เพียงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์ได้ การใช้ในปริมาณที่เหมาะสมจะมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิดแต่ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของยีสต์และรา สมุนไพรแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน (Spinosa *at al.,* 2015) มีปัจจัยที่มีผลทำให้ประสิทธิภาพของเครื่องเทศในการทำลายจุลินทรีย์ขึ้นกับส่วนผสมของเครื่องเทศที่ใช้อายุเครื่องเทศ ความเข้มข้นของเครื่องเทศ ชนิดของเชื้อ และสภาวะที่ใช้ในการทดสอบ เช่น อุณหภูมิ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และระยะเวลาที่จุลินทรีย์สัมผัสกับเครื่องเทศ

2.2.1.2 ลูกแป้งเดิม ใช้เป็นแหล่งจุลินทรีย์ ต้องไม่แก่เกินไปจนมอดกินหรือใช้ลูกแป้งที่มีเชื้อราอื่นปนเปื้อนภายนอกจนเห็นได้ชัด

2.2.1.3 แป้ง ควรใช้แป้งข้าวจ้าวล้วน ๆ จะมีคุณภาพดีที่สุดตามตำรับเดิมผู้ผลิตจะบดแป้งใช้เป็นคราว ๆ ไป ข้าวที่ใช้จะต้องไม่เก่าหรือขึ้นรา ไม่นิยมใช้แป้งสำเร็จทั้งนี้เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และหลีกเลี่ยงกรดโพรพิโอนิกที่เป็นสารยับยั้งเชื้อรา ซึ่งมักใส่ลงไปในแป้งสำเร็จ (กฤษดา, 2552)

2.2.1.4 น้ำ ปริมาณน้ำมีความสำคัญมากในการควบคุมความชื้นของลูกแป้ง ถ้ามีความชื้นมากเกินไปจะทำให้ลูกแป้งเหม็นเปรี้ยวและเสียได้ หรือแห้งเกินไปจะทำให้ลูกแป้งแตกหรือราเจริญในลูกแป้งได้ไม่ดีเท่าที่ควร ถ้าความชื้นในลูกแป้งเหมาะสมจะทำให้เก็บรักษาจุลินทรีย์ในลูกแป้งได้นาน

คุณภาพของลูกแป้งขึ้นอยู่กับคุณภาพของเครื่องเทศ ข้าว ลูกแป้งที่ใช้เป็นกล้าเชื้อและกรรมวิธีการผลิต ลูกแป้งที่ดีควรมีสีนวล น้ำหนักเบา ข้างในโปร่ง ก้อนแป้งเป็นรูพรุน ซึ่งเกิดจากการฟูของแป้งขณะที่บ่ม ไม่มีรอยแตกร้าว เมื่อบี้จะร่วนเป็นผงละเอียด ภายในมีเส้นใยของเชื้อราขึ้นอยู่อย่างสม่ำเสมอ มีกลิ่นหอมไม่เหม็นเปรี้ยวและที่สำคัญให้ผลดีเมื่อนำไปหมัก

2.3 กระบวนการผลิตลูกแป้ง

ลูกแป้ง (มผช.๓/๒๕๔๖) ตามพระราชบัญญัติสุรา พ.ศ. 2493 มาตรา 4 จัดเป็นเชื้อสุราอย่างหนึ่งตามนิยาม ดังนี้ “ลูกแป้ง” หมายถึง เชื้อสุรา แป้งเชื้อสุรา แป้งข้าวหมักหรือเชื้อใด ๆ เมื่อหมักกับวัตถุหรือของเหลวอื่น ๆ แล้วสามารถทำให้เกิดแอลกอฮอล์ การทำลูกแป้งอาจผสมสมุนไพรหรือเครื่องเทศด้วย การผลิตลูกแป้งมีสูตรต่างกันหลายตำหรับ แต่องค์ประกอบที่สำคัญก็คือปลายข้าวดิบหรือข้าวสารบดละเอียด ซึ่งใช้ได้ทั้งข้าวเหนียวและข้าวจ้าว นำมาผสมกับเครื่องเทศสมุนไพรต่าง ๆ เครื่องเทศเหล่านี้บางตำรับใช้ในลักษณะเป็นผงแต่บาง ตำรับก็ใช้ในรูปของสารสกัดในน้ำเดือดในเครื่องเทศสมุนไพรจะมีสารส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดจำเป็น เช่น เป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน วิตามิน เกลือแร่ ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระบวนการหมักของเชื้อราและยีสต์ เช่น รากหวาย มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนอบเชย ดดหมา นอกจากจะให้กลิ่นหอมในสาโทแล้วยังเป็นแหล่งของแร่ธาตุสำคัญสำหรับการหมัก และสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดไม่ต้องการ เช่น น้ำมันหอมของกานพลู มีสารยับยั้งแบคทีเรียแลกติกและเชื้อราหลายชนิด

อรวรรณ และคณะ (2553) ได้รายงานว่าปริมาณการใช้และผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในเครื่องเทศสมุนไพรไทยไว้หลายชนิด สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ซึ่งในความเป็นจริงผู้ผลิตลูกแป้งจะไม่ใช้เครื่องเทศสมุนไพรอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงชนิดเดียวในปริมาณมาก ๆ แต่จะใช้หลาย ๆ ชนิดในปริมาณมากผสมกันเพื่อเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน ดังนั้นการเก็บลูกแป้งไว้นาน ๆ อาจทำให้สารเหล่านี้สูญเสียคุณสมบัติ เนื่องจากสารสำคัญระเหยจนหมดไปได้ เมื่อผสมข้าวกับเครื่องเทศแล้วปั้นเป็นก้อนโรยด้วยผงลูกแป้งเก่า บ่มในบรรยากาศที่ควบคุมระดับความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิ เป็น

เวลา 2 วัน จะสังเกตเห็นการเจริญของเส้นใยราปกคลุมทั่วเห็นเป็นสีขาว และตากจนลูกแป้งแห้งและมีน้ำหนักเบา

โดยทั่วไปกระบวนการผลิตและสมุนไพรที่ใช้ทำลูกแป้งจะแตกต่างกันไปตามสูตรแต่ละท้องถิ่น ส่วนใหญ่มีขบวนการดังนี้

1.เตรียมแป้งโดยซาวข้าวเหนียวให้สะอาด แช่น้ำประมาณ 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปโม่แล้วซับน้ำให้แห้งหรือทำให้ข้าวสะเด็ดน้ำก่อนจึงบดให้ละเอียดแล้วร่อน การแช่ข้าวนานเกินไปจะมีผลทำให้แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก และ *Bacillus* spp. เจริญเพิ่มจำนวนในปริมาณมากขึ้น ทำให้ลูกแป้งที่ผลิตได้ด้อยคุณภาพ

2.การบดสมุนไพรให้ละเอียด โดยการอบสมุนไพรให้แห้งแล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด แล้วชั่งให้ได้น้ำหนักตามต้องการ

3.ผสมแป้งและสมุนไพรกับลูกแป้งเก่าที่บดละเอียด โดยใช้ลูกแป้งเก่า 15 กรัม ต่อแป้ง 1 กิโลกรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน เติมน้ำในปริมาณที่เมื่อนวดแป้งแล้วจะปั้นเป็นก้อนได้ ซึ่งควรมีความชื้นประมาณ 45-46 เปอร์เซ็นต์ (ประมาณ 80 มิลลิลิตรของน้ำต่อแป้ง 100 กรัม)

4.เมื่อนวดแป้งจนเหนียวแล้วจึงปั้นเป็นก้อนกลมขนาดต่าง ๆ พบว่าการหมักแป้งที่นวดเสร็จแล้วประมาณ 6-12 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาปั้นจะได้ลูกแป้งที่มีคุณภาพดีกว่าที่ปั้นโดยไม่หมักแป้ง

5.ปั้นเป็นลูกแป้งกลม ๆ นำไปวางบนกระด้งที่สะอาดหรือภาชนะที่ระบายอากาศได้ดี โดยวางลูกแป้งแต่ละลูกห่างกันเล็กน้อย เนื่องจากเมื่อเชื้อจุลินทรีย์เจริญจะทำให้ลูกแป้งฟูขึ้น ส่วนลูกแป้งด้านที่ติดกับภาชนะจะแบนราบตามผิวที่สัมผัสโดยที่ด้านบนยังคงรูปร่างโค้งเป็นครึ่งวงกลม สำหรับการปั้นลูกแป้งขนาดใหญ่เมื่อเรียงบนภาชนะแล้วควรกดด้านบนเล็กน้อยเพื่อให้ลูกแป้งบางลง จุลินทรีย์ภายในลูกแป้งจะมีอากาศมากขึ้น

6.คลุมลูกแป้งด้วยผ้าขาวบาง 2 ชิ้น โดยไม่ให้สัมผัสกับลูกแป้งเพื่อรักษาอุณหภูมิและความชื้น บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน ลูกแป้งจะมีเส้นใยเชื้อราสีขาวเกิดขึ้นแสดงว่าใช้ได้ จากนั้นนำไปตากแดดให้แห้งประมาณ 3-5 วัน นำไปเก็บไว้ในภาชนะที่แห้งและปิดฝาให้สนิท อย่าให้ถูกความชื้นหรือที่มีความร้อน จะเก็บไว้ได้นาน 6 เดือน (อภิชญา, 2556)

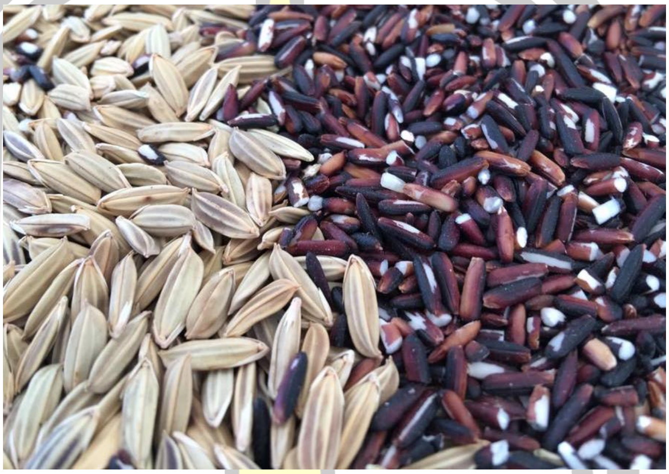
ขนาดของลูกแป้งมีตั้งแต่ลูกเล็กเท่ากระสุนหรือใหญ่ขนาดเท่าลูกมะนาว โดยทั่วไปจะใช้ลูกแป้งหนักประมาณ 2-5 กรัมต่อข้าวเหนียวหรือวัตถุดิบ 1 กิโลกรัม แต่ถ้าต้องการเพิ่มปริมาณแอลกอฮอล์ก็สามารถเพิ่มลูกแป้งได้อีกแต่อาจจะมีกลิ่นของเครื่องเทศปนอยู่ด้วย

2.4.ข้าวเหนียวลืมผัว

2.4.1 ประวัติความเป็นมาของข้าวเหนียวลืมผัว

ข้าวเหนียวลืมผัว (*Oryza sativa* Linn.) เป็นชื่อที่นายสมเดช ท้าววัฒนากุล ประธานสภา อบต.คีรีราษฎร์เป็นผู้ตั้งชื่อ โดยได้ความคิดจากเรื่องที่เล่าสืบต่อกันมาเกี่ยวกับสามี

ภรรยาชาวม้งคู่หนึ่ง คือเมื่อสามีชาวม้งได้ออกไปทำธุระนอกบ้าน โดยให้ภรรยาหุงข้าวไว้ แต่ระหว่างที่รอสามีกลับบ้าน ภรรยาได้หยิบข้าวที่สุกแล้วมาปั้นกินเล่น ด้วยความที่ข้าวดังกล่าวมีกลิ่นหอม รสชาติอร่อย เคี้ยวเพลิน ภรรยาจึงกินข้าวหมดโดยไม่รู้ตัวไม่เหลือเก็บไว้ให้สามีจึงเป็นที่มาของ “อร่อยจนลืมผัว” นั่นเอง



ภาพที่ 2 เมล็ดข้าวเหนียวลืมผัว

ข้าวเหนียวลืมผัว เป็นข้าวเหนียวนาปีของกลุ่มชาติพันธุ์ชาวม้ง บ้านรวมไทยพัฒนาที่ 3 ตำบลรวมไทยพัฒนา อำเภอพบพระ จังหวัดตาก ปลูกในสภาพไร่ สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 650 เมตร และได้มีกลุ่มชาติพันธุ์ชาวม้ง นำเมล็ดพันธุ์มาปลูกในบริเวณรอยต่อระหว่างอำเภอนครไทย และอำเภอชาติตระการ จังหวัดพิษณุโลก

ต่อมาปี 2533 นายพนัส สุวรรณธาดา ตำแหน่งในขณะนั้นคือ เจ้าพนักงานการเกษตร 5 ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก (เกษียณอายุราชการในตำแหน่งเจ้าพนักงานการเกษตร 6 ศูนย์วิจัยข้าวนครราชสีมา ปี 2551) ไปปฏิบัติการราชการโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริภูขัด ภูเมี่ยง ภูสอยดาว บริเวณอำเภอนครไทยและอำเภอชาติตระการจังหวัดพิษณุโลก ได้พบเห็นและสนใจจึงรวบรวมและนำมาปลูกเปรียบเทียบกับข้าวที่ปลูกจากแหล่งเดิม อำเภอพบพระ และคัดเลือกพันธุ์ให้บริสุทธิ์

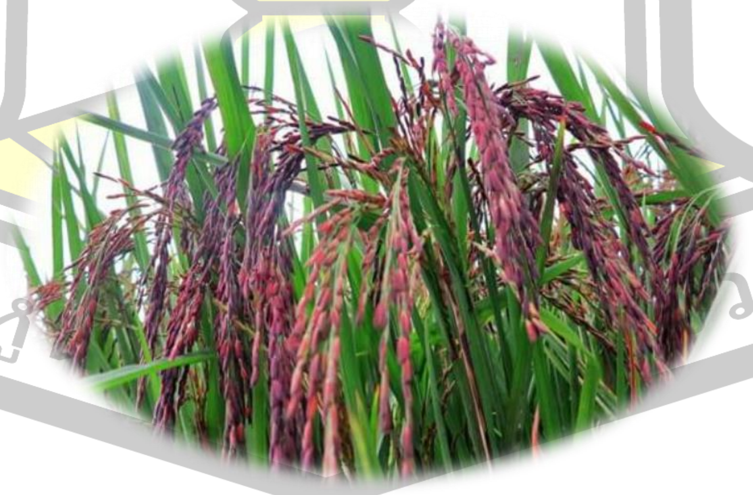
ระหว่างปี 2534-2538 ณ ส่วนแยกของสถานีทดลองพืชสวนดอยมูเซอ อำเภอพบพระ จังหวัดตาก เพื่อใช้ในโครงการตามพระราชเสาวนีย์ของสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ เมื่อคัดเลือกพันธุ์บริสุทธิ์แล้วได้มอบเมล็ดพันธุ์ให้นายไชยวัฒน์ วัฒนไชย ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร ในขณะนั้น (เกษียณอายุราชการในตำแหน่ง รองอธิบดีกรมการข้าว ปี 2552 ปัจจุบันเป็นที่ปรึกษาอธิบดีกรมการข้าว) สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ ที่เสด็จมาเยี่ยมชมโครงการฯ

จากนั้น นายพนัส สุวรรณธาดา จึงได้ทำแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์บริสุทธิ์ในปี 2539 แล้วนำเมล็ดพันธุ์ที่ได้ไปให้กลุ่มชาติพันธุ์ชาวม้ง ที่ตำบลรวมไทยพัฒนา อำเภอพบพระ จังหวัดตาก ซึ่งเป็นแหล่งปลูกดั้งเดิมปลูกขยายพันธุ์เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป แต่เมื่อเวลาผ่านไปด้วยวิธีการปลูกแบบชาวเขาที่มักปลูกข้าวหลายพันธุ์ใกล้กันหรือปลูกด้วยกัน ทำให้ข้าวเหนียวลืมผัวมีเมล็ดพันธุ์ข้าวพันธุ์อื่นปน และไม่เป็นพันธุ์บริสุทธิ์

ปี 2550 ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลกและศูนย์วิจัยข้าวแพร่ จึงได้เริ่มทำการคัดเลือกพันธุ์บริสุทธิ์อีกครั้ง เริ่มจากการคัดเลือกแบบหมู่ (Mass selection) และคัดเลือกรวงในปี 2551 เพื่อมาทำเป็นพันธุ์บริสุทธิ์โดยปลูกแบบรวงต่อแถวแล้วนำไปเปรียบเทียบผลผลิตเบื้องต้นที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรตาก ทดสอบการปรับตัวในแปลงเกษตรกรที่อำเภอเขาค้อจังหวัดเพชรบูรณ์ปลูกเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานีและในนาราษฎร์วิเคราะห์คุณค่าเมล็ดทางโภชนาการ ทดสองปฏิกิริยาการตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจน ทดสอบปฏิกิริยาต่อโรคและแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญ วิเคราะห์คุณภาพเมล็ดทางกายภาพ เคมีคุณภาพสีการหุงต้มรับประทานและทำลายพิมพ์เอกลักษณ์ (DNA fingerprint) (ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2557)

2.4.2 ลักษณะประจำพันธุ์

ข้าวเหนียวดำลืมผัว หรือข้าวเหนียวลืมผัว เป็นข้าวเหนียวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวกล้องสีดำ ไวต่อช่วงแสง อายุสั้น เก็บเกี่ยวประมาณกลางเดือนตุลาคม ลักษณะทรงกอตั้ง ต้นแข็ง ไม่ล้มง่าย ปล้องสีเหลืองอ่อน กาบใบและใบสีเขียว ลิ้นใบสีน้ำตาลอ่อน หูใบสีเหลืองน้ำตาล ใบธงหักลง คอรวงยาว รวงค่อนข้างแน่น กลีบดอกระยะออกรวง 50 เปอร์เซ็นต์ มีสีเขียวอ่อน เมื่อถึงระยะน้ำนม กลีบดอกจะเปลี่ยนสีเป็นแถบสีม่วงบนพื้นสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ลักษณะต้นข้าวลืมผัว

ที่มา : ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, (2557)

ต่อมาเมื่อเข้าสู่ระยะแป้งแข็ง สีกลีบดอกจะเปลี่ยนเป็นสีฟางแถบม่วงดำและเมื่อข้าวถึงระยะสุกแก่ สีเปลือกเมล็ดเปลี่ยนเป็นสีฟางแถบดำ ความสูงเฉลี่ย 151 เซนติเมตร น้ำหนักข้าวเปลือก 10.4 กิโลกรัมต่อถังข้าวเปลือก 1,000 เมล็ด หนัก 38.1 กรัม

ทั้งนี้ ข้าวเปลือกยาว 10.7 มิลลิเมตร หนา 1.9 มิลลิเมตร คุณภาพการสีดี ได้ข้าวเมล็ดเต็มและต้นข้าว 48.2 เปอร์เซ็นต์ คุณภาพเมล็ดทางเคมีการสลายเมล็ดในด่างที่ 1.4 และ 1.7 เปอร์เซ็นต์ KOH ค่าอุณหภูมิแป้งสุกปกติ ค่าอัตราการยืดตัวปกติ ระยะพักตัว 5 สัปดาห์

2.4.3 สรรพคุณของข้าวเหนียวลืมผัว

1. เมล็ดของข้าวเหนียวลืมผัวมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ดังนี้

- สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น แอนโทไซยานิน และแกมมาโอไรซานอล
- กรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น โอเมกา 3 โอเมกา 6 และโอเมกา 9
- วิตามิน เช่น วิตามิน บี 1 และวิตามิน บี 2
- ธาตุอาหารอื่น ๆ เช่น เหล็ก แคลเซียม และแมงกานีส

คุณค่าทางโภชนาการเหล่านี้ สามารถป้องกันการเกิดโรคหัวใจ ลดการแข็งตัวของเลือด ลดการขยายตัวของเซลล์มะเร็ง ช่วยบำรุงตับ ป้องกันโรคสมองเสื่อมหรือโรคอัลไซเมอร์ ลดไขมันในเส้นเลือด โรคเบาหวาน รวมไปถึงโรคหย่อนสมรรถภาพทางเพศในชายและหญิง เป็นต้น

2. ข้าวพันธุ์นี้ เป็นข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงดำ หรือที่เรียกกันว่า ข้าวเหนียวดำ เป็นข้าวเหนียวที่มีกลิ่นหอม รสชาติอร่อย เมื่อเคี้ยวจะรู้สึกมัน กรุบ หนึบ ภายในนุ่มเหนียว เนื่องจากเป็นข้าวที่ยังไม่ได้ผ่านการขัดสี

2.4.4 พื้นที่แนะนำในการปลูก

สภาพไร่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินดี มีอากาศเย็น และระดับความสูงประมาณ 400-800 เมตร จากระดับน้ำทะเลปานกลาง

2.4.5 ข้อควรระวังในการปลูกข้าว

ข้าวเหนียวลืมผัว เป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง รวมถึงมีศัตรูพืช เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และเพลี้ยกระโดดหลังขาว

ทั้งนี้ ข้าวเหนียวลืมผัวเปิดตัวครั้งแรกโดยกลุ่มแม่บ้านเกษตรกรบ้านป่าคาใหม่ ซึ่งตั้งอยู่ใน ตำบลคีรีราษฎร์ อำเภอพบพระ จังหวัดตาก โดยชาวบ้านได้นำมาจำหน่ายเป็นรายได้เสริมในงานประเพณีกินข้าวใหม่ขององค์การบริหารส่วน ต.คีรีราษฎร์ ในปี พ.ศ. 2548 หลังจากนั้นข้าวเหนียวลืมผัวก็เริ่มเป็นที่รู้จักแพร่หลาย ซึ่งนอกจากจะนำไปนึ่งเป็นข้าวเหนียวแล้ว ยังสามารถนำข้าวเหนียวลืมผัวไปผสมข้าวอื่น ๆ ก่อนนำไปต้ม เพื่อให้ข้าวต้มมีสีม่วงอ่อนสวยงามน่ารับประทาน หรือจะนำไปทำเป็นขนมข้าวเหนียวเปียก หรือจะทำเป็นเครื่องดื่มจำพวกชาข้าวได้

2.4.6 ขั้นตอนการนึ่งข้าวเหนียวลืมผัว

1. นำข้าวเหนียวที่ได้ไปทำการล้างน้ำให้สะอาด โดยล้างประมาณ 2 น้ำ
2. เติมน้ำสะอาดลงไปให้พอท่วม ตามด้วยเกลือ 1 ช้อนโต๊ะที่เตรียมไว้
3. หลังจากนั้นแช่ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ชั่วโมง ก็สามารถนำไปนึ่งได้

สาเหตุที่ต้องแช่ข้าวเหนียวในน้ำเกลือก่อนนำไปนึ่งนั้น เพราะจะช่วยลดระยะเวลาในการแช่ข้าวเหนียวได้ ซึ่งปกติการแช่ข้าวเหนียวอาจต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 1 คืน แต่เมื่อเติมเกลือลงไปจะใช้เวลาแช่ข้าวเหนียวแค่ 1-2 ชั่วโมง ก็จะช่วยทำให้ข้าวเหนียวนุ่มน่ารับประทานยิ่งขึ้นได้อย่างง่ายดาย (ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2557)

2.5 กระบวนการหมักแอลกอฮอล์

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในสภาพที่ไม่มีอากาศ การหมักแอลกอฮอล์ที่รู้จักกันดีโดยทั่วไปเป็นการหมักโดยเชื้อยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* spp. ตามทฤษฎียีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้ 51.1 เปอร์เซ็นต์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซต์ 48.9 เปอร์เซ็นต์

แต่ในทางปฏิบัติน้ำตาลประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นที่ถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ นอกนั้นยีสต์ใช้สำหรับการเจริญและเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่น ๆ ในการหมักแอลกอฮอล์ในระดับอุตสาหกรรมจะได้ผลผลิตต่าง ๆ ดังนี้ (จารุวรรณ, 2551)

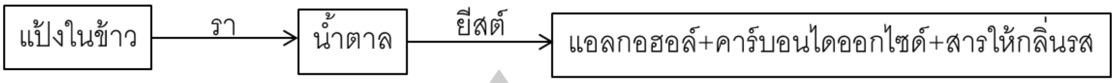
1. Ethanol	48.4	เปอร์เซ็นต์
2. Carbon dioxide	46.5	เปอร์เซ็นต์
3. Acetaldehyde	0-0.3	เปอร์เซ็นต์
4. Acetic acid	0.05-0.25	เปอร์เซ็นต์

2.6 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักสาโท

ลูกแป้งที่ใช้ในการหมักสาโทนั้นมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่ และเป็นจุลินทรีย์เฉพาะบางชนิดเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากการใช้เครื่องเทศสมุนไพรในส่วนผสมของลูกแป้ง ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ จุลินทรีย์ที่พบในลูกแป้งได้แก่ รา และยีสต์

2.6.1 เชื้อรา

รา เป็นสิ่งมีชีวิตที่ต้องการอากาศในการหายใจ และจะผลิตน้ำย่อยออกมาย่อยแป้งในเมล็ดข้าว ให้กลายเป็นน้ำตาล ส่วนยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเซลล์เดียว ที่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ซึ่งจะสร้างน้ำย่อยเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ นอกจากนั้นยังผลิตกลิ่นรสของเครื่องดื่ม ทำให้มีกลิ่นชวนดื่ม การเจริญของยีสต์ไม่จำเป็นต้องใช้อากาศในการหายใจ ดังนั้นจึงสามารถหมักในขั้นนี้ ในภาชนะปิดได้ แต่ต้องมีช่องระบายก๊าซออก เพราะในการผลิตแอลกอฮอล์นั้นจะมีผลพลอยได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์



ภาพที่ 4 กระบวนการย่อยแป้งของราและการหมักยีสต์

ที่มา : นิภาพร และคณะ, (2550)

รา ที่พบในลูกแป้ง ได้แก่ *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus oryzae* ซึ่งเป็นราสีขาว ในการหมักช่วงแรก เชื้อราจะสร้างเส้นใยชอนไชไปทั่วข้าว และย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล แต่เนื่องจากเป็นราสีขาวจึงไม่ทำให้ข้าวเปลี่ยนสี เนื่องจากมองไม่เห็นเส้นใยชัดเจน ต่างจากการหมักซีอิ๊วเต้าเจี้ยว ที่ใช้ราสีเขียว เมื่อแป้งในข้าวถูกย่อยกลายเป็นน้ำตาล จึงไม่สามารถอุ้มน้ำเอาไว้ได้ และน้ำที่มีอยู่ก็จะซึมออกมา เป็นน้ำเชื่อมข้าว ในช่วงนี้ราจะสร้างกรด ทำให้ข้าวมีความเป็นกรด คือมีค่า pH ต่ำลง ทำให้เกิดสภาพที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ และยับยั้งแบคทีเรียที่จะทำให้ข้าวบูดเน่า

2.6.2 เชื้อยีสต์

ยีสต์หลักที่พบในลูกแป้ง คือ *Saccharomycopsis fibuligera* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีความสามารถผลิตน้ำย่อย ย่อยแป้งได้ด้วย แต่ในลูกแป้งจะไม่พบยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้ทำไวน์ ซึ่งขัดกับความเชื่อเดิมที่ว่าลูกแป้งเป็นแหล่งของยีสต์นี้ซึ่งทำให้เกิดการหมัก

2.7 เอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการหมักสาโท

เอนไซม์ที่มีความสำคัญในการหมักสาโท คือ เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ซึ่งเป็น extracellular enzyme มีความสามารถในการย่อยแป้ง พบในสัตว์เซลล์ของพืชและจากการสร้างของจุลินทรีย์ สามารถแบ่งเอนไซม์อะไมเลสตามตำแหน่งการย่อยแป้งได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. Endoamylase ย่อยสลายแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง α-1,4 glucosidic linkage ทำให้ได้ reducing group และ dextrin ซึ่งมี glucose chain ขนาดต่าง ๆ กัน เอนไซม์ประเภทนี้ คือ α-amylase หรือ amylo (1,4) dextrinase เอนไซม์นี้พบทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์

2. Exoamylase ย่อยแป้งจาก non-reducing end เข้าไป เอนไซม์ประเภทนี้ ได้แก่ β-amylase และ glucoamylase (Štornik *et al*., 2016)

2.8 ไซเดอร์

ไซเดอร์ (Cider หรือ Cyder) เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่กำลังได้รับความนิยมมากขึ้นเรื่อยๆ ด้วยวัฒนธรรมการดื่มที่ไม่ยุ่งยากเหมือนไวน์ ไซเดอร์เป็นการหมักน้ำผลไม้หรือธัญพืชด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดอะซิติก ทำให้มีรสเปรี้ยวเล็กน้อย ไซเดอร์ยังอุดมไปด้วยวิตามินและสารที่มีประโยชน์ ช่วยทำให้ระบบขับถ่ายทำงานได้ดีขึ้น ลดความเสี่ยงการเกิดเซลล์มะเร็งในลำไส้ใหญ่ และลดปริมาณน้ำตาลในกระแสเลือด เป็นต้น (Lorenzini *et al*., 2019)

2.8.1 ประเภทของไซเดอร์

ประเภทแรก ไซเดอร์มีรสชาติ และมีปริมาณแอลกอฮอล์ที่แตกต่างกัน ขึ้นกับกระบวนการหมัก ส่วนประกอบที่ใช้หมักไซเดอร์ เช่น ชนิดผลไม้ และระยะเวลาในการหมัก ทำให้ไซเดอร์มีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไป เช่น “soft cider” คือ ไซเดอร์ชนิดมีแอลกอฮอล์ ในปริมาณต่ำร้อยละ 0.5 โดยมีกลิ่นรสผลไม้ หรือธัญพืช มีรสออกหวาน ซึ่งโดยปกติไม่มีการเติม สารเพิ่มความหวานแต่เป็นรสชาติที่มาจากน้ำผลไม้ หรือธัญพืชไซเดอร์ที่ได้จากการหมัก

ประเภทที่สอง เรียกว่า “hard cider” คือ ไซเดอร์ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงกว่าประเภทแรก โดยมีระดับปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 4.5-6.5 ไซเดอร์ที่มีการผลิตจากแหล่งผลิตต่างกัน ปริมาณแอลกอฮอล์ อาจแตกต่างกันได้ เช่น soft cider ในประเทศฝรั่งเศส มีแอลกอฮอล์ ต่ำกว่าร้อยละ 3.0 ซึ่งจะแตกต่างจากไซเดอร์ดั้งเดิมของประเทศอังกฤษ ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ถึงร้อยละ 8.5 หรือสูงกว่า

2.8.2 กระบวนการผลิตไซเดอร์

การผลิตไซเดอร์ประกอบด้วยขั้นตอนการหมักที่สำคัญ 2 ขั้นตอน คือ

1. การหมักระยะแรก นำผลไม้หรือธัญพืชมาสกัดให้เป็นน้ำ หรือทำการหมักเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยยีสต์ (*Saccharomyces*) ที่ได้จากการเติมเชื้อยีสต์สายพันธุ์เฉพาะหรือยีสต์ที่มีตามธรรมชาติที่ติดมากับผิวผลไม้ หรือธัญพืช

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

2. การหมักระยะที่สอง เป็นการหมักเพื่อเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก โดยแบคทีเรีย *Acetobacter* sp. ขั้นตอนนี้จึงเป็นการหมักเพื่อให้เกิดกลิ่นรสที่ดี ไซเดอร์มีรสชาติ (วรรณดี และคณะ, 2560)

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

2.9 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไซเดอร์

2.9.1 ยีสต์

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อ (budding) บางชนิดมีการแบ่งตัว (binary fission) รูปร่างกลม (spherical) หรือรี (cllipsoidal) หรือรูปไข่ (oval) (ภาพที่ 5) ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เจริญได้ในอาหารที่มี pH เป็นกรด ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกยีสต์ คือ ขนาดและสีของโคโลนี การสืบพันธุ์ (บุษกร, 2550)ยีสต์มีอยู่หลากหลายสายพันธุ์แต่ก็มีไม่กี่สายพันธุ์เท่านั้นที่นำมาใช้หมักอาหาร เช่น *Candida* spp. และ *Saccharomyces cerevisiae* ยีสต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น เบียร์

ไวน์ ขนมปัง ไซเดอร์ และเอทานอล ซึ่งการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้ผลิต เอทานอลเพื่อผลิตไซเดอร์หมักนั้นต้องคำนึงถึงความสามารถเจริญได้ในวัตถุดิบที่มีน้ำตาล และต้องสามารถผลิตเอทานอลได้สูงเป็นปัจจัยที่ต้องให้ความสำคัญเป็นอันดับแรก (ชูชาติ และคณะ, 2559)

ภาพที่ 5 *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา : Remli *et al*., 2014

2.9.1.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล

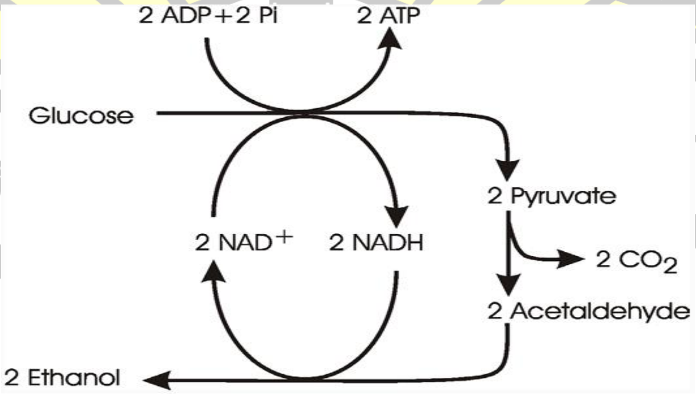
ความสามารถในการหมักเอทานอลของยีสต์เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสายพันธุ์ แต่กระบวนการหมักเอทานอลยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ปัจจุบันจึงมีการคัดเลือกยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมในการหมักเอทานอล นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาการผลิตเอทานอลโดยการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* แต่แบคทีเรียมีความสามารถทนต่อเอทานอลได้ต่ำกว่ายีสต์ ซึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์ ได้แก่ ความทนต่อเอทานอล ความทนต่อความเข้มข้นของสับสเตรท และความทนอุณหภูมิสูง การเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์จะถูกยับยั้งด้วยแอทานอล โดยพบว่าเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 1-2 ส่งผลให้การเจริญเติบโตของยีสต์ลดลง ซึ่งเอทานอลจะไปยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และโปรตีนทำให้การเจริญเติบโตลดลง เนื่องจากโปรตีนในเซลล์เสื่อมสภาพ (denature) ในขณะที่ความเข้มข้นของสับสเตรทสูงกว่าร้อยละ 14 จะมีผลต่อการเจริญของยีสต์ และอัตราการหมักจะลดลง เนื่องจากเซลล์ยีสต์จะเกิดพลาสโมไลซิส นอกจากนี้อุณหภูมิที่ใช้หมักเอาทานอลก็มีความสำคัญ โดยทั่วไปช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล คือ 25-28 องศาเซลเซียส อุณหภูมิในกระบวนการหมักเอทานอลมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ สำหรับการออกซิเดชั่นทำให้เกิดการสะสมของไพรูเวทและเอทานอล (อุไรวรรณ และคณะ, 2555)

