รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย
การคัดแยกและจำแนกจุลินทรีย์จากลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อ สำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวหมัก

Isolation and identification of microbial from Loog-pang as starter cultures for production of fermented rice products

นางสาวอรอง จันทร์ประสาทสุข

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 223075
สัญญาเลขที่ 110/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย
การคัดแยกและจำแนกจุลินทรีย์จากลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อ สำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวหมัก

Isolation and identification of microbial from Loog-pang as starter cultures for production of fermented rice products

นางสาวอรอง จันทร์ประสาทสุข
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 110/2559

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 110/2559)

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อคัดแยกและจัดจำแนกราและยีสต์จากลูกแป้งซึ่งเป็นกล้าเชื้อธรรมชาติท้องถิ่นที่ใช้สำหรับผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวหมักต่างๆ ของประเทศไทย เพื่อนำมาพัฒนาเป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์สำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวหมัก โดยนำลูกแป้งจากตลาดศรีราชาและหนองมน จังหวัดชลบุรี ซึ่งตั้งอยู่ทางภาคตะวันออกของประเทศไทย มาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากผลการทดลองพบว่า MS1 และ MN1 เป็นประชากรหลักของลูกแป้งจากตลาดศรีราชาและหนองมน โดยมีจำนวนประชากรเท่ากับ 7.82 และ 5.91 log cfu/g ตามลำดับ และพบว่า YN1 เป็นยีสต์หลักของลูกแป้งจากตลาดหนองมน โดยมีจำนวนประชากรเท่ากับ 5.83 log cfu/g และไม่พบยีสต์ในลูกแป้งจากตลาดศรีราชา จากการทดสอบความสามารถของการย่อยแป้งบน starch agar และปลายข้าวเหนียวนึ่งสุก พบว่า MS1 มีความสามารถย่อยแป้งสูงสุดบน starch agar ในขณะที่ไม่สามารถตรวจสอบผลการทดลองของ MN1 ได้ อย่างไรก็ตาม ทั้งรา MS1 และ MN1 สามารถย่อยปลายข้าวเหนียวนึ่งสุกได้ จากผลการจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเบื้องต้น พบว่า MN1 อาจเป็น *Amylomyces* และ ยีสต์ YN1 ถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อบรีสุทธิ์สำหรับการหมักแอลกอฮอล์ จากผลการทดลองพบว่าการหมักไวน์ข้าวด้วย YN1 นาน 5 วัน สามารถผลิตปริมาณแอลกอฮอล์ได้เท่ากับ 7.1%(v/v)

Abstract

The objective of this research is to isolate and primarily identify the indigenous molds and yeasts associated with Look-pang, the traditional rice cake starter culture of Thai rice mash and wine products, to develop as pure cultures for fermented rice products. Look-pang samples were collected from two local areas, Sriracha (S) and Nongmon (N), in Chonburi province, which is located in the eastern part of Thailand. The culturation of molds and yeasts conducted in synthetic media indicated that mold MS1 and MN1 were the main population of Look-pang from S and N which was 7.82 and 5.91 log cfu/g respectively. YN1 was the main yeast found from N which was 5.83 log cfu/g and no yeast has been detected from S. Their potencies of saccharification were evaluated by starch agar and steamed broken glutinous rice saccharification tests. MS1 showed the highest efficiency of saccharification in starch agar, while MN1 could not be detected. However, both of MS1 and MN1 could saccharify steamed broken glutinous rice. Based on the results of primary filamentous morphology properties, MN1 could be Amylomyces mold. YN1 has been used as pure yeast starter culture for the alcoholic fermentation. The results showed that YN1 could produce alcohol content to 7.1 %(v/v) in day 5 of rice wine fermentation.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
เรื่อง	
1. เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	
1.1 ลูกแป้ง	1
1.2 บทบาทของจุลินทรีย์ในลูกแป้งต่อกระบวนการหมัก	11
1.3 กล้าเชื้อท้องถิ่น	12
1.4 กล้าเชื้อบริสุทธิ์	18
2. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	18
3. วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	19
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	19
5. รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย	20
5.1 ลูกแป้ง	20
5.2 การคัดแยกรา	20
5.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งเบื้องต้น	20
5.4 การคัดแยกยีสต์	22

เรื่อง **หน้า**

5.5 การทดสอบการหมักผลิตภัณฑ์ด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์ 25

5.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ 25

6. ผลการวิจัย 26

6.1 การคัดแยกรา 27

6.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งของราที่คัดแยกได้ 34

6.3 การทดสอบการย่อยข้าวด้วยกล้าเชื้อราบริสุทธิ์ 35

6.4 การคัดแยกยีสต์ 38

6.5 การทดสอบหมักไวน์ข้าวด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ 40

7. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 44

ผลผลิต 46

รายงานสรุปการเงิน 47

เอกสารอ้างอิง 49

ภาคผนวก 52

ประวัตินักวิจัย 72

สารบัญตาราง (List of tables)

ตารางที่		หน้า
1.1	ชื่อเรียกลูกแป้งตามภาษาท้องถิ่นของประเทศต่างๆและการใช้ประโยชน์	1
1.2	ตำรับลูกแป้งข้าวหมาก	3
1.3	ตำรับลูกแป้งสุรา	3
1.4	ราและยีสต์ที่แยกได้จากกล้าเชื้อผสมของแต่ละประเทศ	15
6.1	ลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดแยกได้จากลูกแป้ง ก	29
6.2	ลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดแยกได้จากลูกแป้ง ข	30
6.3	จำนวนกลุ่มของราที่คัดแยกได้จากลูกแป้ง ก และ ข	33
6.4	ผลการทดสอบการย่อยแป้งด้วย starch agar	36
6.5	ประสิทธิภาพการย่อยแป้งของราที่คัดแยกได้จากลูกแป้ง	37
6.6	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของน้ำเชื่อมข้าวจากปลายข้าวเหนียวที่ย่อยด้วยกล้าเชื้อราบริสุทธิ์	38
6.7	ลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์จากลูกแป้ง ก และ ข	39
6.8	ผลวิเคราะห์ทางเคมีของไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* angle® และยีสต์ YN1 เทียบกับไวน์ยี่ห้อสาโทสยาม	43

สารบัญภาพ (List of illustrations)

ภาพที่		หน้า
1.1	แผนภูมิการผลิตลูกแป้ง	5
5.1	การคัดแยกราจากลูกแป้ง	21
5.2	การคัดแยกยีสต์จากลูกแป้ง	23
5.3	การหมักไวน์ข้าวด้วยกล้าเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์	25
6.1	ลูกแป้งจากศรีราชา (ก) และลูกแป้งจากหนองมน (ข)	26
6.2	MN9 และ MN5 สร้างสปอร์สีเขียวเข้มบนปลายข้าวเหนียวนึ่งสุก	37

บทนำ (Introduction)

1. เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

1.1 ลูกแป้ง

ลูกแป้ง คือกล้าเชื้อจุลินทรีย์ (Inoculum) ที่เก็บในรูปเชื้อแห้งเพื่อใช้ในการหมักอาหารหมักหลายชนิดในประเทศแถบเอเชีย เทคโนโลยีการผลิตและการใช้ลูกแป้งมีมาแต่โบราณก่อนที่มนุษย์จะเข้าใจถึงศาสตร์ทางจุลชีววิทยา โดยเข้าใจกันว่ามีต้นกำเนิดมาจากประเทศจีน และถ่ายทอดไปยังประเทศเพื่อนบ้าน เช่น ธิเบต สิขิม อินเดีย เกาหลี และส่วนการใช้ประโยชน์นั้นจะคล้ายคลึงกันเป็นส่วนใหญ่ คือใช้ในการหมักที่มีกิจกรรมการเปลี่ยนแป้งในวัตถุดิบ ประเภทธัญพืชและพืชหัว ให้เป็นน้ำตาล (Sacchrification) เพื่อผลิตอาหารหมักประเภทข้าวหมาก สุราและเมรัย เช่น กระแช่ สาโท หรือ อุ ยกเว้น “ราจิเทมเป้” ของอินโนนีเซียยที่ใช้ในการผลิตเทมเป้ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง โดยกิจกรรมของกล้าเชื้อจะเป็นการย่อยสลายโปรตีน สำหรับในประเทศไทยนั้นยังมีลูกแป้งที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูจากวัตถุดิบพวกธัญพืช ซึ่งเรียกว่า “ส่าน้ำส้ม” ชาวตะวันตกเรียกลูกแป้งรวมๆกันว่า “Chinese yeast cake” รายละเอียดเกี่ยวกับชื่อเรียกของลูกแป้งในแต่ละท้องถิ่นและประโยชน์ใช้สอยปรากฏในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ชื่อเรียกลูกแป้งตามภาษาท้องถิ่นของประเทศต่างๆและการใช้ประโยชน์

ประเทศ	ชื่อท้องถิ่น	ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ลูกแป้ง
จีน	ชิเหยว, เป๊ะเหยว ชิ-ชุ	ข้าวหมาก, เครื่องดื่มประเภทกระแช่, สุราจากข้าว
ไต้หวัน	เพคค่า(pakka)	สุราจากข้าว
ธิเบท	พับ(phab)	เครื่องดื่มประเภทกระแช่, สุราจากข้าว
สิขิม	ลีเวน(levian)	เครื่องดื่มประเภทกระแช่, สุราจากข้าว
อินเดีย	บุคคาร์(bukha) เมอร์ซ่า(murcha) รามู (ramur)	เครื่องดื่มประเภทกระแช่, สุราจากข้าว
เกาหลี	นูรุก	สุราจากข้าว
อินโดนีเซีย	ราจิทาเป้ ราจิเบราส ราจิพอยยัม ราจิเทมเป้	ข้าวหมาก เครื่องดื่มประเทศกระแช่ มันสำประหลักหมักแบบข้าวหมาก (tape ketela), เทมเป้

มาเลเซีย	ราจิทาไป, จุเปียง	เครื่องดื่มประเภทกระแช่
ไทย	ลูกแป้ง	ข้าวหมาก
	แป้งเชื้อสุรา	กระแช่, สาโท, อุ
	ลูกแป้งน้ำส้ม, ส่าน้ำส้ม	สุราจากข้าว น้ำส้มสายชู

ที่มา : นภา โลห์ทอง, 2534

1.1.1 คุณภาพและลักษณะทั่วๆไป

ลูกแป้งที่ดีจะโปร่งเบา สีนวล ไม่มีรอยแตกร้าว ก้อนแป้งเป็นรูพรุน ซึ่งเกิดจากการฟูของแป้งขณะบ่ม เมื่อขยี้จะยุ่ยเป็นผงละเอียด ไม่มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว มีรูปร่างและขนาดต่างๆกัน ลูกแป้งข้าวหมากส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 เซนติเมตร ลูกแป้งจากบางท้องถิ่น เช่น ลูกแป้งของอินเดียและมาเลเซียมีลักษณะเป็นวงแหวน ลูกแป้งเหล้าเกาหลียงของจีนมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 12-15 เซนติเมตร มีลักษณะคล้ายวงแหวนเช่นกัน ลูกแป้งจากไต้หวันเมื่อแห้งแล้วนิยมป่นเป็นผงและบรรจุขายเป็นซอง ลูกแป้งที่ผลิตจากแต่ละแห่งจะมีประสิทธิภาพการหมักต่างกัน ซึ่งบางครั้งไม่สามารถบอกได้ด้วยลักษณะปรากฏ

1.1.2 การผลิตลูกแป้ง

1.1.2.1 วัตถุดิบองค์ประกอบของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตลูกแป้งได้แก่

- แป้ง ซึ่งถึงแม้ว่าข้อมูลที่ได้จากผู้ผลิตจะระบุว่าใช้ได้ทั้งแป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวจ้าว แต่ผลจากการศึกษาพบว่าลูกแป้งที่ผลิตโดยใช้แป้งข้าวเจ้าล้วนๆ จะมีคุณภาพดีกว่าที่ผลิตด้วยแป้งข้าวเหนียว หรือแป้งข้าวจ้าวผสมแป้งข้าวเหนียว ในประเทศจีนมีลูกแป้งหลายชนิดที่ผลิตจากแป้งสาลี เช่น ลูกแป้งสำหรับหมักเหล้าเกาเลียง ตามตำรับเดิมผู้ผลิตจะบดแป้งใช้เป็นคราวๆไป ไม่นิยมใช้แป้งสำเร็จ ทั้งนี้เผื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ซึ่งอาจมีอยู่ในแป้งที่ผลิตและเก็บโดยขาดความระมัดระวัง อนึ่งการผลลิตแป้งสำเร็จเป็นการค้าส่วนใหญ่จะมีการเติมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราเช่น กรดโปรปิโอนิก สารเหล่านี้จะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ลูกแป้งที่เป็นเชื้อราและยีสต์ สำหรับการผลิตลูกแป้งซึ่งจุลินทรีย์เป็นแบคทีเรียเช่น ลูกแป้งน้ำส้มสายชูนั้น จากการทดลองพบว่าการใช้แป้งที่ผลิตเป็นการค้าให้ผลดีกว่าการใช้แป้งที่ผลิตขึ้นเอง และจากการตรวจวิเคราะห์พบว่าแป้งที่ผลิตขายเป็นการค้าในปัจจุบัน (เฉพาะแป้งแห้งที่บรรจุถุงพลาสติกปิดสนิท) มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนน้อยมาก เมื่อเทียบกับแป้งที่ผลิตเองในห้องปฏิบัติการ สำหรับการผลิตแป้งเพื่อใช้ในแต่ละครั้งนี้ ต้องเลือกข้าวที่ไม่เก่าเก็บและไม่อับรา