2.9.1.2 กระบวนการหมักเอทานอล

กระบวนการหมักเอทานอลในสภาวะที่มีอากาศ ยีสต์จะเจริญเติบโตเนื่องจากมีการออกซิ-เดชั่นของกลูโคสเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์โดยวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) และในกระบวนการลูกโซ่หายใจ ซึ่งออกซิเจนจะทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายและเป็นองค์ประกอบของไซโตโครมในกระบวนการลูกโซ่หายใจเพื่อสร้างมวลเซลล์ แต่ในกระบวนการหมักเอทานอลในสภาวะที่ไม่มีอากาศ เริ่มต้นจากน้ำตาลถูกเปลี่ยนไปตามวิถีไกลโคลไลซิส (Glycolytic pathway) หรือกระบวนการเอมบ์เดนเมเยอร์ฮอฟพาร์นาส (Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway) จะได้ไพรูเวท (pyruvate) โดยน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล จะให้ไพรูเวท 2 โมเลกุล

ต่อจากนั้นไพรูเวทเกิดการแยกเอาคาร์บอนไดออกไซม์ออก เรียกว่า การเกิดการดีคาร์บอก-ซิเลชั่น (decarboxylation) โดยมีเอนไซม์ไพรูเวทดีคาร์บอกซีเลส (pyruvate decarboxylase) เป็นตัวเร่งสร้างแอซิตัลดิไฮด์ (acetaldehyde) และจะถูกรีดิวส์โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) เป็นเอทานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (ภาพที่ 6) ซึ่งการหมักน้ำตาลของยีสต์สามารถคำนวณได้ด้วยสมการ Gay-Lussac ต่อไปนี้

ซึ่งตามทฤษฎีการหมัดเอทานอล กลูโคส 1 กรัม จะให้ปริมาณเอทานอล 0.511 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.489 กรัม นั่นมีค่าผลผลิตทางทฤษฎี (theoretiacal yield) สำหรับการผลิตเอทานอลเท่ากับร้อยล่ะ 51.1 แต่ในการหมักทั่วไป กลูโคส 1 กรัม จะให้เอทานอลเพียงร้อยละ 90 ของผลผลิตทางทฤษฎี เพราะกลูโคสส่วนหนึ่งยีสต์จะใช้เพื่อการเจริญเติบโต และบางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตพลอยได้ เช่น กลีเซอรอล และซัคซิเนท นอกจากนี้กระบวนการหมักเอทานอลยังขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น เอทานอล ความเข้มข้นของสับสเตรท สารอาหาร และสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ พีเอช ออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ (ชูชาติ และคณะ, 2559)

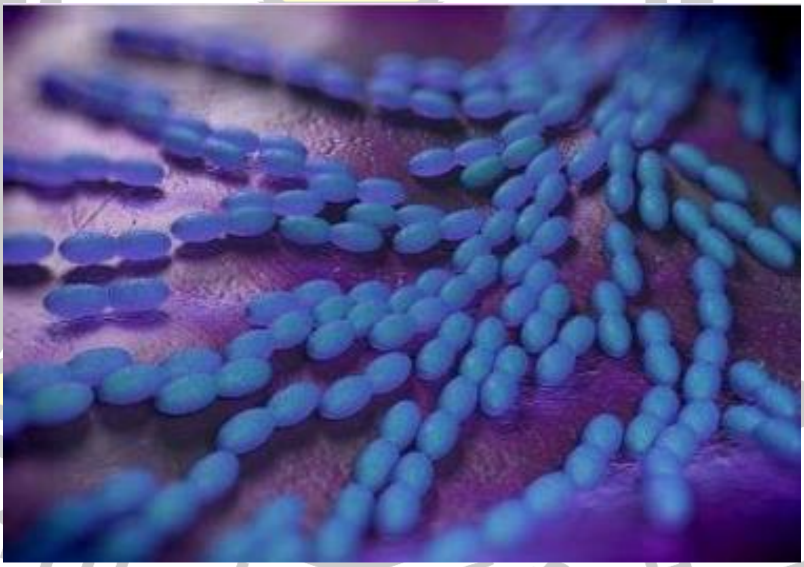


ภาพที่ 6 กระบวนการผลิตเอทานอลของยีสต์

ที่มา : Remli *et al*., 2014

2.9.2 แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก

แบคทีเรียกรดอะซิติกจัดอยู่ในแฟมิลี *Acetobacteraceae* (ภาพที่ 7) ปัจจุบันประกอบด้วย 12 จีนัส 59 สายพันธุ์ ซึ่งแต่ละจีนัสจะมีสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาวะในการออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นเอทานอลต่างกัน กลุ่มที่ผลิตกรดอะซิติกได้ คือ จีนัส *Acetobacter* sp. และ *Gluconobacter* เซลล์รูปร่างเป็นแท่ง แกรมลบ จัดเป็นพวกต้องการออกซิเจนในการหายใจ (obligate aerobe) สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติกได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีในช่วง pH 5.3-6.3 (Hulkins, 2006) แบคทีเรียจีนัส *Gluconobacter* สามารถออกซิไดซ์เอทานอลได้เป็นกรดอะซิติกเพียงอย่างเดียวแต่ให้ปริมาณกรดอะซิติกต่ำ (สมใจ, 2550)แบคทีเรีย *Acetobacter* สามารถออกซิไดซ์เอทานอล ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ เรียกว่า overoxidation แหล่งคาร์บอนที่ดี ได้แก่ กลีเซอรอล เอทานอล น้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 30 ไม่สร้างรงควัตถุสีน้ำตาล และมีระบบยูบิควิโนน (ubiquinone) ชนิด Q9 เป็นองค์ประกอบหลักภายในเซลล์ ซึ่งแตกต่างกับจีนัส *Gluconobacter* และ *Gluconacetobacter* ที่มีระบบยูบิควิโนนชนิด Q10 สามารถสร้างรงควัตถุ สีน้ำตาล และเจริญที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 30 (Dung, 2013)



ภาพที่ 7 Acetobacteraceae

ที่มา : Dung, 2013

2.9.2.1 ความสามารถในการทนกรดอะซิติก

โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดอะซิติกจะสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติกระดับหนึ่งเท่านั้นและจะถูกยับยั้งด้วยกรดอะซิติกที่เซลล์ผลิตขึ้นเป็นสาเหตุให้เกิดการลดจำนวนของเซลล์ลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งปริมาณกรดอะซิติกที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่า pH ลดลงซึ่งส่งผลให้เซลล์ทำงานหนักในการรักษาสมดุลในเซลล์ (กฤษณา, 2554) เนื่องจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียต้องอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อย และดูดซึมสารอาหารเพื่อผลิตพลังงาน

2.9.2.2 ความสามารถในการผลิตกรดอะซิติก

ปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดอะซิติก คือ ต้องมีความสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีปริมาณเอทานอลและมีความสามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงและเร็วโดยที่ไม่ถูกยับยั้งด้วยกรดอะซิติกที่เซลล์ผลิตขึ้น

ชื่นจิตร และคณะ, 2561 ได้ศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากโคจิข้าวเหนียวโดยวิธีการหมักแบบดั้งเดิม โดยเริ่มต้นจากการทำโคจิข้าว ได้แก่ ข้าวเหนียวฮาง ข้าวเหนียวขาว และข้าวเหนียวดำ โดยใช้สปอร์ *Aspergillus oryzae* L. 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/w) กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 1% (w/w) ในขั้นตอนการหมักกรดอะซิติกใช้ *Acetobacter aceti* 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ผลการทดลองพบว่า ข้าวเหนียวดำมีความเหมาะสมกว่าข้าวชนิดอื่น เนื่องจากมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 0.821 ยูนิต/กรัม มีปริมาณของแข็งละลายทั้งหมดสูงสุดได้ 10 องศาบริกซ์ ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด 11 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรดอะซิติก 5.16 เปอร์เซ็นต์

แบคทีเรียที่นิยมนำมาผลิตกรดอะซิติก ได้แก่ *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter peroxidans* และ *Gluconobacter oxydans* ซึ่งขั้นตอนการผลิตกรดอะซิติกสามารถแบ่งได้ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกแบคทีเรียกรดอะซิติกจะออกซิไดซ์เอทานอลเป็นแอซิตัลดิไฮด์ โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcoholdyhydrogenase) และขั้นที่สองเป็นการเปลี่ยนแอซิตัลดิไฮด์ไปเป็นกรดอะซิติก โดยเอนไซม์แอซิตัลดีไฮโดรจีเนส (acetadyhyde dehydrogenase) ซึ่งเอนไซน์ทั้งสองชนิดนี้เกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Qi *et al*., 2014)

2.10 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตารางที่ 2 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักสาโท

เชื้อจุลินทรีย์	วัตถุดิบที่ใช้	สภาวะที่ใช้ในการทดลอง	วิธีการทดลอง	ผลการทดลอง	ที่มา
Rhizopus sp., *Mucor* sp., *Amylomyces* sp., *Aspergillus* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *S. diastaticus*, *Hensenula* sp., *Torulopsis* sp.	ข้าวหอมมะลิดอย, ข้าวเหนียวลืมผัว, ข้าวหอมภูพาน, ข้าวหอมนิล, ข้าวไรซ์เบอร์รี่, ข้าวหอมมะลิ, ข้าว กข.6	อุณหภูมิห้อง 14 วัน	นำตัวอย่างข้าวทั้ง 7 ชนิด มานึ่งให้สุกแล้วนำมาหมักโดยใช้ลูกแป้ง ซึ่งจะหมักไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 4 วัน หลังจากนั้นเติมน้ำสะอาด หมักต่ออีกเป็นระยะ 14 วัน เพื่อให้ได้สาโทที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูง ทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล โดยใช้ Hand refractometer ปริมาณกรดทั้งหมดโดยใช้วิธีการไตเตรตความเป็นกรดด่างโดยใช้ pH meter ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้ Ebulliometer ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยทำการทดสอบแบบ Hedonic scale test	จากทดลองพบว่า ข้าวหอมภูพานสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงที่สุดร้อยละ 15.30 ค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมดของสาโททั้ง 7 ชนิด พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 3.35–3.88 และ 0.029–0.109 โมลาร์ตามลำดับ นอกจากนี้การทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบ 40 คน พบว่า ข้าวหอมนิลมีระดับความพึงพอใจมากที่สุด	ชูชาติ และคณะ, (2559)

ตารางที่ 2 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักสาโท (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	**วัตถุดิบที่ใช้**	**สภาวะที่ใช้ในการทดลอง**	**วิธีการทดลอง**	**ผลการทดลอง**	**ที่มา**
Amylomyces sp., *Aspergillus* sp. *Rhizopus* sp. *Saccharomyces Cerevisiae* SYL16, *S. cerevisiae* SYL18, S. *cerevisiae* SYL20 *S. cerevisiae* SYL 24	ข้าวเหนียว	อุณหภูมิห้อง 14 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 48 ชั่วโมง	คัดแยกเชื้อราและยีสต์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อผสมในการผลิตลูกแป้ง โดยใช้รา 3 สายพันธุ์ และยีสต์ 4 สายพันธุ์ ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูง และมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลสูง ซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตลูกแป้ง ซึ่งได้มีการออกแบบการทดลองทั้งหมด 9 treatment จากนั้นทำการหมักสาโทจากลูกแป้ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 48 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์หา ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Miller (1959) ปริมาณกรดทั้งหมด (ปรับปรุงจาก AOAC, 1990) และ ปริมาณแอลกอฮอล์ในรูปเอทานอลโดยวิธี dichromate oxidation	จากการทอลอง พบว่าสูตรที่ 2 (*Amylomyces* sp., *Rhizopus* sp., *S. cerevisiae* SYL 16 และ *S. cerevisiae* SYL 18) ให้ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ซึ่งค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 0 และ 14 เท่ากับ 171.10 และ 34.60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมีปริมาณกรดทั้งหมด 0.73 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 14 มีปริมาณเอทานอลที่สูงที่สุดเท่ากับ 16.75 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ	วีระสิทธิ์ และคณะ, (2552)

ตารางที่ 2 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักสาโท (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	วัตถุดิบที่ใช้	สภาวะที่ใช้ในการทดลอง	วิธีการทดลอง	ผลการทดลอง	ที่มา
Rhizopus sp., *Saccharomyces* sp., *S. cerevisiae* NP 01, *S. bayanus* EC1118, *S. cerevisiae* Sweden	ข้าวเหนียว	อุณหภูมิห้อง 35 วัน	เปรียบเทียบระยะเวลาในการหมักเอทานอลในการผลิตสาโทโดยใช้เชื้อ *Rhizopus* sp. และยีสต์ผสมทำการหมักสาโทซึ่งมีลูกแป้งทั้งหมด 4 สูตร ทำการทดลองสูตรละ 4 ซ้ำ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 35 วัน ในระหว่างกระบวนการหมักสาโท เก็บตัวอย่างสาโทที่เวลาต่าง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดโดยใช้ Hand refractomater ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี Phenol sulfuric ความเป็นกรดด่างโดยใช้ pH meter ปริมาณกรดทั้งหมดโดยใช้วิธีการไตเตรต (Zoecklien และคณะ, 1995) และปริมาณเอทานอลโดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟ (Laopaiboon และคณะ, 2007) วัดปริมาณสารระเหยหลัก และทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่มีต่อผลิตภัณฑ์	จากการทดสอบเปรียบเทียบระยะเวลาการหมักสาโท คือ สาโทสูตรที่ 1 ใช้ยีสต์เดี่ยวจากโรงงาน (หจก.สัมฤทธิ์มั่นคง) สาโทสูตรที่ 2, 3 และ 4 ใช้ยีสต์ผสมระหว่างยีสต์โรงงานและ *S. cerevisiae* NP01, *S. bayanus* EC 1118 และ *S. cerevisiae* Sweden จากการทดลองพบว่า ยีสต์ที่ผสมในสูตรที่ 2 สามารถลดเวลาในการหมักเอทานอลจาก 35 วัน เป็น 32 วัน โดยได้ความเข้มข้นเอทานอลประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)	อรวรรณ และคณะ, (2553)

ตารางที่ 3 การหมักไซเดอร์และน้ำส้มสายชู

เชื้อจุลินทรีย์	วัตถุดิบที่ใช้	สภาวะที่ใช้ในการทดลอง	วิธีการทดลอง	ผลการทดลอง	ที่มา
A. oryzae L. *S. cerevisiae.* *Acetobacter aciti.*	ข้าวเหนียวฮาง ข้าวเหนียวขาว ข้าวเหนียวดำ	30 องศาเซลเซียส 7 วัน	ศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากโคจิข้าวเหนียว โดยวิธีการหมักแบบดั้งเดิม โดยเริ่มต้นจากการทำโคจิข้าว ได้แก่ ข้าวเหนียวฮาง ข้าวเหนียวขาว และข้าวเหนียวดำ โดยใช้สปอร์ *Aspergillus oryzae* L 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/w) กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 1 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ในขั้นตอนการหมักกรดอะซิติกใช้ *Acetobacter aceti* 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v)	ผลการทดลองพบว่า ข้าวเหนียวดำมีความเหมาะสมกว่าข้าวชนิดอื่น เนื่องจากมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 0.821 ยูนิต/กรัม dry weight มีปริมาณของแข็งละลายทั้งหมดสูงสุดได้ 10 องศาบริกซ์ ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด 11 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรดอะซิติก 5.16 เปอร์เซ็นต์	ชื่นจิตร และคณะ, (2561)

ตารางที่ 3 การหมักไซเดอร์และน้ำส้มสายชู (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	**วัตถุดิบที่ใช้**	**สภาวะที่ใช้ในการทดลอง**	**วิธีการทดลอง**	**ผลการทดลอง**	**ที่มา**
Saccharomyces cerevisiae Rhone 2226, *Saccharomyces cerevisiae* BDX	กล้วยน้ำว้า, กล้วยไข่, กล้วยเล็บมือนาง	22 องศาเซลเซียส 10 วัน	เปรียบเทียบการหมักไซเดอร์จากกล้วย 3 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว้า กล้วยไข่ และกล้วยเล็บมือนาง โดยการหมักใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 2 สายพันธุ์ คือ Rhone 2226 และ BDX ซึ่งการหมักไซเดอร์กล้วย มี 2 แบบ คือ การหมักโดยเติมหัวเชื้อในโหลแก้วที่มีน้ำกล้วย และการหมักโดยเติมหัวเชื้อในโหลแก้วที่มีเนื้อกล้วยหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ หมักที่ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าปริมาณแอลกอฮอล์ และปริมาณน้ำตาล	ผลการทดลอง พบว่าสายพันธุ์กล้วยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อระยะเวลาในการหมักไซเดอร์ ชนิดกล้วยไม่มีอิทธิพลต่อเชื้อยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ ในระหว่างการหมักนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) ของค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลและปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น ในขณะหมักบ่มความหวาน (องศาบริกซ์) จะลดลงผกผันกับปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้น และเมื่อเวลาหมักบ่ม 8-10 วัน ได้ปริมาณแอลกอฮอล์ ร้อยละ 12.5-14	วรรณดี และคณะ, (2555)

ตารางที่ 3 การหมักไซเดอร์และน้ำส้มสายชู (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	วัตถุดิบที่ใช้	สภาวะที่ใช้ในการทดลอง	วิธีการทดลอง	ผลการทดลอง	ที่มา
Amylomycse rouxii TISTR 3182 , *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049, *Acetobacter aceti* TISTR 354	ข้าวเหนียวดำ	อุณหภูมิห้อง	ศึกษาปริมาณโคจิที่เหมาะสมในการย่อยข้าวเหนียวดำ วางแผนการทดลองแบบสุ่ม โดยแปรผันปริมาณเปอร์เซ็นต์หัวเชื้อที่ใช้ 5 ระดับ คือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ0.5 นำโคจิมาผสมกับส่วนประกอบต่าง ๆ ของลูกแป้งเพื่อผลิตลูกแป้งจากนั้นศึกษาหา สภาวะการหมักสาโท 14 ระดับ คือ 1 ถึง 14 วัน หาสภาวการณ์หมักน้ำส้มสายชู 5 ระดับ คือ 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติก หาปริมาณเอทานอล	การศึกษาพัฒนาไซเดอร์ โดยใช้โคจิของเชื้อรา *Amylomycse rouxii* TISTR 3182 ปริมาณ 0.4% ของน้ำหนักข้าวเหนียวดำจะได้น้ำตาลกลูโคส 39.6 เปอร์เซ็นต์ และหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049 เป็นเวลา 8 วัน จะได้ไวน์ข้าวเหนียวดำที่มีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 11.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการปรับไวน์ข้าวเหนียวดำให้มีปริมาณแอลกอฮอล์ เริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ค่า pH เท่ากับ 5.5 หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* TISTR 354 ด้วยวิธีการเขย่าให้อากาศเป็นเวลา 3 วัน จะได้น้ำไซเดอร์จากข้าวเหนียวดำที่มีปริมาณกรดอะซิติก 5.48 เปอร์เซ็นต์ ค่า pH 3.38	ประวีณา และคณะ, (2556)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย

ตารางที่ 4 สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย

รายการสารเคมี	รุ่น/บริษัทผู้ผลิต/ประเทศ
ข้าวเหนียวลืมผัว	เครือข่ายวิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทรีย์อีสาน อำเภอเสลภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด ประเทศไทย วันที่ 27 ตุลาคม 2560
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	Fluka Chemical Co., USA
ผงมอลต์ (Malt extract)	Fluka Chemical Co., USA
เพปโทน (peptone)	Fluka Chemical Co., USA
ผงวุ้น (Agar Powder)	Fluka Chemical Co., USA
บีฟเอกซ์แทรกซ์ (Beef extract)	Fluka Chemical Co., USA
ผงแป้ง (Soluble starch)	Fluka / USA
น้ำตาลเด็กซ์ทรส (Dextrose)	Fluka / USA
แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO3)	BDH Prolabo, UK
เอทานอล (C2H5OH)	BDH (Poole, UK)
กลูโคส (C6H12O6)	Fluka / USA
กรดอะซิติก (CH3COOH)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
กรดทาร์ทาริก (C4H6O6)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
กรดแลกติก (C3H6O3)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
กรดซักซินิก (C4H6O4)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl2)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
กรดซิตริก (C6H10O8)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand

รายการวัสดุและเครื่องมือ (ต่อ)	**รุ่น/บริษัทผู้ผลิต/ประเทศ**
จานเพาะเชื้อ (Petri dish)	Pyrex / USA
แท่งแก้วงอ (Glass rod spreader)	Pyrex / USA
ที่เจาะ จุกคอร์ก (Cork borer)	Pyrex / USA
หลอดทดลอง (Tube)	Pyrex / USA
บีกเกอร์ (Beaker)	Pyrex / USA
เพลต 96 หลุม (96 well plate)	Cole-parmer / USA
ทิป (Tip)	Finn / Thermo scientific / Finland
เครื่องดูดจ่ายสารละลายขนาดเล็ก (Micropipette)	Finnpipette F1 / Thermo scientific / Finland
ตู้เก็บตัวอย่าง -20 องศาเซลเซียส (Freezer -20 °C)	Panasonic / Thailand
เครื่องชั่งแบบละเอียด (Analytical Balance)	Presica 25A / Switzerland
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	Mettler Toledo FiveEASY^{TM}Plus / FEP20
เครื่องบ่มแบบเขย่า (Shaking Incubators)	LSI-1005R / LabTech / Korea
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	Binder / Germany
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)	MAR1200 / LabTech / Korea
หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)	LAC-50605 / LabTech / Korea
เครื่องเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)	Universal 320R / Germany
เครื่องผสมตัวอย่าง (Vortex mixer)	Harmony / Japan
ตู้บ่ม (Incubator)	Binder / Germany
เครื่องวัดความหวาน (Hand refractometer)	Master-93H / ATAGO / Japan
เครื่องอ่านถาดไมโครเพลท (Microplate reader)	M965 / mastertech / Taiwan
เครื่องวัดสี color flex	CM-600d / Konica Minolta /Japan
เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	20A Series / Shimadzu / Japan
เครื่องวิเคราะห์แก๊สโครมาโทรกราฟฟี่ (GC)	Shimazu / Japan
เครื่องวิเคราะห์แก๊สโครมาโทรกราฟฟี่แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS)	QP2010 / Shimadsu / Japan

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1. การเก็บตัวอย่างลูกแป้งสาโท

เก็บตัวอย่างลูกแป้งผลิตสาโทจากสำนักงานเครือข่ายวิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทรีย์อีสาน อำเภอเสลภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด (เก็บตัวอย่างลูกแป้งวันที่ 27 ตุลาคม 2560) บ้านนาข่า ตำบลนาข่า อำเภอวาปีปทุม จังหวัดมหาสารคาม (เก็บตัวอย่างลูกแป้งวันที่ 30 พฤศจิกายน 2560) และตำบลเกาะยาวน้อย อำเภอเกาะยาว จังหวัดพังงา (เก็บตัวอย่างลูกแป้งวันที่ 15 พฤศจิกายน 2560) ทำการเก็บไว้ในภาชนะหรือถุงพลาสติกที่ปิดสนิท แล้วเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.2. คัดแยกเชื้อราและยีสต์จากลูกแป้งสาโท

3.2.2.1 การคัดแยกเชื้อรา

(ดัดแปลงจาก ชูชาติ และคณะ, 2559; ลือชัย, 2548)

นำลูกแป้งตัวอย่างหมักข้าวเหนียวลืมผัวเป็นสาโท โดยใช้ข้าวเหนียวลืมผัวที่นึ่งสุก 50 กรัม แล้วคลุกกับลูกแป้งร้อยละ 0.5 ปล่อยให้การหมักเกิดขึ้นที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 72 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นเส้นใยเชื้อราแล้วจึงนำเมล็ดข้าวมาวางในอาหาร potato dextrose agar (PDA) 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แยกเอาเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันมาทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยนำมา cross streak บนอาหารใหม่อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำเชื้อราเก็บไว้บน PDA slant เก็บในตู้เย็นเพื่อศึกษาต่อไป

3.2.2.2 วิธีการแยกยีสต์

นำลูกแป้งตัวอย่างหมักข้าวเหนียวลืมผัวเป็นสาโท โดยใช้ข้าวเหนียวลืมผัวที่นึ่งสุก 50 กรัม แล้วคลุกกับลูกแป้งร้อยละ 0.5 ปล่อยให้การหมักเกิดขึ้นที่อุณหภูมิห้อง เมื่อได้ประมาณ 72 ชั่วโมง จะเกิดน้ำหวานใส ๆ ออกมาที่เรียกว่า “น้ำต้อย” แยกยีสต์ที่เจริญในน้ำต้อย โดยนำน้ำต้อยมา spread plate บนอาหาร yeast extract peptone dextrose agar (YPD) agar 3 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อยีสต์เจริญนำมา cross streak บนอาหาร YPD agar จนได้เชื้อบริสุทธิ์และเก็บไว้ศึกษาต่อไป

3.2.3 การคัดเลือกเชื้อราและยีสต์

3.2.3.1 การคัดเลือกเชื้อรา

(ดัดแปลงจาก จิราภรณ์ และคณะ, 2553)

เพาะเลี้ยงราแต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2.2.1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นเพาะเชื้อแบบจุด (point inoculation) 1 จุด ลงบนจุดกึ่งกลางของจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วใช้คอร์กบอเรอร์ (cork borer) เบอร์ 4 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว กดลงไปบริเวณขอบโคโลนีของราเส้นใย ซึ่งเป็นบริเวณ

ที่เชื้อมีอายุน้อย ใช้เข็มถ่ายเชื้อเกี่ยวชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยวางลงบนตรงกลางอาหาร soluble starch agar (SA) ที่มีแป้งความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วหยดสารละลายไอโอดีนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ท่วมผิวหน้าอาหารเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที เทสารละลายออก และสังเกตบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเทียบกับขนาดโคโลนีเพื่อคัดเลือกราเส้นใยที่สามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลสออกมาย่อยแป้งได้ดีที่สุด จากนั้นนำเส้นใยราที่คัดเลือกได้มาวางในข้าวเหนียวลืมผัวนึ่งสุก (น้ำหนัก 40 กรัม) ที่บรรจุอยู่ในขวดโหล คลุกเคล้าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) method

3.2.3.2 การคัดเลือกเชื้อยีสต์

ทดสอบประสิทธิภาพในการหมักน้ำตาลและการผลิตเอทานอล

การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2.2.2 ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้ดี ทนต่อสภาวะการหมักที่มีแอลกอฮอล์สูงเพื่อใช้หมักข้าวเหนียวร่วมกับเชื้อราที่คัดเลือกได้ ประสิทธิภาพการหมักน้ำตาล โดยทดลองหมักในสารละลายน้ำตาลทรายที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 20 องศาบริกซ์ เติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ (w/v) แบ่งใส่หลอดละ 10 มิลลิลิตร (ภายในหลอดจะมีหลอดดักแก๊สอยู่ด้วย) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นถ่ายเชื้อยีสต์ที่เลี้ยงไว้ 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 วัน ในสภาวะไม่เขย่า ตรวจผลจากปริมาณน้ำตาลที่ลดลงด้วย hand refrectometer และวัดปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ โดยเครื่องวิเคราะห์แก๊สโครมาโทรกราฟฟี่ (GC) คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ในปริมาณสูงไว้ใช้ในการทำลูกแป้งต่อไป

ทดสอบความสามารถในการทนต่อแอลกอฮอล์

เตรียมน้ำหมักความเข้มข้นเริ่มต้น 15 องศาบริกซ์ โดยนำน้ำตาลมาหมักมาต้มกับน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ เติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และเติมเอทานอลลงไปในน้ำหมักให้มีความเข้มข้นของเอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์ และ 15 เปอร์เซ็นต์ นำน้ำหมักที่ได้แบ่งใส่หลอดที่เตรียมไว้ หลอดละ 10 มิลลิลิตร (ภายในหลอดจะมีหลอดดักแก๊สอยู่ด้วย) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นถ่ายเชื้อที่เลี้ยงไว้ 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 วัน ตรวจสอบผลโดยสังเกตปริมาณแก๊สในหลอดดักแก๊ส

3.2.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อราและยีสต์

3.2.4.1 การจัดจำแนกจีนัสของเชื้อรา

- จัดจำแนกจีนัสของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยนำเชื้อราบริสุทธ์ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA สังเกตลักษณะของโคโลนี และเส้นใย

- นำเชื้อราที่บริสุทธิ์แล้วส่งตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.2.4.2 การจัดจำแนกจีนัสของยีสต์

(ดัดแปลงจาก จิราพร, 2551)

- สัณฐานวิทยาของเซลล์ โดยนำยีสต์มา streak ลงบนอาหาร YPD agar และถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YPD broth และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 วัน สังเกตรูปร่าง ลักษณะโคโลนีการเจริญบนอาหารแข็ง และลักษณะเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์

- นำเชื้อยีสต์ที่บริสุทธิ์แล้วส่งตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

การสกัดดีเอ็นเอ

- นำเชื้อราและยีสต์ที่คัดเลือกได้มาแยกเชื้อใหเปนโคโลนีเดียว (single colony) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธ์ในอาหารแข็ง บมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปนเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นใชไม่จิ้มฟนที่อบฆาเชื้อแล่วแตะโคโลนีเดี่ยว มาเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร บมบนเครื่องเขยา ความเร็ว 200 รอบตอนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปนเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเก็บเซลลโดยใสใน microtube ขนาด 1 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงที่ 8,000 รอบตอนาที เปนเวลา 2 นาที เพื่อเก็บเซลล เทสารละลายสวนบนทิ้ง นำตะกอนเซลลมาล่างด่วย Tris–Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer (TE buffer) 567 ไมโครลิตร เติม 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) 30 ไมโครลิตรเอนไซม Proteinase K ความเข่มข่น 20 มิลลิกรัมตอมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบมไว่ที่ 37 องศาเซลเซียส เปนเวลา 1 ชั่วโมง แลวเติมโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเขยาใหเขากัน บมตอ 10-15 นาที

- กำจัดโปรตีนโดยการเติม สารละลาย Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) 1 เทาผสมให่เข่ากันโดยเอียงหลอดกลับไปกลับมา จากนั้นจะนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบตอนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายสวนบนใสในหลอดใหม่ กำจัดโปรตีนที่เหลือด่วย Phenol/Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) 1 เทา ซ้ำอีกครั้ง

- ตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติม isopropanal 0.6 เทา ของปริมาตรที่มีอยู นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบตอนาที เปนเวลา 15 นาทีเทสารละลายสวนใสทิ้ง ล่างเกลือที่ติดมากับตะกอนดีเอ็นเอด่วยเอทานอล 70% 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบตอนาที เปนเวลา 15 นาที เทสารละลายสวนใสทิ้ง ตากตะกอนดีเอนเอให่แห่ง ละลายด่วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 30 ไมโครลิตร เก็บไวที่ -20 องศาเซลเซียส

- ตรวจสอบขนาดและคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยวิธีการ gel electrophoresis โดยใช้ 1.2% agarose gel ใน 0.5x Tris – Borate – EDTA buffer (TBE buffer) โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ 4 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร ผ่านกระแสไฟฟ้ากระแสตรงความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาทีแล้วนำแผ่เจลอะกาโรส มาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นาน 15 นาที และแช่น้ำ อีก 10 นาทีตรวจดูแถบดูแถบเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ถ่ายภาพด้วย gel documentation

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบ โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยมวลต่อปริมาตร ย้อมเจลอะกาโรสด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตรวจสอบด้วยเครื่องเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation) แล้วตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ เจือจางสารละลายดีเอ็นเอ 50 เท่า ดูอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (OD260/OD280)

การสร้างเครื่องหมายลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน 24 ชนิด มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์สากล (universal primer) เชื้อยีสต์ในส่วน D1/D2 โดยใช้

Forward primer : D1 : 5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’

Reverse primer : D2 : 5’-ACGATCGATTTGCACGTCAG-3’

เชื้อราในส่วน ITS1/ITS4 โดยใช้

Forward primer : ITS1 : 5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’

Reverse primer : ITS4 : 5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’

ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นจึงตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของแต่ละยีนที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ 30-40 นาที แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วตรวจสอบการเรืองแสงของดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตในเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์สารพันธุกรรม

3.2.5 การเตรียมเชื้อยีสต์และราในการผลิตลูกแป้ง

3.2.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

(ดัดแปลงจาก ชื่นจิตร และคณะ, 2561)

เขี่ยเชื้อยีสต์ในอาหารเอียง YPD agar อายุ 48 ชั่วโมง ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว YPD broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการปรับความเข้มข้นของยีสต์ให้ได้จำนวนเซลล์เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับด้วย Hemacytometer เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

3.2.5.2 การเตรียมทาเนโคจิ

ชั่งข้าวเหนียวลืมผัว 25 กรัม ใส่ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาล้างแล้วแช่น้ำทิ้งไว้ค้างคืน (ประมาณ 12-20 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิห้อง เทน้ำที่แช่ข้าวทิ้ง ทำให้เมล็ดข้าวสะเด็ดน้ำ ปิดด้วยจุกสำลีนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นถ่ายเชื้อราจากลูกแป้งที่คัดเลือกไว้ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ลงในข้าวนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว คลุกเคล้าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อต่อไป

3.2.5.3 ศึกษาปริมาณส่วนผสมหัวเชื้อในการผลิตลูกแป้งสาโทในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการศึกษาปริมาณส่วนผสมราและยีสต์ในการผลิตลูกแป้งสาโทในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีปริมาณอัตราส่วนระหว่าง รา : ยีสต์ (ตารางที่ 5) ใช้แป้งข้าวเจ้าสูตรละ 400 กรัม (น้ำหนักลูกละประมาณ 6-7 กรัม) ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร

ตารางที่ 5 อัตราส่วนของเชื้อรากับยีสต์ในลูกแป้งสาโท

สูตรลูกแป้งสาโท	อัตราส่วน รา (กรัม) : ยีสต์ (มิลลิลิตร)
สูตรที่ 1	1 : 1
สูตรที่ 2	2 : 1
สูตรที่ 3	3 : 1

3.2.6 การศึกษาการผลิตลูกแป้งสาโทในระดับห้องปฏิบัติการ

3.2.6.1 การเตรียมลูกแป้งตามสูตรต่าง ๆ

(ดัดแปลงจาก วีระสิทธิ์ และคณะ, 2552)

นำกล้าเชื้อยีสต์และทาเนโคจิที่เตรียมไว้ผสมตามในสูตรการทำลูกแป้ง ซึ่งอัตราส่วนของสมุนไพรแสดงในตารางที่ 6 คลุกเคล้าให้เข้ากันดี ปั้นเป็นก้อนกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร (น้ำหนักประมาณ 6-7 กรัม) ใส่ภาชนะที่ถ่ายเทอากาศได้ดี บ่มบนชั้นและคลุมด้วยผ้าขาวบาง 2-3 ชั้น ให้มีการถ่ายเทอากาศได้ดีเพื่อให้มีการเจริญของเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 1 วัน เพื่อทำให้ลูกแป้งแห้ง เก็บใส่ถุงพลาสติกปิดแน่นเพื่อป้องกันความชื้นเพื่อใช้ในการหมักต่อไป

ตารางที่ 6 อัตราส่วนผสมสมุนไพรในการผลิตลูกแป้งสาโท

ส่วนประกอบ	**ปริมาณ (กรัม)**
กระเทียม (*Allium sativa*)	6
ขิง (*Zingiber officinale*)	6
ข่า (*Alpinia siamensis*)	6
ชะเอม (*Myriopteron extensum*)	6
พริกไทย (*Piper nigrum*)	6
อบเชย (*Cinnamomum*)	6
ดีปลี (*Piper chaba*)	2
แป้งข้าวจ้าว (*Oryza sativa*)	400

ที่มา : นภา, (2537)

3.2.7 การทดสอบประสิทธิภาพของลูกแป้ง

การทดสอบประสิทธิภาพของลูกแป้ง นำลูกแป้งที่ได้จากข้อ 3.2.6.1 มาทดสอบประสิทธิภาพของการหมักโดยทำการแช่ข้าวเหนียวลืมผัว 500 กรัม ทิ้งไว้ค้างคืน ทำให้ข้าวเหนียวสะเด็ดน้ำและห่อด้วยผ้าขาวบาง นำไปนึ่งบนรังถึง จับเวลาหลังน้ำเดือด 40 นาที นำข้าวมาผึ่งให้เย็น พรมน้ำประมาณ 250 มิลลิลิตร ให้ทั่วเพื่อให้เมล็ดข้าวแยกตัวออกจากกัน จากนั้นนำลูกแป้งมาบดจนละเอียด ชั่งผงลูกแป้ง 6 กรัม โรยลูกแป้งพร้อมคลุกให้เข้ากันและนำข้าวใส่ในโหล ปิดฝาโหล นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร (การผ่าน้ำ) ลงในโหลพร้อมปิดฝาให้สนิท และบ่มต่อไปอีก 12 วัน (เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 วัน) หลังจากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางบรรจุใส่ภาชนะ แล้วเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ (KMS) จำนวน 12 กรัมต่อลิตร (ไพบูลย์ และคณะ, 2549) ปิดฝาภาชนะให้มิดชิดแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.8 กระบวนการหมักไซเดอร์

การศึกษาการหมักไซเดอร์จากสาโทข้าวลืมผัววันที่ 15 ทั้ง 3 สูตร ได้จากข้อ 3.2.7 เติมเชื้อแบคทีเรีย Acetobacter aceti TISTR102 ซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศ ไทย (วว.))