- สมุนไพร เป็นองค์ประกอบที่สำคัญซึ่งแต่ละประเทศจะมีสูตรการผลิตลูกแป้งที่ต่างกันหลายตำรับ และมักจะเก็บเป็นความลับที่ถ่ายทอดกันเฉพาะครัวเรือน ยกตัวอย่างตำรับลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งสุราตามตารางที่ 1.2 และ 1.3 สำหรับลูกแป้งอินโดนีเซีย

และฟิลิปปินส์นั้นมีองค์ประกอบของสมุนไพรคล้ายคลึงกัน ได้แก่ ขิง ข่า กระเทียม พริกไทย และพริกชี้ฟ้าแห้ง เป็นหลัก เมื่อเปรียบเทียบชนิดของสมุนไพรที่ใช้ในแต่ละตำรับของแต่ละประเทศ จะเห็นว่าสมุนไพรที่ใช้เป็นองค์ประกอบพื้นฐานร่วมกันในหลายๆตำรับ ได้แก่ กระเทียม พริกไทย ขิง และข่า

นอกจากชนิดและปริมาณแล้ว สิ่งสำคัญอีกประการหนึ่งคือคุณภาพของสมุนไพร กล่าวคือสำหรับสมุนไพรที่เป็นของแห้ง ต้องแห้งสนิทปราศจากการเจริญของเชื้อรา ส่วนประเภทที่เป็นของสดต้องตัดส่วนที่เน่าเสียออก สมุนไพรเหล่านี้ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อน ความเก่าใหม่ของสมุนไพรที่ใช้จึงนับว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่ง เนื่องจากสารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่เป็นสารระเหย การเก็บสมุนไพรไว้เป็นเวลานานๆ สารเหล่านี้จะลดปริมาณลง โดยเฉพาะสมุนไพรที่เก็บไว้ในลักษณะเป็นผงละเอียด อัตราการระเหยจะยิ่งเป็นไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการซื้อสมุนไพรเพื่อใช้ในเรื่องนี้จึงควรเลือกซื้อชนิดที่ยังไม่ได้บด และนำมาบดใช้เป็นคราวๆไป

ตารางที่ 1.2 ตำรับลูกแป้งข้าวหมาก

องค์ประกอบ	**ปริมาณ (กรัม)**
ชะเอม	180
พริกไทย	60
ดีปลี	120
กระเทียม	420
ขิง	120
ข่า	60
ข้าวเจ้า	1200

ที่มา : ขุนกฤษณามรวิสิฐ, 2494 อ้างถึงใน นภา โลห์ทอง, 2534 หน้า 9

ตารางที่ 1.3 ตำรับลูกแป้งสุรา

องค์ประกอบ	**ปริมาณ (กรัม)**
กระเทียม	40
ขิง	40
ข่า	20
ชะเอม	40
พริกไทย	6
ดีปลี	6
หัวหอม	20

ข้าวเจ้า	2500

ที่มา : วรชิน สถิตนิมานการ, 2493 อ้างถึงใน นภา โลห์ทอง, 2534 หน้า 10

1.1.3 การเตรียมวัตถุดิบและการปั้นลูกแป้ง

ภาพที่ 1.1 แสดงขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบและการปั้นลูกแป้ง ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1.1.3.1 เตรียมแป้งโดยซาวข้าวให้สะอาด แช่น้ำไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำไปโม่และทับน้ำให้แห้ง หรือทำให้ข้าวสะเด็ดน้ำเสียก่อนแล้วจึงนำไปบดหรือปั่นด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้าให้ละเอียดแล้วร่อนด้วยแร่ง การแช่ข้าวนานเกินไปโดยไม่เปลี่ยนน้ำ จะมีผลให้แบคทีเรียกรดแลคติก และ *Bacillus* spp. เจริญเพิ่มจำนวนในปริมาณมาก ทำให้ลูกแป้งที่ผลิตได้ด้อยคุณภาพ

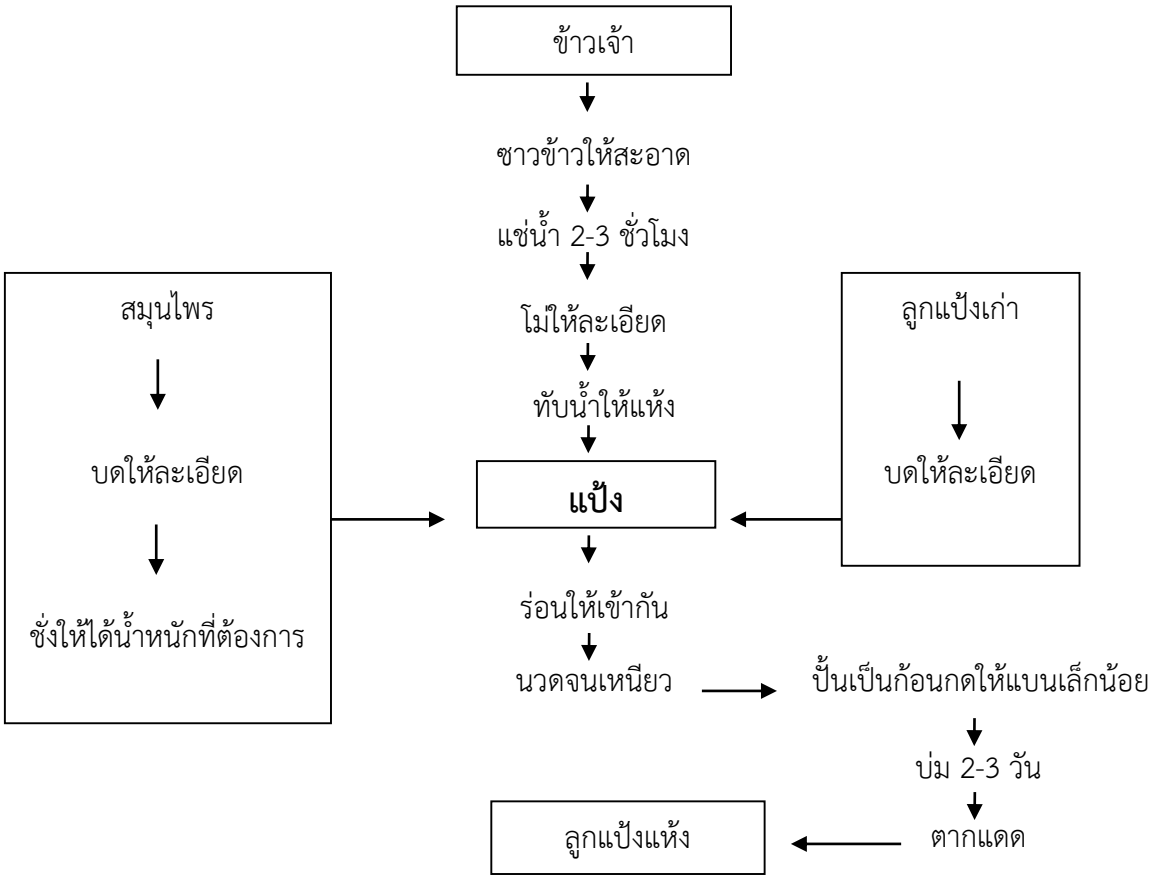
1.1.3.2 บดสมุนไพรชนิดแห้งให้ละเอียด สมุนไพรสดอาจจะนำไปบดพร้อมกับข้าว

1.1.3.3 ผสมแป้งและสมุนไพรกับลูกแป้ง (ลูกแป้ง 5 กรัมต่อแป้ง 1 กิโลกรัม) ที่บดละเอียดให้เข้ากันโดยการร่อยหรือปั่นด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้าความเร็วต่ำๆ เติมน้ำหรือน้ำต้มชะเอมในปริมาณที่เมื่อนวดแป้งแล้วปั้นเป็นก้อนได้ ปริมาณน้ำที่ใช้นั้นกำหนดได้ไม่แน่นอนขึ้นกับความแห้งของแป้งที่ใช้ ปริมาณสมุนไพรสดซึ่งแตกต่างกันในแต่ละตำรับและสภาวะความชื้นในบรรยากาศขณะบ่มลูกแป้ง ซึ่งต้องอาศัยประสบการณ์ของผู้ผลิต

1.1.3.4 เมื่อนวดแป้งจนเหนียวแล้วจึงปั้นเป็นก้อนกลมขนาดต่างๆ กันตามชนิดของลูกแป้งในการผลิตลูกแป้งเหล่านั้น พบว่าการหมักแป้งที่นวดไว้แล้วประมาณ 6-12 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาปั้นจะได้ลูกแป้งที่มีคุณภาพดีกว่าที่ปั้นโดยไม่หมักแป้ง

1.1.3.5 เรียงลูกแป้งบนกระด้งหรือภาชนะก้นโปร่งอื่นๆ ให้แต่ละลูกห่างกันเล็กน้อย เนื่องจากเมื่อจุลินทรีย์เจริญจะทำให้ลูกแป้งฟูขึ้น ส่วนของลูกแป้งด้านที่ติดกับภาชนะแบนราบตามผิวที่สัมผัส โดยที่ด้านบนยังคงรูปร่างโค้งเป็นครึ่งวงกลม สำหรับการปั้นลูกแป้งขนาดใหญ่เมื่อเรียงบนภาชนะแล้วควรกดด้านบนลงเล็กน้อย เพื่อให้ลูกแป้งบางลง จุลินทรีย์ภายในก้อนแป้งจะมีโอกาสรับอากาศมากขึ้น

1.1.3.6 เมื่อเรียงลูกแป้งเต็มภาชนะแล้ว โรยผงลูกแป้งที่เตรียมไว้ลงบนผิวของลูกแป้งที่ปั้นใหม่ โดยใช้ผงลูกแป้งประมาณ 15 กรัม ต่อสูตรที่ใช้แป้ง 1 กิโลกรัม คลุมภาชนะด้วยผ้าหนาๆ โดยไม่ให้ผ้าสัมผัสกับผิวลูกแป้ง บ่มประมาณ 48 ชั่วโมงนำไปตากแดดให้แห้งแล้วเก็บในภาชนะที่ฝาปิดสนิท การที่ลูกแป้งได้รับแสงแดดโดยตรงจะทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ลดลงไปบ้าง ซึ่งเป็นผลจากรังสีอัลตาไวโอเลต (UV) ดังนั้นควรตากลูกแป้งโดยมีแผ่นกระจกใสกั้นแสงอยู่ด้านบน โดยเว้นระยะห่างระหว่างผิวลูกแป้งและกระจกให้อากาศถ่ายเทได้



ภาพที่ 1.1 แผนภูมิการผลิตลูกแป้ง

ที่มา : ดัดแปลงจาก นภา โลห์ทอง, 2534; โชคชัย วนภู และคณะ, 2546)

1.1.4 จุลินทรีย์ในลูกแป้ง

ลูกแป้งเป็น “กล้าเชื้อผสม” (Mixed culture) ที่มีทั้งรา ยีสต์และแบคทีเรีย

1.1.4.1 รา

ราที่ตรวจพบในลูกแป้งจากทุกๆแหล่งที่มีรายงานการศึกษา ได้แก่ *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus* spp ปริมาณที่พบมากน้อยนั้นขึ้นกับชนิดของลูกแป้ง เชื้อหลักที่พบในลูกแป้งข้าวหมากได้แก่ *A. rouxii* ซึ่งส่วนใหญ่พบประมาณ 10^4 CFU ต่อกรัม ส่วนลูกแป้งที่ปั้นใหม่ๆ จะพบถึง $1.5 \times 10^5 - 2.7 \times 10^5$ CFU ต่อกรัม จุลินทรีย์นี้มีปรากฏเพียง species เดียว และไม่มีรายงานว่าแยกได้จากธรรมชาติ ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นเชื้อผ่าเหล่าอย่างถาวรมาจาก *Rhizopus* spp. ในการแยกเชื้อจากลูกแป้งในระยะแรกๆ ได้จัดจำแนกจุลินทรีย์นี้เป็น *Chlamydomucor rouxii*, *C. japonicas*. *C. rouxiznus* และ *Rhizopus chlamydosporus*