3.2.8.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อ *A. aceti* TISTR102 จากเพลทที่เลี้ยงเชื้อไว้ โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ 5-6 โคโลนีลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose Yeast Extract Broth (GYE) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้จำนวนเซลล์เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับด้วย Hemacytometer เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

3.2.8.2 ขั้นตอนการผลิตไซเดอร์

(ดัดแปลงจาก ชื่นจิตร และคณะ, 2561)

ในการหมักไซเดอร์ใช้น้ำสาโททั้ง 3 สูตร จากข้อ 3.2.7 ปริมาณ 250 มิลลิลิตร ใส่ในฟาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อ *A. aceti* TISTR102 ที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในน้ำหมักนำไปหมักบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ วัน แล้วเติมโพแทสเซียมเมตาไบ-ซัลไฟท์ (KMS) จำนวน 12 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองน้ำไซเดอร์ออกจาตะกอน นำใส่ขวดปิดฝาให้มิดชิดแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

3.2.8.3. วิเคราะห์คุณลักษณะต่าง ๆ ของไซเดอร์

ไซเดอร์หมักจากสาโทข้าวเหนียวลืมผัว นำน้ำไซเดอร์หมักมาวัดหาคุณลักษณะ ดังนี้

วิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

- วัดค่าสี L*, a* และ b* ด้วยเครื่อง ColorFlex (รุ่น CM-600d/Konica Minolta /Japan)

วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

- วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS method

ดูดสารละลายตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด eppendorf tube เติมสารละลาย DNS ที่เตรียมไว้ เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำไปในไมโครเพลท นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำไปหาค่าน้ำตาลกลูโคสโดยเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคส

- วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter (รุ่น Mettler Toledo FiveEASY^{TM}Plus / FEP20)

- วัดของแข็งที่ละลายทั้งหมด (total dissolved solids; TDS) ด้วย Hand refractometer (รุ่น Master-93H ATAGO Japan)

- วัดปริมาณแอลกอฮอล์ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟฟี่ (GC, Colum PEG-ETOH colum, temperature 80 °C, Injector temperature 120 °C, Detecter temperature 150 °C, Carrier gas nitrogen, Speed เท่ากับ 3 ปริมาณที่ฉีด 1 µg เวลาที่สารออก 3 นาที)

- วัดปริมาณกรดอะซิติกและกรดต่าง ๆ ด้วยเครื่อง HPLC (Colum Aminex HPX-87H colum.300x7.8 mm.,Temperature 65 °C, Detection UV@220 nm.)

- วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยเครื่อง Microplate reader (M965/ mastertech/Taiwan)

การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ดัดแปลงการวิเคราะห์ตาม วิธีของ Radoševic *et al.*, (2017) และ Thomas *et al.*, (2018) โดยนำตัวที่เตรียมไว้ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu Reagent 10 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและ เติม 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เทียบกับ กราฟมาตรฐาน gallic acid โดยใช้เครื่อง Microplate reader (M965 / mastertech/ Taiwan)

- วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ด้วยเครื่อง Microplate reader (M965/ mastertech/ Taiwan)

การวัดปริมาณฟลาโวนอยด์ ดัดแปลงการวิเคราะห์ตาม วิธีของ Tian *et al.*, (2016) โดยนำตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ผสมน้ำกลั่น 60 ไมโครลิตร จากนั้น ปิเปต 5% $NaNO_2$ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและ ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที เติม 10% $AlCl_36H_2O$ 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 1 M NaOH 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 12 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐาน rutin โดยใช้เครื่อง Microplate reader (M965 / mastertech / Taiwan)

- วิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ด้วยเครื่อง Microplate reader (M965 / mastertech/ Taiwan)

เตรียมสารละลาย DPPH radical ในเมทานอลความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ และเตรียมตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร เติม DPPH ลงไปในสารละลายที่เตรียมไว้ เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) (ดัดแปลงจาก Zhang *et al.*, (2016)

จากนั้นทำการคำนวณ % radical scavenging จากสมการ

พหุน ปณฺ ตโต ชีเว

$$\% \text{ radical scavenging} = [1 - (A_{sample}/A_{control})] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

และ $A_{control}$ คือ ค่าดูดกลืนแสงของ DPPH

- วิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ด้วยเครื่อง Microplate reader (M965 / mastertech / Taiwan)

เตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสมสารละลาย 300 มิลลิโมลาร์ Acetate buffer pH 3.6 สารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ $FeCl_3.6H_2O$ และสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ TPTZ ใน 40 มิลลิโมลาร์ HCl ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ จากนั้นเตรียมตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ผสมกับ FRAP reagent ดังตารางที่ 3.4 เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (n=3) (ดัดแปลงจาก Wei *et al*., 2011) คำนวณค่าการดูดกลืนแสงจากสมการ

$$\text{Absorbance} = A - B - C$$

คำนวณความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (FRAP value) โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้รับกราฟมาตรฐานของ Ferrous sulfate ($FeSO_4$) แสดงค่าในรูปของมิลลิโมลาร์สมมูลย์ของ Fe^{2+}/กรัม

ตารางที่ 7 ตัวแปรในการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

ตัวแปร	ส่วนประกอบ
A (Test sample)	Sample ที่ความเข้มข้น 100 ppm 1 ml + FRAP reagent 9 ml
B (Blank)	Sample ที่ความเข้มข้น 100 ppm 1 ml + Acetate buffer 9 ml
C (Control)	Ethanol 1 ml + FRAP reagent 9 ml

- วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยเครื่อง Microplate reader (M965/ mastertech / Taiwan)

ปิเปตตัวอย่าง ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วย 1% HCl ในเมทานอล และ 1% HCl ในเอทานอล ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader (M965 / mastertech / Taiwan) ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Ranganna, 1977)

- วิเคราะห์ปริมาณสารระเหยในผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ แก๊สโครมาโทกราฟฟี่แมสสเปกโตรมิเตอร์แมส (GC-MS, Column: DB-WAX 30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm, Carrier: Hydrogen at 48 cm/sec, Oven: 35°C for 5 min 35-230°C at 6°/min 230°C for 5 min, Injector: Split 1:20, 1.5 µL, Detector: FID Nitrogen makeup gas at 30 mL/min)

3.2.9 ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

(ดัดแปลงจาก เกศริน และคณะ, 2561)

การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส โดยนำน้ำไซเดอร์ที่ผลิตไว้แล้วมาทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้บริโภคจำนวน 30 คน ใช้แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยวิธีการให้คะแนนความชอบ 7 ระดับ (1 = ชอบน้อยที่สุด 2 = ชอบน้อย 3 = ค่อนข้างชอบน้อย 4 = ชอบปานกลาง 5 = ค่อนข้างชอบมาก 6 = ชอบมาก 7 = ชอบมากที่สุด) ในด้านของกลิ่น สี รสชาติ และการยอมรับรวม โดยวางแผนแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design : RCBD) โดยแบ่งผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกผู้ทดสอบที่มีอายุระหว่าง 20-30 ปี และกลุ่มที่สองมีอายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไป

3.2.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล มีดังนี้

3.2.10.1 สถิติพื้นฐาน ได้แก่

- ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$)
- ร้อยละ (%)
- ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

3.2.10.2 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT) ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 21

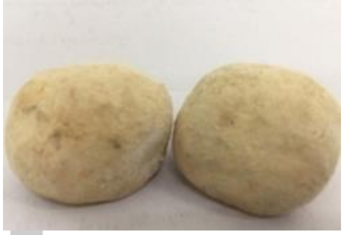
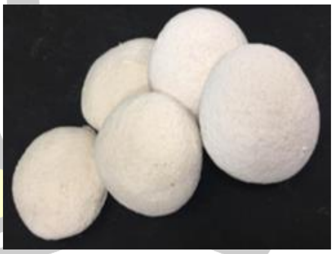
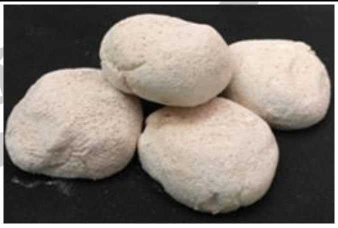
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1. เก็บตัวอย่างลูกแป้งสาโทเพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์

เก็บรวบรวมตัวอย่างลูกแป้งสาโทที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ จากหลายถิ่นเพื่อให้มีความแตกต่าง โดยเก็บตัวอย่างลูกแป้งสาโท 3 แหล่ง ได้แก่ ลูกแป้งสาโทจากเครือข่ายวิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทรีย์อีสาน จังหวัดร้อยเอ็ด ลูกแป้งสาโทจากบ้านนาข่า ตำบลนาข่า อำเภอวาปีปทุม จังหวัดมหาสารคาม และลูกแป้งสาโทจาก ตำบลเกาะยาวน้อย อำเภอเกาะยาว จังหวัดพังงา (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ตัวอย่างลูกแป้งจากแหล่งต่าง ๆ

แหล่งที่มาของลูกแป้งสาโท	**วันที่เก็บตัวอย่าง**	**ลักษณะลูกแป้ง**	**เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)**	**สี**	**รูปภาพ**
เครือข่ายวิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทรีย์อีสาน จังหวัดร้อยเอ็ด	วันที่ 27 ตุลาคม 2560	เป็นก้อนแป้งครึ่งวงกลม ไม่มีรอยแตก	3.6	สีนวลเหลืองเล็กน้อย	
บ้านนาข่า ตำบลนาข่า อำเภอวาปีปทุม จังหวัดมหาสารคาม	วันที่ 30 พฤศจิกายน 2560	กลมแบน ไม่มีรอยแตก	2.9	สีนวลขาว	
ตำบลเกาะยาวน้อย อำเภอเกาะยาว จังหวัดพังงา	15 พฤศจิกายน 2560	กลมแบน ไม่มีรอยแตก	3.2	สีนวลขาว	

4.2. การคัดแยกเชื้อราและเชื้อยีสต์จากลูกแป้งสาโท

การคัดแยกเชื้อราและเชื้อยีสต์จากลูกแป้งสาโททั้ง 3 แหล่ง จากวิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทร์อีสาน ตำบล ธวัชบุรี อำเภอเสลภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด บ้านนาข่า ตำบลนาข่า อำเภอวาปีปทุม จังหวัดมหาสารคาม และตำบลเกาะยาวน้อย อำเภอเกาะยาว จังหวัดพังงา คัดแยกหาเชื้อราและยีสต์ได้ 20 ไอโซเลท เชื้อรา 11 ไอโซเลท และเชื้อยีสต์ 9 ไอโซเลท (ตารางที่ 9) สอดคล้องกับงานวิจัยของลือชัย (2548) ที่คัดแยกเชื้อราและยีสต์จากลูกแป้งเพื่อใช้ผลิตสาโท ซึ่งแต่ละลูกแป้งได้เชื้อเพียง 3-4 ไอโซเลท สาเหตุที่คัดแยกเชื้อราและยีสต์จากเมล็ดข้าวและน้ำต้อยของสาโทได้เพียง 3-5 ไอโซเลท ต่อตัวอย่างลูกแป้ง เนื่องจากในการหมักสาโทนั้นจะสังเกตได้ว่ามีเชื้อราเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่เจริญเต็มเม็ดข้าว และแย่งการเจริญของเชื้อราชนิดอื่น ซึ่งเชื้อราและยีสต์มีบทบาทสำคัญในการหมักสาโท ประสิทธิภาพในการหมักสาโทของเชื้อราขึ้นอยู่กับหลาย ๆ ปัจจัย เช่น อายุและความโปร่งพรุนของลูกแป้ง ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยแป้งของรา ลูกแป้งใหม่ที่มีความโปร่งพรุนนั้นเกิดจากเชื้อยีสต์ในลูกแป้งปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ทำให้ลูกแป้งโปร่งพรุนและเชื้อราจะเจริญแทรกสร้างสปอร์อยู่ในรูพรุนเหล่านี้ ยิ่งมีรูพรุนมาก ปริมาณสปอร์ของเชื้อราก็จะมีมาก ดังนั้นในกระบวนการหมักสาโทจากข้าวเหนียวลืมผัว เชื้อราจะเจริญและย่อยแป้งจากข้าวได้เร็วขึ้น ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นผสมกับน้ำที่หมัก เรียกว่า “น้ำต้อย” ได้เร็วขึ้น

ตารางที่ 9 แหล่งที่มาของลูกแป้งสาโท จำนวนเชื้อรา และยีสต์ที่คัดแยกได้

แหล่งลูกแป้ง	**รหัสเชื้อ**	**จำนวนไอโซเลท**	**จำนวนเชื้อที่ศึกษา**	
			รา	ยีสต์
วิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทร์อีสาน ตำบลธวัชบุรี อำเภอเสลภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด	LPR1, LPR2, LPR3, LPR4, LPR5	5	3	2
บ้านนาข่า ตำบลนาข่า อำเภอวาปีปทุม จังหวัดมหาสารคาม	LPS1, LPS2, LPS3, LPS4, LPS5, LPS6	6	4	2
ตำบลเกาะยาวน้อย อำเภอเกาะยาว จังหวัดพังงา	LPP1, LPP2, LPP3, LPP4, LPP5, LPP6, LPP7, LPP8, LPP9	9	4	5
รวม		**20**	**11**	**9**

หมายเหตุ LPR1 = ลูกแป้งจังหวัดร้อยเอ็ดไอโซเลทที่ 1
LPR2 = ลูกแป้งจังหวัดร้อยเอ็ดไอโซเลทที่ 2
LPR3 = ลูกแป้งจังหวัดร้อยเอ็ดไอโซเลทที่ 3
LPR4 = ลูกแป้งจังหวัดร้อยเอ็ดไอโซเลทที่ 4
LPR5 = ลูกแป้งจังหวัดร้อยเอ็ดไอโซเลทที่ 5
LPP1 = ลูกแป้งจังหวัดพังงาไอโซเลทที่ 1
LPP2 = ลูกแป้งจังหวัดพังงาไอโซเลทที่ 2
LPP3 = ลูกแป้งจังหวัดพังงาไอโซเลทที่ 3
LPP4 = ลูกแป้งจังหวัดพังงาไอโซเลทที่ 4
LPP5 = ลูกแป้งจังหวัดพังงาไอโซเลทที่ 5
LPS1 = ลูกแป้งจังหวัดมหาสารคามไอโซเลทที่ 1
LPS2 = ลูกแป้งจังหวัดมหาสารคามไอโซเลทที่ 2
LPS3 = ลูกแป้งจังหวัดมหาสารคามไอโซเลทที่ 3
LPS4 = ลูกแป้งจังหวัดมหาสารคามไอโซเลทที่ 4
LPS5 = ลูกแป้งจังหวัดมหาสารคามไอโซเลทที่ 5
LPS6 = ลูกแป้งจังหวัดมหาสารคามไอโซเลทที่ 6
LPP6 = ลูกแป้งจังหวัดพังงาไอโซเลทที่ 6
LPP7 = ลูกแป้งจังหวัดพังงาไอโซเลทที่ 7
LPP8 = ลูกแป้งจังหวัดพังงาไอโซเลทที่ 8
LPP9 = ลูกแป้งจังหวัดพังงาไอโซเลทที่ 9

4.3. การคัดเลือกเชื้อราและยีสต์

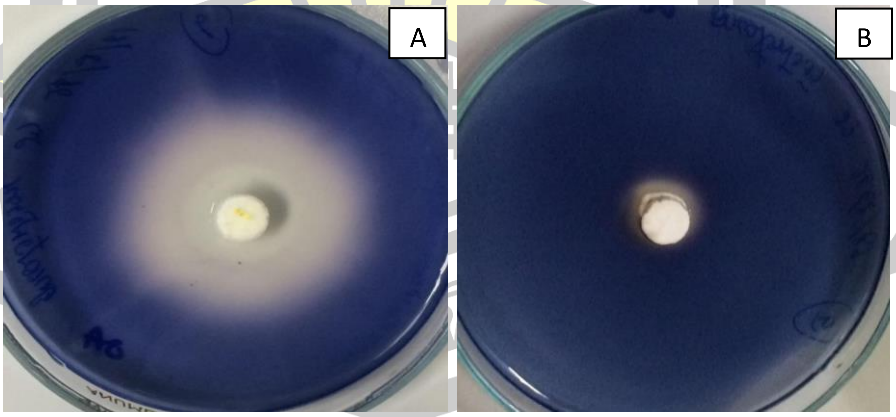
4.3.1 การคัดเลือกเชื้อราที่มีคุณสมบัติย่อยแป้งที่ดีเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อลูกแป้ง

ความสามารถในการย่อยแป้ง พบว่าราที่สามารถย่อยแป้งได้ดีมี 2 ไอโซเลท ได้แก่ LPP1 และ LPP3 ซึ่งมีผลต่างของบริเวณใสกับความกว้างของโคโลนี 0.2 และ 1.8 ตามลำดับ (ตาราง

ที่ 10 และภาพที่ 8) สอดคล้องกับงานวิจัยของ มณชัย (2546) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces* spp., *Rhizopus* spp. และ *Aspergillus* spp. ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งสาโท โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งบนอาหาร soluble starch พบว่าราทุกไอโซเลทย่อยแป้งได้น้อย โดยมีอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณส่วนใส และเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีน้อยกว่า 1

ตารางที่ 10 ความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อราที่คัดแยกได้จากลูกแป้งสาโทแหล่งต่าง ๆ

รหัสเชื้อ	**ความกว้างโคโลนี (เซนติเมตร)**	**ความกว้าง clear zone (เซนติเมตร)**	Halo : Colony ratio
LPR1	-	-	-
LPR2	-	-	-
LPR3	-	-	-
LPS1	-	-	-
LPS2	-	-	-
LPS3	-	-	-
LPS4	-	-	-
LPP1	1.35	1.40	1.04
LPP2	-	-	-
LPP3	4.26	7.83	1.84
LPP4	-	-	-

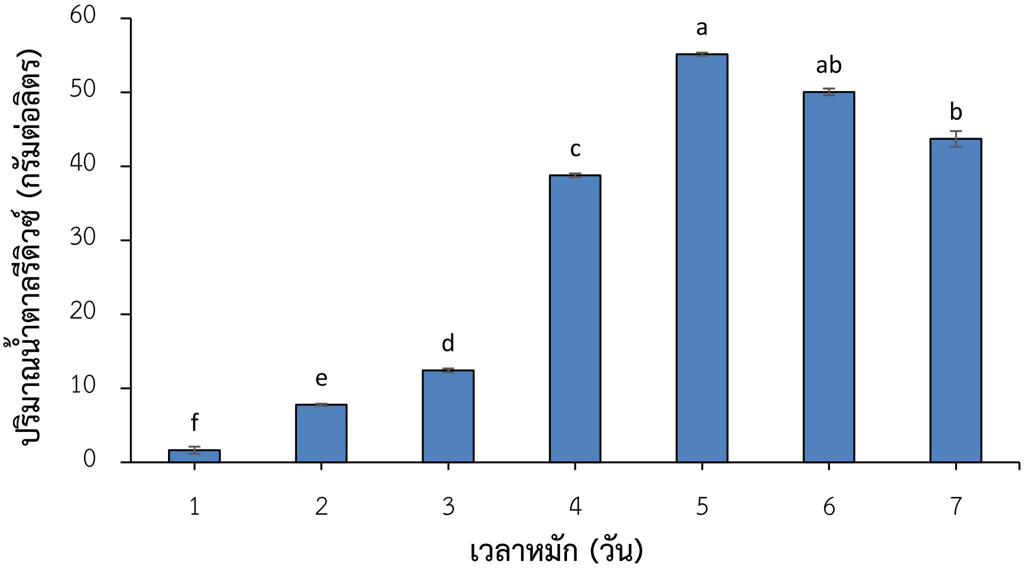


ภาพที่ 8 การสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา

(A) LPP3 และ (B) LPP1 จากจังหวัดพังงาในการย่อยแป้งบนอาหาร starch agar (SA)

โดยมีค่า Halo : Colony ratio 1.8 และ 1.0 ตามลำดับ

เชื้อราจะสร้างเส้นใยชอนไชไปทั่วข้าวและย้อยแป้งให้เป็นน้ำตาล การเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลจะใช้ระยะเวลาประมาณ 3-5 วัน โดยเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส ชนิดแอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ในการย่อยแป้งในเมล็ดข้าวเหนียวไปเป็นน้ำตาลกลูโคส (ชาญชัย, 2550) และเชื้อรา LPP3 มีความสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งได้มากที่สุด โดยคัดเลือกได้จากตำบลเกาะยาวน้อย อำเภอเกาะยาว จังหวัดพังงา มาทดสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยการหมักข้าวเหนียวลืมผัว ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในวันที่ 5 มีค่า 55.17 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เชื้อรา LPP3
จากตำบลเกาะยาวน้อย อำเภอเกาะยาว จังหวัดพังงา

4.3.2 การคัดเลือกเชื้อยีสต์

4.3.2.1 ทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล

คัดเลือกเชื้อยีสต์จากการตรวจผลปริมาณแก๊สในหลอดดักแก๊ส (durham tube) และปริมาณน้ำตาลคงเหลือต่ำที่สุด จะเห็นได้ว่ายีสต์ไอโซเลท LPR5 มีความสามารถในการหมักน้ำตาลได้ดีกว่าเชื้อยีสต์ไอโซเลทอื่น ๆ ซึ่งจะสังเกตจากปริมาณน้ำตาลที่ลดลง และปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น มีค่า 19.07±0.06 องศาบริกซ์ และ 1.54±0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 11) ซึ่ง Kreger-van Rij, (1984) กล่าวว่าความเข้มข้นของน้ำตาลมีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ หากความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกินไปจะทำให้เซลล์ของเชื้อยีสต์สูญเสียน้ำ และยีสต์อาจตายหรือเจริญได้น้อย

ตารางที่ 11 ความสามารถในการหมักน้ำตาลในอาหารที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมด
เริ่มต้น 20 องศาบริกซ์

ไอโซเลท	**วันที่ 1**	**วันที่ 5**	**องศาบริกซ์**	**แอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์)**
LPR4	_	++	19.47^{cd}±0.06	1.15^{b}±0.04
LPR5	++	++++	19.07^{e}±0.06	1.54^{a}±0.05
LPS5	-	+	19.37^{cde}±0.12	0.67^{c}±0.03
LPS6	-	+++	19.20^{de}±0.10	1.20^{b}±0.03
LPP5	-	-	19.80^{ab}±0.10	0.07^{d}±0.03
LPP6	-	-	19.77^{abc}±0.06	0.05^{d}±0.04
LPP7	-	-	20.03^{a}±0.06	0.02^{d}±0.01
LPP8	-	-	19.87^{ab}±0.06	0.04^{d}±0.02
LPP9	-	-	19.87^{ab}±0.06	0.04^{d}±0.01

หมายเหตุ a b c ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

หมายเหตุ		
	-	เชื้อไม่ขึ้น ไม่เกิดฟอง
	+	มีแก๊ส ¼ ของหลอด
	++	มีแก๊ส ½ ของหลอด
	+++	มีแก๊ส ¾ ของหลอด
	++++	มีแก๊สเต็มหลอด

4.3.2.2 ทดสอบความสามารถทนต่อแอลกอฮอล์

นอกจากยีสต์จะมีความสามารถในการใช้น้ำตาลแล้ว ยีสต์ยังมีความสามารถในการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์สูงด้วย โดยปกติสาโทของไทยที่หมักด้วยลูกแป้งมีแอลกอฮอล์ประมาณ 8-12 เปอร์เซ็นต์ (ประดิษฐ์, 2543) ในงานวิจัยนี้ต้องการคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักให้ได้แอลกอฮอล์สูงและทนต่อแอลกอฮอล์อย่างน้อย 10-15 เปอร์เซ็นต์ โดยคัดเลือกเชื้อยีสต์จากการตรวจผลปริมาณแก๊สในหลอดดักแก๊ส (durham tube) จะเห็นว่ายีสต์ไอโซเลท LPR4, LPR5 และ LPS6 มีความสามารถในการทนต่อแอลกอฮอล์ 10 เปอร์เซ็นต์ และ 15 เปอร์เซ็นต์ ได้ดีกว่าเชื้อยีสต์ไอโซเลทอื่น ๆ โดยยีสต์ไอโซเลท LPR5 สามารถสร้างแก๊สและมีความทนต่อแอลกอฮอล์มากที่สุด หลังจากหมักไปแล้ว 5 วัน (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ความสามารถในการหมักอาหารที่มีแอลกอฮอล์ 10 เปอร์เซ็นต์ และ 15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้น 15 องศาบริกซ์

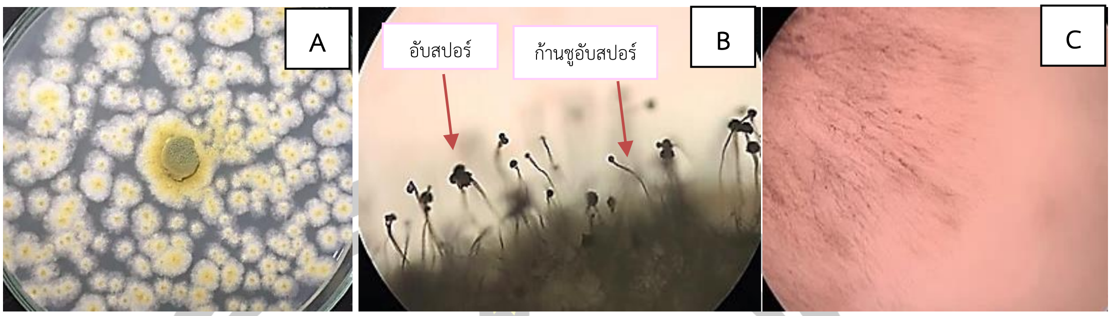
ไอโซเลท	**แอลกอฮอล์ 10 เปอร์เซ็นต์**		**แอลกอฮอล์ 15 เปอร์เซ็นต์**	
	วันที่ 1	วันที่ 5	วันที่ 1	วันที่ 5
LPR4	-	++	-	+
LPR5	+	++++	-	+++
LPS5	-	+	-	-
LPS6	-	+++	-	+
LPP5	-	-	-	-
LPP6	-	-	-	-
LPP7	-	-	-	-
LPP8	-	-	-	-
LPP9	-	-	-	-

หมายเหตุ - เชื้อไม่ขึ้น ไม่เกิดฟอง
+ มีแก๊ส ¼ ของหลอด
++ มีแก๊ส ½ ของหลอด
+++ มีแก๊ส ¾ ของหล
++++ มีแก๊สเต็มหลอด

4.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อราและยีสต์

4.4.1 การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

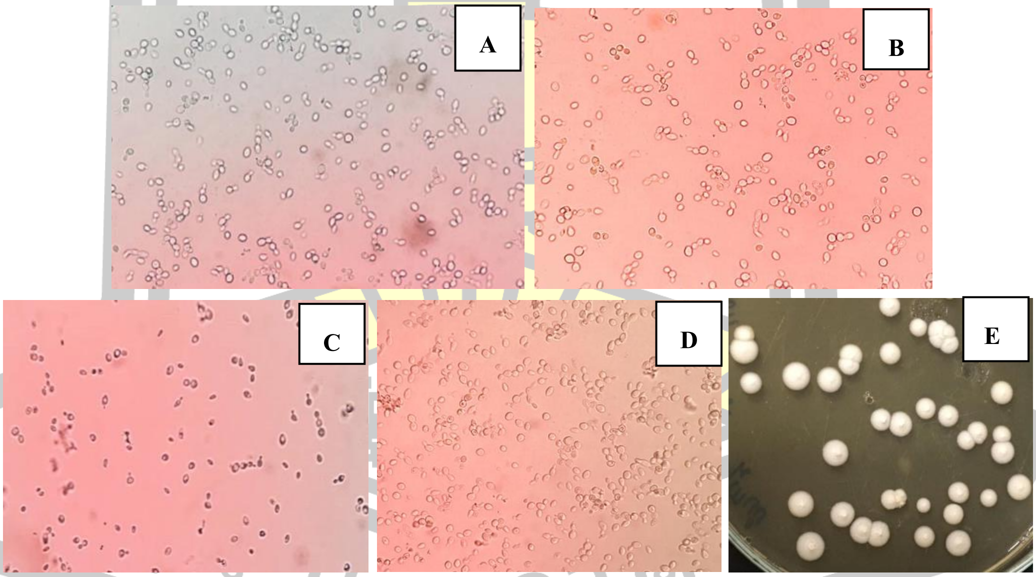
การจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โดยนำเชื้อราบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้และมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ มาเลี้ยงในอาหาร PDA เพื่อสังเกตลักษณะโคโลนี พบว่า เชื้อราไอโซเลท LPP3 เจริญเริ่มแรกสีขาวจากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเขียวเหลืองคล้ายสีมะกอกถึงสีน้ำตาลเมื่ออายุมากขึ้น ตรงกลางมีสีเข้มที่สุด และบริเวณขอบโคโลนีมีเส้นใยสีขาวเกิดขึ้น (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา LPP3 ที่คัดแยกได้จากตำบลเกาะยาวน้อย อำเภอเกาะยาว จังหวัดพังงา (A) ลักษณะโคโลนี, (B) สปอร์, (C) ลักษณะเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X
(ถ่ายภาพโดย น.ส.พิกุลทอง ผิวเหลือง เมื่อวันที่ 27 พฤศจิกายน 2560)

4.4.2 การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การจำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อยีสต์ โดยนำเชื้อยีสต์บริสุทธ์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ มีลักษณะโคโลนีสีขาว ทรงกลม และเป็นเซลล์เดี่ยวรูปร่างกลม รูปไข่ หรือเหมือนผลเลมอน มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ลักษณะเซลล์ยีสต์จากลูกแป้งร้อยเอ็ด (LPR4=A และ LPR5=B), ลูกแป้งสารคาม (LPS5=C และ LPS6=D) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X, ลักษณะโคโลนีของ LPR5 (E)
(ถ่ายภาพโดย น.ส.พิกุลทอง ผิวเหลือง เมื่อวันที่ 9 ธันวาคม 2560)

4.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยวิธี PCR (polymerase chain reaction) เพิ่มปริมาณยีนของเชื้อยีสต์ในส่วน D1/D2 โดยใช้

Forward primer : D1 : 5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’