- ลักษณะที่สำคัญของรา

ราเป็นยูคาริโอต เคโมออร์แกโนโทรฟ ไม่มีคลอโรฟิลล์ ดำรงชีวิตแบบแอโรบ (aerobe) หรือแฟคัลเตตีฟแอนแอโรบ(facultative anaerobe) มีลักษณะเป็นทัลลัส (thullus) อาจเป็นเซลล์เดียว เช่น ยีสต์ แต่ส่วนใหญ่ประกอบด้วยหลายเซลล์มาต่อกันเป็นสายยาว มีผนังเซลล์ประกอบด้วยเซลลูโลส(cellulose) หรือไคติน(chitin) อย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองอย่าง และมีสปอร์เพื่อการสืบพันธุ์

- สัณฐานวิทยาของรา

รามีทั้งชนิดเป็นเซลล์เดียว เช่น ยีสต์ และที่เป็นหลายเซลล์เรียงเป็นสายใย(hypha) กลุ่มของเส้นใยเรียกว่าไมซีเลียม (mycelium) เส้นใยทั่วไปมีความกว้าง 5-10 ไมโครเมตร และมีความยาวมาก เส้นใยประกอบด้วยผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์และช่องว่างภายในที่บรรจุโพโทรพลาซึม เยื่อหุ้มเป็นเยื่อสองชั้นล้อมรอบโพรโทพลาซึม ส่วนผนังเซลล์ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลส(hemicellulose) หรือไคติน ในราชั้นต่ำผนังเซลล์ประกอบด้วยเซลลูโลส

การเจริญของเส้นใยเกิดทางด้านใกล้ปลาย โดยมีการยืดตัวบริเวณนั้น เส้นใยจะมีการแบ่งตัวเว้าเข้ามาในเซลล์ (centripetal invagination) และเกิดผนังกั้นโดยเยื่อหุ้มเซลล์คอกเข้ามา เกิดเป็นผนังที่ไม่สมบูรณ์ เพราะมีรูตรงกลางผนังเพื่อให้โพรโทพลาซึมไหลเวียนถึงกันได้ แม้แต่นิวเคลียสก็เคลื่อนที่จากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์ได้

เส้นใยแบ่งเป็น 3 แบบ คือ

- เส้นใยไม่มีผนังกั้น (nonseptate หรือ coenocytic hypha) เส้นใยจะเป็นท่อทะลุถึงกัน มีไซโทพลาซึมและนิวเคลียสต่อเนื่องกัน
- เส้นใยที่มีผนังกั้น และนิวเคลียสอันเดียวในแต่ละเซลล์
- เส้นใยที่มีผนังกั้น และมีนิวเคลียสหลายอันในแต่ละเซลล์

เส้นใยของราที่เจริญแตกแขนงออกไปเรียกว่าไมซีเลียม ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ส่วนที่ยึดเกาะอาหาร (somatic หรือ vegetative mycelium) มีหน้าที่ดูดซึมอาหารที่ย่อยแล้วไปเลี้ยงทัลลัสส่วนต่างๆ และส่วนที่ยื่นไปในอากาศ (aerial หรือ reproductive mycelium) ทำหน้าที่สร้างสปอร์เพื่อการสืบพันธุ์

เส้นใยของราสามารถเปลี่ยนรูปร่างเพื่อทำหน้าที่พิเศษ ได้แก่ ไรซอยด์ (rhizoid) ซึ่งมีลักษณะคล้ายรากพืชยื่นออกมาจากไมซีเลียม ไรซอยด์จะยึดให้รากติดกับผิวอาหารช่วยดูดซึมอาหาร

- การสร้างสปอร์

การสร้างสปอร์ของราแบ่งออกเป็นสองประเภทคือ สปอร์แบบไม่อาศัยเพศ และแบบอาศัยเพศ การสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเกิดขึ้นโดยการแบ่งไมโทซิสและไม่มีการรวมตัวกันของนิวเคลียสของเซลล์ มีหลายชนิด ได้แก่

- โคนิดิโอสปอร์ หรือโคนิเดีย (conidiospore หรือ conidia) เกิดที่ปลายเส้นใยมีทั้งขนาดเล็กที่เรียกว่า ไมโครโคนิเดีย(microconidia) และขนาดใหญ่ เรียกว่า แมโครโคนิเดีย (macroconidia)
- สปอร์แรงกิโอสปอร์ (sporangiospore) เกิดภายในถุงหรืออับสปอร์(sporangium) ซึ่งอยู่ที่ปลายเส้นใยที่เรียกว่าสปอร์แรงกิโอฟอร์ (sporangiophore) สปอร์แรงกิโอสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาเรียกว่า ซูโอสปอร์ (zoospores) ส่วนสปอร์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้เรียกว่า อะพลาโนสปอร์ (aplanospores)
- อาร์โธสปอร์ หรือออยเดีย (arthrospore หรือ oidia) เป็นสปอร์เซลล์เดียวที่เกิดจากเส้นใยหลุดออกมากลายเป็นสปอร์ ตัวอย่างเช่น *Coccidioides immitis*
- แคลมิโอสปอร์ (chlamydospore) เป็นสปอร์เซลล์เดียวผนังหนา คงทนต่อสภาพที่ไม่เหมาะสมได้ ตัวอย่างราที่สร้างสปอร์แบบนี้ คือ *Candida albicans*
- บลาสโตสปอร์ (blastospore) เป็นสปอร์ที่เกิดโดยการแตกหน่อของสปอร์เดิม การสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ เกิดจากการรวมตัวกันของสองนิวเคลียสกลายเป็นไซโกตนิวเคลียสหลังจากนั้นจึงแบ่งตัวแบบไมโอซิสกลายเป็นสปอร์ สปอร์แบบนี้จะมีจำนวนน้อยกว่าที่ได้จากสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ สปอร์แบบอาศัยเพศมีหลายชนิด ได้แก่
- แอสโคสปอร์ (ascospore) เป็นสปอร์ที่เกิดภายในถุง (ascus) มักมี 8 แอสโคสปอร์ต่อ 1 ถุง
- เบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) เป้นสปอร์ที่สร้างบนเบสิเดียม(basidium) โดยสร้างภายนอกที่ปลายก้านสเตอริกมา (sterigma) มักมี 4 สปอร์เกิดบนก้านแต่ละก้าน
- ไซโกสปอร์ (zygospore) เป็นสปอรีขนาดใหญ่ผนังหนา เกิดจาการรวมนิวเคลียสของเส้นใยสองเส้นมาพันกัน
- โอโอสปอร์ (oospore) เป็นสปอร์ที่เกิดภายในโครงสร้างที่เรียกว่า โอโอโกเนียม(oogonium) เกิดจาการรวมนิวเคลียสของไข่หรือโอโอสเฟียร์ (oosphere) กับแกมีตเพศผู้ที่สร้างจากแอนเทอริเดียม

- การดำรงชีวิต

ราเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยสามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมากๆ เช่น แยม

เยลลี่ ซึ่งปกติความเข้มข้นขนาดนี้จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังสามารถทนต่อสภาพความเป็นกรดได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นด้วย

การเจริญของยีสต์บางชนิดเป็นแฟคัลเตตีฟ คือเจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ แต่ราส่วนใหญ่เป็นพวกต้องการอากาศ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของราอยู่ระหว่าง 22-30 องศาเซลเซียส ส่วนพวกที่ทำให้เกิดโรคชอบอุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ราบางชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำขนาด 0 องศาเซลเซียสได้ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารในตู้เย็นเน่าเสีย ราสามารถใช้อาหารได้หลายชนิด เนื่องจากเป็นพวกเฮเทอโรโทรฟจึงสามารถใช้อนินทรีย์คาร์บอน เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ บางชนิดสามารถใช้สารอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น เกลือแอมโมเนียมได้ แต่ต้องการสารอินทรีย์ไนโตรเจนในการสร้างโปรตีน (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2552)

1.1.4.2 ยีสต์

การหมักแอลกอฮอล์คือการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยยีสต์ ในทางทฤษฎีหากใช้น้ำตาล 10 กิโลกรัมจะได้เอทานอล 6.5 ลิตรหรือ 5.1 กิโลกรัมและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 4.9 กิโลกรัม และได้พลังงานในรูปของความร้อน 2.6 เมกาจูลต่อกิโลกรัมของเอทานอล ในทางปฏิบัติจะไม่สามารถผลิตเอทานอลได้ถึง 5.1 กิโลกรัมหรือ 51 เท่าของน้ำตาล เนื่องจากน้ำตาลส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในการเจริญของยีสต์ ส่วนใหญ่จะได้ประมาณ 1.5 ถึง 1.8 กิโลกรัมต่อน้ำตาล 10 กิโลกรัม

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

ภาพที่ 1.2 Alcoholic fermentation (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตจัดอยู่ในจำพวกราเซลล์เดี่ยว ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลอยู่ในสกุลของ *Saccharomyces sp.* ซึ่งมีหลายชนิดได้แก่ *S. cerevisiae, S. bayanus, S. carlsbergensis, S. fermentati* ยีสต์เหล่านี้สามารถหมักได้อย่างรวดเร็ว ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูง และทนทานต่อสภาวะแวดล้อม เช่น ดีกรีแอลกอฮอล์ อุณหภูมิ และค่า pH นอกจากนี้ยีสต์ที่ดีควรตกตะกอนเองได้ง่ายต่อการทำไวน์ใส ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถอยู่ได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีก๊าซออกซิเจน ในการหมักเริ่มต้นจะใช้ออกซิเจนช่วยเพื่อเพิ่มอันราของการแบ่งเซลล์ (แตกหน่อ) เรียกว่า Aerobic เมื่อมีการเจริญมากพอระดับหนึ่งแล้วจะไม่มีนำอากาศเข้าไปในถังหมักอีก ซึ่งสภาวะนี้เรียกว่า Anaerobic ซึ่งในสภาวะนี้เซลล์ของยีสต์จะเริ่มมีการผลิตเอทธานอล หากในช่วงที่มีการผลิตเอทธานอลเซลล์ยีสต์ได้รับก๊าซออกซิเจนมากกลไกการสร้างเอทธานอลของยีสต์ก็จะหยุดลงแต่จะสร้างกรดน้ำส้มขึ้นมาแทนหรือเรียกว่า บูด นั่นเอง

- การเจริญของยีสต์สามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะ คือ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

- ระยะเริ่มต้น (Lag phase) เป็นระยะที่เซลล์กำลังปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่เพื่อเริ่มการเจริญ ระยะนี้จะมีช่วงเวลาสั้นๆประมาณ 1-6 ชั่วโมง ขึ้นกับการเตรียมหัวเชื้อ ความแข็งแรงของเซลล์ ความสดใหม่ของเซลล์ และสารอาหารที่มีอยู่
- ระยะการเจริญ (Log phase หรือ Exponential phase) หลังระยะเริ่มต้นเสร็จสิ้นประมาณ 30 นาที เซลล์ยีสต์เริ่มแตกหน่อเพื่อเพิ่มจำนวน ในระยะนี้จำนวนของเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นทวีคูณหรือเพิ่มแบบค่า log ทางคณิตศาสตร์ ปริมาณของก๊าซคาร์บอนได ออกไซด์ก็จะเพิ่มมากขึ้นจนทำให้เห็นฟองอากาศผุดขึ้นมามากมาย ขณะเดียวกันเซลล์ยีสต์ก็เริ่มจับกลุ่มกันเองมากขึ้น และเริ่มมีการผลิตแอลกอฮอล์
- ระยะคงที่ (Stationary phase) เมื่อสารอาหารเริ่มหมดลงการเจริญหรือการแบ่งเซลล์จะลดน้อยลงด้วย ดังนั้นในช่วงนี้จำนวนเซลล์ของยีสต์จะค่อนข้างคงที่ เซลล์ยีสต์เริ่มมีการตกตะกอนมากขึ้น แอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุด
- ระยะตาย (Death phase) เป็นระยะที่เซลล์ตายตะกอนเซลล์จะมีปริมาณมากขึ้น ปริมาณแอลกอฮอล์จะคงที่ ไวน์ที่ได้จะเริ่มใสมากขึ้น

- ลักษณะของยีสต์

หากดูรูปร่างของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้วจะเห็นว่าไม่มีความแตกต่างกันมากนัก ความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์จะอยู่ที่ความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ ความสามารถทนทานต่อดีกรีของแอลกอฮอล์ การให้กลิ่น สี ความเร็วที่ใช้หมัก ปริมาณฟองที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก ปริมาณการเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น แอลกอฮอล์ชนิดหนัก (Isoamyl alcohol) และสารพิษต่างๆ