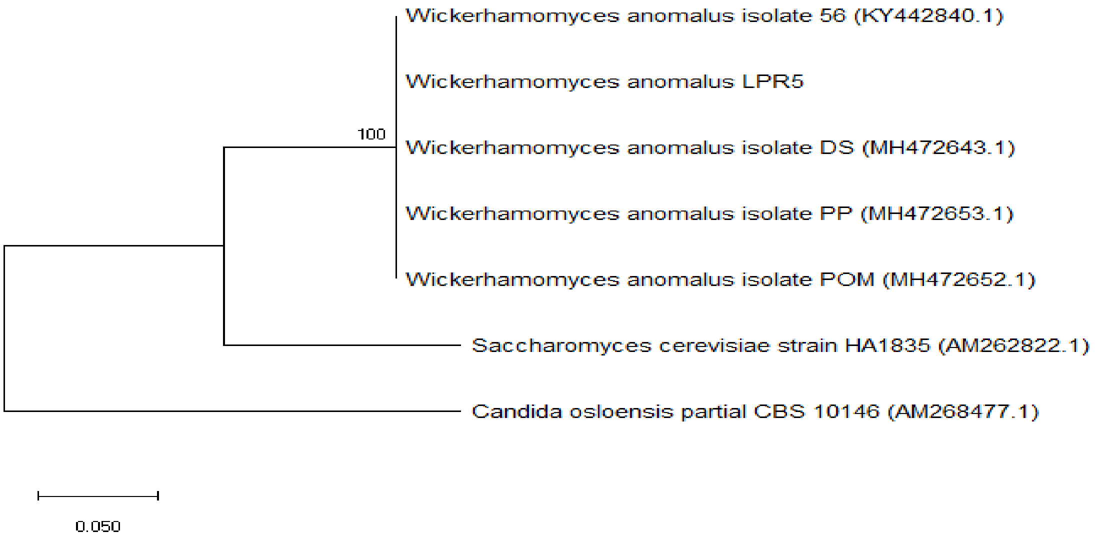
Reverse primer : D2 : 5’-ACGATCGATTTGCACGTCAG-3’

การเพิ่มปริมาณยีนของเชื้อราในส่วน ITS1/ITS4 โดยใช้

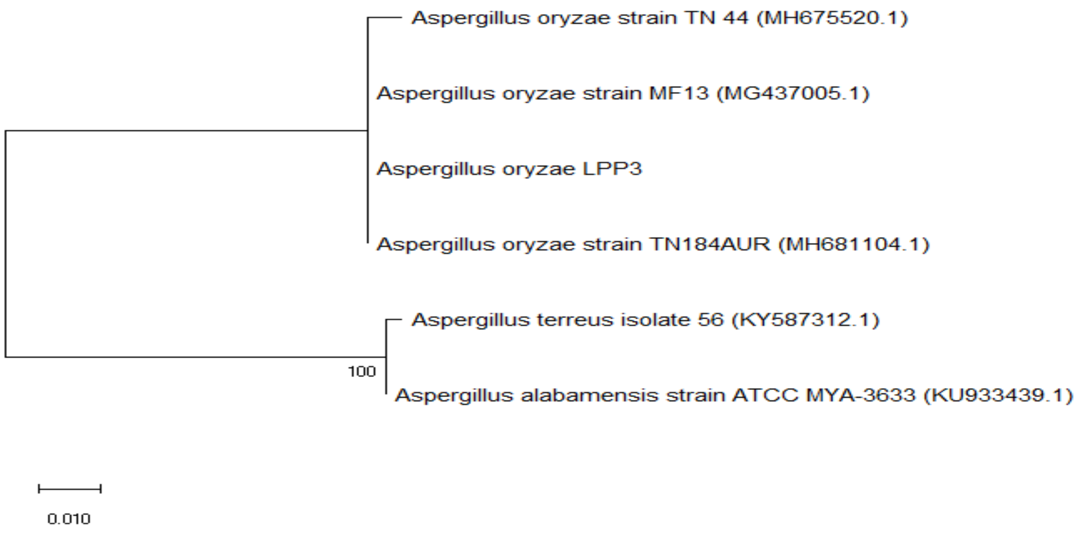
Forward primer : ITS1 : 5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’

Reverse primer : ITS4 : 5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’

จากภาพแผนภูมิวิวัฒนาการของยีสต์ และเชื้อรา (Phylogenetic tree) ที่สร้างขึ้นด้วยวิธี Maximum Likelihood method โดยใช้โปรแกรม MEGA X (www.megasoftware.net) ที่ Bootstrap value ทำ 1,000 ซ้ำ พบว่าการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของเชื้อยีสต์ LPR5 มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ *Wickerhamomyces anomalus* (ภาพที่ 12) และเชื้อรา LPP3 มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* (ภาพที่ 13 และตารางที่ 13)


Wickerhamomyces anomalus isolate 56 (KY442840.1)
Wickerhamomyces anomalus LPR5
100
Wickerhamomyces anomalus isolate DS (MH472643.1)
Wickerhamomyces anomalus isolate PP (MH472653.1)
Wickerhamomyces anomalus isolate POM (MH472652.1)
Saccharomyces cerevisiae strain HA1835 (AM262822.1)
Candida osloensis partial CBS 10146 (AM268477.1)
0.050

ภาพที่ 12 แผนภูมิวิวัฒนาการสายพันธุ์ยีสต์ *Wickerhamomyces anomalus* LPR5


Aspergillus oryzae strain TN 44 (MH675520.1)
Aspergillus oryzae strain MF13 (MG437005.1)
Aspergillus oryzae LPP3
Aspergillus oryzae strain TN184AUR (MH681104.1)
Aspergillus terreus isolate 56 (KY587312.1)
100
Aspergillus alabamensis strain ATCC MYA-3633 (KU933439.1)
0.010

ภาพที่ 13 แผนภูมิวิวัฒนาการสายพันธุ์รา *Aspergillus oryzae* LPP3

ตารางที่ 13 สายพันธุ์เชื้อยีสต์และเชื้อราที่มีความสามารถผลิตน้ำตาลและแอลกอฮอล์

No.	Closest species[a]	Accession no.[b]	% Identity[c]	Origin of closest relative[d]
LPR5	*Wickerhamomyces anomalus*	MH472643	100%	Termite, Tunisia
LPP3	*Aspergillus oryzae*	MH681104	100%	Auricular sample, Tunisia

[a] Closest species with highest % identity and highest Max score on BLAST search (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)

[b] GenBank accession no. of strains on NCBI website (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)

[c] Based on BLAST search results, identity (%) of strains compared to the closest relatives.

[d] Based on BLAST search results, origin of the closest relatives.

พหูน ปณ ฅิโต ชีเว

4.6 ขั้นตอนการผลิตลูกแป้งสาโท

จากการคัดเลือกเชื้อราและยีสต์ในขั้นตอนต่าง ๆ ข้างต้น พบว่าคัดเลือกเชื้อ *Aspergillus oryzae* LPP3 ที่สามารถย่อยแป้งเป็นน้ำตาลได้ดีที่สุด ส่วนเชื้อยีสต์ทางผู้ทำวิจัยได้ทำการหมัก พบว่าเชื้อยีสต์ *Wickerhamomyces anomalus* LPR5 ที่คัดแยกได้ให้ปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่ตรงกับวัตถุประสงค์งานวิจัย ทางผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนเชื้อยีสต์เป็น *Saccharomyces* *cerevisiae* TISTR5013 การปรับปรุงการผลิตลูกแป้งปัจจัยที่สำคัญ คือเชื้อที่ใช้จะต้องมีกิจกรรมของเอนไซม์และให้คุณสมบัติทางเคมีของสาโทได้ดี และสมุนไพรที่ใช้ควรมีคุณสมบัติช่วยในเรื่องของการเก็บรักษาลูกแป้งให้คงสภาพ ลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม มีการศึกษาปริมาณเชื้อราต่อยีสต์ที่ผสมในลูกแป้ง โดย จันทรา (2551) ได้ศึกษาหาปริมาณส่วนผสมระหว่างเชื้อราต่อยีสต์ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตลูกแป้งสาโท ในระดับห้องปฏิบัติการโดยการออกแบบการทดลองจากการคำนวณโดยวิธีทากุชิ พบว่าปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นอัตราส่วนราต่อยีสต์ ที่เหมาะสมที่สุดคือ 3:1 ซึ่งให้คุณสมบัติทางเคมีดีที่สุด ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการปรับอัตราส่วนเชื้อเริ่มต้นของราต่อยีสต์แบ่งออกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 1:1 2:1 และ 3:1 (ตารางที่ 15) เพื่อให้ได้สาโทที่มีคุณสมบัติทางเคมี และกายภาพที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งได้ใช้สมุนไพรชนิดต่าง ๆ ตามอัตราส่วนในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 อัตราส่วนผสมสมุนไพรในการผลิตลูกแป้งสาโท

ส่วนประกอบ	**ปริมาณ (น้ำหนัก)**
กระเทียม (*Allium sativa*)	6 กรัม
ขิง (*Zingiber officinale*)	6 กรัม
ข่า (*Alpinia siamensis*)	6 กรัม
ชะเอม (*Myriopteron extensum*)	6 กรัม
พริกไทย (*Piper nigrum*)	6 กรัม
อบเชย (*Cinnamomum*)	6 กรัม
ดีปลี (*Piper chaba*)	2 กรัม
แป้งข้าวจ้าว (*Oryza sativa*)	400 กรัม

ที่มา : นภา, (2537)

ตารางที่ 15 ลักษณะและอัตราส่วนของเชื้อราต่อยีสต์ของลูกแป้ง 3 สูตร

สูตรลูกแป้งสาโท	อัตราส่วน รา (กรัม) ต่อ ยีสต์ (มิลลิลิตร)	ลักษณะลูกแป้งสาโท	อายุการเก็บ
ลูกแป้งสาโทสูตร 1	1 : 1		เก็บไว้ในภาชนะที่แห้งและปิดฝาให้สนิท อย่าให้ถูกความชื้นหรือที่มีความร้อน จะเก็บไว้ได้นาน 6 เดือน
ลูกแป้งสาโทสูตร 2	2 : 1		
ลูกแป้งสาโทสูตร 3	3 : 1		

4.7 คุณลักษณะของสาโทข้าวเหนียวลืมผัวจากลูกแป้งที่ผลิตได้

ในกระบวนการหมักสาโทโดยใช้ข้าวเหนียวลืมผัวเป็นวัตถุดิบตั้งต้น ผสมกับลูกแป้งแต่ละสูตร จำนวน 3 สูตร ที่ผลิตไว้ จากนั้นทำการหมักสาโท 15 วัน วิเคราะห์คุณลักษณะต่าง ๆ ต่อไปนี้

4.7.1 การวิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมีของสาโท

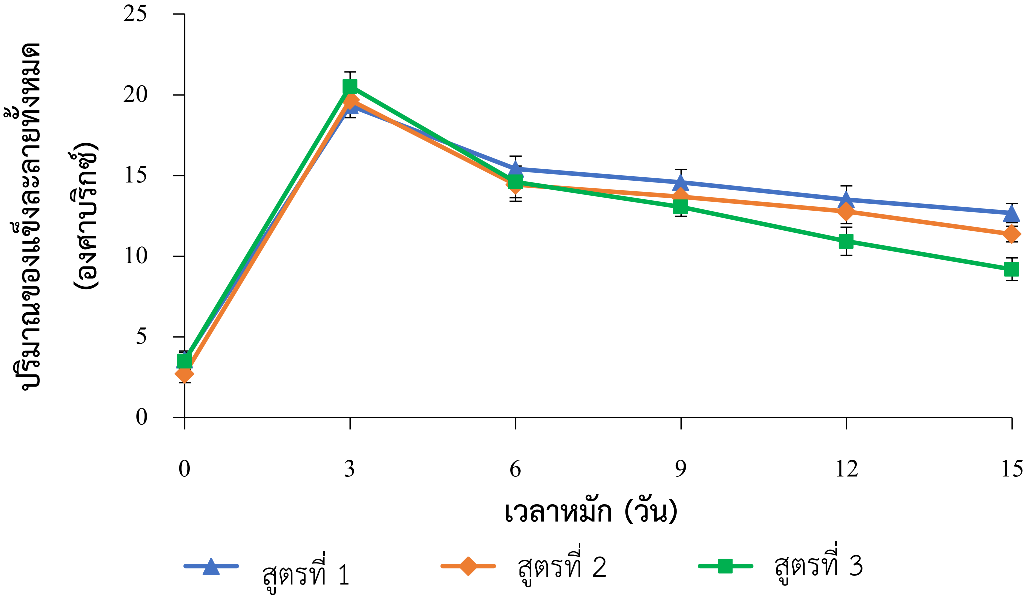
4.7.1.1 ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) (total dissolved solid; TDS)

จากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดในระหว่างการหมัก 15 วัน (ตารางที่ 16 และภาพที่ 14) พบว่าในระหว่างการหมักมีปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดสาโทที่หมักด้วยลูกแป้งทั้ง 3 สูตร มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นภายใน 3 วันแรก หลังจากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงอย่างต่อเนื่อง การเพิ่มขึ้นในช่วงแรกเกิดจากการย่อยแป้งของเชื้อราที่อยู่ในลูกแป้ง (Dung, 2013) ซึ่งจากการหมักสาโท พบว่า สาโทสูตรที่ 3 มีการใช้น้ำตาลเร็วที่สุดของการหมักทั้ง 15 วัน ซึ่งค่าของแข็งที่ละลายทั้งหมดต่ำที่สุด คือ 9.19 องศาบริกซ์

ตารางที่ 16 ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) (total dissolved solid; TDS) สาโทข้าวเหนียวลืมผัว 3 สูตร

สูตรสาโท	เวลาหมัก (วัน)					
	0	3	6	9	12	15
1	$3.57^{a} \pm 0.56$	$19.34^{b} \pm 0.76$	$15.41^{a} \pm 0.80$	$14.58^{a} \pm 0.80$	$13.51^{a} \pm 0.84$	$12.67^{a} \pm 0.60$
2	$2.70^{a} \pm 0.54$	$19.68^{ab} \pm 0.61$	$14.43^{a} \pm 1.02$	$13.68^{ab} \pm 0.56$	$12.76^{a} \pm 0.74$	$11.37^{b} \pm 0.48$
3	$3.50^{a} \pm 0.54$	$20.53^{a} \pm 0.90$	$14.61^{a} \pm 0.98$	$13.05^{b} \pm 0.58$	$10.93^{b} \pm 0.88$	$9.19^{c} \pm 0.70$

หมายเหตุ a b c ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 14 ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมดในสาโท 3 สูตร

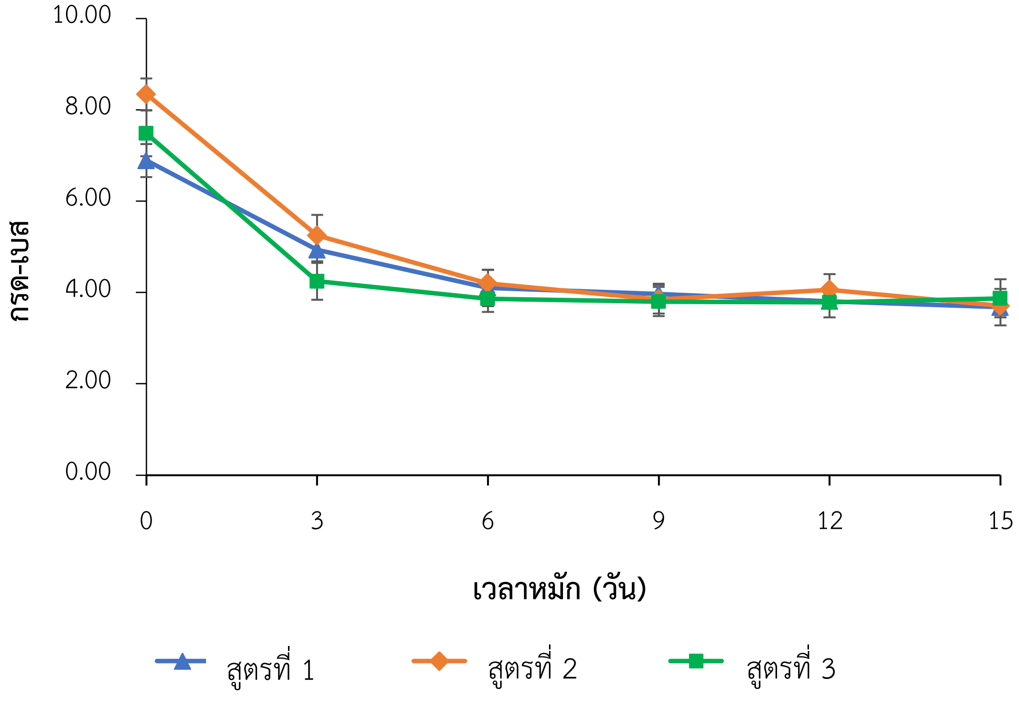
4.7.1.2 กรด-เบส (pH)

ค่า pH เริ่มต้นในการหมักอยู่ระหว่าง 6.89-8.34 หลังจากหมักเป็นเวลา 15 วัน พบว่าค่า pH ลดลงอยู่ระหว่าง 3.68-4.00 (ตารางที่ 17 และภาพที่ 15) ส่วนใหญ่แล้วเชื้อยีสต์มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก ทั้งนี้ค่า pH จะอยู่ในช่วงที่เหมาะสมในการหมักสาโท และเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อยีสต์โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 3.00-4.00 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ด้วย (อรวรรณ และคณะ, 2553)

ตารางที่ 17 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) สาโทข้าวเหนียวลืมผัว 3 สูตร

สูตรสาโท	เวลาหมัก (วัน)					
	0	3	6	9	12	15
1	$6.89^{b}\pm0.36$	$4.93^{ab}\pm0.25$	$4.10^{a}\pm0.40$	$3.97^{a}\pm0.23$	$3.81^{a}\pm0.15$	$3.68^{a}\pm0.40$
2	$8.34^{a}\pm0.35$	$5.25^{a}\pm0.45$	$4.20^{a}\pm0.29$	$3.85^{a}\pm0.31$	$4.06^{a}\pm0.34$	$3.70^{a}\pm0.20$
3	$7.48^{b}\pm0.50$	$4.24^{b}\pm0.40$	$3.86^{a}\pm0.29$	$3.80^{a}\pm0.32$	$3.78^{a}\pm0.33$	$4.00^{a}\pm0.34$

หมายเหตุ a b ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 15 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในสาโท 3 สูตร

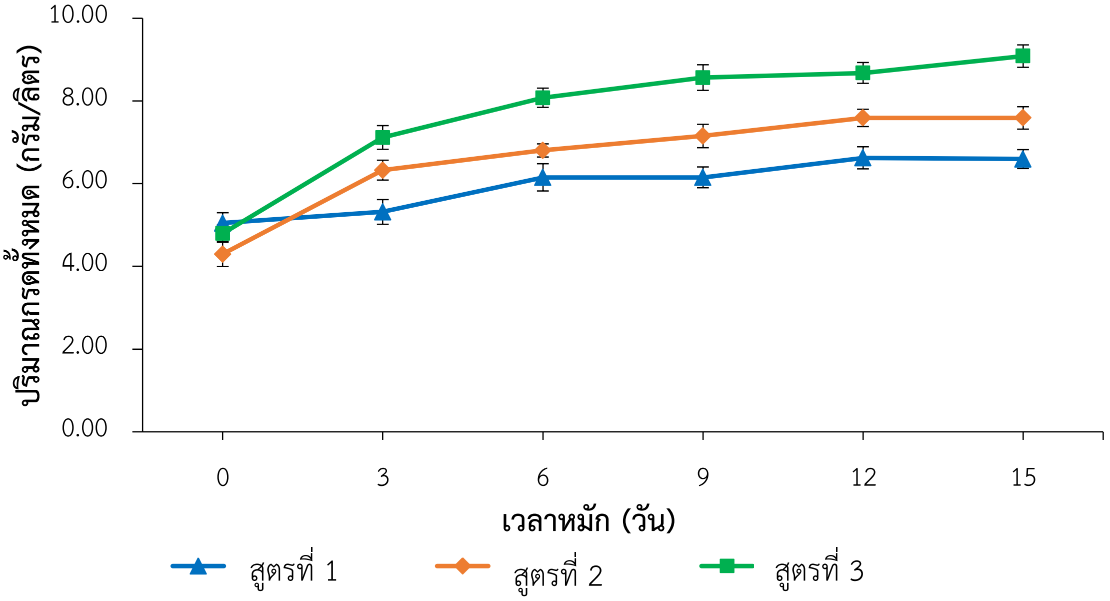
4.7.1.3 ปริมาณกรดทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)

ปริมาณกรดทั้งหมดที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักสาโททั้ง 3 สูตร พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 4.30-9.08 กรัมต่อลิตร ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากคาร์บอนไดออกไซด์ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักสาโท ในขณะที่ไม่มีออกซิเจน โดยคาร์บอนไดออกไซด์สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำทำให้เกิดกรดคาร์บอนิค ซึ่งเป็นกรดอ่อน ๆ ส่งผลให้ pH ลดลง ทำให้ปริมาณกรดรวมเพิ่มขึ้นและไปยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ (Dittrich, 1977) (ตารางที่ 18 และภาพที่ 16)

ตารางที่ 18 ปริมาณกรดทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ของสาโทข้าวเหนียวลืมผัว 3 สูตร

สูตรสาโท	เวลาหมัก (วัน)					
	0	3	6	9	12	15
1	$5.05^{a}\pm0.01$	$5.32^{c}\pm0.01$	$6.15^{c}\pm0.02$	$6.15^{c}\pm0.02$	$6.62^{c}\pm0.01$	$6.59^{c}\pm0.01$
2	$4.30^{c}\pm0.02$	$6.32^{b}\pm0.01$	$6.80^{b}\pm0.02$	$7.15^{b}\pm0.00$	$7.59^{b}\pm0.03$	$7.59^{b}\pm0.03$
3	$4.79^{b}\pm0.01$	$7.12^{a}\pm0.01$	$8.08^{a}\pm0.02$	$8.56^{a}\pm0.01$	$8.68^{a}\pm0.02$	$9.08^{a}\pm0.01$

หมายเหตุ a b c ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 16 ปริมาณกรดทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ในสาโททั้ง 3 สูตร

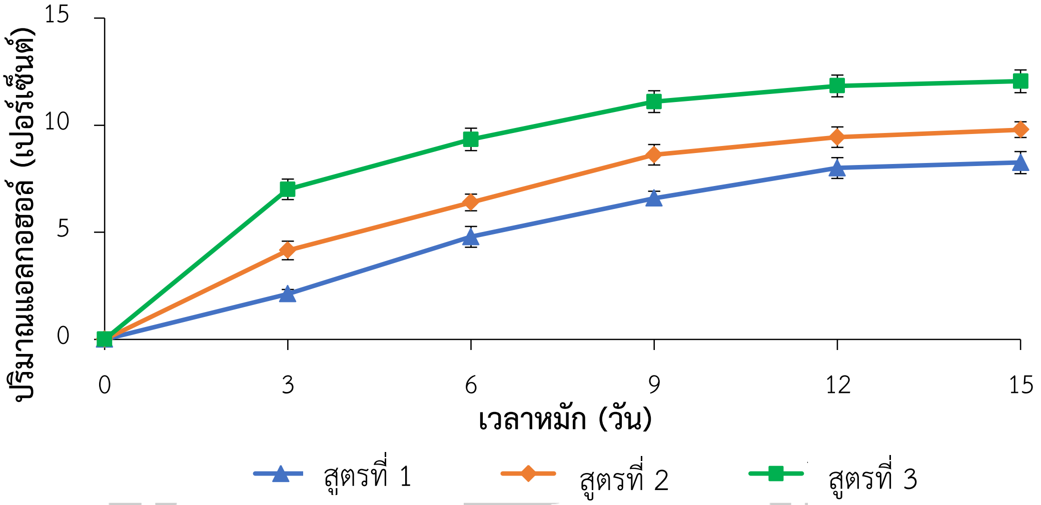
4.7.1.4 ปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์)

ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มสูงขึ้น เป็นผลมาจากเชื้อราและยีสต์ในลูกแป้งที่มีคุณสมบัติในการย่อยน้ำตาลและผลิตแอลกอฮอล์ ซึ่งยีสต์ยังช่วยทำให้กลิ่นและรสชาติของสาโทดีขึ้นด้วย (เกศริน และคณะ, 2561) จากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมัก 15 วันพบว่าในระหว่างการหมัก ปริมาณเอทานอลของสาโทที่หมักด้วยลูกแป้งทุกสูตรมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 15 ของการหมัก โดยสาโทสูตรที่ 3 ที่มีอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 12.05 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 19 และภาพที่ 17)

ตารางที่ 19 ปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์) ในสาโท 3 สูตร

สูตรสาโท	เวลาหมัก (วัน)					
	0	3	6	9	12	15
1	$0^{a}\pm0$	$2.12^{c}\pm0.20$	$4.79^{c}\pm0.49$	$6.59^{c}\pm0.32$	$8.00^{c}\pm0.48$	$8.74^{c}\pm0.01$
2	$0^{a}\pm0$	$4.16^{b}\pm0.43$	$6.39^{b}\pm0.40$	$8.62^{b}\pm0.48$	$9.43^{b}\pm0.48$	$9.90^{b}\pm0.01$
3	$0^{a}\pm0$	$7.00^{a}\pm0.48$	$9.34^{a}\pm0.52$	$11.10^{a}\pm0.51$	$11.83^{a}\pm0.51$	$12.05^{a}\pm0.06$

หมายเหตุ a b c ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)



ภาพที่ 17 ปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์) ในสาโท 3 สูตร

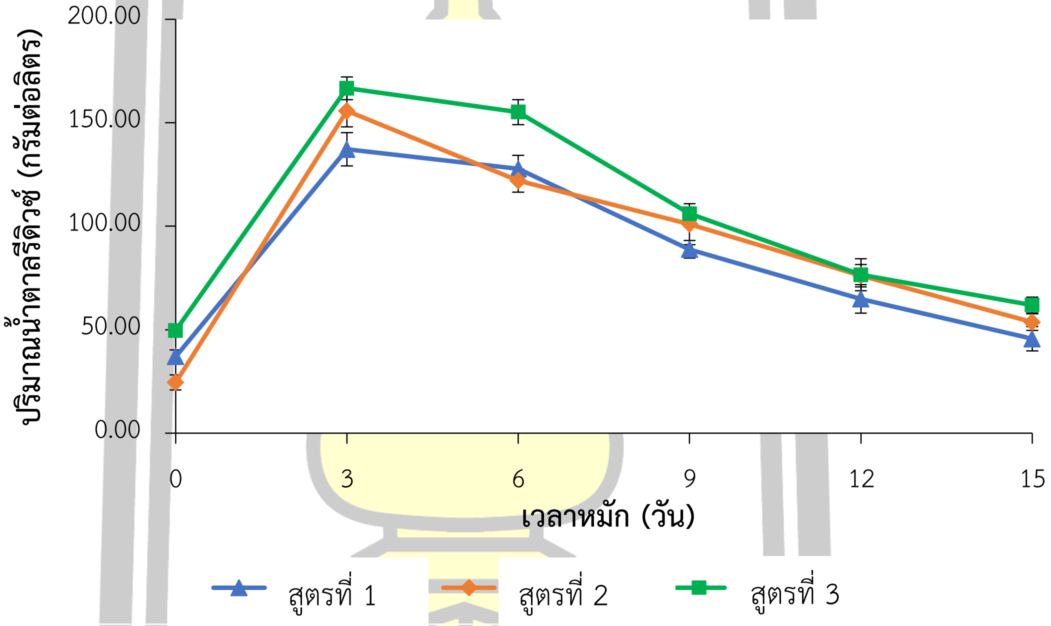
4.7.1.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงวันต่าง ๆ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 0 และ วันที่ 15 ของสาโทสูตรที่ 3 มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดเมื่อเทียบกับทุกสูตร ซึ่งมีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 166.67 กรัมต่อลิตร ในการหมักสาโททั้ง 15 วัน จากมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน สาโท มผช.3, 2546) ได้กล่าวถึงคุณสมบัติทางเคมีแต่ไม่มีข้อใดระบุถึงระดับของปริมาณน้ำตาล เพราะสาโทที่จำหน่ายจะมีการปรับแต่งปริมาณน้ำตาลตามความต้องการ ดังนั้น การที่สาโทมีปริมาณน้ำตาลที่อยู่ในระดับที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งที่สำคัญเพื่อลดปริมาณการปรับแต่งปริมาณน้ำตาล ภาพรวมในเรื่องปริมาณน้ำตาลของสูตรที่ 3 มีค่าที่สูงที่สุดของปริมาณน้ำตาลในวันที่ 0 ถึงวันที่ 15 จึงสรุปได้ว่าเป็นสูตรที่ดีที่สุดในด้านคุณสมบัติทางเคมีของปริมาณน้ำตาล (ตารางที่ 20 และภาพที่ 18)

ตารางที่ 20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) สาโทข้าวเหนียวลืมผัว 3 สูตร

สูตร สาโท	เวลาหมัก (วัน)					
	0	3	6	9	12	15
1	37.05^{b}±3.18	137.14^{b}±8.05	127.68^{b}±6.50	88.82^{b}±4.25	64.89^{a}±6.92	45.59^{b}±5.87
2	24.52^{c}±3.62	155.73^{a}±7.80	122.02^{b}±5.52	101.05^{ab}±9.86	76.16^{a}±5.39	53.67^{ab}±4.00
3	46.67^{a}±2.27	166.67^{a}±5.51	155.12^{a}±6.05	106.06^{a}±2.16	76.57^{a}±7.67	61.92^{a}±3.89

หมายเหตุ a b c ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 18 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ในสาโท 3 สูตร

4.7.1.6 วิเคราะห์สารระเหยของสาโททั้ง 3 สูตร โดยเครื่อง GC-MS

กระบวนการหมักสาโท โดยใช้ข้าวเหนียวลืมผัวมีองค์ประกอบทางเคมีที่มีอิทธิพลต่อกลิ่น และรสชาติ ซึ่งสาโท 3 สูตร พบสารระเหยทั้งหมด ได้แก่ กรดคาร์บอมิก กรดโพรพิโอลิก เอทานอล เอทิลอะซิเตท 2,3-บิวเทนไดออล กรดโพรพาโนอิก และกลีเซอรอล (ตารางที่ 21) สารระเหยเหล่านี้จะช่วยให้สาโทมีกลิ่นหอมและมีรสชาติที่ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu *et al.*, (2018) ได้วิเคราะห์สารระเหยของไวน์ข้าวด้วยเครื่อง GC-MS พบว่า สารที่ให้กลิ่นหอมในไวน์ที่โดดเด่นที่สุด ได้แก่ เอทานอล แอลกอฮอล์ เอทิลอะซิเตท 2,3-บิวเทนไดออล 1-เมทิลแนฟทาลีน 2-เมทิลแนฟทาลีน กรดต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ยังช่วยให้รสชาติของไวน์ดีขึ้นด้วย

ตารางที่ 21 วิเคราะห์สารระเหยของสาโททั้ง 3 สูตร โดยเครื่องวิเคราะห์ GC-MS

Compound	Peak area (%)			RT	Formula	MW
	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3			
Carbonic acid	9.60	-	-	1.696	CH_3NO_2	61.04
Propiolic acid	-	8.80	8.73	1.704	$C_3H_2O_2$	70.047
Ethanol	10.44	27.22	34.36	3.658	CH_3CH_2OH	46.07
Ethyl acetate	-	-	19.10	12.687	$C_4H_8O_2$	88.106
Ethylic acid	11.59	6.72	11.67	12.716	$C_2H_4O_2$	60.052
2,3-Butanediol	15.63	14.14	10.29	13.779	$C_4H_{10}O_2$	90.122
Propanoic acid	19.75	8.66	5.20	19.549	$C_3H_6O_2$	74.08
Glycerol	23.71	30.29	4.24	20.611	$C_3H_8O_3$	92.094
Carbon oxide	5.87	5.73	6.02	3.725	CO_2	44.01
Dimethylamine	3.54	5.23	4.65	2.042	$(CH_3)_2NH$	44.08
Lactic acid	6.47	5.28	6.21	19.833	$C_3H_6O_3$	90.08
Octadeamethyl-cyclononasiloxane	1.34	2.16	1.89	23.533	$C_{18}H_{54}O_9Si_9$	666
Methyl ester	4.22	3.96	4.26	19.559	$C_4H_8O_3$	104

4.8 กระบวนการหมักไซเดอร์จากสาโททั้ง 3 สูตร

จากการศึกษากระบวนการหมักไซเดอร์เพื่อให้ได้กรดอะซิติก นำสาโทข้าวลืมผัว 3 สูตร มาฆ่าเชื้อด้วย KMS ซึ่งมีปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้น คือ 8.26, 9.79 และ 12.05 เปอร์เซ็ฯต์ ตามลำดับ จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* TISTR102 หมักต่อโดยให้อากาศอีก 7 วัน และวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพ เคมี และหากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระต่อไป

4.8.1 วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ

4.8.1.1 วัดสี

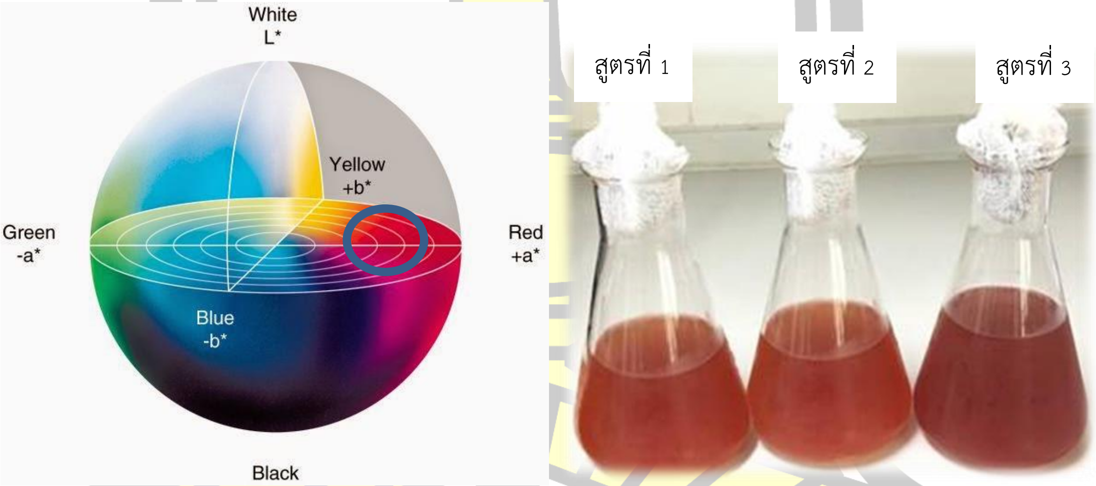
ค่าสี (L* a* และ b*) ที่เป็นค่าที่นิยม ในการประเมินลักษณะปรากฏของตัวอย่างที่ทำการ ศึกษา โดยค่า L* ที่เข้าใกล้ 100 หมายถึง ตัวอย่างมี ความสว่างมากจนเป็นสีขาวหรือสีจาง แต่ถ้าค่า L* เข้าใกล้ 0 หมายถึง ตัวอย่างมีความสว่างน้อยลงจน เป็นสีคล้ำ ส่วนค่า a* ที่เป็นบวก แสดงว่าตัวอย่าง เป็นสีแดง แต่ค่า a* ที่เป็นลบ แสดงว่าตัวอย่างเป็น สีเขียว และในค่า b* ที่