การใช้ยีสต์ขนมปัง(Baker’s yeast) มาหมักแอลกอฮอล์ ยีสต์ขนมปังจะกินน้ำตาลมากแต่ให้แอลกอฮอล์ต่ำ ประมาณ 14% ในขณะที่ยีสต์สำหรับทำไวน์สามารถให้แอลกอฮอล์สูงถึง 20% ใช้น้ำตาลน้อยกว่า และให้กลิ่นหอมที่ดีกว่ายีสต์ขนมปังมาก นอกจากนี้ยีสต์ทำไวน์ยังมีคุณสมบัติในการให้สารอินทรีย์อื่นๆในปริมาณน้อยกว่ามาก ได้แก่ อัลดีไฮด์ ฟูเซลออย เอสเทอร์ เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ส่วนมากเป็นอันตรายต่อระบบตับไตและทำให้เกิดอาการปวดหัว

- ชนิดของยีสต์

ยีสต์ที่มีจำหน่ายโดยทั่วไปจะมี 2 ลักษณะ คือ แบบของเหลวหรืออยู่ในสารอาหารเหลว และแบบแห้ง ยีสต์แบบของเหลวมักไม่สะดวกต่อการขนส่ง การใช้งาน และการจัดเก็บ เพราะอายุค่อนข้างสั้นและต้องเก็บในที่เย็น จึงมักนิยมใช้แบบแห้งมากกว่า

- ปัจจัยควบคุมการเจริญของยีสต์

ปัจจัยที่ใช้ในการควบคุมการเจริญของยีสต์จึงมีค่อนข้างมาก ได้แก่

- ก๊าซออกซิเจน

ในสภาวะที่มีอากาศหรือออกซิเจนยีสต์จะสามารถแบ่งตัวเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าได้ในเวลาไม่ถึงชั่วโมงในระยะการเจริญและจะได้เซลล์ยีสต์เป็นหลายล้านเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง การเจริญของยีสต์ในช่วงนี้แต่จะให้ปริมาณแอลกอฮอล์น้อยมาก อีกประการหนึ่งในสภาวะที่มีอากาศนั้นยีสต์จะผลิตกรดน้ำส้มขึ้นมาแทนที่จะเป็นแอลกอฮอล์ทำให้ไวน์มีรสเปรี้ยวและมีกลิ่นบูด ในทางตรงข้ามภาวะที่ไม่มีอากาศยีสต์จะแบ่งเซลล์ได้น้อยกว่าแต่จะสร้างแอลกอฮอล์ได้ดีกว่า ในการหมักด้วยถังขนาดเล็กจึงควรใช้อุปกรณ์ดักอากาศ (Air lock) โดยเติมน้ำเข้าไปในอุปกรณ์เท่านั้นก็สามารถป้องกันไม่ให้อากาศจากภายนอกเข้าสู่ถังได้ แต่จะยอมให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผลิตโดยยีสต์ออกมาจากถังได้

- ไนโตรเจน

การเจริญของยีสต์ต้องการอาหารจำพวกโปรตีนมากเพื่อใช้สร้างเซลล์ใหม่ โปรตีนจะได้จากการสังเคราะห์ภายในเซลล์ของยีสต์โดยใช้ธาตุไนโตรเจนเป็นหลัก โดยปกติปริมาณของไนโตรเจนในน้ำองุ่นที่ใช้ทำไวน์นั้นจะมีอยู่เพียงพอ แต่หากใช้วัตถุดิบอื่นซึ่งอาจมีปริมาณไนโตรเจนไม่เพียงพอสามารถแก้ไขได้โดยการเติมสารที่ให้ไนโตรเจนลงไป ที่นิยมใช้คือ Diammonium -phosphate (DAP)

- สารอาหารเสริม (Micronutrients)

เช่นเดียวกับไนโตรเจน ยีสต์ก็ต้องการอาหารเสริมเพื่อใช้เป็นสารช่วยเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆในเซลล์ สารอาหารเสริมเหล่านี้ได้แก่ วิตามิน และแร่ธาตุ

- คุณสมบัติของยีสต์ที่เหมาะสมในการใช้หมักไวน์ (ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2546)
  - หมักได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ
  - หมักได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูง ทนต่อแอลกอฮอล์สูง
  - หมักไวน์เสร็จแล้วได้ตะกอนดี ทำให้ไวน์ใสง่าย
  - ให้กลิ่นและรสดี
  - ให้ Glycerol ในปริมาณค่อนข้างสูง
  - ไม่ให้กลิ่นแก๊สไข่เน่า (H_2S) หรือให้ในปริมาณที่ต่ำมาก
  - ไม่กลายพันธุ์ (Mutation) ง่าย
  - ไม่ก่อให้เกิดฟอง (Foam) มากในระหว่างการหมักไวน์
- ยีสต์ที่พบในลูกแป้ง

ยีสต์ที่พบในลูกแป้งข้าวหมากส่วนใหญ่ได้แก่ *Endomycopsis* spp. เช่น *H. malanga* โดยมี *Saccharomyces cerevisiae* ปนมาบ้าง ส่วนลูกแป้งเหล้าจะพบ *S. cerevisiae* ในปริมาณมากกว่า *Endomycopsis* spp. นอกจากนั้นยังมียีสต์อื่นที่พบใน

ลูกแป้งเฉพาะแหล่งได้แก่ *Candida* spp., *Torulopsis* spp. ซึ่งยีสต์ที่พบในลูกแป้งทั่วๆ ไปจะมีปริมาณสูงถึง $5 \times 10^6 - 8 \times 10^7$ เซลต่อกรัมของลูกแป้ง (นภา โลห์ทอง, 2534)

1.1.4.3 แบคทีเรีย

สำหรับแบคทีเรียได้มีรายงานการตรวจพบแบคทีเรียแลคติก ซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* โดยพบถึงประมาณ $10^4 - 10^7$ เซลต่อกรัม ขึ้นกับที่มาของลูกแป้ง นอกจาก *P. pentosaceus* แล้ว ในลูกแป้งข้าวหมากจากบางท้องถิ่นยังตรวจพบ *Lactobacillus* spp. และเชื้อน้ำส้มสายชู (*Acetobacter* spp., *Gluconobacter* spp.) *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่พบในลูกแป้งอยู่บ่อยครั้ง เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในปริมาณมากมากับวัตถุดิบ เช่น แป้งและสมุนไพร แต่หากส่วนผสมของสมุนไพรที่ใช้เหมาะสม จะลดปริมาณจุลินทรีย์นี้ไปได้มาก เช่นพบว่า ขิง ชะเอม อบเชย ดอกจันทร์และลูกจันทร์ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (นภา โลห์ทอง, 2534; Vu Nguyen Thanh et al., 2008)

1.2 บทบาทของจุลินทรีย์ในลูกแป้งต่อกระบวนการหมัก

A. rouxii และ *Rhizopus* spp. เป็นราที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ เอนไซม์ที่ผลิตได้มีทั้งแอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ดังนั้นในกระบวนการหมัก เชื้อราเหล่านี้จึงมีบทบาทในการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาล ส่วน *Endomycopsis* spp. และ *Hansenula* spp. เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งเช่นเดียวกัน นอกจากนั้นยังสามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ และเอสเทอร์ ดังนั้นในการหมักข้าวหมาก *A. rouxii* และยีสต์สองสกุลนี้ จึงมีบทบาทในการทำให้เกิดความหวานและผลิตสารที่ให้กลิ่นรสของข้าวหมาก

สำหรับแบคทีเรียแลคติกนั้น ไม่มีรายงานการศึกษาถึงบทบาทที่แน่ชัดโดยเฉพาะในการหมักข้าวหมาก การมีแบคที่เรียเหล่านี้ในปริมาณมาก จะมีผลให้ข้าวหมากเปรี้ยวไม่เป็นที่นิยม ส่วนเครื่องดื่มมึนเมาประเภทกระแช่หรือสาโทนั้น ยีสต์จะเจริญและผลิตแอลกอออล์ได้ดีเมื่อน้ำหมักมี pH ต่ำ (4.2 – 4.5) และการมีกรดในน้ำหมักยังเป็นผลทำให้จุลินทรีย์ปนเปื้อนอื่นๆเจริญได้ช้าลง นอกจากนั้นเครื่องดื่มประเภทนี้ยังนิยมให้มีรสเปรี้ยวเล็กน้อย ดังนั้นแบคทีเรียแลคติกในลูกแป้งจึงมีบทบาทในเรื่องนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งลูกแป้งที่ใช้หมักเหล้าจากข้าวของอินเดียที่เรียกว่า “ซอนนิ” ซึ่งนิยมให้มีรสเปรี้ยวจัด สำหรับการหมักกระแช่หรือสาโทของไทยโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้ง ได้แก่ *A. rouxii* และ *Rhizopus spp.* รวมกับ *S. cerevisiae* น้ำหมักจะมี pH ประมาณ 4.1 – 4.5 อยู่แล้วโดยไม่ต้องเติมแบคทีเรียแลคติก เพราะทั้ง *A. rouxii* และ *Rhizopus spp.* ที่แยกจากลูกแป้งนั้นเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดได้ดี ส่วน *Acetobacter* spp. ที่พบในลูกแป้งข้าวหมาก ถึงแม้จะ

มีในปริมาณน้อยก็จะมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมคุณภาพโดยมีกรดน้ำส้มเกิดขึ้น (นภา โลห์ทอง, 2534)

1.3. กล้าเชื้อท้องถิ่น

จากที่กล่าวมาแล้วในข้างต้น การผลิตไวน์ข้าวแบบดั้งเดิมนั้นมีการใช้กล้าเชื้อท้องถิ่นซึ่งมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศและมีส่วนผสมที่แตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น ส่งผลให้ไวน์ข้าวมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากในกล้าเชื้อท้องถิ่นจะประกอบไปด้วย รา ยีสต์ และแบคทีเรีย ด้วยเหตุนี้จึงมีรายงานวิจัยต่างๆ ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกราและยีสต์บริสุทธิ์จากกล้าเชื้อในท้องถิ่น เพื่อนำไปใช้สำหรับหมักไวน์ข้าวต่อไป ดังเช่น

สุมัลลิกา โมรากุล (2545) ได้คัดแยกเชื้อราและยีสต์เพื่อศึกษาการผลิตไวน์ข้าวโดยใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในการหมักเพื่อลดปัญหาคุณภาพไวน์ไม่คงที่จากการใช้ลูกแป้งซึ่งเป็นกล้าเชื้อผสม โดยคัดแยกจากลูกแป้งโดยตรง พบรา 6 ไอโซเลต คือ M1, M2, M3, M4, M5 และ M6 ยีสต์ 3 ไอโซเลต คือ Y1, Y2 และ Y3 เมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และโปรติเอส พบว่า M2 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับย่อยข้าวมากที่สุด และเมื่อนำ M2 มาทำ slide culture พบว่าคือ *Ammylomyces* sp. M2 เมื่อนำน้ำหมักที่ผ่านการย่อยโดย *Amylomyces* sp. M2 มาหมักด้วยยีสต์ที่แยกได้ เทียบกับ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทางการค้า พบว่า การหมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ทางการค้าให้ไวน์ที่มีกลิ่นรสดีที่สุด

Savitree Limtong, Somporn Sintara, Poonpilai Suwanarit and Napha Lotong (2002) ได้คัดแยกยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า พบว่าในลูกแป้งข้าวหมาก 38 ตัวอย่าง แยกได้ยีสต์ 43 ไอโซเลตและในลูกแป้งเหล้า 19 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 49 ไอโซเลต และเมื่อนำไปจำแนก พบว่า ยีสต์ 31 ไอโซเลตจากลูกแป้งข้าวหมาก และ 20 ไอโซเลตจากลูกแป้งเหล้า คือ *Saccharomycopsis fibuligera* ส่วนไอโซเลตอื่นที่พบในลูกแป้งทั้งสอง ได้แก่ *Pichia anomala* (8), *Issatchenkia orientalis* (6), *P. burtonii* (6), *P. fabianii* (4), *Candida rhagii* (4), *C. glabrata* (3), *Torulaspora globosa* (3), *P. mexicana* (2) และที่แยกได้อย่างละไอโซเลตคือ *P. heimii, Rhodotorula philyla*, *Saccharomyces cerevisiae*, *T. delbrueckii* and *Trichosporon asahii* ซึ่ง *S. fibuligera* เป็นยีสต์สายพันธุ์เดียวที่พบในลูกแป้งข้าวหมาก 23 ตัวอย่าง (60.53%) และลูกแป้งเหล้า 7 ตัวอย่าง (36.84%)

Rungsima Daroonpunt, Somboon Tanasupawat, and Suwimon Keeratipibul (2011) คัดแยกสายพันธุ์ราจากลูกแป้งข้าวหมากจากจังหวัดนครปฐม, ตราด, ชุมพร (4 ตัวอย่าง), สงขลา (4 ตัวอย่าง), นครศรีธรรมราช (6 ตัวอย่าง), ลพบุรี, นครราชสีมา , พัทลุง, กระบี่, และฉะเชิงเทรา และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส จากการศึกษาพบ