เป็นบวกแสดงว่าตัวอย่างเป็น สีเหลือง แต่ถ้าค่า b* เป็นลบแสดงว่าตัวอย่างเป็น สีน้ำเงิน (อรุณทิพย์, 2555) พบว่า ไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร จะมีค่า L* a* และ b* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 22) โดยในลักษณะค่า L* พบว่า ไซเดอร์สูตร 3 มีค่า L* น้อยที่สุด (L*=30.38) อย่างมีนัยสำคัญ รองลงมา คือ ไซเดอร์สูตร 2 (L*=33.19) และไซเดอร์สูตร 3 (L*=35.72) ซึ่งพบว่าไซเดอร์สูตร 3 มีสีม่วงอ่อน และสูตร 1 และ สูตร 2 มีสีส้ม (ภาพที่ 19)

ตารางที่ 22 ค่าสีของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

สูตรไซเดอร์	สีที่ปรากฎ	ค่าสี		
		L*	a*	b*
1	ส้ม	$35.72^{a} \pm 0.02$	$0.67^{c} \pm 0.03$	$6.06^{c} \pm 0.04$
2	ส้ม	$33.19^{b} \pm 0.04$	$1.01^{b} \pm 0.03$	$6.43^{b} \pm 0.02$
3	ม่วงอมส้ม	$30.38^{c} \pm 0.04$	$1.74^{a} \pm 0.04$	$6.97^{a} \pm 0.02$

หมายเหตุ a b c ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 19 สีของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

4.8.2 วิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมี

4.8.2.1 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH)

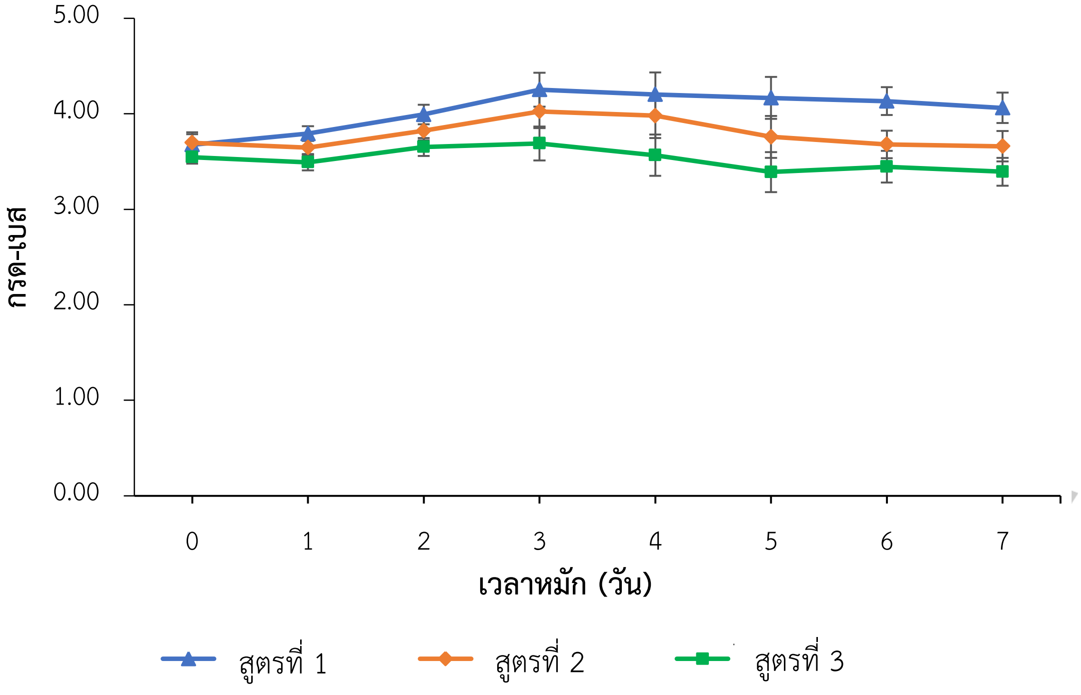
กรด-เบส (pH) เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการหมักไซเดอร์ ซึ่งการวิเคราะห์ค่า pH ที่เหมาะสมในการหมักมีค่า pH อยู่ระหว่าง 3.5-5 พบว่า ไซเดอร์หมักทั้ง 3 สูตร ค่า pH อยู่ระหว่าง 3.39-4.25 ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมในการหมักไซเดอร์ (ตารางที่ 23 และภาพที่ 20) สอดคล้องกับงานวิจัยของ สมใจ (2550) ศึกษาผลของค่า pH ให้อยู่ในช่วงระหว่าง 3-6 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 23 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

วันที่หมัก	สูตรไซเดอร์		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
0	3.68^{Ad} ±0.07	3.70^{Ae} ±0.11	3.55^{Bb} ±0.07
1	3.79^{Ad} ±0.09	3.65^{ABg} ±0.08	3.49^{Bbc} ±0.02
2	3.99^{Ac} ±0.09	3.82^{Bc} ±0.10	3.65^{Ca} ±0.02
3	4.25^{Aa} ±0.18	4.03^{Ba} ±0.18	3.69^{Ca} ±0.03
4	4.20^{Aab} ±0.22	3.98^{Bb} ±0.23	3.57^{Cb} ±0.03
5	4.17^{Aab} ±0.21	3.76^{Bd} ±0.22	3.39^{Cd} ±0.02
6	4.13^{Aabc} ±0.16	3.68^{Bef} ±0.15	3.45^{Ccd} ±0.10
7	4.06^{Abc} ±0.14	3.66^{Bf} g±0.16	3.39^{Cd} ±0.02

หมายเหตุ a b c... ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์เล็กกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

A B C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวนอนเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 20 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

4.8.2.2 ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด

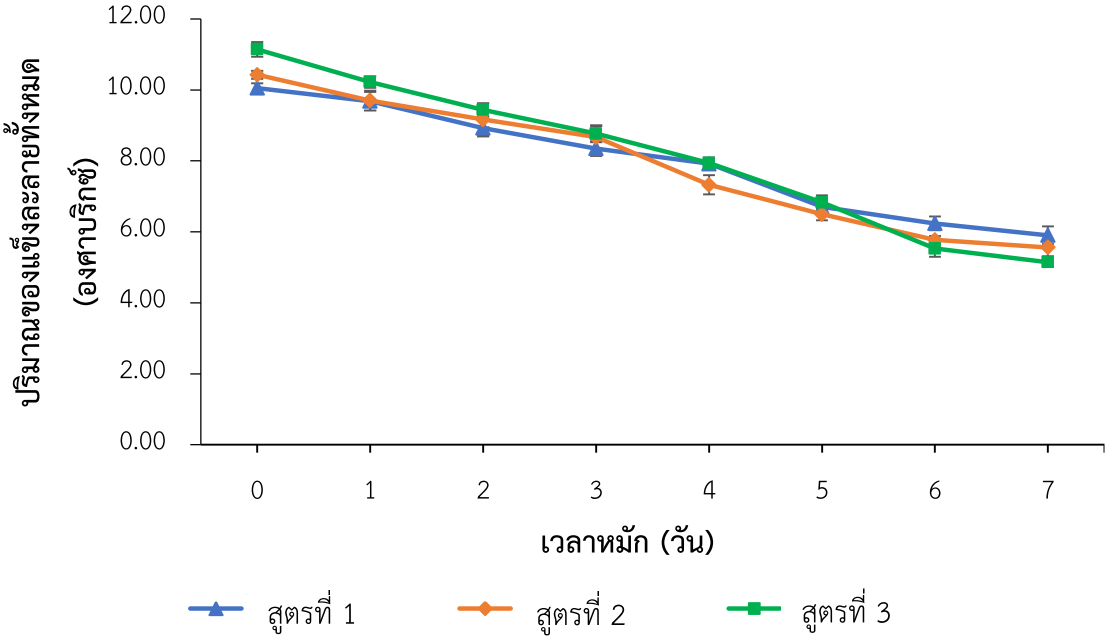
การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดได้ในระหว่างการหมักไซเดอร์ พบว่า ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมดมีแนวโน้มลดลง จากนั้นจะคงที่ (ตารางที่ 24 และภาพที่ 21) เนื่องจากในกระบวนการหมักไซเดอร์นั้นเชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* TISTR102 สามารถออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดอะซิติกได้ แต่ไม่สารมารถออกซิไดซ์น้ำตาลได้ จึงทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดได้เกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยในระหว่างการหมัก (มะลิวัลย์ และคณะ, 2554)

ตารางที่ 24 ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

วันที่หมัก	สูตรไซเดอร์ (องศาบริกซ์)		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
0	10.05^{Ca}±0.07	10.43^{Ba}±0.03	11.41^{Aa}±0.06
1	9.68^{Bb}±0.04	9.70^{Bb}±0.07	10.22^{Ab}±0.08
2	8.93^{Cc}±0.02	9.16^{Bc}±0.04	9.44^{Ac}±0.09
3	8.35^{Cd}±0.05	8.67^{Bd}±0.02	8.77^{Ad}±0.02
4	7.92^{Ae}±0.08	7.32^{Ce}±0.03	7.94^{Ae}±0.04
5	6.70^{Bf}±0.02	6.49^{Cf}±0.06	6.83^{Af}±004
6	6.24^{Ag}±0.04	5.77^{Bg}±0.02	5.53^{Cg}±0.05
7	5.91^{Ah}±0.10	5.56^{Bh}±0.02	5.15^{Ch}±0.02

หมายเหตุ a b c... ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์เล็กกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

A B C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวนอนเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)



ภาพที่ 21 แสดงปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) ไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

4.8.2.3 น้ำตาลรีดิวซ์

การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างการหมักไซเดอร์ พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูตรที่ 1 ลดลงเหลือ 58.29 กรัมต่อลิตร ในสูตร 2 มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 57.61 กรัมต่อลิตร และไซเดอร์สูตร 3 มีค่าลดลงเหลือ 54.92 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 25 และภาพที่ 22) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้วลดลงและเริ่มคงที่ในระหว่างการหมักไซเดอร์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ชื่นจิตร และคณะ, (2561) ได้ทำการหมักไซเดอร์จากหัวเชื้อโคจิข้าวเหนียว พบว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีการเปลี่ยนแปลงลดลงเล็กน้อย เนื่องจากการหมักไซเดอร์ไม่มีเชื้อราที่สร้างเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งในข้าวให้ได้น้ำตาล และไม่มียีสต์ที่ใช้น้ำตาลในการผลิตแอลกอออล์ มีเพียงเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดที่ใช้แอลกอฮอล์ในการผลิตกรดอะซิติก จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย

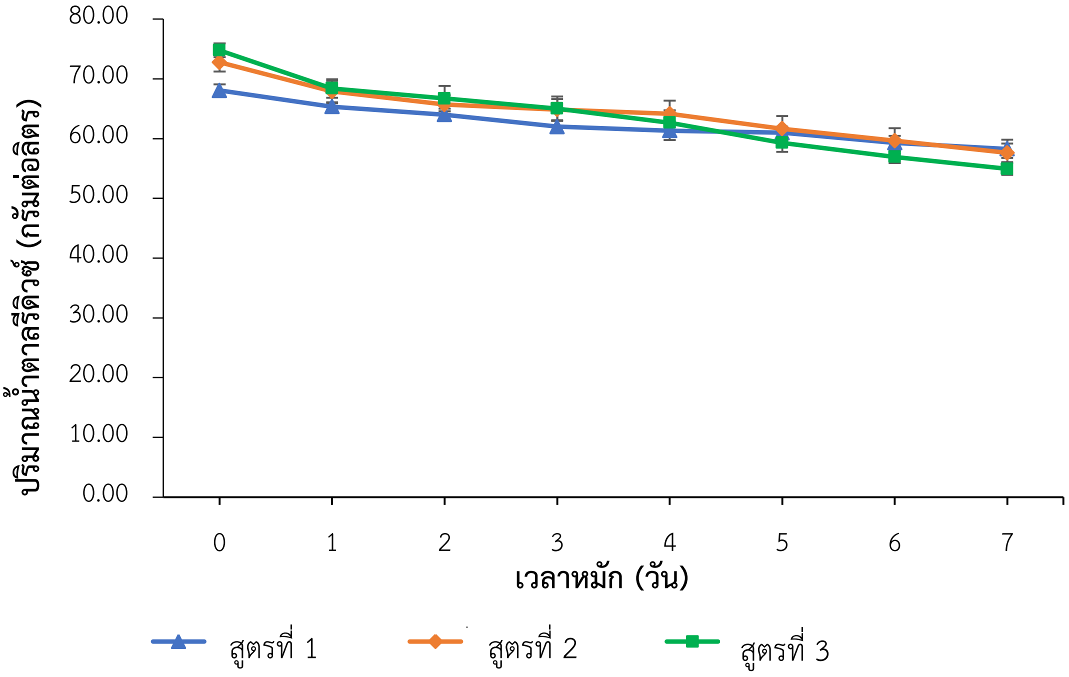
ศูนย์ ปณ ฑิโต ชีเว

ตารางที่ 25 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

วันที่หมัก	สูตรไซเดอร์ (กรัมต่อลิตร)		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
0	68.05^{Ba} ±1.01	72.76^{Aa} ±1.54	74.78^{Aa} ±1.17
1	65.36^{Bb} ±0.58	67.88^{ABb} ±1.77	68.39^{Ab} ±1.54
2	64.01^{Ab} ±1.01	65.69^{Abc} ±1.54	66.70^{Abc} ±2.10
3	61.99^{Ac} ±1.01	64.85^{Abcd} ±1.77	65.02^{Acd} ±2.02
4	61.32^{Acd} ±1.54	64.14^{Acd} ±2.23	62.66^{Ad} ±2.10
5	60.98^{Acd} ±1.01	61.65^{Ade} ±2.10	59.30^{Ae} ±1.54
6	59.30^{Ade} ±1.17	59.63^{Aef} ±2.10	56.94^{Aef} ±1.01
7	58.29^{Ae} ±1.54	57.61^{ABf} ±1.54	54.92^{Bf} ±1.01

หมายเหตุ a b c... ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์เล็กกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

A B C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวนอนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 22 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

4.8.2.4 ปริมาณแอลกอฮอล์

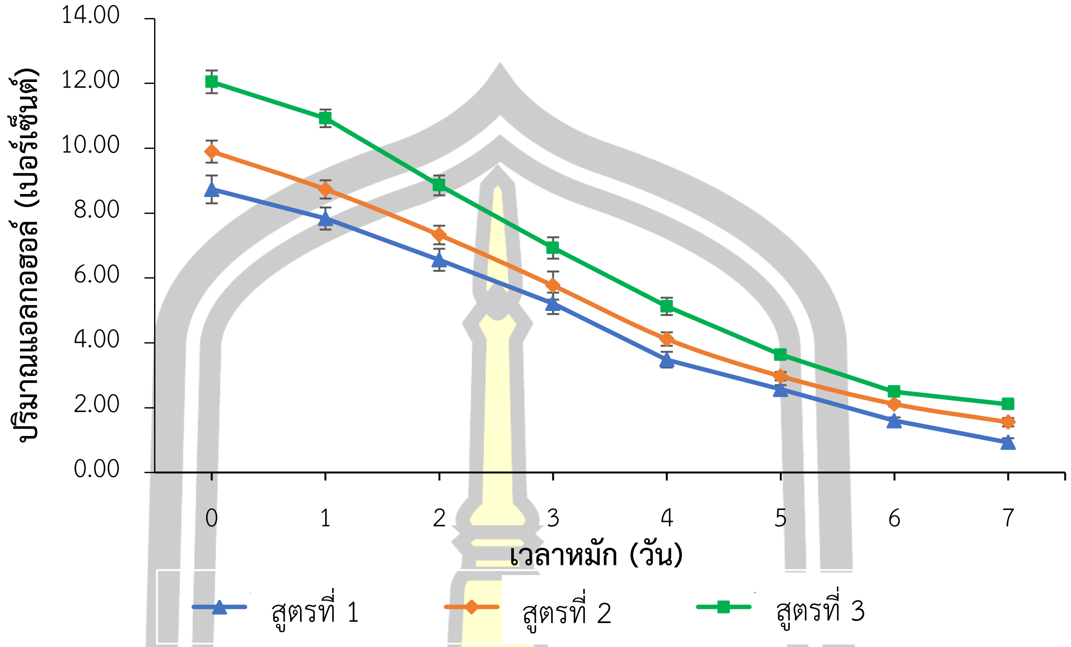
วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ระหว่างการหมักไซเดอร์ โดยเครื่อง GC พบว่า ปริมาณแอลกอฮอล์ค่อย ๆ ลดลง (ตารางที่ 26 และภาพที่ 23) เนื่องจากกรดอะซิติกเกิดกระบวนการหมักเอทิลแอลกอฮอล์ด้วยแบคทีเรีย *Acetobacter* ซึ่งสามารถออกซิไดซ์เอทิลแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกในสภาวะที่มีอากาศ (จารุวรรณ, 2551) ไซเดอร์สูตรที่ 1 มีปริมาณแอลกอฮอล์ 0.93 เปอร์เซ็นต์ ไซเดอร์สูตรที่ 2 มีปริมาณแอลกอฮอล์ 1.55 เปอร์เซ็นต์ และไซเดอร์สูตรที่ 3 มีปริมาณแอลกอฮอล์ 2.11 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 26 ปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

วันที่หมัก	สูตรไซเดอร์ (เปอร์เซ็นต์)		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
0	$8.74^{Ca}\pm0.01$	$9.90^{Ba}\pm0.01$	$12.05^{Aa}\pm0.06$
1	$7.84^{Cb}\pm0.04$	$8.73^{Bb}\pm0.10$	$10.93^{Ab}\pm0.03$
2	$6.56^{Cc}\pm0.05$	$7.33^{Bc}\pm0.06$	$8.86^{Ac}\pm0.01$
3	$5.22^{Cd}\pm0.24$	$5.77^{Bd}\pm0.03$	$6.93^{Ad}\pm0.06$
4	$3.48^{Ce}\pm0.20$	$4.12^{Be}\pm0.04$	$5.12^{Ae}\pm0.05$
5	$2.57^{Cf}\pm0.07$	$2.97^{Bf}\pm0.11$	$3.63^{Af}\pm0.05$
6	$1.60^{Cg}\pm0.05$	$2.11^{Bg}\pm0.07$	$2.49^{Ag}\pm0.08$
7	$0.93^{Ch}\pm0.04$	$1.55^{Bh}\pm0.02$	$2.11^{Ah}\pm0.02$

หมายเหตุ a b c... ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์เล็กกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

A B C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวนอนเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 23 ปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

4.8.2.5 ปริมาณกรดอะซิติก

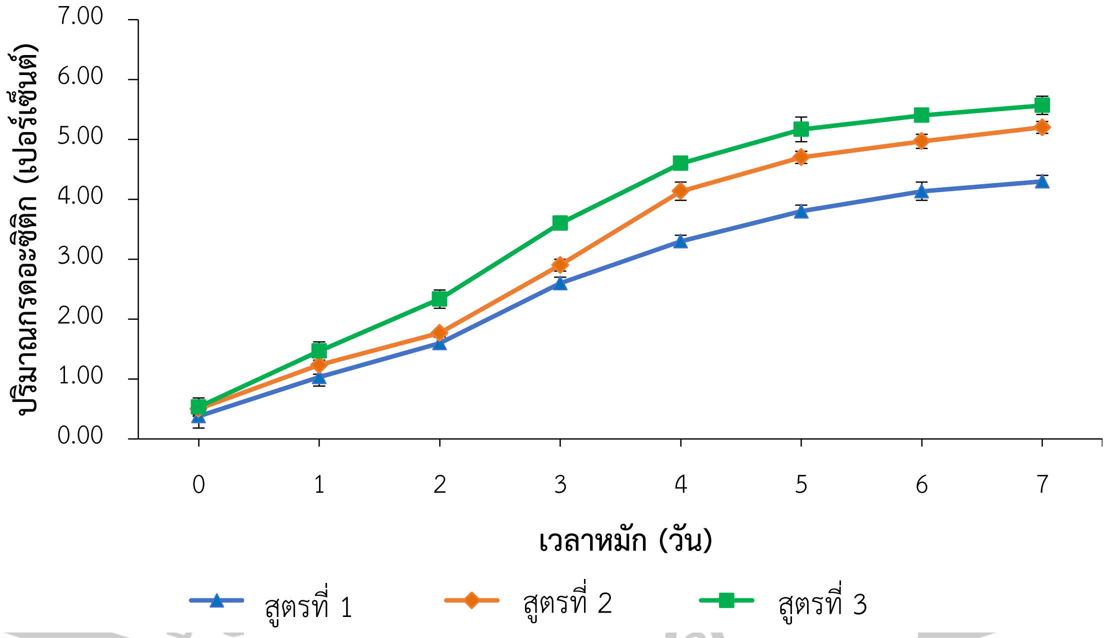
การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร โดยเครื่องวิเคราะห์ HPLC พบว่า ปริมาณกรดอะซิติกทั้ง 3 สูตรมีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดในวันที่ 7 สูตรที่ 1 มีค่า 4.30 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 2 มีค่า 5.20 เปอร์เซ็นต์ และสูตรที่ 3 มีค่า 5.57 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 27 และภาพที่ 24) ซึ่งจะเห็นได้ว่าไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร เกิดกระบวนการหมักกรดอะซิติกอย่างรวดเร็วของการหมัก ซึ่งเป็นเวลาที่เหมาะสมในการหมักกรดอะซิติกเพื่อให้ได้น้ำไซเดอร์ที่ได้มาตรฐาน (Spinosa *et al.*, 2015)

ตารางที่ 27 ปริมาณกรดอะซิติก (เปอร์เซ็นต์) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

วันที่หมัก	สูตรไซเดอร์ (เปอร์เซ็นต์)		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
0	$0.38^{Bg}\pm0.20$	$0.50^{Ah}\pm0.10$	$0.53^{Ag}\pm0.15$
1	$1.03^{Cf}\pm0.15$	$1.23^{Bg}\pm0.05$	$1.47^{Af}\pm0.15$
2	$1.60^{Ce}\pm0.10$	$1.77^{Bf}\pm0.06$	$2.33^{Ae}\pm0.15$
3	$2.60^{Cd}\pm0.10$	$2.90^{Be}\pm0.10$	$3.60^{Ad}\pm0.10$
4	$3.30^{Cc}\pm0.10$	$4.13^{Bd}\pm0.15$	$4.60^{Ac}\pm0.10$
5	$3.80^{Cb}\pm0.10$	$4.70^{Bc}\pm0.10$	$5.17^{Ab}\pm0.21$
6	$4.13^{Ca}\pm0.15$	$4.97^{Bb}\pm0.12$	$5.40^{Aab}\pm0.10$
7	$4.30^{Ca}\pm0.10$	$5.20^{Ba}\pm0.10$	$5.57^{Aa}\pm0.15$

หมายเหตุ a b c... ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์เล็กกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (*p*<0.05)

A B C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวนอนเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (*p*<0.05)



ภาพที่ 24 ปริมาณกรดอะซิติก (เปอร์เซ็นต์) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

(1). วัดปริมาณกรดต่าง ๆ

การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร โดยเครื่องวิเคราะห์ HPLC พบกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ กรดแลคติก กรดทาร์ทาริก กรดซิตริก กรดโพรพิโอนิก กรดซักซินิก และกรดอะซิติก (ตารางที่ 28) ซึ่งเป็นสารที่มีอิทธิพลต่อสีกลิ่น และรสชาติ ของไซเดอร์ (กฤษณา, 2554)

ตารางที่ 28 ปริมาณกรดอินทรีย์ (กรัมต่อลิตร) ที่พบในไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

สูตร	วัน	กรดอินทรีย์ (กรัมต่อลิตร)					
		ซิตริก	ทาร์ทาริก	ซักซินิก	แลคติก	โพรพิโอนิก	อะซิติก
1	0	3.80^{v}±0.07	5.00^{w}±0.02	10.50^{v}±0.05	8.40^{v}±0.04	28.10^{v}±0.09	3.80^{v}±0.20
	1	5.40^{s}±0.11	9.40^{t}±0.11	16.70^{s}±0.08	12.60^{t}±0.09	31.60^{s}±0.13	10.33^{t}±0.15
	2	8.70^{q}±0.08	10.30^{s}±0.09	23.40^{q}±0.09	20.80^{n}±0.11	34.80^{r}±0.09	16.00^{q}±0.10
	3	13.20^{n}±0.11	14.50^{p}±0.08	26.70^{n}±0.14	26.10^{k}±0.04	38.20^{q}±0.11	26.00^{n}±0.10
	4	22.50^{k}±0.20	17.50^{o}±0.20	30.80^{m}±0.07	30.70^{g}±0.11	41.60^{o}±0.21	33.00^{l}±0.10
	5	30.10^{i}±0.11	18.10^{n}±0.04	35.50^{k}±0.13	32.50^{d}±0.08	44.50^{m}±0.02	38.00^{j}±0.10
	6	41.10^{e}±0.14	19.40^{m}±0.09	39.40^{i}±0.05	36.70^{b}±0.11	57.70^{h}±0.14	41.00^{i}±0.15
	7	42.40^{d}±0.09	19.80^{l}±0.07	45.70^{f}±0.04	39.20^{a}±0.07	61.60^{e}±0.16	43.00^{h}±0.10
2	0	3.50^{w}±0.08	8.10^{v}±0.05	10.50^{v}±0.11	8.20^{w}±0.13	29.40^{u}±0.11	5.00^{u}±0.10
	1	4.91^{t}±0.11	12.00^{r}±0.09	16.40^{t}±0.05	16.40^{q}±0.12	30.80^{t}±0.06	12.33^{s}±0.05
	2	7.74^{r}±0.02	18.10^{n}±0.11	24.60^{p}±0.13	19.90^{o}±0.11	47.55k±0.09	17.67^{p}±0.06
	3	36.90^{g}±0.13	23.40^{k}±0.10	35.10^{l}±0.11	21.50^{m}±0.09	53.42^{i}±0.04	29.00^{m}±0.10
	4	29.50^{j}±0.11	28.10^{j}±0.05	40.40^{h}±0.14	26.40^{j}±0.07	59.16^{f}±0.08	41.33^{i}±0.15
	5	34.00^{h}±0.03	30.20^{i}±0.08	53.80^{e}±0.09	28.70^{i}±0.14	62.20^{d}±0.12	47.00^{f}±0.10
	6	42.90^{c}±0.05	37.50^{f}±0.20	66.00^{b}±0.07	30.50^{h}±0.11	64.60^{c}±0.04	49.67^{e}±0.12
	7	45.40^{a}±0.09	40.10^{e}±0.14	72.62^{a}±0.11	31.80^{e}±0.07	70.89^{a}±0.07	52.00^{c}±0.10
3	0	4.01^{u}±0.13	9.10^{u}±0.07	7.90^{w}±0.08	10.20^{u}±0.05	21.10^{x}±0.09	5.33^{u}±0.15
	1	9.86^{p}±0.08	13.10^{q}±0.12	13.50^{u}±0.11	13.70^{s}±0.04	23.50^{w}±0.08	14.67^{r}±0.15
	2	12.60^{o}±0.11	30.40^{h}±0.11	19.40^{r}±0.19	15.40^{r}±0.12	39.50^{p}±0.11	23.33^{o}±0.15
	3	13.50^{m}±0.04	35.80^{g}±0.08	25.40^{o}±0.13	19.40^{p}±0.07	42.50^{n}±0.08	36.00^{k}±0.10
	4	21.67^{l}±0.05	41.20^{d}±0.11	37.60^{j}±0.11	23.40^{l}±0.11	45.26^{l}±0.11	46.00^{g}±0.10
	5	38.68^{f}±0.09	43.80^{c}±0.05	42.80^{g}±0.2	28.80^{i}±0.04	49.84^{j}±0.16	51.67^{d}±0.21
	6	41.22^{e}±0.08	46.70^{b}±0.13	58.40^{d}±0.12	31.60^{f}±0.08	58.25^{g}±0.11	54.00^{b}±0.10
	7	43.11^{b}±0.03	49.08^{a}±0.06	61.80^{c}±0.09	34.50^{c}±0.03	69.54^{b}±0.11	55.67^{a}±0.15

หมายเหตุ a b c... ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์เล็กกำกับต่างกันจากแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

(2). % ค่าผลที่ได้ของผลิตภัณฑ์

ผลที่ได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต (product yield; $Y_{p/s}$) คือ สัดส่วนระหว่างปริมาณผลิตภัณฑ์ (P) ที่เพิ่มขึ้นต่อปริมาณสับสเทรต (S) ที่ถูกใช้ไป โดย

$$\%\ \text{Yield} = (P/S)*100$$

เมื่อ P คือ ปริมาณผลิตภัณฑ์กรดอะซิติกที่เกิดขึ้น
S คือ ปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตกรดอะซิติก

ผลที่ได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต ($Y_{p/s}$) ไซเดอร์สูตรที่ 1 มีค่าเท่ากับ 49.22 เปอร์เซ็นต์ ไซเดอร์สูตรที่ 2 มีค่าเท่ากับ 52.53 เปอร์เซ็นต์ และไซเดอร์สูตรที่ 3 มีค่าเท่ากับ 46.21 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 29) โดยค่าที่ได้จะสามารถบอกถึงความสารถในการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ได้ว่าไซเดอร์สูตรไหนเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ได้มาก ซึ่งค่าผลผลิตภัณฑ์นี้จะนำมาคิดหาอัตราการผลิตได้ เช่น ต้นทุน กำไร ความคุมค่าในการผลิต เมื่อสามารถคำนวณหาค่าต่าง ๆ ได้ก็สามารถเลือกสูตรที่ดีที่สุดเพื่อให้คุ้มแก่การลงทุน ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกไซเดอร์สูตรที่ 2 ในการผลิตเพราะไซเดอร์สูตรที่ 2 มีค่าผลผลิตภัณฑ์ที่ได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับไซเดอร์ทุกสูตร

ตารางที่ 29 ค่าผลที่ได้ของผลิตภัณฑ์ไซเดอร์ข้าวลืมผัวทั้ง 3 สูตร

วันที่หมัก	% ผลผลิตที่ได้		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
0	4.35^{h}	5.05^{h}	4.42^{h}
1	11.82^{g}	12.45^{g}	12.18^{g}
2	18.31^{f}	17.85^{f}	19.37^{f}
3	29.76^{e}	29.29^{e}	29.88^{e}
4	37.77^{d}	41.75^{d}	38.18^{d}
5	43.49^{c}	47.47^{c}	42.89^{c}
6	47.30^{b}	50.17^{b}	44.82^{b}
7	49.22^{a}	52.53^{a}	46.21^{a}

หมายเหตุ a b c... ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์เล็กกำกับต่างกันจากแถวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

4.8.3 วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระไซเดอร์

กระบวนการหมักไซเดอร์จากสาโททั้ง 3 สูตร โดยการทดสอบหาปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของไซเดอร์ และปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด ดังนี้

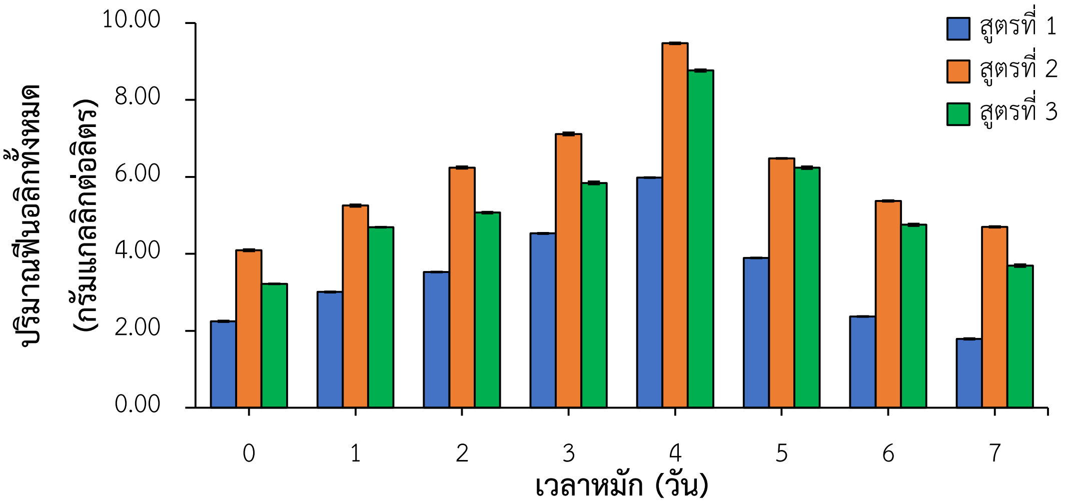
4.8.3.1 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของไซเดอร์ที่หมักจากสาโททั้ง 3 สูตร พบว่า ไซเดอร์ทั้ง 3 สูตรมีปริมาณฟีนอลิกสูงในวันที่ 4 ของการหมัก ซึ่งสูตรที่ 2 มีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด มีค่า 9.47±0.02 กรัมแกลลิกต่อลิตร รองลงมาคือ ไซเดอร์ที่ 3 มีค่า 8.76±0.03 กรัมแกลลิกต่อลิตร และปริมาณฟีนอลิกน้อยสุด คือ ไซเดอร์สูตรที่ 1 มีค่า 5.98±0.01 กรัมแกลลิกต่อลิตร (ตารางที่ 30 และภาพที่ 25) สอดคล้องกับงานวิจัยของ ปวีณา และคณะ, (2555) ได้วิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่างข้าวหอมมะลิ ข้าวเหนียว ข้าวเหนียวดำ และข้าวเหนียวแดง และนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นข้าวฮางงอก ข้าวกล้องงอก และข้าวคั่ว พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.34 ถึง 2.65 กรัมแกลลิกต่อลิตร

ตารางที่ 30 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (กรัมแกลลิกต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

วันที่หมัก	ฟีนอลิกทั้งหมด (กรัมแกลลิกต่อลิตร)		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
0	2.24^{g}±0.02	4.09^{h}±0.02	3.22^{g}±0.01
1	3.01^{e}±0.01	5.25^{f}±0.03	4.69^{e}±0.01
2	3.52^{d}±0.01	6.24^{d}±0.03	5.07^{d}±0.02
3	4.53^{b}±0.01	7.11^{b}±0.04	5.84^{c}±0.04
4	5.98^{a}±0.01	9.47^{a}±0.02	8.76^{a}±0.03
5	3.89^{c}±0.01	6.48^{c}±0.01	6.24^{b}±0.04
6	2.37^{f}±0.01	5.37^{e}±0.02	4.76^{de}±0.03
7	1.79^{h}±0.01	4.70^{g}±0.01	3.69^{f}±0.03