รา 100 สายพันธุ์ที่แยกได้จากลูกแป้ง 21 ตัวอย่าง และจากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส พบว่า รา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ LK4-1, LK8-2, LK12-5 และ LK17-1 มีช่วงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่สูงอยู่ในช่วง 0.36 ถึง 0.44 unit/ml และเมื่อนำไปพิสูจน์ พบว่า สายพันธุ์ LK4-1, LK8-2 และ LK12-5 มีลักษณะใกล้เคียงกับ *Amylomyces rouxii* และสายพันธุ์ LK17-1 คือ *Rhizopus microspores*

Jung-Hwa Song, Jae-Ho Kim, Byung-Hak Ahn และ Jong-Soo Lee (2010)ศึกษาสายพันธุ์ที่แตกต่างกันของรา เพื่อดูการผลิตไวน์ข้าวของเกาหลีให้มีคุณภาพร่วมกับสามารถต้านความดันโลหิตได้ดี และเป็นที่ยอมรับ โดยแยกสายพันธุ์ราจากนูรักได้ 867 ไอโซเลต และเลือกมา 24 ไอโซเลต เพื่อนำมาศึกษาต่อโดยวัดจากกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส พบว่า รา No. 17 มีการผลิตเอทธานอลสูงเมื่อทำงานร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* และเมื่อนำ รา No.17 ไปพิสูจน์ลักษณะเฉพาะทางชีวโมเลกุลพบว่าคือ *Rhizopus stolonifer* No.17 ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักไวน์ที่สามารถต้านความดันหิตได้ดีคือ เติม *R. stolonifer* No.17 ลงในโคจิให้ความเข้มข้น 35 sp/g และหมักเป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส *S. cerevisiae*

Dung, Rombouts, Nout (2005) ได้พิจารณาคัดเลือกราที่สามารถสร้างน้ำเชื่อมข้าว และยีสต์ที่สามารถสร้างและทนแอลกอฮอล์จากกล้าเชื้อไวน์ข้าวเวียดนามและหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักไวน์ข้าว เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกล้าเชื้อไวน์ข้าวเวียดนาม (Men) ได้แก่ เชื้อรา และยีสต์ โดยราที่ตรวจพบคือ *Amylomyces rouxii, Amylomyces aff. rouxii, Rhizopus oligosporus* และ *Rhizopus oryzae* ราเหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายสตาร์ช รวมถึงสร้างกลูโคสและเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสได้ในขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาลของข้าวเหนียวม่วง รา *A. rouxii* ทำงานได้ดีสามารถสร้างกลูโคสได้มากถึง 25 % (w/w) และมีค่าการทำงานของเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสสูงถึง 0.6 U/g ยีสต์สายพันธุ์ที่แยกได้มีความคล้ายกับ *Saccharomyces cerevisiae* โดยเลือกจากคุณสมบัติการสร้างแอลกอฮอล์ที่ดี ความทนทานต่อแอลกอฮอล์ของ *S. cerevisiae* ในการทดสอบ challenge tests มีค่าเท่ากับ 9–10% (w/v), and 13.4% (w/v) ภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลคือ การเติมเชื้อราลงไปในข้าวนึ่งสุก 5 log cfu/g และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สำหรับในช่วงหมักแอลกอฮอล์นั้นมีภาวะที่เหมาะสมกับการหมักคือ เติมยีสต์ลงในน้ำเชื่อมข้าว 5.5 log cfu/ml และบ่มที่อุณหภูมิ 28.3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

Thitisararak, Plumcharoen and Rungsardthong (2003) คัดแยกรา 2 สายพันธุ์จากลูกแป้งเหล้า ได้แก่ *Aspergillus* sp. และ *Rhizopus* sp. จากนั้นนำมาทำกล้าเชื้อบริสุทธิ์แบบแห้ง นำไปหมักข้าวเหนียวที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับข้าว

เหนียวที่หมักด้วยลูกแป้งเหล้า พบว่าการหมักด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์แบบแห้งให้ผลิตภัณฑ์ที่ดีกว่าผลิตภัณฑ์ที่หมักด้วยลูกแป้งเหล้าในด้านกลิ่นรส และความนุ่มนวลของผลิตภัณฑ์

Savitree Limtong et al. (2002) ได้คัดแยกยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก 38 ตัวอย่างและลูกแป้งเหล้า 19 ตัวอย่าง พบว่าในลูกแป้งข้าวหมาก 31 ตัวอย่าง มียีสต์อยู่ในช่วง $3.9 \times 10^4 - 2{,}9 \times 10^7$ ซึ่งอีก 7 ตัวอย่างไม่พบยีสต์ ส่วนในลูกแป้งเหล้าพบยีสต์ทั้งหมดใน 19 ตัวอย่างอยู่ในช่วง $2.9 \times 10^4 - 5.0 \times 10^7$ และเมื่อนำยีสต์จากลูกแป้งทั้งสองชนิดไปจัดจำแนกสายพันธุ์ พบว่า ยีสต์ 31 ไอโซเลตจากลูกแป้งข้าวหมากและ 20 ไอโซเลตจากลูกแป้งเหล้า คือ *Saccharomycopsis fibuligera*. ส่วนยีสต์สายพันธุ์อื่นที่พบในลูกแป้งทั้งสองชนิด ได้แก่ *Pichai anomala*(8), *Issatchenkia orientalis*(6), *P. fabianii*(6), *Candida rhagii*(4), *C. glabrata*(3), *Torulaspora*(3), *P. Mexicana*(2) และที่พบอย่างละไอโซเลตได้แก่ *P. heimii, Rhodotorula philyla, Saccharomyces cerevisiae, T. delbrueckii* และ *Trichosporon asahii*

มณชัย เดชสังกรานนท์ (2546) ได้คัดแยกรา *Amylomyces* และ *Rhizopus* จากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้าแล้วนำมาเลี้ยงในข้าวเหนียวนึ่ง พบว่าราทั้งสองสกุลมีบทบาทในการหมักข้าวต่างกัน โดย *Amylomyces* spp. จะผลิตกรดได้ต่ำประมาณ 0.88-1.29 % ส่วน *Rhizopus* spp. จะผลิตกรดได้ประมาณ 3.7-4.3 % จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งบนอาหาร Rose Bengal dichloran chloramphenical agar (RBDC) ที่มี soluble starch 4 % พบว่าราทุกไอโซเลตย่อยแป้งได้น้อย โดยมีอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีน้อยกว่า 1 แต่ไม่เท่ากับ 0 โดย *Rhizopus* spp. ย่อยแป้งเป็นน้ำตาลได้ต่ำกว่า *Amylomyces* spp.

จากรายงานวิจัยต่างๆที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่าในกล้าเชื้อผสมแต่ละท้องถิ่น และแต่ละประเทศนั้นมีจุลินทรีย์ต่างๆ อยู่มากมาย ซึ่งสามารถสรุปรายงานการคัดแยกราและยีสต์จากกล้าเชื้อผสมได้ดังในตารางที่ 1.4

1.4. กล้าเชื้อบริสุทธิ์

จากการศึกษาถึงบทบาทของจุลินทรีย์ในลูกแป้งชนิดต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ทำให้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ราและยีสต์คุณภาพดีและมีประสิทธิภาพในการหมัก มาใช้ในการผลิตกล้าเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อให้ได้กล้าเชื้อที่สม่ำเสมอ ทุกวันนี้ไม่เพียงแต่จะมีการศึกษาเกี่ยวกับการแยกเชื้อจากลูกแป้งเท่านั้น ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการนำเชื้อบริสุทธิ์ซึ่งมีความหลากหลายทางสายพันธุ์มาผลิตเป็นกล้าเชื้อเพื่อปรับปรุงการผลิตไวน์ข้าวให้ได้คุณภาพสูงขึ้น จึงมีรายงานการศึกษาต่างๆ ที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์ในการผลิตไวน์ข้าว เช่น

ตารางที่ 1.4 ราและยีสต์ที่แยกได้จากกล้าเชื้อผสมของแต่ละประเทศ

ประเทศ	งานวิจัย	กล้าเชื้อท้องถิ่น	รา	ยีสต์	อ้างอิง
ไทย	ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของรา	ลูกแป้งข้าวหมาก	*Amylomyces rouxii, Rhizopus microsporus*	-	Rungsima Daroonpunt et al., (2011)
ไทย	แยกยีสต์บริสุทธิ์	ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้า	-	*Saccharomycopsis fibuligera*, *Pichia anomala*, *Issatchenkia orientalis, P. burtonii*, *P. fabianii*, *Candida rhagii , C. glabrata*, *Torulaspora globosa, P. Mexicana*, *P. heimii, Rhodotorula philyla*, *Saccharomyces cerevisiae*, *T. delbrueckii* และ *Trichosporon asahii*	Savitree Limtong et al., (2002)
ไทย	แยกราและยีสต์บริสุทธิ์	ลูกแป้งข้าวหมาก (เชียงใหม่)	*Aspergillus* sp., *Mucor* sp. และ *Rhizopus* sp	*Candida krusii* , *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida* sp.	อรัญญา มโนสร้อย และคณะ, (ม.ป.ป.)

ตารางที่ 1.4 ราและยีสต์ที่แยกได้จากกล้าเชื้อผสมของแต่ละประเทศ (ต่อ)

ประเทศ	งานวิจัย	กล้าเชื้อท้องถิ่น	รา	ยีสต์	อ้างอิง
ไทย	ศึกษาการหมักของกล้าเชื้อบริสุทธิ์และกล้าเชื้อผสม	ลูกแป้งเหล้า	*Aspergillus* sp. *Rhizopus* sp.	-	Thitisararak, Plumcharoen and Rungsardthong (2003)
ไทย	คัดแยกและจัดจำแนกยีสต์จากลูกแป้ง	ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้า	-	*Saccharomycopsis fibuligera*. *Pichai anomala*, *Issatchenkia orientalis*, *P. fabianii*, *Candida rhagii*, *C. glabrata*, *Torulaspora*, *P. Mexicana*, *P. heimii, Rhodotorula philyla, Saccharomyces cerevisiae, T. delbrueckii* และ *Trichosporon asahii*	Savitree Limtong et al. (2002)
ไทย	การหมักของราสองสกุลที่คัดแยกได้จากลูกแป้ง	ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้า	*Amylomyces* spp. *Rhizopus* spp.	*Saccharomycopsis fibuligera*	มณชัย เดชสังกรานนท์ (2546)

ตารางที่ 2-7 ราและยีสต์ที่แยกได้จากกล้าเชื้อผสมของแต่ละประเทศ (ต่อ)

ประเทศ	งานวิจัย	กล้าเชื้อท้องถิ่น	รา	ยีสต์	อ้างอิง
เวียดนาม	แยกราบริสุทธิ์	Men	*Amylomyces rouxii, Amylomyces aff. rouxii, Rhizopus oligosporus* และ *Rhizopus oryzae*	-	Dung et al., (2005)
เกาหลี	ศึกษากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส ของรา	Nuruk	*Rhizopus stolonifer*	-	Jung-Hwa Song et al., (2010)
อินเดีย	แยกยีสต์บริสุทธิ์	Hamei	-	*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala, Trichosporon sp., Candida tropicalis, Pichia guilliermondi, Candida parapsilosis, Torulaspora delbrueckii, Pichia fabianii* และ *Candida montana*	K. Jeyaram et al., (2008)

สุนันทา วงศ์ปิยชน, ละม้ายมาศ ยังสุข, พูลศรี สว่างจิต (2546) ศึกษาคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมของราและยีสต์ในการผลิตไวน์ข้าว ในการคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus oryzae จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่* TISTR No.3031, 3065, 3086, 3147, 3191, 3222, 3232, 3250, 3256 และ 3373 พบว่า รา 3 สายพันธุ์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง ได้แก่ TISTR No.3222 No. และNo.3147 ส่วนการคัดเลือก *Saccharomyces cerevisiae จำนวน 10 สายพันธุ์คือ* TISTR No. 5003, 5039, 5055, 5094, 5161, 5169, 5196, 5197, 5278 *และ* Kyo-kai พบว่ายีสต์ 3 สายพันธุ์มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ค่อนข้างสูง คือ TISTR No.5169, No.5196 และ No.5197 และจากการทดสอบทางประสาทสัมผัส เชื้อ No.5197 จะให้กลิ่นรสของไวน์ข้าวดีกว่าสายพันธุ์อื่น

สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา (2546) ศึกษาการใช้กล้าเชื้อราบริสุทธิ์ในการผลิตไวน์ข้าวแทนลูกแป้งพื้นบ้าน โดยแยกเชื้อรา *Amylomyces* sp. M2 จากลูกแป้ง เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ดีบนรำข้าวสาลี โดยมีปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดเท่ากับ 27.13 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง ภายในเวลา 5 วัน ของการเติบโต และมีปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะมิเลส และโปรติเอส เท่ากับ 883.40, 46.84 และ 426.31 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ กล้าเชื้อรานี้เมื่อนำมาทำให้แห้งโดยมีความชื้น 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยข้าวเหนียวได้ใกล้เคียงกับกล้าเชื้อราสดและลูกแป้ง แต่ย่อยข้าวเจ้านาปรังได้ดีกว่า และให้ปริมาณกรดจากการย่อยข้าวทุกชนิดต่ำกว่าลูกแป้ง

Thitisararak, Plumcharoen และ Rungsardthong (2003) ศึกษาการผลิตกล้าเชื้อแห้งจากเชื้อราบริสุทธิ์ 2 ไอโซเลตคือ *Aspergillus* sp. และ *Rhizopus* sp. และเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ 3 ไอโซเลต คือ Y01, Y02, Y03 ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าของไทยโดยนำเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์ทั้งหมดมาผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน จากนั้นนำมาหมักไวน์ข้าวโดยเปรียบเทียบกับไวน์ข้าวที่หมักด้วยลูกแป้งทางการค้า พบว่ากล้าเชื้อที่ผลิตจากเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์ได้รับการยอมรับทางประสาทสัมผัสทางด้านกลิ่น และความนุ่มมากกว่าไวน์ข้าวที่หมักด้วยลูกแป้งทางการค้า

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่ได้จากการหมักข้าว เช่น ไวน์ข้าวเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการผลิตกันมานานหลายร้อยปีในประเทศแถบทวีปเอเชียรวมทั้งประเทศไทย (ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2546) โดยการผลิตไวน์ข้าวแบบดั้งเดิมนั้นมีการใช้กล้าเชื้อท้องถิ่นซึ่งมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ เช่น Chu ของประเทศจีน Nuruk ของประเทศเกาหลี Koji ของประเทศญี่ปุ่น Ragi ของอินโดนีเซียและมาเลเซีย Bubod ของประเทศฟิลิปปินส์ Marchaa ของประเทศอินเดีย (โชคชัย วนภู และคณะ, 2546) Men ของประเทศเวียดนาม (Dung, Rombouts, Nout, 2005) และ ลูกแป้ง (Look-pang) ของประเทศไทย ไวน์ข้าวที่ผลิตใน

ประเทศไทยนั้นส่วนใหญ่ทำมาจากข้าวเหนียว (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว) เมื่อนำมาทำให้สุกและคลุกกับลูกแป้งซึ่งคือกล้าเชื้อจุลินทรีย์ (Inoculum) ที่เก็บในรูปเชื้อแห้งเพื่อใช้ในการหมัก ภายในลูกแป้งประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนแป้งในข้าวหรือธัญพืชและพืชหัวอื่นๆให้เป็นน้ำตาล (Sacchrification) สำหรับผลิตอาหารหมักประเภทข้าวหมาก สุราและเมรัย เช่น กระแช่ สาโท หรือ อุ

การผลิตลูกแป้งเป็นการใช้ภูมิปัญญาชาวบ้านที่มีความหลากหลายและแตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่นขึ้นอยู่กับส่วนผสมที่ใช้ทำลูกแป้ง จากงานวิจัยที่ผ่านมารายงานว่า ลูกแป้งประกอบด้วยแป้งข้าวเจ้า สมุนไพรต่างๆ ที่ใช้เป็นองค์ประกอบพื้นฐานร่วมกัน ได้แก่ กระเทียม พริกไทย ขิง ข่า และจุลินทรีย์ ได้แก่ รา เช่น *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus* spp. ยีสต์ เช่น *Endomycopsis* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* spp. และแบคทีเรีย เช่น *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus* spp. (นภา โล่ห์ทอง, 2534; Vu Nguyen Thanh et al., 2008) และยังพบว่าราและยีสต์เป็นจุลินทรีย์หลักที่พบในลูกแป้งและมีบทบาทสำคัญต่อการหมักไวน์ข้าว ซึ่งประกอบด้วยกระบวนการสองขั้นตอนได้แก่ การย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาล (Saccharification) โดยรา และยีสต์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ (Alcoholic fermentation) อย่างไรก็ตามเนื่องจากลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อท้องถิ่นที่ได้จากธรรมชาติจึงอาจทำให้มีจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่มีความจำเป็นต่อการหมักไวน์ข้าวและยังเป็นสาเหตุที่ทำให้ไวน์ข้าวมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอหรือเกิดการเสื่อมเสียได้ (สุมัลลิกา โมรากุล, 2545) ส่วนปลายข้าวเหนียวนั้นเป็นผลพลอยได้ประมาณ 15% จากกระบวนการสีข้าวเหนียว มีราคาต่ำ แต่เป็นแหล่งให้พลังงานที่ดีจึงนำเอาปลายข้าวเหนียวมาใช้ผสมเป็นสูตรอาหารสุกรและสัตว์ปีกได้โดยไม่มีข้อจำกัด อย่างไรก็ตามการนำปลายข้าวเหนียวมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตภัณฑ์ข้าวหมักและไวน์ข้าวนั้นก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถเพิ่มมูลค่าให้กับนอกเหนือจากการนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกราและยีสต์จากลูกแป้งท้องถิ่นเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์สำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวหมัก ได้แก่ ไวน์ข้าวจากปลายข้าวเหนียว

3. วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1. คัดแยกราและยีสต์จากลูกแป้งที่มีจำหน่ายในตลาดหนองมน ต.แสนสุข และตลาดศรีราชา อ.ศรีราชา จังหวัดชลบุรี ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ (cultural method)
2. ศึกษาสมบัติการหมักของกล้าเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์สำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวหมัก

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. กล้าเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์จากลูกแป้งสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวหมัก
2. รูปแบบการหมักผลิตภัณฑ์ข้าวหมักด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากลูกแป้ง

5. รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย

5.1 ลูกแป้ง

ลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่นิยมใช้ผลิตข้าวหมากและไวน์ข้าวในแต่ละท้องถิ่นมาเป็นเวลานาน ลูกแป้งประกอบด้วยแป้งข้าวเจ้า สมุนไพร และ ลูกแป้งเก่าที่ประกอบด้วยรา ยีสต์ และแบคทีเรีย ในแต่ละท้องถิ่น ในการทดลองนี้จึงนำลูกแป้งจาก 2 แหล่งได้แก่ ตลาดศรีราชาและตลาดหนองมนมาคัดแยกราและยีสต์เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตไวน์ข้าว โดยเก็บไว้ในเดซิเคเตอร์ตลอดการทดลอง

5.2 การคัดแยกรา

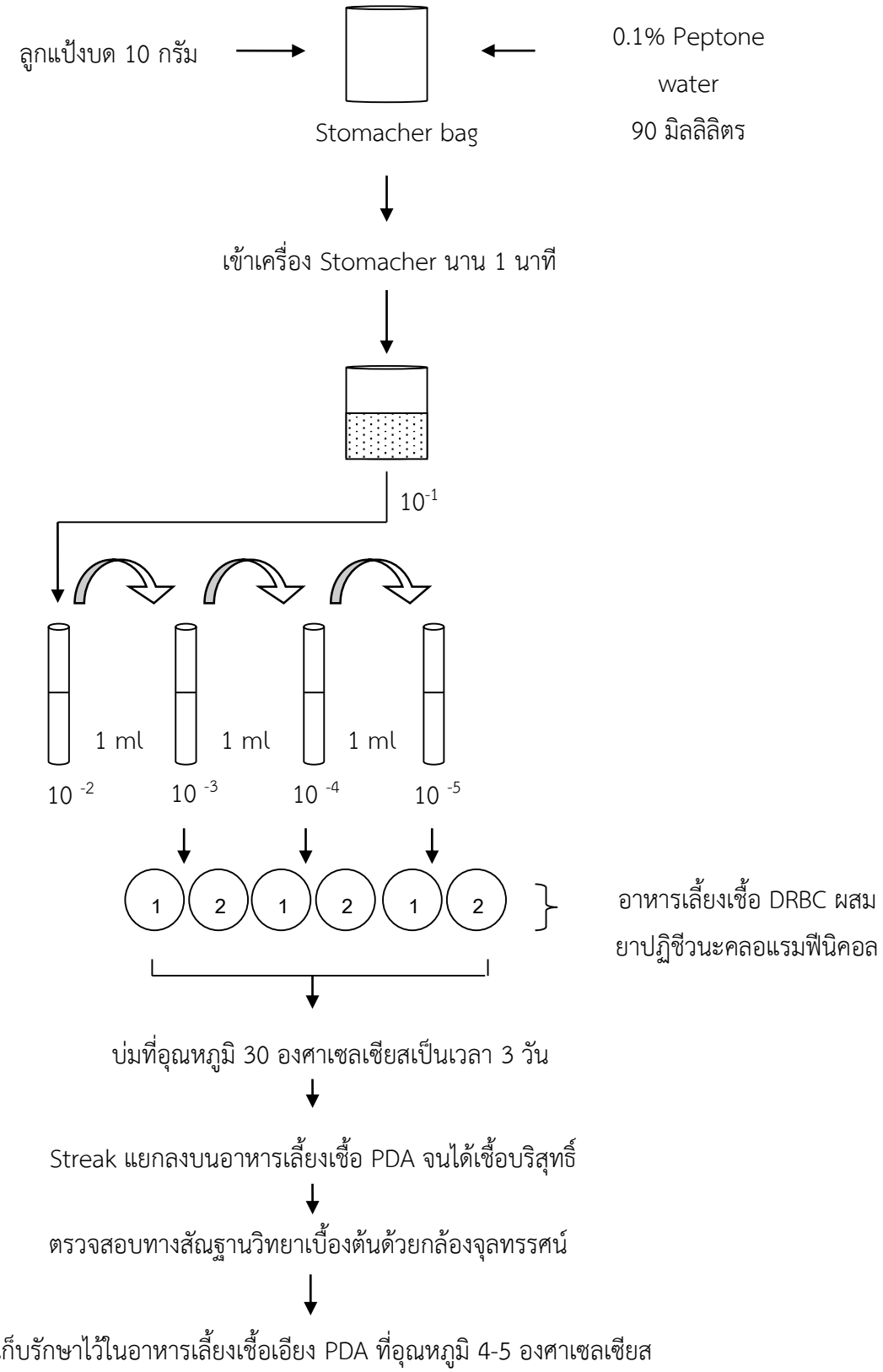
สุ่มลูกแป้งจำนวน 4 ลูก มาบดผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยโกร่งที่ปราศจากเชื้อแล้วนำไปแยกราตามวิธีของ สุมัลลิกา โมรากุล (2545) โดยชั่งลูกแป้ง 10 กรัม ใส่ลงในถุง Stomacher แล้วเติม Peptone water ความเข้มข้น 0.1% ปริมาณ 90 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันในเครื่อง Stomacher จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร มาเจือจาง 10 เท่า แล้วปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5}) ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC ด้วยวิธีสเปรดเพลต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำมานับจำนวนประชากรทั้งหมดจัดกลุ่มราตามลักษณะโคโลนี สังเกตและบันทึกรูปร่าง ลักษณะและขนาดของโคโลนี ลักษณะของเส้นใย สีของสปอร์ และสีใต้โคโลนี แล้วสุ่มเลือกโคโลนีที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันตามตาราง Krejcie and Morgan (Krejcie, and Morgan, 1970) มา streak แยกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อีกครั้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ทำซ้ำจนกระทั่งได้ราบริสุทธิ์ นำราที่ได้ไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 200 เท่า เพื่อจัดจำแนกต่อไป (ภาคผนวก ง1) เก็บราที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเอียง (PDA Slants) ที่อุณหภูมิ 4 – 5 องศาเซลเซียส ขั้นตอนการคัดแยกราจากลูกแป้งแสดงดังภาพที่ 2.1

5.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งเบื้องต้น

5.3.1 Starch agar diffusion test

นำราที่คัดแยกได้ มาตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งเบื้องต้นโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อนำเส้นใยรามาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งของราโดยหยดสารละลายไอโอดีนความเข้มข้น 0.25% บริเวณรอบโคโลนีของรา (เพื่อให้เห็นบริเวณใสได้ชัดเจน) สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้น วัดขนาดของบริเวณใสและโคโลนีด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ แล้วคำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยแป้งของราจาก

$$\text{Saccharification ability} = \frac{\text{Diameter of clear zone (cm)}}{\text{Diameter of colony (cm)}}$$