หมายเหตุ a b c... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 25 ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด (กรัมแกลลิกต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

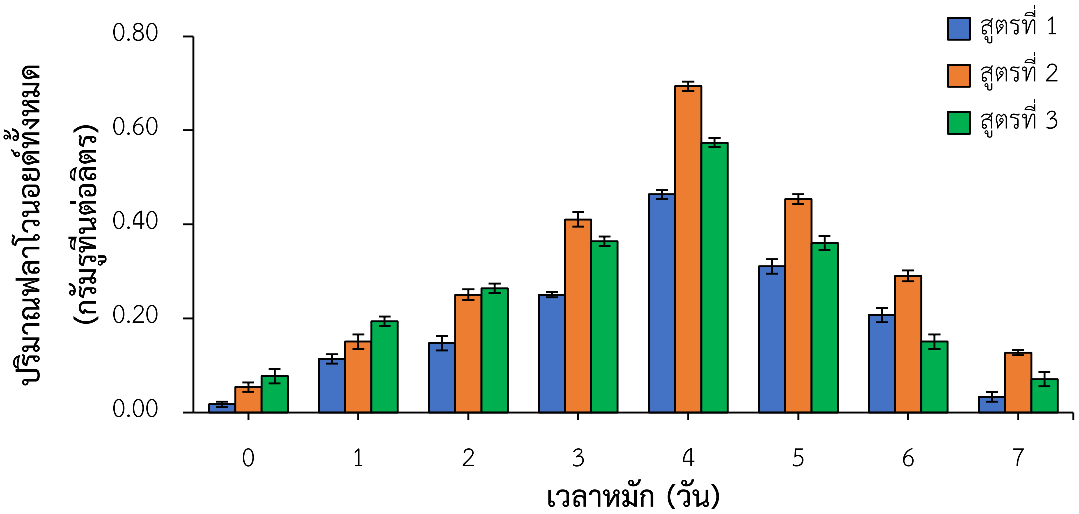
4.8.3.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของไซเดอร์ พบว่า ไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงในวันที่ 4 ของการหมัก ซึ่งไซเดอร์สูตรที่ 2 มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุดมีค่า 0.69±0.01 กรัมรูทีนต่อลิตร ไซเดอร์สูตรที่ 3 มีปริมาณฟลาโวนอยด์มีค่า 0.57±0.01 กรัมรูทีนต่อลิตร และไซเดอร์สูตรที่ 1 มีปริมาณฟลาโวนอยด์น้อยสุด มีค่า 0.46±0.01 กรัมรูทีนต่อลิตร (ตารางที่ 31 และภาพที่ 26)

ตารางที่ 31 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (กรัมรูทีนต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

วันที่หมัก	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (กรัมรูทีนต่อลิตร)		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
0	0.02^{g}±0.01	0.05^{h}±0.01	0.08^{g}±0.02
1	0.11^{f}±0.01	0.15^{f}±0.02	0.19^{g}±0.01
2	0.15^{e}±0.02	0.25^{e}±0.01	0.26^{c}±0.01
3	0.25^{c}±0.01	0.41^{c}±0.02	0.36^{b}±0.01
4	0.46^{a}±0.01	0.69^{a}±0.01	0.57^{a}±0.01
5	0.31^{b}±0.02	0.45^{b}±0.01	0.36^{b}±0.02
6	0.21^{d}±0.02	0.29^{d}±0.01	0.15^{f}±0.02
7	0.03^{g}±0.01	0.13^{g}±0.01	0.07^{g}±0.02

หมายเหตุ a b c... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 26 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (กรัมรูทีนต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

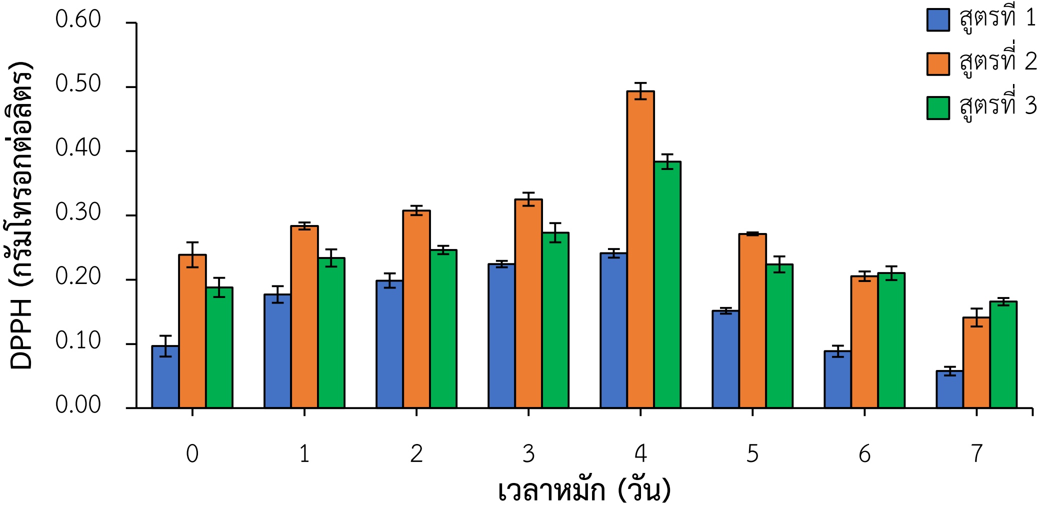
4.8.3.3 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร พบว่าไซเดอร์ทั้ง 3 สูตรมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก ซึ่งไซเดอร์สูตรที่ 2 มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดมีค่า 0.49±0.01 กรัมโทรอกต่อลิตร ไซเดอร์สูตรที่ 3 มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ มีค่า 0.38±0.01 กรัมโทรอกต่อลิตร และไซเดอร์สูตรที่ 1 มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด มีค่า 0.24±0.01 กรัมโทรอกต่อลิตร (ตารางที่ 32 และภาพที่ 27) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wachira , (2015) ได้ทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของไวน์ข้าวเหนียวลืมผัวและข้าวหอมนิล พบว่าไวน์ข้าวเหนียวลืมผัวมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าไวน์ข้าวหอมนิล (ร้อยละ 80.26±1.75) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ วิลาวัลย์ และคณะ, (2560) ทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเหนียวลืมผัวและข้าวเหนียวไร่ทิพย์ พบว่าน้ำส้มสายชูที่หมักจากข้าวเหนียวลืมผัวมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเหนียวไร่ทิพย์ มีค่าเท่ากับร้อยละ 72.53±0.14 และ 65.26±0.21

ตารางที่ 32 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH (กรัมโทรอกต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

วันที่หมัก	กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH (กรัมโทรอกต่อลิตร)		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
0	0.10^{f}±0.02	0.24^{d}±0.02	0.19^{f}±0.01
1	0.18^{d}±0.01	0.28^{c}±0.01	0.23^{cd}±0.01
2	0.20^{c}±0.01	0.31^{b}±0.01	0.25^{c}±0.01
3	0.22^{b}±0.00	0.32^{b}±0.01	0.26^{b}±0.01
4	0.24^{a}±0.01	0.49^{a}±0.01	0.38^{a}±0.01
5	0.15^{e}±0.00	0.27^{c}±0.00	0.22^{de}±0.01
6	0.09^{f}±0.01	0.21^{e}±0.01	0.21^{e}±0.01
7	0.06^{g}±0.01	0.14^{f}±0.01	0.17^{g}±0.01

หมายเหตุ a b c... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (*p*<0.05)



ภาพที่ 27 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (กรัมโทรอกต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

4.8.3.4 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP

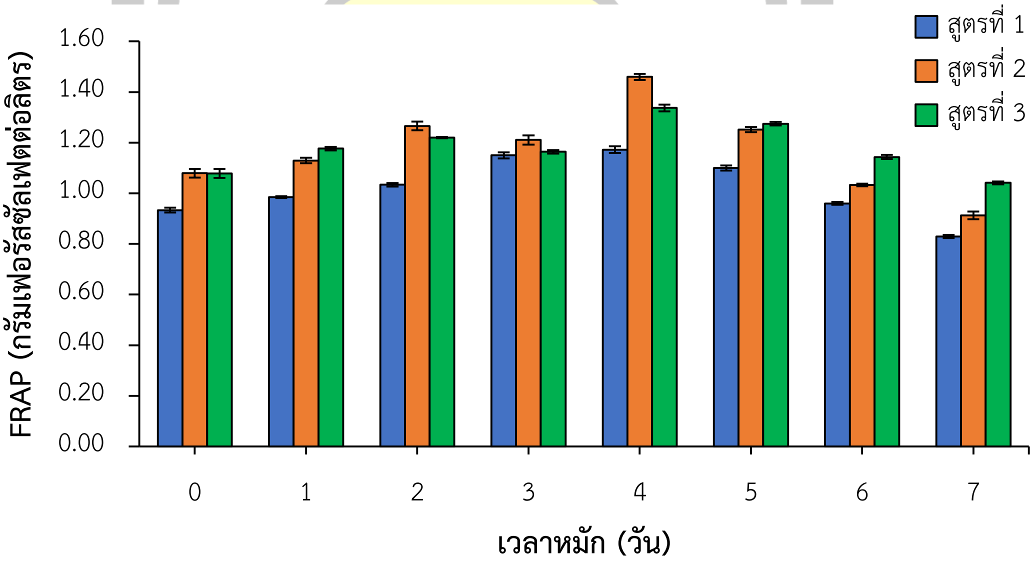
ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของไซเดอร์หมัก พบว่าไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก ซึ่งไซเดอร์สูตรที่ 2 มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด มีค่า 1.46±0.01 กรัมเฟอรัสซัลเฟตต่อลิตร ไซเดอร์สูตรที่ 3 มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ มีค่า 1.34±0.01 กรัมเฟอรัสซัลเฟตต่อลิตร และไซเดอร์สูตรที่ 1 มีค่า

กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระน้อยสุด มีค่า 1.17±0.01 กรัมเฟอรัสซัลเฟตต่อลิตร (ตารางที่ 33 และภาพที่ 28) เมื่อเทียบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

ตารางที่ 33 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP (กรัมเฟอรัสซัลเฟตต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

วันที่หมัก	กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP (กรัมเฟอรัสซัลเฟตต่อลิตร)		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
0	0.93^{g}±0.01	1.08^{e}±0.02	1.08^{f}±0.02
1	0.98^{e}±0.00	1.13^{d}±0.01	1.18^{d}±0.01
2	1.03^{d}±0.01	1.27^{b}±0.02	1.22^{c}±0.00
3	1.15^{b}±0.01	1.21^{c}±0.02	1.16^{d}±0.01
4	1.17^{a}±0.01	1.46^{a}±0.01	1.34^{a}±0.01
5	1.10^{c}±0.01	1.25^{b}±0.01	1.27^{b}±0.01
6	0.96^{f}±0.01	1.03^{f}±0.01	1.14^{e}±0.01
7	0.83^{h}±0.01	0.91^{g}±0.01	1.04^{g}±0.01

หมายเหตุ a b c… ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 28 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (กรัมเฟอรัสซัลเฟตต่อลิตร) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

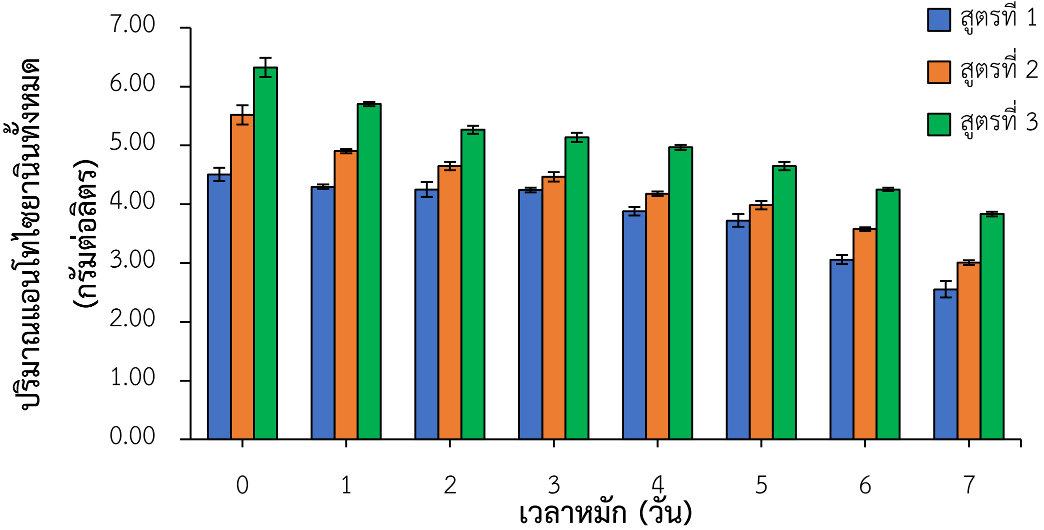
4.8.3.5 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของไซเดอร์หมักทั้ง 3 สูตร พบว่าปริมาณสารแอนโทไซยานินมีปริมาณลดลง (ตารางที่ 34 และภาพที่ 29) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของรุ่งทิวา และคณะ (2551) พบว่า ปริมาณแอนโทไซยานินที่ลดลงมีผลมาจากระยะเวลาและแสงสว่างในระหว่างการหมักในขวดพลาสติกใส นอกจากนี้ยังมีปัจจัยต่าง ๆ เข้ามาเกี่ยวข้องหลายปัจจัย เช่น ปริมาณเอทานอล ออกซิเจน เป็นต้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีผลโดยตรงต่อปริมาณสารแอนโทไซยานิน และสีของผลิตภัณฑ์ด้วย สารแอนโทไซยานินทั้งหมดที่มีในข้าวสีม่วงดำ 85 เปอร์เซ็นต์ จะเป็นสาร cyaniding-3-glucoside และ peonidin-3-glucoside (Hu *et al.*, 2003) ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ (Chen *et al.*, 2006) อีกทั้งยังช่วยในการควบคุมภาวะของการเป็นโรคหัวใจ โดยช่วยปรับระดับของสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งปัจจัยที่ทำให้เกิดการอักเสบได้ (Wang *et al.*, 2007)

ตารางที่ 34 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ของไซเดอร์ข้าวลืมผัว

วันที่หมัก	ปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
0	4.50^{a}±0.11	5.52^{a}±0.16	6.33^{a}±0.03
1	4.30^{b}±0.04	4.90^{b}±0.03	5.70^{b}±0.04
2	4.25^{b}±0.13	4.65^{c}±0.07	5.27^{c}±0.08
3	4.24^{b}±0.04	4.47^{d}±0.08	5.14^{d}±0.04
4	3.88^{c}±0.07	4.18^{e}±0.04	4.97^{e}±0.06
5	3.72^{c}±0.11	3.98^{f}±0.07	4.65^{f}±0.03
6	3.06^{d}±0.07	3.58^{g}±0.03	4.25^{g}±0.14
7	2.55^{e}±0.14	3.01^{h}±0.04	3.83^{h}±0.06

หมายเหตุ a b c… ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพที่ 29 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ของไซเดอร์ข้าวลืมผัว

4.9 ทดสอบทางประสาทสัมผัสของไซเดอร์

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผู้สูงวัยที่มีอายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไป ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร ทางด้านสี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม พบว่า ไซเดอร์สูตร 3 มีระดับความพึงพอใจด้านสีมากที่สุด คือ 6.43±0.37 ในขณะที่ไซเดอร์สูตร 2 มีระดับความพอใจต่อกลิ่น 5.61±0.26 รสชาติ 5.51±0.27 และความพึงพอใจโดยรวมมากที่สุด 6.24±0.45 (ตารางที่ 35) และจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของกลุ่มวัยรุ่นที่มีอายุระหว่าง 20-30 ปี พบว่าไซเดอร์สูตรที่ 3 มีระดับความพึงพอใจด้านสีมากที่สุด คือ 4.55±0.60 ในขณะที่ไซเดอร์สูตร 2 มีระดับความพอใจต่อกลิ่น 3.95±0.67 รสชาติ 3.65±0.39 และความพึงพอใจโดยรวมมากที่สุด 4.05±0.62 (ตารางที่ 36) จะเห็นได้ว่าผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสในกลุ่มวัยรุ่นมีความชอบโดยรวมของไซเดอร์น้อยกว่าในกลุ่มผู้สูงวัย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (ชูชาติ และคณะ, 2559) ทดสอบทางประสาทสัมผัสการหมักจากข้าว กข. ข้าวหอมภูพาน ข้าวลืมผัว ข้าวหอมมะลิดอย 105 ข้าวไรซ์เบอรี่ และข้าวหอมนิล พบว่า ข้าวหอมนิลมีระดับความพึงพอใจสีมากที่สุด โดยที่ข้าว กข.6 มีระดับความพึงพอใจกลิ่น รสชาติ และความพึงพอใจโดยรวมมากที่สุด

ตารางที่ 35 ความพึงพอใจต่อไซเดอร์ด้านลักษณะต่าง ๆ ของผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัส จำนวน 30 คน (อายุ 35 ปีขึ้นไป)

ไซเดอร์	สี	กลิ่น	รสชาติ	โดยรวม
สูตร 1	5.22^{c}±0.40	5.06^{c}±0.29	5.08^{b}±0.30	5.39^{c}±0.32
สูตร 2	6.01^{b}±0.47	5.61^{a}±0.26	5.51^{a}±0.27	6.24^{a}±0.45
สูตร 3	6.43^{a}±0.37	5.22^{b}±0.25	5.13^{b}±0.31	5.76^{b}±0.43

หมายเหตุ a b ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 36 ความพึงพอใจต่อไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร ด้านลักษณะต่าง ๆ ของผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัส (อายุ 20-30 ปี)

ไซเดอร์	สี	กลิ่น	รสชาติ	โดยรวม
สูตรที่ 1	3.29^{b}±0.79	2.95^{b}±0.76	2.55^{b}±0.51	2.65^{b}±0.67
สูตรที่ 2	3.34^{b}±0.51	3.95^{a}±0.67	3.65^{a}±0.39	4.05^{a}±0.62
สูตรที่ 3	4.55^{a}±0.60	3.68^{ab}±0.76	3.05^{b}±0.39	3.72^{ab}±0.55

หมายเหตุ a b ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแนวตั้งเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

1 = ชอบน้อยที่สุด
2 = ชอบน้อย
3 = ค่อนข้างชอบน้อย
4 = ชอบปานกลาง
5 = ค่อนข้างชอบมาก
6 = ชอบมาก
7 = ชอบมากที่สุด

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกเชื้อราและยีสต์จากลูกแป้งสาโทจากจังหวัดร้อยเอ็ด จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดพังงา สามารถคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus oryzae* LPP3 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้ง และเชื้อยีสต์ *Wickerhamomyces anomalus* LPR5 ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์ นำมาผลิตลูกแป้งสาโท พบว่าให้ปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ จึงเปลี่ยนเชื้อยีสต์เป็นเชื้อ *Sacchromyces cerevisiae* TISTR5013 ในการผลิตลูกแป้ง ผลการทดสอบประสิทธิภาพการหมักสาโท พบว่าลูกแป้งสูตรที่ 3 (อัตราส่วนราต่อยีสต์ 3:1) มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงที่สุด มีค่า 12.05±0.06 เปอร์เซ็นต์

การหมักสาโทจากลูกแป้งทั้ง 3 สูตร พบว่าสาโทสูตรที่ 3 มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 15 วัน จากการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในแต่ละวัน พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มคงที่ในวันที่ 9 ของการหมัก ดังนั้นวันที่เหมาะสมในการหมักสาโท คือวันที่ 9-15 จากนั้นหมักไซเดอร์จากสาโทข้าวลืมผัวด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* TISTR102 บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน ผลการทดลอง พบว่าไซเดอร์สูตรที่ 1 และ 2 มีสีส้ม และไซเดอร์สูตรที่ 3 มีสีม่วงอมส้ม ไซเดอร์สูตรที่ 3 มีปริมาณกรดอะซิติกสูงที่สุด มีค่า 5.57±0.15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานกำหนดมีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณแอลกอฮอล์คงเหลือหลังจากการหมักไซเดอร์ร้อยละ 2.11±0.02 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด 5.15±0.02 องศาบริกซ์ pH 3.39±0.02 และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 54.92±1.01 จากการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของไซเดอร์ข้าวลืมผัวทั้ง 3 สูตร พบว่าไซเดอร์สูตรที่ 2 มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงที่สุด คือ DPPH 0.49±0.01 กรัมโทรอกต่อลิตร และ FRAP 1.46±0.01 กรัมเฟอรัสซัลเฟตต่อลิตร ปริมาณฟีนอลิก 9.47±0.02 กรัมแกลลิกต่อลิตร ปริมาณฟลาโวนอยด์ 0.69±0.01 กรัมรูทีนต่อลิตร และปริมาณแอนโทไซยานิน เนื่องจากระยะเวลาและแสงสว่างในการหมักไซเดอร์มีผลทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินลดลง

นอกจากนี้ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 7-points hedonic scale test โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน โดยแบ่งผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้สูงวัยอายุตั้งแต่ 30 ปีขึ้นไป พบว่าไซเดอร์สูตรที่ 3 มีระดับความพึงพอใจสีมากที่สุด ในขณะที่ไซเดอร์สูตรที่ 2 มีระดับความพอใจต่อกลิ่น รสชาติ และความพึงพอใจโดยรวมมากสุด และกลุ่มที่สอง วัยรุ่นมีอายุระหว่าง 20-30 ปี พบว่าไซเดอร์สูตรที่ 3 มีระดับความพึงพอใจสีมากที่สุด ในขณะที่ไซเดอร์สูตรที่ 2 มีระดับความพอใจต่อกลิ่น รสชาติ และความพึงพอใจโดยรวมมากสุด ดังนั้นการทดลองหมักไซเดอร์

ในครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า กลุ่มผู้สูงวัยมีความชอบโดยรวมมากกว่ากลุ่มวัยรุ่น และทั้งสองกลุ่มผู้ทดสอบมีความชอบไซเดอร์สูตรที่ 2 เหมือนกัน ซึ่งไซเดอร์สูตรที่ 2 มีความเหมาะสมในการผลิตไซเดอร์ข้าวลืมผัวมากที่สุด ที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานการผลิต และระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมที่สุด คือ 4 วัน ทั้งปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณกรดอะซิติก กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีปริมาณสูงที่สุด และการยอมรับของการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยรวมมากที่สุด

ข้อเสนอแนะ

- ควรเก็บตัวอย่างลูกแป้งสาโทมากกว่านี้ จะทำให้การคัดแยกเชื้อราและยีสต์มีความหลากหลาย และมีประสิทธิภาพในการผลิตลูกแป้งสาโท
- สามารถใช้ผลไม้และธัญพืชชนิดอื่น ๆ หมักไซเดอร์แทนข้าวลืมผัวได้ ซึ่งอาจจะได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีรสชาติ
- สามารถเพิ่มน้ำตาลหรือน้ำผึ้งเพื่อเติมรถชาติให้น่าดื่มยิ่งขึ้น
- ควรฉีดหาสารหอมระเหยในไซเดอร์ข้าวลืมผัว ด้วยเครื่อง GC-MS

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กระทรวงอุตสาหกรรม. (2546). มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.๓/๒๕๔๖) สาโท. กรุงเทพฯ : *ไทยเจริญการพิมพ์.*

กระทรวงอุตสาหกรรม. (2516). มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง, *สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม*. กรุงเทพฯ, 23 หน้า.

กฤษดา ศิรามพุช. (2552). สรรพคุณข้าวเหนียว. แหล่งที่มา : http://kulc.lib.ku.ac.th/blog?p=946, สืบค้นวันที่ 3 พฤษภาคม 2562.

กฤษณา ตลับกลาง. (2554). การผลิตสาโทคุณภาพสูงโดยราและยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เกศริน แก้วมณี และวัชรี หาญเมืองใจ. (2561). การผลิตและการทดสอบประสาทสัมผัสของข้าวหมากจากข้าวเหนียวกล้องและข้าวเหนียวกล้องงอก. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

จารุวรรณ มณีศรี. (2551). เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพฯ. *สำนักงานพิมพ์โฟเพช.*

จิราพร จันทรา. (2551). การผลิตลูกแป้งสาโทในระดับกึ่งอุตสาหกรรม. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิราภรณ์ ยอดเถื่อน, วลัยรัตน์ จันทร์ปานนท์ และหทัยรัตน์ ริมคีรี. (2553). การคัดเลือกเชื้อบริสุทธ์โดยทดสอบการย่อยแป้งและการผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำข้าวหมาก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชาญชัย อาจินสมาจาร. (2550). ทักษะภาวะผู้นำ. กรุงเทพฯ : *มัลติอินฟอร์เมชันเทคโนโลยี.*

ชูชาติ กุดเป่ง, วิชัย เสริมผล และ วราวุธ ธนะมูล. (2559). การศึกษาการผลิตสาโทจากพันธ์ข้าวพื้นเมืองชนิดต่าง ๆ ในจังหวัดนครราชสีมา. คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา.

ชื่นจิตร จันทจรูญพงษ์, นัดดา ราชนิยม และณัฐวัลย์ พลพันธุ์. (2561). การศึกษากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวโคจิข้าวเหนียว. ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนาการ. คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมการเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เดชาวุฒิ วานิชสรรพ์, นิทัศน์ นิลฉวี,ทวีศักดิ์ รัตนคม และพรรณนิการ์ กงจักร. (2558). ขั้นตอนวิธีนับจำนวนเชื้อบนแผ่นฮีโมซิโตมิเตอร์ด้วยเทคนิคประมวลผลภาพและดีบีสแกน. *วารสารเทคโนโลยีสารสนเทศ, 11*(2), 56-61.

นภา โล่ห์ทอง. (2537). กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 159 น.

นิภาพร อามัสสา และชลันธร วิชาศิลป์. (2550). การคัดแยกเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการบ่มไวน์เม่าสกลนคร. รายงานฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน.

บรรจง มหินทรภาพ, รสสุคนธ์ เหล่าไพบูรณ์ และนภา โลห์ทอง. (2530). การผลิตลูกแป้งด้วยเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นน้ำส้มสายชู. *วารสารเกษตรศาสตร์, 21*, 278-288.

บัญญัติ สุขศรีงาน. (2518). ประสิทธิภาพของเครื่องเทศบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 109 หน้า.

บัญญัติ สุขศรีงาม. (2527). ประสิทธิภาพของเครื่องเทศบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เครื่องเทศที่ใช้เป็นสมุนไพร เล่ม 2. กรุงเทพฯ : *อบรมการพิมพ์*. ครั้งที่ 1

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

ปวีณา รัตนเสนา และประภัสสร บุษหมั่น. (2555). กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในข้าวกล้อง ข้าว กล้องงอก และข้าวฮางงอกของข้าวไทยบางสายพันธุ์. เครือข่ายสารสนเทศงานวิจัยเกษตรไทย.

ประดิษฐ์ ครุวัณณา. (2543). สาโทและสาเก. เอกสารการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่องเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จากผลิตผลการเกษตร จัดโดยสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประวีณา ลาภา, เพ็ญขวัญ ชมปรีดา และ วิชัย หฤทัยธนาสันต์. (2556). การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเหนียวดำกล้อง. งานประชุมวิชาการเสนองานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 12. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พระราชบัญญัติสุรา. (2493). สามัตสาร. สำนักงานคณะกรรมการกฤษฎีกา. 6(1) : 1-10.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนปนนท์. (2560). ลูกแป้งสาโท. *ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร.*

มะลิวัลย์ ซิ่วสุวรรณ และนฤมล ทองไว. (2554). การแยกและการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อการผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำผึ้ง. ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มณชัย เดชสังกรานนท์. (2546). คุณสมบัติของยีสต์และราที่มีบทบาทในการหมักข้าวหมากและสาโท. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัชทิยา เทียบมา และจตุรงค์ อยู่กำเนิด. (2558). การผลิตข้าวไรซ์เบอรี่จากเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้ง. สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.

ลือชัย บุตคุป.(2548). การคัดเลือกเชื้อราและยีสต์จากลูกแป้งเพื่อใช้ผลิตสาโท. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

วรรณดี มหรรณพกุล และขนิษฐา อินทร์ประสิทธิ์. (2560). การผลิตไซเดอร์กล้วย. *วารสารวิทยาศาสตร์บริการ*. ฉบับที่ 188.

วรรณดี มหรรณพกุล, ขนิษฐา อินทร์ประสิทธิ์, ปิติ กาลธิยานันท์ และปัญจ์ยศ มงคลชาติ. (2555). การศึกษาเบื้องต้นในการผลิตไซเดอร์กล้วยเพื่อการผลิตในวิสาหกิจชุมชน. กิจกรรมวิจัย. กรุงเทพฯ : *กรมวิทยาศาสตร์บริการ*.

วิลาวัลย์ บุณย์ศุภา, กรรณิการ์ ทองดอนเปรียง และ พันธิวา แก้วมาตย์. (2560). คุณสมบัติทางเคมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเหนียวดำ 2 แบบ. วารสารวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม, *9*, 69-78.

วีระสิทธิ์ กัลยากฤต และทรงศักดิ์ บูรณเศวตธรรม. (2547). การคัดเลือกจุลินทรีย์จากลูกแป้งที่ผลิตเอนไซม์ และแอลกอฮอล์เพื่ออุตสาหกรรมสาโท. น. 409-416. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วีระสิทธิ์ กัลยากฤต และสมพร โตใจ. (2552). การคัดเลือกและลักษณะของแบคทีเรียทนเกลือที่ให้กลิ่นและรสชาติจากน้ำปลา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วชิราภา เขียวรอด. (2552). การศึกษาการเปรียบเทียบการหมักสาโทด้วยเชื้อผสมของจุลินทรีย์บริสุทธิ์และลูกแป้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากร. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยมหิดล.

วรชิน สถิตนิมานกการ. (2493). ตำรับลูกแป้งเหล้า. อ้างโดย นภา โล่ทอง. 2535. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 160 น.

ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2557). ข้าวไรซ์เบอรี่ สืบค้นเมื่อ 3 พฤษภาคม 2562, จาก http://dna.kps.ku.ac.th.

สมพร สินธารา. (2544). การแยกการจัดจำแนก และการเก็บรักษายีสต์และราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ ศิริโชค. (2550). จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. *ศูนย์ส่งเสริมกรุงเทพ*, กรุงเทพมหานคร.

สุทธิเวช ต.แสงจันทร์. (2555). ขั้นตอนการทำน้ำไรซ์ไซเดอร์ข้าวเหนียวลืมผัว. *กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 188.

สุนทรี สมแสง. (2550). การเปรียบเทียบการเปลี่ยนสีของลิ้นจี่ (พันธุ์กวางเจา) ที่ถนอม ด้วยความดันสูงยิ่งและความร้อน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตมหาวิทยาลัย เชียงใหม่, เชียงใหม่.

สุพัฒน์ พงษ์ไทย. (2556). การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากราข้าวหอมนิล และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหมู. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร.มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุวนา ว่องเกื้อกูล และอรวรรณ ป้องวิเศษ. (2553). การทำสาโทเพื่อเพิ่มปริมาณแอลกอฮอล์. เทคโนโลยีการหมัก. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

สุวินัย เกิดทับทิม. (2559). การจัดการความรู้ภูมิปัญญาท้องถิ่นการทำลูกแป้งข้าวหมาก. คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์. มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.

อรวรรณ ดีสุทธิ์, อมรรัตน์ สำเนียง, พัฒนา เหล่าไพบูลย์, กิติพงษ์ เวชกาม และ ลักขณา เหล่าไพบูลย์. (2553). การลดระยะเวลาการหมักเอทานอลในการผลิตสาโทโดยใช้ *Rhizopus* sp. และยีสต์ผสม. *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น*. 15:670-678.

อภิชญา เตชะวสัญญู. (2556). การแยก จำแนกลักษณะสมบัติของยีสต์และราในลูกแป้งสุราเพื่อการผลิตสาโท. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรุณทิพย์ เหมะธุลิน, สกุลกานต์ สิมลา, สุรศักดิ์ บุญแต่ง และสุดาทิพย์ อินทร์ชื่น. (2555). ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี (L*, a* และ b*) กับปริมาณแอนโทไซยานิน ในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง. *แก่นเกษตร*, *40*(4), 59-64.

อุไรวรรณ วัฒนกุล. (2555) คุณค่าทางโภชนาการบางประการในข้าวหมากที่ผลิตจากข้าวสังข์หยดพัทลุง. *การประชุมวิชาการแห่งชาติ ครั้งที่ 9* (721-729). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

Chen, PN., Kuo, WH., Chiang, CL., Chiou, HL., Hsieh, YS and Chu, SC. (2006). Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repression of MMPs and u-PA expression. *Chemico-Biological Interaction*, *163*(2006), 218-229.

Dittrich, M. (1977). Cynareae, systematic review. In: Heywood, V.H., Harborne, J.B., Turner, B.L. (eds), The biology and chemistry of Compositae. *Academic Press*, New York. 999–1015.

Dung, N.T.P., Rombout, F.M. and Nout, M.J.R. (2006). Functionality of Selected Strains of Moulds and Yeasts from Vietnamese Rice Wine Starters. *Food Microbiology*, *23*(4), 331-340.

Dung, N.T.P. (2013). Vietnamese rice-based alcoholic beverages. *International Food Research*, *20*(3) : 1035-1041.

Gullo, M., Zanichelli, G., Verzelloni, E., Lemmetti, F. and Giudici, P. (2016). Feasible acetic acid fermentations of alcoholic and sugary substrates in combined operation mode. *Process Biochemistry*, *51* (9), 1129-1139.

Hu, C., Zawistowski, J., Ling, WH. and Kitts, DD. (2003). Black rice (*Oryza sativa* L. *indica*) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. *Agriculture and Food Chemistry*, *51*, 5271-5277.

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

Jeffrey, J. Semanchek and David, A. Golden. (1996). Survival of Escherichia coli 0157:H7 during Fermentation of Apple Cider. *Food Protection*, *59*(12), 1256—1259.

Jingke Liu, Wei Zhao, Shaohui Li, Aixia Zhang, Yuzong Zhang and Songyan Liu. (2018). Characterization of the Key Aroma Compounds in Proso Millet Wine Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Molecules*, *462*(23), 230-245.