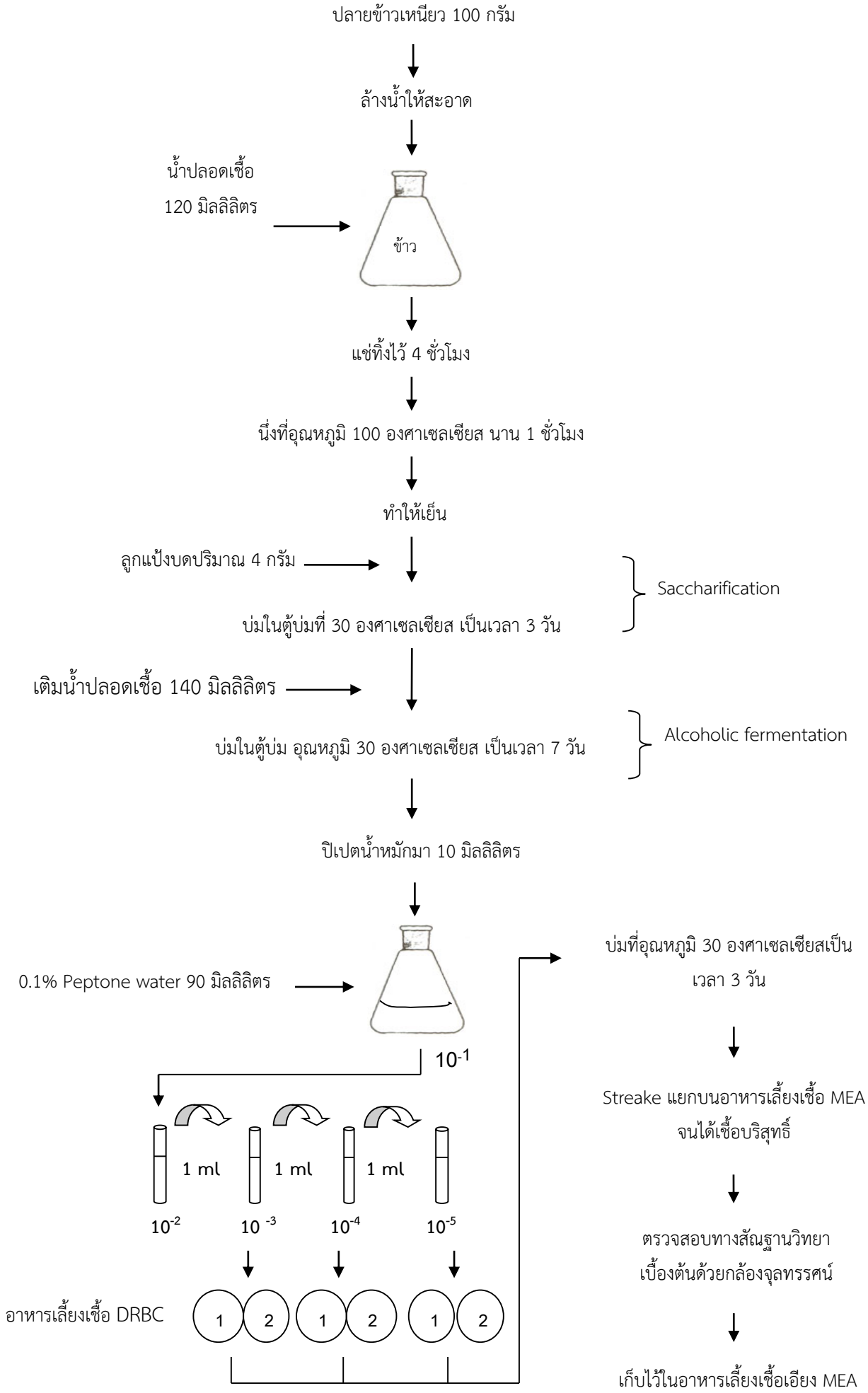
ภาพที่ 5.1 การคัดแยกราจากลูกแป้ง

5.3.2 Saccharification test of broken glutinous rice

นำราบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเอียง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน มาเติมน้ำเกลือปลอดเชื้อ 0.85% w/v NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (Dung et al., 2005b) จากนั้นใช้ลูปเขี่ยเชื้อขูดสปอร์รา ได้เป็นสารละลายสปอร์ราแล้วนำไปหาความเข้มข้นเริ่มต้นโดยใช้ Haemacytometer จากนั้นนำปลายข้าวเหนียว 200 กรัม ล้างน้ำให้สะอาด แล้วใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดเชื้อ 240 มิลลิลิตร และแช่ข้าวทิ้งไว้นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงที่อุณหภูมิประมาณ 35-40 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมกล้าเชื้อราให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 5 log spore/g ปลายข้าว (กล้าเชื้อ 4 มิลลิลิตร/ปลายข้าว 50 กรัม) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วเก็บตัวอย่างวันสุดท้ายเพื่อวิเคราะห์ค่า Total Soluble Solid (TSS) และ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Lane and Eynon คัดเลือกกล้าเชื้อราบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยข้าวสูงสุด จากค่า TSS และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีค่าสูงสุดเพื่อใช้เป็นกล้าเชื่อสำหรับผลิตไวน์ข้าวในการทดลองขั้นต่อไป

5.4 การคัดแยกยีสต์

ชั่งปลายข้าว 100 กรัม นำมาซาวน้ำให้สะอาด จากนั้นใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดเชื้อลงไป 120 มิลลิลิตร แช่ข้าวไว้ 4 ชั่วโมง นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นถึงที่อุณหภูมิประมาณ 35 – 40 องศาเซลเซียส ใส่ลูกแป้งบดละเอียดจำนวน 4 กรัม ลงไปผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (Saccharification) จากนั้นนำมาเติมน้ำปลอดเชื้อปริมาณ 140 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (Alcoholic fermentation) (ดัดแปลงจาก Dung et al., 2005) ปิเปตน้ำข้าวหมักมา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน peptone water ความเข้มข้น 0.1% ปริมาณ 90 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่าง 10 เท่า เป็นลำดับ แล้วปิเปตตัวอย่างระดับความเจือจางที่เหมาะสมมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA (สุมัลลิกา โมรากุล, 2545) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน นับจำนวนประชากรยีสต์ทั้งหมดและจัดกลุ่มยีสต์ตามลักษณะโคโลนี และตรวจสอบทางลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นด้วยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า เก็บยีสต์ที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเอียง (MEA slants) ที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำไปเตรียมเป็นกล้าเชื้อยีสต์บริสุทธิ์สำหรับผลิตไวน์ข้าวในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 5.2 การคัดแยกยีสต์จากลูกแป้ง

5.5 การทดสอบการหมักผลิตภัณฑ์ด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์

การหมักไวน์ข้าวแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการ คือ Saccharification เป็นการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสโดยราที่มีเอนไซม์จำพวก อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ส่วนกระบวนการที่สอง คือ การหมักน้ำตาลกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์ซึ่งเกิดจากการทำงานของยีสต์ เรียกว่า Alcoholic fermentation การทดลองนี้จึงนำราที่คัดเลือกได้ มาใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับย่อยข้าวให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลและใช้ยีสต์ที่คัดแยกได้และ *Saccharomyces serevisiae* ทางการค้ามาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักน้ำตาลให้เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ เตรียมกล้าเชื้อยีสต์โดยนำน้ำเชื่อมข้าวที่ได้จากการหมักด้วยกล้าเชื้อราบริสุทธิ์ (Saccharification) มาวัด °Brix และปรับให้ได้ TSS ประมาณ 10-13% นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วใช้ลูปเขี่ยเชื้อนำยีสต์ที่แยกได้ใส่ลงในน้ำเชื่อมข้าวนำไปเข้าเครื่อง shaker ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 20 ชั่วโมง (โชคชัย วนภู และคณะ, 2546) จากนั้นชั่งปลายข้าว 200 กรัม ล้างน้ำให้สะอาด แล้วใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดเชื้อ 240 มิลลิลิตร และแช่ข้าวทิ้งไว้นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงที่อุณหภูมิประมาณ 35-40 องศาเซลเซียส เติมกล้าเชื้อราเริ่มต้นประมาณ 5 log spore/g ปลายข้าว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำน้ำเชื่อมข้าวที่ได้มาปรับค่า TSS เริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 20 °Brix นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นและเติมกล้าเชื้อยีสต์ลงไปให้ได้ปริมาณยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 cfu/mL แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อติดตามวิเคราะห์ผลทางจุลชีววิทยาและเคมี ได้แก่ pH Total Soluble Solid (TSS) ปริมาณแอลกอฮอล์ และ Titratable Acidity (TA) ในรูปกรดแลกติก เปรียบเทียบกับไวน์ข้าวทางการค้าของประเทศไทย

56. การวิเคราะห์ทางสถิติ

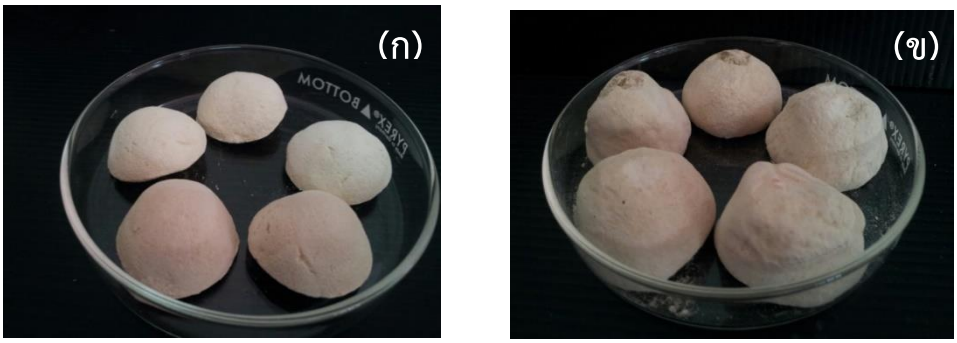
ดำเนินการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ Saccharification ability ด้วยโปรแกรม SPSS version 15.0 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ภาพที่ 5.3 การหมักไวน์ข้าวด้วยกล้าเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์

6. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นแบบแห้งที่ใช้ในอาหารและเครื่องดื่มหมักหลายชนิดมาเป็นเวลานาน จากการศึกษากรรมวิธีการผลิตลูกแป้งจะเห็นได้ว่าชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในลูกแป้งนั้นขึ้นอยู่กับส่วนผสมของลูกแป้งที่เป็นสูตรเฉพาะของแต่ละท้องถิ่น ลูกแป้งถูกนำมาใช้สำหรับการผลิตอาหารหมักที่อาศัยกิจกรรมการเปลี่ยนแป้งในวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาล เช่น ข้าวหมาก สุราและเมรัย เช่น กระแช่ สาโท หรือ อุ เป็นต้น การผลิตลูกแป้งจะใช้แป้งข้าวเจ้าหรือแป้งข้าวเหนียวมาผสมกับสมุนไพรซึ่งอาจเป็นสมุนไพรสดหรือแห้ง จากนั้นปั้นเป็นก้อน โดยรูปร่างและขนาดขึ้นอยู่กับแต่ละประเทศ เช่น ลูกแป้งของไทยจะมีลักษณะครึ่งวงกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 เซนติเมตร ลูกแป้งของอินเดียและมาเลเซีย จะมีลักษณะเป็นก้อนขนาดเล็ก ลูกแป้งของเกาหลีและจีนมีลักษณะเป็นก้อนขนาดใหญ่โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 12-15 เซนติเมตร ส่วนลูกแป้งของญี่ปุ่นจะนิยมป่นเป็นผง เป็นต้น (โชคชัย วนภู และคณะ, 2546) หลังจากปั้นเป็นก้อนแล้วจะต่อเชื้อโดยการโรยผงลูกแป้งเดิมลงไปบนก้อนแป้งที่ปั้นไว้ แล้วนำไปตากให้แห้ง

จากการสังเกตลักษณะ สี และกลิ่นของลูกแป้งที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ลูกแป้งจากตลาดศรีราชาและจากตลาดหนองมน พบว่า ลูกแป้งจากตลาดศรีราชามีลักษณะเป็นโค้งเป็นครึ่งวงกลม ผิวเรียบเนียน ขนาดของลูกแป้งแต่ละลูกมีความสม่ำเสมอ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 2.970±0.087 เซนติเมตร ลูกแป้งมีสีครีม ไม่มีกลิ่นของสมุนไพรเด่นชัด แต่มีกลิ่นตุ่นๆของเชื้อรา เมื่อแบ่งลูกแป้งออกพบเส้นใยของราเจริญอยู่ทั่วไปและเส้นใยมีสีขาว ส่วนลูกแป้งจากตลาดหนองมน พบว่าลักษณะค่อนข้างไม่สม่ำเสมอ มีขนาดใหญ่กว่าลูกแป้งจากตลาดศรีราชาเล็กน้อย โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 3.203±0.099 เซนติเมตร ลูกแป้งมีสีครีม และมีกลิ่นแรงกว่าลูกแป้งจากตลาดศรีราชา (รูปที่ 6.1) เมื่อแบ่งลูกแป้งออกพบเส้นใยของราเจริญอยู่ทั่วไปและมีเส้นใยสีขาวเช่นเดียวกับลูกแป้งจากตลาดศรีราชา จากการคัดแยกราและยีสต์จากตัวอย่างลูกแป้งทั้งสองแหล่งให้ผลการทดสองดังนี้