Kreger-van Rij, N.J.W. (1984). The Yeast : A Taxonomic Study. 3rd ed. Amsterdam : *Science Publisher B.V.*

Law, S.V., Bakar, A.F., Hashim, M.D. and Hamid, A.A. (2013). Mini Review Popular fermented foods and beverages in southeast Asia. *International Food Research, 19*(2), 475-484.

Linsken, HF. and Aidoo, JF. (1988). Wine analysis. *Berlin Heidelberg*, *6*, New York.

Maal, K.B., Shafiei, R. and Kabiri, N. (2010). Production of apricot vinegar using an isolated Acetobacter strain from Iranian apricot. *Nutrition and Food Engineering, 4*(11), 177-180.

Marilinda, L., Barbara, S., Davide, S., Maurizio, U. and Giacomo, Z.. (2019). Assessment of yeasts for apple juice fermentation and production of cidervolatile compounds. *Food Science and Technology*, *22*(2019), 224–230.

Mas, A., Torija, M. J., Garcia-Parrilla Mdel, C., and Troncoso, A.M. (2014). Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar. *Scientific World*, , *6*(2014), 1-6.

Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(2), 1017-1020.

Norihiko, T., Noriaki, S., Riichiro, O. and Seinosuke, U. (1994). Composition of anthocyanin pigments in aromatic red rice and its wine.

Prangthip, P., Surasiang, R., Charoensiri, R., Leardkamolkarn, V., Komindr, S., Yamborisut, U., Vanavichit, A. and Kongkachuichaia, R. (2013). Amelioration of hyperglycemia, hypelipidemia, oxidative stress and inflammation in steptozotocin-induced diabetic rats fed a high fat diet by riceberry supplement. *Functional foods*, *31*(5),: 195-203.

Qi, Z., Yang, H., Xia, X., Quan, W., Wang W., and Yu, X. (2014), Achieving high strength vinegar fermentation via regulating cellular growth status and aeration strategy. *Process Biochemistry*, *49*(7), 1063-1070.

Radošević, K., Srček, V.G., Bubalo, M.C., Rimac Brnčić, S., Takács, K., and Redovniković, I.R. (2017). Assessment of glucosinolates, antioxidative and antiproliferative activity of broccoli and collard extracts. *Food Composition and Analysis*, *61*(2017), 59–66.

Ranganna, S. (1977). Manual of analysis of fruit and vegetable. New Delhi, india, T*ata McGrawHill Publishing Company Ltd.*

Remli, N.A.M., Shah, U.K.M., Mohamad, R. and Abd-Aziz., S. (2014). Effect of chemical and thermal pre-treatments on the enzymatic saccharification of rice straw for sugar production. *BioResources*, *9*(1),. 510-522.

Roda, A., Faveri, D.M.D., Giacosa, S., Dordoni, R. and Lambri, M. (2016). Effect of pre-treatments on the saccharification of pineapple waste as a potential source for vinegar production. *Cleaner production*, *112*(2016), 4477-4484.

Spinosa, W.A., Santos junior, V., Galvan, D., Florio, J.L. and Gomez, R.J.H.C. (2015). Vinegar rice (*Oryza sativa* L.) produced by a submerged fermentation process from alcoholic fermented rice. *Food Science and technology*, *35*(1), 196-201.

Stornik, A., Skok, B. and Trcek. J. (2016). Comparison of cultivable acetic acid bacterial microbiota in organic and conventional apple cider vinegar. *Food Technology and Biotechnology*, *54*(1), 113-119.

Thomas, M., Badr, A., Desjardins, Y., Gosselin, A., and Angers, P. (2018). Characterization of industrial broccoli discards (Brassica oleracea var. italica) for their glucosinolate, polyphenol and flavonoid contents using UPLC MS/MS and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, *245*(2018), 1204-1211.

Tian, M., Xu, X., Liu, Y., Xie, L., and Pan, S. (2016). Effect of Se treatment on glucosinolate metabolism and health-promoting compounds in the broccoli sprouts of three cultivars. *Food Chemistry*, *190*(2016), 374–380.

Wachira, S. (2015). The production of red wine from black jasmine rice. *Food research*, *4*(6), 69-81.

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 anti-inflammatory status in patients with coronary heart disease. *Clinical Nutrition*, *16(*1), 295-301.

Wei, J., Miao, H., and Wang, Q. (2011). Scientia Horticulturae Effect of glucose on glucosinolates , antioxidants and metabolic enzymes in Brassica sprouts. *Scientia Horticulturae*, *129*(4), 535–540.

Zhang, L., Tu, Z.C., Yuan, T., Wang, H., Xie, X., and Fu, Z.F. (2016). Antioxidants and α-glucosidase inhibitors from Ipomoea batatas leaves identified by bioassay-guided approach and structure-activity relationships. *Food Chemistry*, *208*(2016), 61-67.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

หั่นมันฝรั่งเป็นก้อนขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร หนัก 200 กรัม ต้มให้เดือดนานจนก้อนมันฝรั่งเริ่มนิ่ม กรองเอาแต่น้ำ แล้วเติมน้ำตาล dextrose, agar และน้ำกลั่น จนได้ปริมาตร 1 ลิตร ต้มให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จึงนำไปอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Starch agar (SA)

Soluble starch	40	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 6.5-7 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Yeast malt extract agar (YM agar)

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Yeast malt extract broth (YM broth)

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Yeast extract peptone dextrose agar (YPD agar)

Yeast extract	10.0	กรัม
Peotone	20.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Glucose Yeast Extract Broth (GYB)

Yeast extract	7	กรัม
$CaCO_3$	14	กรัม
Glucose	70	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. Glucose Yeast Extract Agar (GYA)

Yeast extract	7	กรัม
$CaCO_3$	14	กรัม
Glucose	70	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีวิเคราะห์

พหูน ปญ ศึกโต ชีเว

1. การหาปริมาณของแข็งละลายทั้งหมดด้วยเครื่อง handrefractometer

ใช้ปิเปตที่ปราศจากเชื้อดูดตัวอย่างมา 0.2 มิลลิลิตร นำมาวัดด้วยเครื่อง handrefractometer ปริมาณน้ำตาลแสดงเป็น $^{\circ}$Brix

2. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS-method (Miller,1959)

2.1 สารเคมี

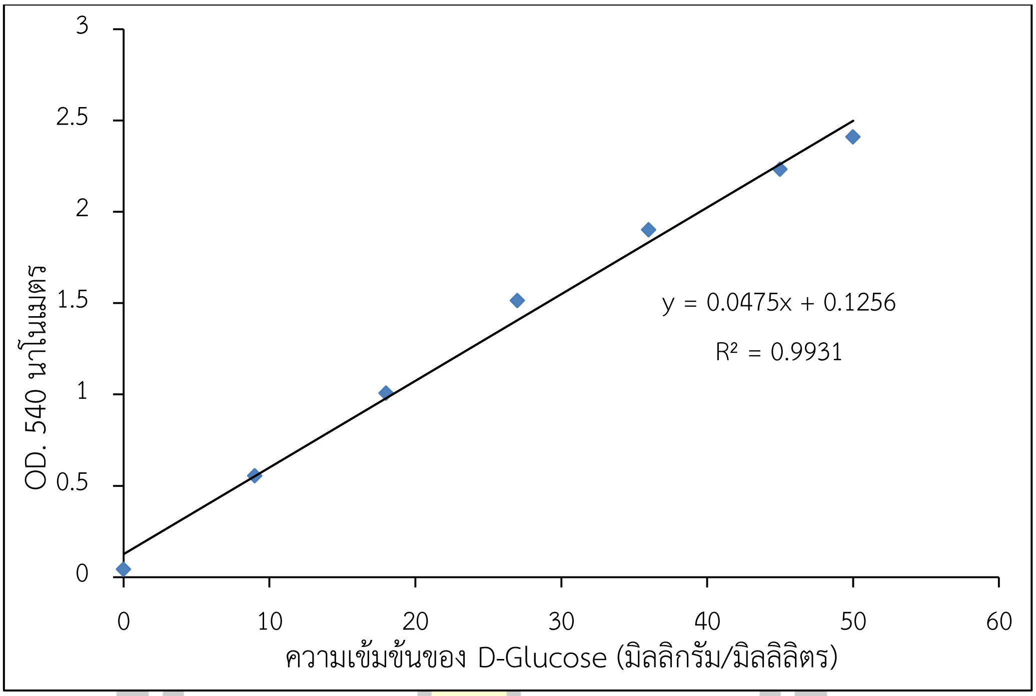
3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) เตรียมโดยชั่ง DNS จำนวน 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างลงไปทีละหยด (NaOH 32 กรัม ละลายในน้ำ 350 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากัน นำไปอังในน้ำร้อนจนสารละลายใส แล้วจึงเติม K_2Na-tartrate ลงไปทีละน้อยจนครบ 600 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปจนมีปริมาตรครบ 200 มิลลิลิตร ใส่ในขวดมืดและเก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.2 วิธีการ

ดูดสารละลายตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลาย DNS ที่เตรียมไว้ นำไปต้มในน้ำเดือด 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำไปหาค่าน้ำตาลกลูโคสโดยเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคส

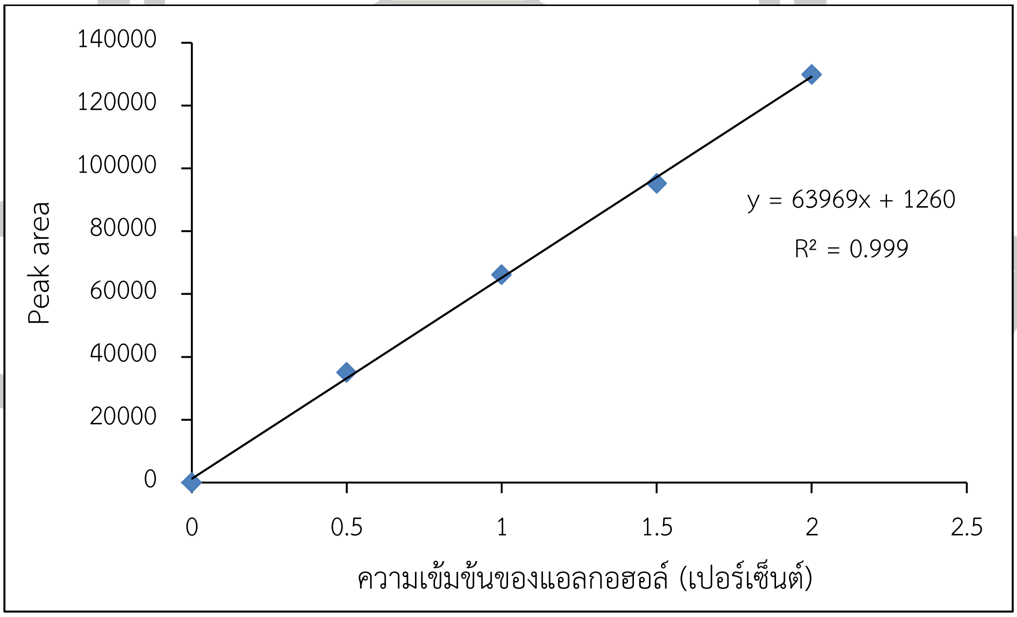
การเตรียมสารละลาย blank ดูดน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม DNS 2 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้สำหรับปรับค่า O.D. เป็น 0

การเตรียมกราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคส โดยใส่สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร เติม DNS 2 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที จึงเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ blank เป็นสารละลายเปรียบเทียบ จากนั้นนำค่า O.D. และความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน



กราฟมาตรฐานกลูโคส

3. การหาปริมาณแอลกอฮอล์ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟฟี่ (Gas Chromatography, GC) สภาวะที่ใช้ Colum PEG-ETOH colum, temperature 80°C, Injector temperature 120°C, Detecter temperature 150°C, Carrier gas nitrogen, Speed เท่ากับ 3 ปริมาณที่ฉีด 1 μg เวลาที่สารออก 3 นาที)



กราฟมาตรฐานแอลกอฮอล์

4. การย้อมสีเชื้อราและยีสต์

4.1 การเตรียมสีย้อมสปอร์

4.1.1 malachite green

ละลาย malachite green 5 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-3 วัน กรองก่อนนำมาใช้

4.1.2 วิธีย้อมสปอร์รา

นำสปอร์เชื้อราที่เลี้ยงไว้ในอาหารแข็งโดยชะล้างสปอร์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 85 เปอร์เซ็นต์ นำมาเจือจาง 10 เท่า และ 100 เท่า ดูดมา 10 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม malachite green จากนั้นนำสปอร์เชื้อรามาใส่ในแผ่นฮีโมซิโตมิเตอร
ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ นำไปนับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

4.2. การนับ Hemacytometer

สไลด์พวกนี้จะมีแอ่ง (chamber) ซึ่งรู้ความลึกของ chamber และที่พื้นของ chamber จะมีตารางสี่เหลี่ยมซึ่งทราบความกว้างความยาวของตารางสี่เหลี่ยม ดังนั้นเมื่อหยดเชื้อจุลินทรีย์ลงไปใน chamber ที่มี cover glass ปิดอยู่ ตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400X ในสี่เหลี่ยมลูกบาศก์เล็ก ก็จะทำให้สามารถคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อมล.ของตัวอย่างได้ สำหรับข้อดีข้อเสียของ counting chamber จะเหมือนกับนับด้วยวิธี stained film (เดชาวุฒิ และคณะ, (2558))

PETROFF
HAUSSER
COUNTER
SPERM
BACTERIA
1/400 SQ. MM
1/200 MM DEEP
HAUSSER
SCIENTIFIC

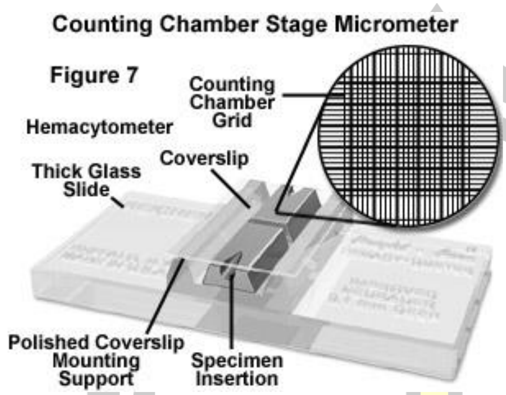
ภาพแผ่นนับฮีโมซิโตมิเตอร

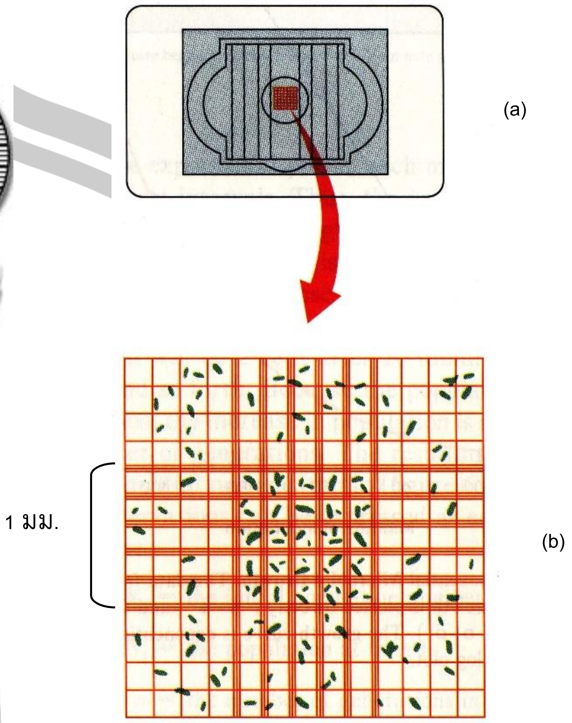
-การนับเชื้อจุลินทรีย์ใช้กำลังขยาย objective lens 40X

-ถ้าเป็นเชื้อแบคทีเรียให้นับช่องที่มีความยาวด้านละ 0.05 มม. และควรเจือจางให้มีแบคทีเรีย 1-10 เซลล์ในแต่ละช่องเล็ก และนับไม่ต่ำกว่า 10 ช่อง

-ถ้าเป็นยีสต์หรือจุลินทรีย์ขนาดใหญ่ให้ใช้ช่องใหญ่ที่มีความยาวด้านละ 0.2 มม.

-การนับให้นับเฉพาะเซลล์ที่แตะหรือทับด้านบนหรือด้านขวาของสี่เหลี่ยมจตุรัส แต่จะไม่นับเซลล์ใดก็ตามที่แตะหรือทับด้านล่างและทางซ้ายมือของสี่เหลี่ยมจัตุรัส


Counting Chamber Stage Micrometer
Figure 7
Hemacytometer
Counting Chamber Grid
Coverslip
Thick Glass Slide
Polished Coverslip Mounting Support
Specimen Insertion



(a) ภาพที่มองจากด้านบนของ chamber มีตารางอยู่กลางสไลด์

(b) ภาพขยายของตารางที่กำลังขยาย 10X ประกอบด้วยสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดใหญ่แต่ละด้านยาว 1 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็กบรรจุอยู่ 25 ช่อง แต่ละช่องมีเส้น 3 เส้นล้อมรอบ โดยแต่ละด้านยาว 0.2 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดเล็กบรรจุอยู่อีก 16 ช่อง (เดชาวุฒิ และคณะ, (2558))

คำนวณปริมาณสปอร์ โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

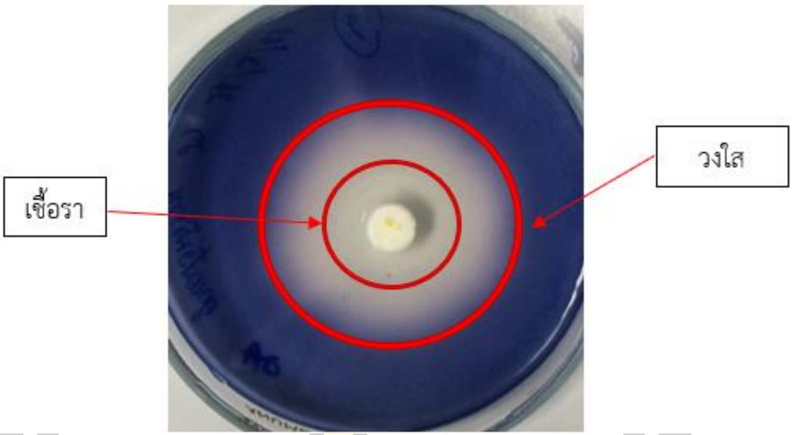
ปริมาณสปอร์ = ค่าเฉลี่ยสปอร์ที่นับได้ × dilution × จำนวนช่องที่นับ × ค่าคงที่ (10^4)

มีหน่วยเป็น สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

กราฟ ภาพประกอบ และข้อมูลการทดลอง

1. การหาเคลียร์โซนวงใสของเชื้อ



ภาพบริเวณการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* LPP3

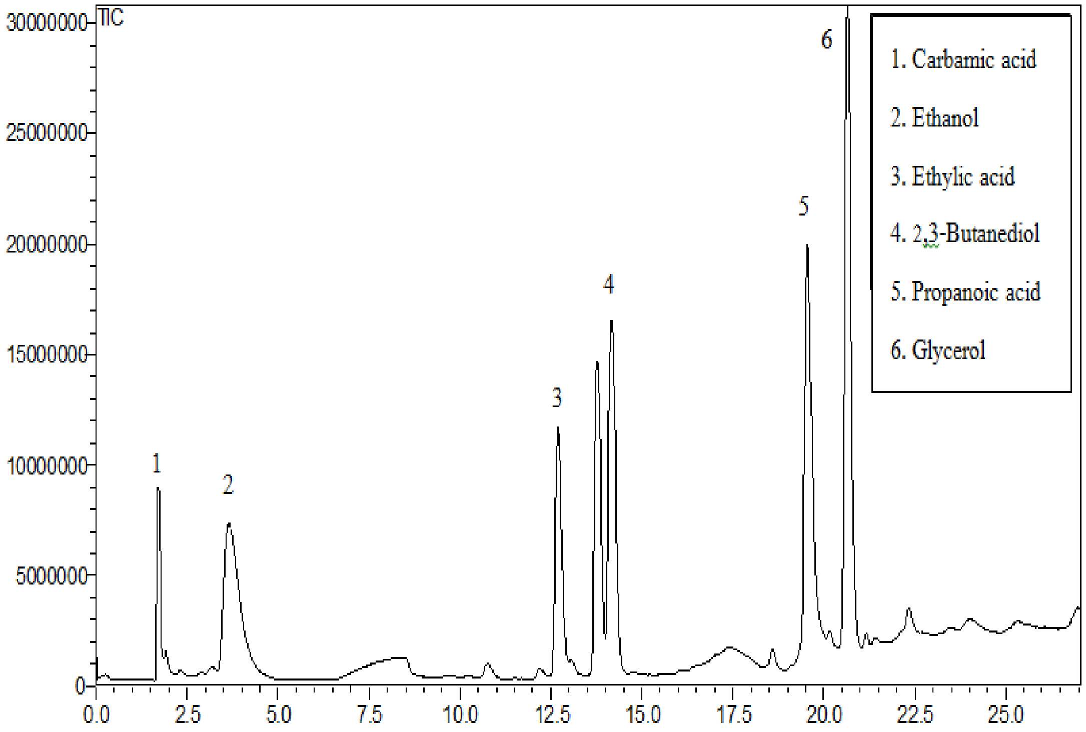
การวัดความกว้างของโคโลนี ใช้สูตรดังนี้

Clear zone = A/B

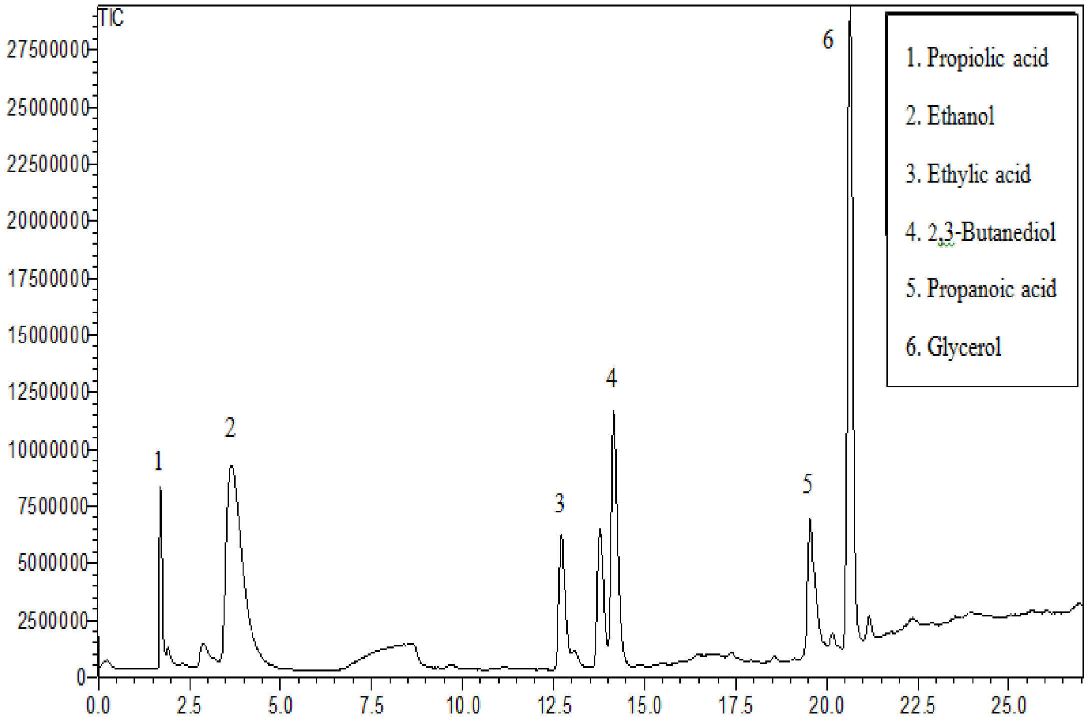
A คือ เส้นผ่านศูนย์กลางเคลียร์โซน
B คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

2. วิเคราะห์ปริมาณสารระเหยของสาโทข้าวลืมผัวทั้ง 3 สูตร

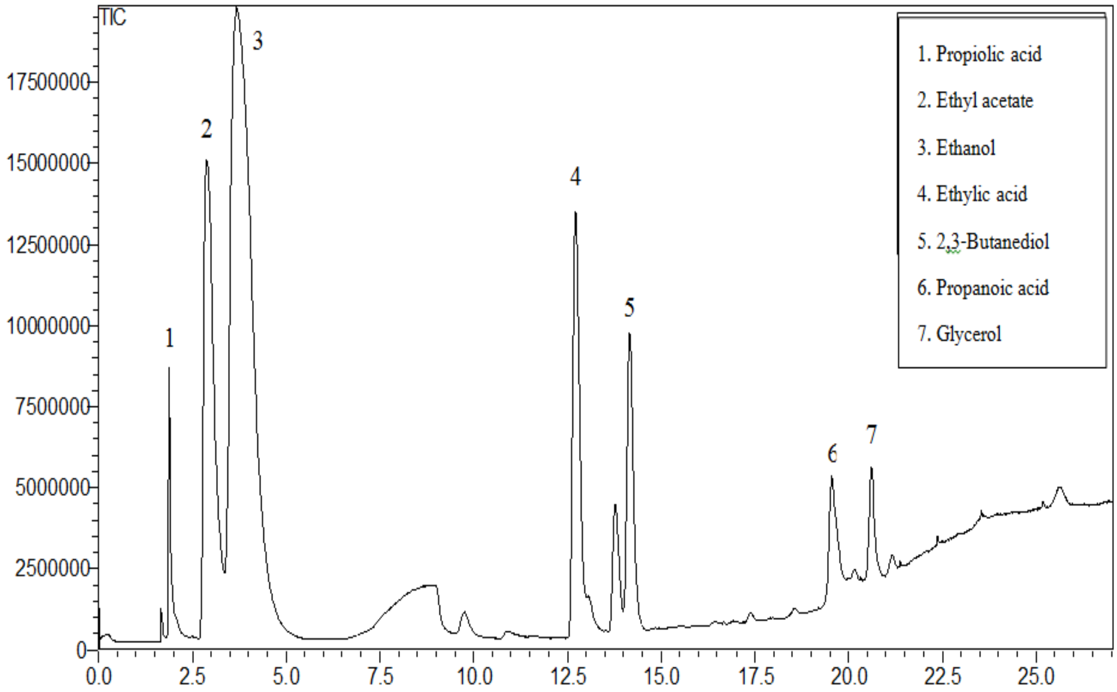
วิเคราะห์ปริมาณสารระเหยในผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ แก๊สโครมาโทรกราฟฟี่แมสสเปก-โตรมิเตอร์แมส (GC-MS, Column: DB-WAX 30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm, Carrier: Hydrogen at 48 cm/sec, Oven: 35°C for 5 min 35-230°C at 6°/min 230°C for 5 min, Injector: Split 1:20, 1.5 µL, Detector: FID Nitrogen makeup gas at 30 mL/min)



ปริมาณสารระเหยของสาโทสูตรที่ 1



ปริมาณสารระเหยของสาโทสูตรที่ 2



ปริมาณสารระเหยของสาโทสูตรที่ 3

3. ข้อมูลวิเคราะห์ทางสถิติไซเดอร์

3.1 กรด-เบส ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
สูตร 1	1.00	3	3.6767	.06755	.00667	3.6480	3.7054	3.67	3.69
	2.00	3	3.7933	.08572	.08413	3.4314	4.1553	3.69	3.96
	3.00	3	3.9933	.08572	.02186	3.8993	4.0874	3.95	4.02
	4.00	3	4.2533	.17517	.01453	4.1908	4.3158	4.23	4.28
	5.00	3	4.2033	.21692	.05364	3.9725	4.4341	4.14	4.31
	6.00	3	4.1667	.20862	.07311	3.8521	4.4812	4.03	4.28
	7.00	3	4.1333	.15815	.05667	3.8895	4.3772	4.02	4.19
	8.00	3	4.0633	.13572	.04372	3.8752	4.2514	4.01	4.15
	Total	24	4.0354	.20893	.04265	3.9472	4.1236	3.67	4.31
สูตร 2	1.00	3	3.6967	.10682	.01202	3.6450	3.7484	3.68	3.72
	2.00	3	3.6467	.07517	.01453	3.5842	3.7092	3.62	3.67
	3.00	3	3.8233	.09528	.00882	3.7854	3.8613	3.81	3.84
	4.00	3	4.0267	.17528	.00882	3.9887	4.0646	4.01	4.04
	5.00	3	3.9800	.23000	.00577	3.9552	4.0048	3.97	3.99
	6.00	3	3.7600	.21800	.01155	3.7103	3.8097	3.74	3.78
	7.00	3	3.6800	.14900	.00577	3.6552	3.7048	3.67	3.69
	8.00	3	3.6600	.15800	.00577	3.6352	3.6848	3.65	3.67
	Total	24	3.7842	.14154	.02889	3.7244	3.8439	3.62	4.04
สูตร 3	1.00	3	3.5467	.06658	.03844	3.3813	3.7121	3.47	3.59
	2.00	3	3.4933	.01528	.00882	3.4554	3.5313	3.48	3.51
	3.00	3	3.6533	.02082	.01202	3.6016	3.7050	3.63	3.67
	4.00	3	3.6900	.03000	.01732	3.6155	3.7645	3.66	3.72
	5.00	3	3.5667	.03055	.01764	3.4908	3.6426	3.54	3.60
	6.00	3	3.3900	.02000	.01155	3.3403	3.4397	3.37	3.41
	7.00	3	3.4467	.09866	.05696	3.2016	3.6917	3.38	3.56
	8.00	3	3.3933	.01528	.00882	3.3554	3.4313	3.38	3.41
	Total	24	3.5225	.11426	.02332	3.4743	3.5707	3.37	3.72

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
สูตร 1	Between Groups	.877	7	.125	15.793	.000
	Within Groups	.127	16	.008		
	Total	1.004	23			
สูตร 2	Between Groups	.456	7	.065	233.510	.000
	Within Groups	.004	16	.000		
	Total	.461	23			
สูตร 3	Between Groups	.266	7	.038	17.549	.000
	Within Groups	.035	16	.002		
	Total	.300	23			

3.2 ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมดของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
สูตร 1	.00	3	10.0533	.06658	.03844	9.8879	10.2187	10.01	10.13
	1.00	3	9.6833	.04163	.02404	9.5799	9.7868	9.65	9.73
	2.00	3	8.9267	.01528	.00882	8.8887	8.9646	8.91	8.94
	3.00	3	8.3467	.04619	.02667	8.2319	8.4614	8.32	8.40
	4.00	3	7.9200	.07810	.04509	7.7260	8.1140	7.83	7.97
	5.00	3	6.7033	.01528	.00882	6.6654	6.7413	6.69	6.72
	6.00	3	6.2400	.03606	.02082	6.1504	6.3296	6.21	6.28
	7.00	3	5.9067	.10116	.05840	5.6554	6.1580	5.79	5.97
	Total	24	7.9725	1.49816	.30581	7.3399	8.6051	5.79	10.13
สูตร 2	.00	3	10.4267	.03055	.01764	10.3508	10.5026	10.40	10.46
	1.00	3	9.7033	.06807	.03930	9.5342	9.8724	9.65	9.78
	2.00	3	9.1633	.04163	.02404	9.0599	9.2668	9.13	9.21
	3.00	3	8.6700	.02000	.01155	8.6203	8.7197	8.65	8.69
	4.00	3	7.3233	.02517	.01453	7.2608	7.3858	7.30	7.35
	5.00	3	6.4933	.05686	.03283	6.3521	6.6346	6.43	6.54
	6.00	3	5.7733	.01528	.00882	5.7354	5.8113	5.76	5.79
	7.00	3	5.5600	.02000	.01155	5.5103	5.6097	5.54	5.58
	Total	24	7.8892	1.77452	.36222	7.1399	8.6385	5.54	10.46
สูตร 3	.00	3	11.4133	.42253	.24395	10.3637	12.4630	11.14	11.90
	1.00	3	10.2233	.08083	.04667	10.0225	10.4241	10.15	10.31
	2.00	3	9.4400	.09165	.05292	9.2123	9.6677	9.34	9.52
	3.00	3	8.7667	.01528	.00882	8.7287	8.8046	8.75	8.78
	4.00	3	7.9367	.04163	.02404	7.8332	8.0401	7.89	7.97
	5.00	3	6.8300	.04000	.02309	6.7306	6.9294	6.79	6.87
	6.00	3	5.5300	.05292	.03055	5.3986	5.6614	5.47	5.57
	7.00	3	5.1467	.01528	.00882	5.1087	5.1846	5.13	5.16
	Total	24	8.1608	2.13044	.43487	7.2612	9.0604	5.13	11.90

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
สูตร 1	Between Groups	51.570	7	7.367	2232.470	.000
	Within Groups	.053	16	.003		
	Total	51.623	23			
สูตร 2	Between Groups	72.401	7	10.343	6782.275	.000
	Within Groups	.024	16	.002		
	Total	72.425	23			
สูตร 3	Between Groups	103.991	7	14.856	594.039	.000
	Within Groups	.400	16	.025		
	Total	104.392	23			

พหูน ปณฺ ทิโต ชีเว

3.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
สูตร 1	0	3	68.0500	1.01000	.58312	65.5410	70.5590	67.04	69.06
	1	3	65.3567	.58312	.33667	63.9081	66.8052	65.02	66.03
	2	3	64.0100	1.01000	.58312	61.5010	66.5190	63.00	65.02
	3	3	61.9900	1.01000	.58312	59.4810	64.4990	60.98	63.00
	4	3	61.3167	1.54280	.89074	57.4841	65.1492	59.97	63.00
	5	3	60.9800	1.01000	.58312	58.4710	63.4890	59.97	61.99
	6	3	59.2967	1.16625	.67333	56.3995	62.1938	57.95	59.97
	7	3	58.2867	1.54280	.89074	54.4541	62.1192	56.94	59.97
	Total	24	62.4108	3.23415	.66017	61.0452	63.7765	56.94	69.06
สูตร 2	0	3	72.7633	1.54280	.89074	68.9308	76.5959	71.08	74.11
	1	3	67.8833	1.77588	1.02530	63.4718	72.2949	66.03	69.57
	2	3	65.6933	1.54280	.89074	61.8608	69.5259	64.01	67.04
	3	3	64.8533	1.77588	1.02530	60.4418	69.2649	63.00	66.54
	4	3	64.1433	2.22300	1.28345	58.6211	69.6656	61.99	66.43
	5	3	61.6533	2.10248	1.21387	56.4305	66.8762	59.97	64.01
	6	3	59.6333	2.10248	1.21387	54.4105	64.8562	57.95	61.99
	7	3	57.6133	1.54280	.89074	53.7808	61.4459	55.93	58.96
	Total	24	64.2796	4.82365	.98462	62.2427	66.3164	55.93	74.11
สูตร 3	0	3	74.7833	1.16625	.67333	71.8862	77.6805	74.11	76.13
	1	3	68.3867	1.54280	.89074	64.5541	72.2192	67.04	70.07
	2	3	66.7033	2.10248	1.21387	61.4805	71.9262	65.02	69.06
	3	3	65.0200	2.02000	1.16625	60.0020	70.0380	63.00	67.04
	4	3	62.6633	2.10248	1.21387	57.4405	67.8862	60.98	65.02
	5	3	59.2967	1.54280	.89074	55.4641	63.1292	57.95	60.98
	6	3	56.9400	1.01000	.58312	54.4310	59.4490	55.93	57.95
	7	3	54.9200	1.01000	.58312	52.4110	57.4290	53.91	55.93
	Total	24	63.5892	6.38722	1.30379	60.8921	66.2863	53.91	76.13

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
สูตร1	Between Groups	219.492	7	31.356	23.797	.000
	Within Groups	21.082	16	1.318		
	Total	240.574	23			
สูตร2	Between Groups	480.694	7	68.671	20.174	.000
	Within Groups	54.462	16	3.404		
	Total	535.155	23			
สูตร3	Between Groups	896.158	7	128.023	48.581	.000
	Within Groups	42.164	16	2.635		
	Total	938.322	23			

พหุน ปญ ฑิโต ชีเว

3.4 ปริมาณแอลกอฮอล์ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
สูตร 1	0	3	8.7367	.00577	.00333	8.7223	8.7510	8.73	8.74
	1	3	7.8367	.04163	.02404	7.7332	7.9401	7.79	7.87
	2	3	6.5900	.07211	.04163	6.4109	6.7691	6.51	6.65
	3	3	5.2167	.23692	.13679	4.6281	5.8052	5.07	5.49
	4	3	3.4800	.20075	.11590	2.9813	3.9787	3.34	3.71
	5	3	2.5667	.07371	.04256	2.3836	2.7498	2.51	2.65
	6	3	1.6000	.04583	.02646	1.4862	1.7138	1.55	1.64
	7	3	.9333	.04041	.02333	.8329	1.0337	.89	.97
	Total	24	4.6200	2.79363	.57025	3.4404	5.7996	.89	8.74
สูตร 2	0	3	9.9000	.01000	.00577	9.8752	9.9248	9.89	9.91
	1	3	8.7333	.10017	.05783	8.4845	8.9822	8.62	8.81
	2	3	7.3267	.06028	.03480	7.1769	7.4764	7.27	7.39
	3	3	5.7667	.02517	.01453	5.7042	5.8292	5.74	5.79
	4	3	4.1167	.04041	.02333	4.0163	4.2171	4.08	4.16
	5	3	2.9700	.10583	.06110	2.7071	3.2329	2.85	3.05
	6	3	2.1133	.07095	.04096	1.9371	2.2896	2.05	2.19
	7	3	1.5533	.02309	.01333	1.4960	1.6107	1.54	1.58
	Total	24	5.3100	2.98508	.60933	4.0495	6.5705	1.54	9.91
สูตร 3	0	3	12.0467	.05508	.03180	11.9099	12.1835	11.99	12.10
	1	3	10.9267	.03215	.01856	10.8468	11.0065	10.89	10.95
	2	3	8.8567	.01155	.00667	8.8280	8.8854	8.85	8.87
	3	3	6.9267	.05508	.03180	6.7899	7.0635	6.87	6.98
	4	3	5.1233	.04509	.02603	5.0113	5.2353	5.08	5.17
	5	3	3.6300	.05292	.03055	3.4986	3.7614	3.59	3.69
	6	3	2.4900	.07550	.04359	2.3025	2.6775	2.42	2.57
	7	3	2.1067	.02082	.01202	2.0550	2.1584	2.09	2.13
	Total	24	6.5133	3.64073	.74316	4.9760	8.0507	2.09	12.10

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
สูตร 1	Between Groups	179.275	7	25.611	1820.132	.000
	Within Groups	.225	16	.014		
	Total	179.501	23			
สูตร 2	Between Groups	204.881	7	29.269	7138.711	.000
	Within Groups	.066	16	.004		
	Total	204.947	23			
สูตร 3	Between Groups	304.827	7	43.547	19141.409	.000
	Within Groups	.036	16	.002		
	Total	304.863	23			

3.5 ปริมาณกรดอะซิติกทั้งหมดของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
สูตร1	วันที่ 0	3	.3800	.19672	.11358	-.1087	.8687	.20	.59
	วันที่1	3	1.0333	.15275	.08819	.6539	1.4128	.90	1.20
	วันที่2	3	1.6000	.10000	.05774	1.3516	1.8484	1.50	1.70
	วันที่3	3	2.6000	.10000	.05774	2.3516	2.8484	2.50	2.70
	วันที่4	3	3.3000	.10000	.05774	3.0516	3.5484	3.20	3.40
	วันที่5	3	3.8000	.10000	.05774	3.5516	4.0484	3.70	3.90
	วันที่6	3	4.1333	.15275	.08819	3.7539	4.5128	4.00	4.30
	วันที่7	3	4.3000	.10000	.05774	4.0516	4.5484	4.20	4.40
	Total	24	2.6433	1.42779	.29145	2.0404	3.2462	.20	4.40
สูตร2	วันที่ 0	3	.5000	.10000	.05774	.2516	.7484	.40	.60
	วันที่1	3	1.2333	.15275	.08819	.8539	1.6128	1.10	1.40
	วันที่2	3	1.7667	.05774	.03333	1.6232	1.9101	1.70	1.80
	วันที่3	3	2.9000	.10000	.05774	2.6516	3.1484	2.80	3.00
	วันที่4	3	4.1333	.15275	.08819	3.7539	4.5128	4.00	4.30
	วันที่5	3	4.7000	.10000	.05774	4.4516	4.9484	4.60	4.80
	วันที่6	3	4.9667	.11547	.06667	4.6798	5.2535	4.90	5.10
	วันที่7	3	5.2000	.10000	.05774	4.9516	5.4484	5.10	5.30
	Total	24	3.1750	1.75481	.35820	2.4340	3.9160	.40	5.30
สูตร3	วันที่ 0	3	.5333	.15275	.08819	.1539	.9128	.40	.70
	วันที่1	3	1.4667	.15275	.08819	1.0872	1.8461	1.30	1.60
	วันที่2	3	2.3333	.15275	.08819	1.9539	2.7128	2.20	2.50
	วันที่3	3	3.6000	.10000	.05774	3.3516	3.8484	3.50	3.70
	วันที่4	3	4.6000	.10000	.05774	4.3516	4.8484	4.50	4.70
	วันที่5	3	5.1667	.20817	.12019	4.6496	5.6838	5.00	5.40
	วันที่6	3	5.4000	.10000	.05774	5.1516	5.6484	5.30	5.50
	วันที่7	3	5.5667	.15275	.08819	5.1872	5.9461	5.40	5.70
	Total	24	3.5833	1.84972	.37757	2.8023	4.3644	.40	5.70

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
สูตร1	Between Groups	46.617	7	6.660	393.571	.000
	Within Groups	.271	16	.017		
	Total	46.888	23			
สูตร2	Between Groups	70.618	7	10.088	781.032	.000
	Within Groups	.207	16	.013		
	Total	70.825	23			
สูตร3	Between Groups	78.360	7	11.194	537.326	.000
	Within Groups	.333	16	.021		
	Total	78.693	23			

3.6 ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมดของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
สูตร1	วันที่ 0	3	2.2433	.02082	.01202	2.1916	2.2950	2.22	2.26
	วันที่ 1	3	3.0100	.01000	.00577	2.9852	3.0348	3.00	3.02
	วันที่ 2	3	3.5233	.01528	.00882	3.4854	3.5613	3.51	3.54
	วันที่ 3	3	4.5300	.01000	.00577	4.5052	4.5548	4.52	4.54
	วันที่ 4	3	5.9800	.01000	.00577	5.9552	6.0048	5.97	5.99
	วันที่ 5	3	3.8933	.00577	.00333	3.8790	3.9077	3.89	3.90
	วันที่ 6	3	2.3700	.01000	.00577	2.3452	2.3948	2.36	2.38
	วันที่ 7	3	1.7867	.01528	.00882	1.7487	1.8246	1.77	1.80
	Total	24	3.4171	1.31930	.26930	2.8600	3.9742	1.77	5.99
สูตร2	วันที่ 0	3	4.0900	.02000	.01155	4.0403	4.1397	4.07	4.11
	วันที่ 1	3	5.2533	.03055	.01764	5.1774	5.3292	5.22	5.28
	วันที่ 2	3	6.2400	.02646	.01528	6.1743	6.3057	6.22	6.27
	วันที่ 3	3	7.1133	.04041	.02333	7.0129	7.2137	7.09	7.16
	วันที่ 4	3	9.4700	.01732	.01000	9.4270	9.5130	9.46	9.49
	วันที่ 5	3	6.4800	.01000	.00577	6.4552	6.5048	6.47	6.49
	วันที่ 6	3	5.3767	.01528	.00882	5.3387	5.4146	5.36	5.39
	วันที่ 7	3	4.7000	.01000	.00577	4.6752	4.7248	4.69	4.71
	Total	24	6.0904	1.60665	.32796	5.4120	6.7688	4.07	9.49
สูตร3	วันที่ 0	3	3.2200	.01000	.00577	3.1952	3.2448	3.21	3.23
	วันที่ 1	3	4.6933	.00577	.00333	4.6790	4.7077	4.69	4.70
	วันที่ 2	3	5.0700	.02000	.01155	5.0203	5.1197	5.05	5.09
	วันที่ 3	3	5.8433	.03786	.02186	5.7493	5.9374	5.80	5.87
	วันที่ 4	3	8.7633	.02517	.01453	8.7008	8.8258	8.74	8.79
	วันที่ 5	3	6.2400	.03606	.02082	6.1504	6.3296	6.21	6.28
	วันที่ 6	3	4.7600	.02646	.01528	4.6943	4.8257	4.74	4.79
	วันที่ 7	3	4.0267	.57553	.33228	2.5970	5.4564	3.66	4.69
	Total	24	5.3271	1.61724	.33012	4.6442	6.0100	3.21	8.79

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
สูตร1	Between Groups	40.030	7	5.719	34311.282	.000
	Within Groups	.003	16	.000		
	Total	40.032	23			
สูตร2	Between Groups	59.361	7	8.480	15418.570	.000
	Within Groups	.009	16	.001		
	Total	59.370	23			
สูตร3	Between Groups	59.484	7	8.498	202.426	.000
	Within Groups	.672	16	.042		
	Total	60.155	23			

3.7 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
สูตร1	วันที่ 0	3	.0133	.00577	.00333	-.0010	.0277	.01	.02
	วันที่ 1	3	.1100	.01000	.00577	.0852	.1348	.10	.12
	วันที่ 2	3	.1433	.01528	.00882	.1054	.1813	.13	.16
	วันที่ 3	3	.2467	.00577	.00333	.2323	.2610	.24	.25
	วันที่ 4	3	.4600	.01000	.00577	.4352	.4848	.45	.47
	วันที่ 5	3	.3067	.01528	.00882	.2687	.3446	.29	.32
	วันที่ 6	3	.2033	.01528	.00882	.1654	.2413	.19	.22
	วันที่ 7	3	.0300	.01000	.00577	.0052	.0548	.02	.04
	Total	24	.1892	.14264	.02912	.1289	.2494	.01	.47
สูตร2	วันที่ 0	3	.0500	.01000	.00577	.0252	.0748	.04	.06
	วันที่ 1	3	.1467	.01528	.00882	.1087	.1846	.13	.16
	วันที่ 2	3	.2467	.01155	.00667	.2180	.2754	.24	.26
	วันที่ 3	3	.4067	.01528	.00882	.3687	.4446	.39	.42
	วันที่ 4	3	.6900	.01000	.00577	.6652	.7148	.68	.70
	วันที่ 5	3	.4500	.01000	.00577	.4252	.4748	.44	.46
	วันที่ 6	3	.2867	.01155	.00667	.2580	.3154	.28	.30
	วันที่ 7	3	.1233	.00577	.00333	.1090	.1377	.12	.13
	Total	24	.3000	.20009	.04084	.2155	.3845	.04	.70
สูตร3	วันที่ 0	3	.0733	.01528	.00882	.0354	.1113	.06	.09
	วันที่ 1	3	.1900	.01000	.00577	.1652	.2148	.18	.20
	วันที่ 2	3	.2600	.01000	.00577	.2352	.2848	.25	.27
	วันที่ 3	3	.3600	.01000	.00577	.3352	.3848	.35	.37
	วันที่ 4	3	.5700	.01000	.00577	.5452	.5948	.56	.58
	วันที่ 5	3	.3567	.01528	.00882	.3187	.3946	.34	.37
	วันที่ 6	3	.1467	.01528	.00882	.1087	.1846	.13	.16
	วันที่ 7	3	.0667	.01528	.00882	.0287	.1046	.05	.08
	Total	24	.2529	.16388	.03345	.1837	.3221	.05	.58

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
สูตร1	Between Groups	.466	7	.067	499.125	.000
	Within Groups	.002	16	.000		
	Total	.468	23			
สูตร2	Between Groups	.919	7	.131	984.286	.000
	Within Groups	.002	16	.000		
	Total	.921	23			
สูตร3	Between Groups	.615	7	.088	527.168	.000
	Within Groups	.003	16	.000		
	Total	.618	23			

3.8 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร ด้วยวิธี DPPH

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
สูตร1	วันที่ 0	3	.0967	.01528	.00882	.0587	.1346	.08	.11
	วันที่ 1	3	.1767	.01528	.00882	.1387	.2146	.16	.19
	วันที่ 2	3	.2000	.01000	.00577	.1752	.2248	.19	.21
	วันที่ 3	3	.2233	.00577	.00333	.2090	.2377	.22	.23
	วันที่ 4	3	.2433	.00577	.00333	.2290	.2577	.24	.25
	วันที่ 5	3	.1533	.00577	.00333	.1390	.1677	.15	.16
	วันที่ 6	3	.0900	.01000	.00577	.0652	.1148	.08	.10
	วันที่ 7	3	.0567	.00577	.00333	.0423	.0710	.05	.06
	Total	24	.1550	.06541	.01335	.1274	.1826	.05	.25
สูตร2	วันที่ 0	3	.2400	.02000	.01155	.1903	.2897	.22	.26
	วันที่ 1	3	.2833	.00577	.00333	.2690	.2977	.28	.29
	วันที่ 2	3	.3100	.01000	.00577	.2852	.3348	.30	.32
	วันที่ 3	3	.3233	.01155	.00667	.2946	.3520	.31	.33
	วันที่ 4	3	.4933	.01528	.00882	.4554	.5313	.48	.51
	วันที่ 5	3	.2700	.00000	.00000	.2700	.2700	.27	.27
	วันที่ 6	3	.2033	.00577	.00333	.1890	.2177	.20	.21
	วันที่ 7	3	.1400	.01000	.00577	.1152	.1648	.13	.15
	Total	24	.2829	.09963	.02034	.2408	.3250	.13	.51
สูตร3	วันที่ 0	3	.1867	.01528	.00882	.1487	.2246	.17	.20
	วันที่ 1	3	.2333	.01155	.00667	.2046	.2620	.22	.24
	วันที่ 2	3	.2467	.00577	.00333	.2323	.2610	.24	.25
	วันที่ 3	3	.2733	.01528	.00882	.2354	.3113	.26	.29
	วันที่ 4	3	.3833	.01155	.00667	.3546	.4120	.37	.39
	วันที่ 5	3	.2233	.01155	.00667	.1946	.2520	.21	.23
	วันที่ 6	3	.2067	.01155	.00667	.1780	.2354	.20	.22
	วันที่ 7	3	.1667	.00577	.00333	.1523	.1810	.16	.17
	Total	24	.2400	.06467	.01320	.2127	.2673	.16	.39

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
สูตร1	Between Groups	.097	7	.014	138.286	.000
	Within Groups	.002	16	.000		
	Total	.098	23			
สูตร2	Between Groups	.226	7	.032	250.207	.000
	Within Groups	.002	16	.000		
	Total	.228	23			
สูตร3	Between Groups	.094	7	.013	100.786	.000
	Within Groups	.002	16	.000		
	Total	.096	23			

3.9 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร ด้วยวิธี FRAP

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
สูตร1	วันที่ 0	3	.9300	.01000	.00577	.9052	.9548	.92	.94
	วันที่ 1	3	.9867	.00577	.00333	.9723	1.0010	.98	.99
	วันที่ 2	3	1.0333	.00577	.00333	1.0190	1.0477	1.03	1.04
	วันที่ 3	3	1.1467	.01155	.00667	1.1180	1.1754	1.14	1.16
	วันที่ 4	3	1.1733	.01528	.00882	1.1354	1.2113	1.16	1.19
	วันที่ 5	3	1.1000	.01000	.00577	1.0752	1.1248	1.09	1.11
	วันที่ 6	3	.9567	.00577	.00333	.9423	.9710	.95	.96
	วันที่ 7	3	.8300	.01000	.00577	.8052	.8548	.82	.84
	Total	24	1.0196	.11188	.02284	.9723	1.0668	.82	1.19
สูตร2	วันที่ 0	3	1.0767	.02082	.01202	1.0250	1.1284	1.06	1.10
	วันที่ 1	3	1.1300	.01000	.00577	1.1052	1.1548	1.12	1.14
	วันที่ 2	3	1.2667	.02082	.01202	1.2150	1.3184	1.25	1.29
	วันที่ 3	3	1.2100	.02000	.01155	1.1603	1.2597	1.19	1.23
	วันที่ 4	3	1.4600	.01000	.00577	1.4352	1.4848	1.45	1.47
	วันที่ 5	3	1.2533	.01155	.00667	1.2246	1.2820	1.24	1.26
	วันที่ 6	3	1.0333	.00577	.00333	1.0190	1.0477	1.03	1.04
	วันที่ 7	3	.9133	.01155	.00667	.8846	.9420	.90	.92
	Total	24	1.1679	.16070	.03280	1.1001	1.2358	.90	1.47
สูตร3	วันที่ 0	3	1.0800	.01732	.01000	1.0370	1.1230	1.07	1.10
	วันที่ 1	3	1.1767	.00577	.00333	1.1623	1.1910	1.17	1.18
	วันที่ 2	3	1.2200	.00000	.00000	1.2200	1.2200	1.22	1.22
	วันที่ 3	3	1.1633	.00577	.00333	1.1490	1.1777	1.16	1.17
	วันที่ 4	3	1.3367	.01528	.00882	1.2987	1.3746	1.32	1.35
	วันที่ 5	3	1.2733	.00577	.00333	1.2590	1.2877	1.27	1.28
	วันที่ 6	3	1.1433	.00577	.00333	1.1290	1.1577	1.14	1.15
	วันที่ 7	3	1.0433	.00577	.00333	1.0290	1.0577	1.04	1.05
	Total	24	1.1796	.09252	.01889	1.1405	1.2187	1.04	1.35

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
สูตร1	Between Groups	.286	7	.041	426.876	.000
	Within Groups	.002	16	.000		
	Total	.288	23			
สูตร2	Between Groups	.590	7	.084	381.970	.000
	Within Groups	.004	16	.000		
	Total	.594	23			
สูตร3	Between Groups	.195	7	.028	319.177	.000
	Within Groups	.001	16	.000		
	Total	.197	23			

3.10 วัดสีไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
L*	สูตร 1	3	35.7167	.02517	.01453	35.6542	35.7792	35.69	35.74
	สูตร 2	3	33.1867	.03512	.02028	33.0994	33.2739	33.15	33.22
	สูตร 3	3	30.3800	.04000	.02309	30.2806	30.4794	30.34	30.42
	Total	9	33.0944	2.31207	.77069	31.3172	34.8717	30.34	35.74
a*	สูตร 1	3	.6667	.02517	.01453	.6042	.7292	.64	.69
	สูตร 2	3	1.0100	.03000	.01732	.9355	1.0845	.98	1.04
	สูตร 3	3	1.7367	.04163	.02404	1.6332	1.8401	1.69	1.77
	Total	9	1.1378	.47399	.15800	.7734	1.5021	.64	1.77
b*	สูตร 1	3	6.0600	.03606	.02082	5.9704	6.1496	6.03	6.10
	สูตร 2	3	6.4267	.02082	.01202	6.3750	6.4784	6.41	6.45
	สูตร 3	3	6.9700	.02000	.01155	6.9203	7.0197	6.95	6.99
	Total	9	6.4856	.39718	.13239	6.1803	6.7909	6.03	6.99

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
L*	Between Groups	42.758	2	21.379	18501.183	.000
	Within Groups	.007	6	.001		
	Total	42.765	8			
a*	Between Groups	1.791	2	.895	822.316	.000
	Within Groups	.007	6	.001		
	Total	1.797	8			
b*	Between Groups	1.258	2	.629	884.359	.000
	Within Groups	.004	6	.001		
	Total	1.262	8			

3.11 ค่าผลผลิตที่ได้ (yield) ของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
สูตร1	วันที่ 0	3	4.3600	.01000	.00577	4.3352	4.3848	4.35	4.37
	วันที่ 1	3	11.8233	.01528	.00882	11.7854	11.8613	11.81	11.84
	วันที่ 2	3	18.3267	.01528	.00882	18.2887	18.3646	18.31	18.34
	วันที่ 3	3	29.7700	.01000	.00577	29.7452	29.7948	29.76	29.78
	วันที่ 4	3	37.7800	.01000	.00577	37.7552	37.8048	37.77	37.79
	วันที่ 5	3	43.4800	.01000	.00577	43.4552	43.5048	43.47	43.49
	วันที่ 6	3	47.3133	.01528	.00882	47.2754	47.3513	47.30	47.33
	วันที่ 7	3	49.2300	.01000	.00577	49.2052	49.2548	49.22	49.24
	Total	24	30.2604	16.29362	3.32592	23.3802	37.1406	4.35	49.24
สูตร2	วันที่ 0	3	5.0700	.02000	.01155	5.0203	5.1197	5.05	5.09
	วันที่ 1	3	12.4667	.02082	.01202	12.4150	12.5184	12.45	12.49
	วันที่ 2	3	17.8700	.02000	.01155	17.8203	17.9197	17.85	17.89
	วันที่ 3	3	29.2733	.01528	.00882	29.2354	29.3113	29.26	29.29
	วันที่ 4	3	41.7633	.01528	.00882	41.7254	41.8013	41.75	41.78
	วันที่ 5	3	47.4800	.01000	.00577	47.4552	47.5048	47.47	47.49
	วันที่ 6	3	50.1800	.01000	.00577	50.1552	50.2048	50.17	50.19
	วันที่ 7	3	52.5300	.01000	.00577	52.5052	52.5548	52.52	52.54
	Total	24	32.0792	17.69586	3.61215	24.6069	39.5515	5.05	52.54
สูตร3	วันที่ 0	3	4.4300	.01000	.00577	4.4052	4.4548	4.42	4.44
	วันที่ 1	3	12.1800	.01000	.00577	12.1552	12.2048	12.17	12.19
	วันที่ 2	3	19.3800	.01000	.00577	19.3552	19.4048	19.37	19.39
	วันที่ 3	3	29.8767	.01528	.00882	29.8387	29.9146	29.86	29.89
	วันที่ 4	3	38.1767	.01528	.00882	38.1387	38.2146	38.16	38.19
	วันที่ 5	3	42.8800	.01000	.00577	42.8552	42.9048	42.87	42.89
	วันที่ 6	3	44.8300	.01000	.00577	44.8052	44.8548	44.82	44.84
	วันที่ 7	3	46.2267	.01528	.00882	46.1887	46.2646	46.21	46.24
	Total	24	29.7475	15.32114	3.12742	23.2779	36.2171	4.42	46.24

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
สูตร 1	Between Groups	6106.083	7	872.298	5815317.425	.000
	Within Groups	.002	16	.000		
	Total	6106.086	23			
สูตร 2	Between Groups	7202.292	7	1028.899	4115595.190	.000
	Within Groups	.004	16	.000		
	Total	7202.296	23			
สูตร 3	Between Groups	5398.958	7	771.280	5141865.000	.000
	Within Groups	.002	16	.000		
	Total	5398.961	23			

3.12 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของไซเดอร์ทั้ง 3 สูตร

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
สูตร1	วันที่ 0	3	4.5033	.11719	.06766	4.2122	4.7944	4.37	4.59
	วันที่ 1	3	4.3000	.04000	.02309	4.2006	4.3994	4.26	4.34
	วันที่ 2	3	4.2500	.12530	.07234	3.9387	4.5613	4.12	4.37
	วันที่ 3	3	4.2467	.04163	.02404	4.1432	4.3501	4.20	4.28
	วันที่ 4	3	3.8800	.06557	.03786	3.7171	4.0429	3.81	3.94
	วันที่ 5	3	3.7233	.11015	.06360	3.4497	3.9970	3.61	3.83
	วันที่ 6	3	3.0600	.07000	.04041	2.8861	3.2339	3.01	3.14
	วันที่ 7	3	2.5533	.14189	.08192	2.2009	2.9058	2.40	2.68
	Total	24	3.8146	.65692	.13409	3.5372	4.0920	2.40	4.59
สูตร2	วันที่ 0	3	5.5167	.16197	.09351	5.1143	5.9190	5.33	5.62
	วันที่ 1	3	4.9000	.03464	.02000	4.8139	4.9861	4.86	4.92
	วันที่ 2	3	4.6500	.07211	.04163	4.4709	4.8291	4.59	4.73
	วันที่ 3	3	4.4633	.08083	.04667	4.2625	4.6641	4.39	4.55
	วันที่ 4	3	4.1800	.04000	.02309	4.0806	4.2794	4.14	4.22
	วันที่ 5	3	3.9833	.06807	.03930	3.8142	4.1524	3.93	4.06
	วันที่ 6	3	3.5767	.03055	.01764	3.5008	3.6526	3.55	3.61
	วันที่ 7	3	3.0100	.04000	.02309	2.9106	3.1094	2.97	3.05
	Total	24	4.2850	.75079	.15325	3.9680	4.6020	2.97	5.62
สูตร3	วันที่ 0	3	6.3300	.03464	.02000	6.2439	6.4161	6.29	6.35
	วันที่ 1	3	5.7000	.04000	.02309	5.6006	5.7994	5.66	5.74
	วันที่ 2	3	5.2633	.08083	.04667	5.0625	5.4641	5.19	5.35
	วันที่ 3	3	5.1400	.04000	.02309	5.0406	5.2394	5.10	5.18
	วันที่ 4	3	4.9667	.06110	.03528	4.8149	5.1184	4.90	5.02
	วันที่ 5	3	4.6500	.03464	.02000	4.5639	4.7361	4.61	4.67
	วันที่ 6	3	4.2500	.13748	.07937	3.9085	4.5915	4.10	4.37
	วันที่ 7	3	3.8367	.05774	.03333	3.6932	3.9801	3.77	3.87
	Total	24	5.0171	.75846	.15482	4.6968	5.3374	3.77	6.35

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
สูตร 1	Between Groups	9.777	7	1.397	150.524	.000
	Within Groups	.148	16	.009		
	Total	9.926	23			
สูตร 2	Between Groups	12.869	7	1.838	306.829	.000
	Within Groups	.096	16	.006		
	Total	12.965	23			
สูตร 3	Between Groups	13.155	7	1.879	394.598	.000
	Within Groups	.076	16	.005		
	Total	13.231	23			

แบบประเมินความพึงพอใจทางประสาทสัมผัสของไซเดอร์ข้าวลืมผัว

ชื่อ-นามสกุล..วันที่...................... ....

เพศ ☐ ชาย ☐ หญิง

สถานะ ☐ นักเรียน ☐ นักศึกษา

☐ ครู/อาจารย์ ☐ บุคคลทั่วไป

☐ อื่น ๆ ....

อายุ ☐ 15-20 ปี ☐ 21-25 ปี

☐ 26-30 ปี ☐ มากกว่า 30 ปี

ประสบการณ์ในการดื่มเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์

☐ ไม่เคย ☐ เคยดื่มน้อย

☐ เคยดื่มปานกลาง ☐ เคยดื่มมาก

คำชี้แจง

1. การทดสอบกลิ่น ผู้ทดสอบจะต้องดมกลิ่นครั้งละ 1 ตัวอย่าง แล้วใส่เครื่องหมาย / ลงในช่องให้คะแนน

2. การชิม ให้ผู้ทดสอบบ้วนปากด้วยน้ำเปล่า 1 ครั้ง แล้วรับประทานขนมหวานที่จัดไว้ก่อนเพื่อล้างปากพร้อมสังเกตสี ความขุ่น รสชาติ และการยอมรับโดยรวม

ตัวอย่าง	กลิ่น							สี							รสชาติ							การยอมรับรวม							หมายเหตุ
1	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	
2																													
3																													

1 = ชอบน้อยที่สุด

2 = ชอบน้อย

3 = ค่อนข้างชอบน้อย

4 = ชอบปานกลาง

5 = ค่อนข้างชอบมาก

6 = ชอบมาก

7 = ชอบมากที่สุด

ภาคผนวก ง

การเผยแพร่งานวิจัย

1. ถ่ายทอดความรู้กระบวนการผลิตลูกแป้งสาโทให้ผู้ประกอบการ ที่วิสาหกิจเกษตรอินทรีย์อีสาน จังหวัดร้อยเอ็ด

2. ตีพิมพ์งานวิจัย International Conference on Food Agriculture and Biotechnology 2019

doi:10.14457/MSU.res.2019.15

Screening of Yeasts from Thai Traditional Fermentation Starter (Loog-pang) for Alcoholic Fermentation Products in Community Enterprise

Pikulthong Paewlueng[1]*, Sirirat Deeseenthum[1] and Surachai Rattanasuk[2]

[1] Master degree student, Natural Antioxidant Innovation Research Unit, Department of Biotechnology,
Faculty of Technology, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150 Thailand
[2] Major of General Science, Department of Science and Technology, Faculty of Liberal Arts and Science,
Roi Et Rajabhat University, Roi Et, 45120 Thailand

*Corresponding author's e-mail: pikulthong0936@gmail.com

Abstract:

Thai traditional fermentation starter or Loog-pang is a starter culture in dry including bacteria, yeast and fungi used for traditional Sato processing in Thailand. Alcoholic fermentation products in community enterprise are not good quality enough because of alcohol content are not stable. Thus, this study aimed to isolation of yeasts from Loog-pang. Microbes in Loog-pang Sato from 3 sources including Roi-Et Province, Maha Sarakham Province and Phangnga Province were isolated. Yeasts were isolated using yeast extract-peptone-dextrose (YPD) agar and incubated at 30 °C for 3 days. Yeast culture in YPD broth was incubated in a temperature controlled agitator at 37 °C at 200 rpm for 48 hours. The yeast concentration was adjusted to 10^8 cells /ml to be used as a starter. The isolates were determined for total dissolved solid (TDS), alcohol production and alcohol tolerance. The result found that isolate LPR5 showed the highest total dissolved solid at 19.07 °Brix, the highest alcohol production capacity at 1.54% and gave the highest alcohol tolerance. Consequently, the yeast isolate LPR5 was identified by DNA sequencing and morphology. The results indicated that LPR5 as *Wickerhamomyces anomalus*.

Keywords: Yeast, Thai traditional fermentation starter, Loog-pang, Alcoholic fermentation, Sato

3. ตีพิมพ์งานวิจัย Thai Society for Biotechnology and International Conference 2019

The 31st Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference

Characteristics, volatile compounds and antioxidant activity of black glutinous rice vinegar produced from Leum Pua rice (*Oryza sativa* Linn.) sato.

Pikulthong Paewlueng[1,*], Sirirat Deeseenthan[1], and Surachai Rattanasuk[2]

[1] Master degree student, [1] Assistant professor Natural Antioxidant Innovative Research Unit,Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand.
[3]Lecturer in Biology, Department of Science and Technology, Faculty of Liberal Arts and Science, Roi Et Rajabhat University, Roi Et, 45120, Thailand.
* E-mail : Pikulthong0936@gmail.com

Abstract

Rice vinegar is used as a health food in Asia and contains various active ingredients with antioxidant activity and high levels of amino acids and organic acids. Characteristics, volatile compounds and antioxidant activity of black glutinous rice vinegar produced from Leum Pua rice sato were studied. Fermentation of Loog-pang to produce Thai traditional alcohol (sato) at ratio of fungi (*Aspergillus oryzae* LPP3) to yeast (*Saccharomyces cerevisiae* TISTR5013) of 1:1 (g/L) was conducted for 15 days. Rice sato with alcoholic content of 8.74% was used as the starter for acetic acid fermentation. The liquid was inoculated with *Acetobacter aceti* TISTR102 (~10%) and cultured at 150 rpm, 30 °C for 7 days. After fermentation, acetic acid and ethanol contents were 4.30% and 0.93%, respectively. Total dissolved solid was 5.91 °Brix, pH = 4.06, and reducing sugar content was 58.29 g/L. Volatile compounds were analyzed by GC-MS. Results determined the presence of carbonic acid, propiolic acid, ethanol, ethyl acetate, 2,3-butanediol, propanoic acid, ethylic acid and glycerol. These compounds affected the smell and taste of the product. Six organic acids determined by HPLC included citric acid, tartaric acid, lactic acid, succinic acid, propionic acid and acetic acid. Antioxidant activity of Leum Pua rice vinegar was 0.24 g TE/L of DPPH and 1.17 g Fe(II)/L of FRAP, whereas phenolic content was 5.98 g GAE/L and flavonoid was 0.46 g RE/L. These antioxidants presented the highest content after 4 days of fermentation, whereas anthocyanin content decreased continuously until 7 days of fermentation at 2.55 g/L. Results indicated that the vinegar gave overall satisfaction as ‘mostly like’ when surveyed by 30 volunteers using a 7-point hedonic scale sensory test.

Keywords: Loog-pang; Fungi; Yeast; Vinegar; Sato

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวพิกุลทอง ผิวเหลือง
วันเกิด	วันที่ 9 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2536
สถานที่เกิด	อำเภอเลิงนกทา จังหวัดยโสธร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 129 หมู่ 17 ตำบลบุ่งค้า อำเภอเลิงนกทา จังหวัดยโสธร รหัสไปรษณีย์ 35120
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2554 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเลิงนกทา พ.ศ. 2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด พ.ศ. 2562 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนวิจัย	โครงการพัฒนาศักยภาพบุคคลากร STEM (Science, Technology Engineering, and Mathematics) เพื่อการวิจัยและพัฒนาสำหรับภาคอุตสาหกรรม