ภาพที่ 6.1 ลูกแป้งจากศรีราชา (ก) และลูกแป้งจากหนองมน (ข)

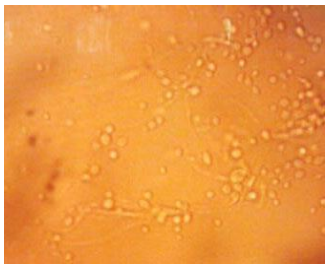
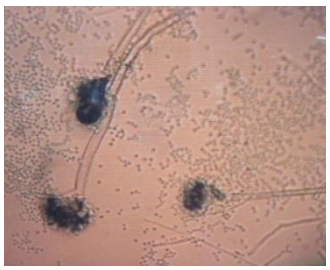
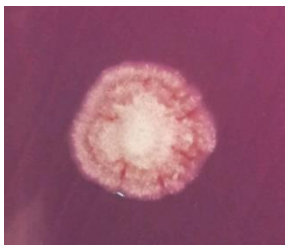
6.1 การคัดแยกรา

ผลการคัดแยกราจากลูกแป้งจากตลาดศรีราชา (ก) และตลาดหนองมน (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC หลังบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เมื่อตรวจนับจำนวนประชากรราทั้งหมดพบว่ามีค่าเท่ากับ 7.84 และ 5.97 log cfu/g ตามลำดับ และเมื่อจัดจำแนกราตามลักษณะโคโลนี แล้วนับจำนวนประชากรของราในแต่ละกลุ่ม (ตารางที่ 4-1 และ 4-2) สุ่มราที่คัดแยกได้ มาทำให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC สังเกตลักษณะโคโลนี สีของเส้นใยและสปอร์ของรา แล้วนำไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า แสดงลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดแยกได้จากลูกแป้งของตลาดศรีราชาและตลาดหนองมนดังตารางที่ 4-1 และ 4-2 ตามลำดับ และจากผลการจัดจำแนกราเบื้องต้น สามารถจัดกลุ่มราที่คัดแยกได้จากลูกแป้งของตลาดศรีราชาและตลาดหนองมนได้เป็น 9 กลุ่ม ดังตารางที่ 4-3

จากผลจำนวนประชากรราพบ รา MS1 ที่คัดแยกได้จากลูกแป้ง ก มีจำนวนเท่ากับ 7.85 log cfu/g ซึ่งมีจำนวนมากที่สุดและมากกว่ารา MS2 และ MS3 สำหรับผลจำนวนประชากรราในลูกแป้ง ข พบ รา MN1 เป็นราที่มีจำนวนประชากรมากที่สุด เท่ากับ 5.91 log cfu/g จากผลจำนวนประชากรราดังกล่าว รา MS1 และ รา MN1 จึงเป็นราสายพันธุ์หลักที่พบในลูกแป้ง ก และ ข ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าราทั้งสองสายพันธุ์นี้อาจเป็นราที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยแป้งให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลในขั้นตอน Saccharification จากผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานที่กล่าวว่าลูกแป้งประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิดแต่จุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบหลักในลูกแป้งคือรา ซึ่งมีหน้าที่สร้างเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์กลุ่มอะไมเลส โดยสามารถย่อยสลายแป้งให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง (สุนันทา วงศ์ปิยชน, ละม้ายมาศ ยังสุข และ พูลศรี สว่างจิต, 2551) เช่น การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส ได้เป็น oligosaccharide และ α-limit-dextrins (พักตร์ประไพ ประจำเมือง และวิชัย ลีลาวัชรมาศ , 2546) จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา (ตารางที่ 4-1 และ 4-2) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า พบว่า รากลุ่มที่ 5 ซึ่งประกอบไปด้วย MN2, MN3, MN4, MN5, MN6, MN7, MN8 และ MN9 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4-2 และ 4-3) และจากการสืบค้นรายงานการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา พบว่า รา ทั้ง 8 ไอโซเลทนี้อาจเป็นราที่อยู่ในสกุล *Penicillium* ซึ่งมีรายงานว่า *Penicillium* sp. มีการสร้างสปอร์ (conidia) บนโครงสร้างคล้ายฝ่ามือ เรียกว่า Penicillus ที่มีลักษณะเป็นปุยสีน้ำเงินถึงสีน้ำเงินอมเขียว (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2549) นอกจากนี้ยังพบว่า รากลุ่มที่ 7 (MN11, MN12 และ MN13) กลุ่มที่ 8 (MN14) และ กลุ่มที่ 9 (MN15 และ MN16) มีลักษณะใกล้เคียงกับราในสกุล *Aspergillus* โดย *Aspergillus* sp. ที่มีเส้นใยแตกแขนงและมีผนังกั้น เส้นใยของเชื้อราไม่มีสี แต่ละส่วนที่กั้นมีนิวเคลียสหลายอัน ก้านชู

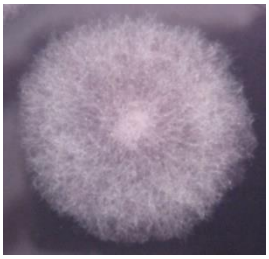
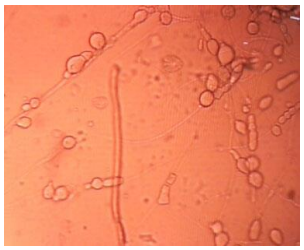
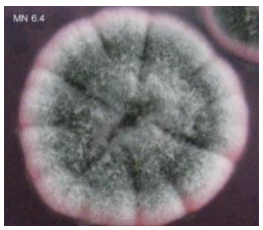
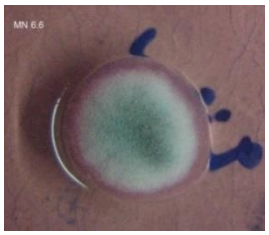
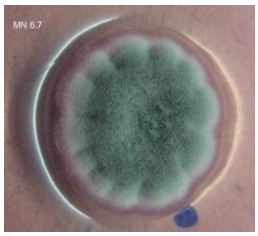
สปอร์อาจมีผนังกั้นหรือไม่มีก็ได้ ที่ส่วนปลายของก้านชูสปอร์ จะโป่งออกเป็น vesicle และมีส่วนที่ยื่นออกมาเป็น sterigma ซึ่งอาจมีชั้นเดียวหรือสองชั้นก็ได้ conidia ถูกสร้างขึ้นภายใน sterigma ซึ่ง conidia ที่สร้างขึ้นภายหลังจะดัน conidia อันแรกๆ ออกมา และยังติดต่อกันอยู่ จึงเกิดเป็นสายของ conidia (ชลนิชา ทองขลิบ และวิเชียร กิจปรีชาวนิจ, 2549) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของชัยวัฒน์ จาติกเสถียร (2520) ที่พบรา *Penicillium* และ *Aspergillus* ในลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า และ Thitisararak, Plumcharoen and Rungsardthong (2003) ที่คัดแยกรา *Aspergillus* sp. ได้จากลูกแป้งของจังหวัดสุรินทร์ สามารถคัดแยกราสายพันธุ์อื่นๆได้จากลูกแป้ง เช่น *Rhizopus, Mucor* และ Chlamydomucor (ชัยวัฒน์ จาติกเสถียร, 2520) *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus microspores* จากลูกแป้งข้าวหมาก (Daroonpunt, Tanasupawat, and Keeratipibul, 2011) และจากกล้าเชื้อที่คล้ายกับลูกแป้งของประเทศต่างๆ เช่น *Amylomyces rouxii*, *Amylomyces aff. rouxii*, *Rhizopus oligosporus* และ *Rhizopus oryzae* ในกล้าเชื้อไวน์ข้าวของเวียดนาม (Dung, Rombouts, Nout, 2005) และ *Lichtheimia, Aspergillus*, *Rhizopus, Rhizomucor, Mucor* และ *Syncephalastrum* ในนูรัก (Nuruk) ของประเทศเกาหลี (Siyoung Yang et al, 2011)

ตารางที่ 6.1 ลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดแยกได้จากลูกแป้ง ก

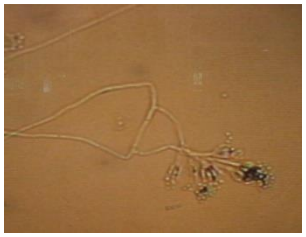
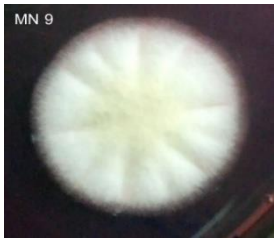
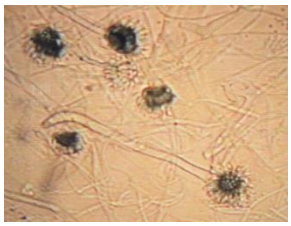
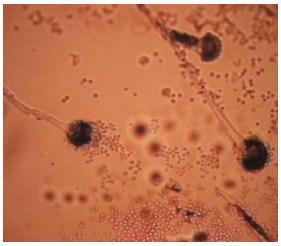
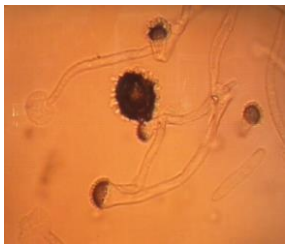
ชื่อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา*	จำนวนโคโลนี	จำนวนประชากรรา (log cfu/g)
MS1			67	7.82
MS2			1	6.00
MS3			1	6.00

* กำลังขยาย ×200

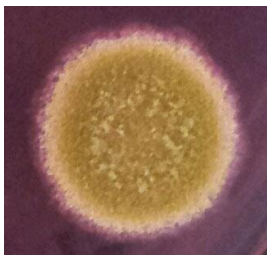
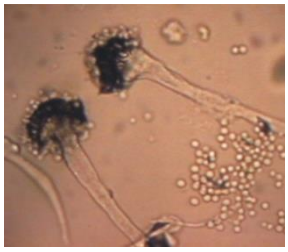
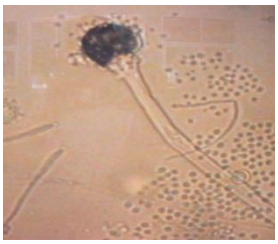
ตารางที่ 6.2 ลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดแยกได้จากลูกแป้ง ข

ชื่อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา*	จำนวนโคโลนี	จำนวนประชากร (log cfu/g)
MN1			82	5.91
MN5			1	4.00
MN7			1	4.00
MN8			1	4.00

* กำลังขยาย ×200

ชื่อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา*	จำนวนโคโลนี	จำนวนประชากร (log cfu/g)
MN9			1	4.00
MN10			1	4.00
MN11			1	4.00
MN12			1	4.00

* กำลังขยาย ×200

ชื่อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา*	จำนวนโคโลนี	จำนวนประชากร (log cfu/g)
MN13			1	4.00
MN14			2	4.30
MN15			1	4.00
MN16			1	4.00

* กำลังขยาย ×200

ตารางที่ 6.3 จำนวนกลุ่มของราที่คัดแยกได้จากลูกแป้ง ก และ ข

กลุ่ม	ชื่อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
1	MS1	โคโลนีมีสีชมพู ลักษณะโคโลนีกลม บริเวณตรงกลางนูนขึ้นมาเป็นเส้นใยมีสีขาว	เส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกั้น สปอร์เกาะกับเส้นใยเป็นฝัก
2	MS2	โคโลนีกลม นูนขึ้นมาจากอาหารและมีสีขาว เส้นใยมีสีขาว และสร้างสปอร์สีเขียวเข้ม	เส้นใยและก้านชูสปอร์เป็นแบบไม่มีผนังกั้น ปลายก้านชูสปอร์มี sterigma ยื่นออกมาคล้ายช่อดอกไม้ ปลาย sterigma มี conidia
3	MS3	โคโลนีสีขาว ลักษณะโคโลนีกลม เส้นใยมีสีขาวพองฟู และสร้างสปอร์สีขาว	เส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกั้น ก้านชูสปอร์มีผนังกั้น ปลายก้านชูสปอร์โป่งออกเป็นถุง สปอร์หลุดออกจากก้านชูสปอร์
4	MN1	โคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอนสีขาว เส้นใยมีสีขาวพองฟู มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว	มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว เส้นใยมีสีขาวฟู สร้าง sporangium น้อยมาก สร้าง chlamydospore จำนวนมาก
กลุ่ม	ชื่อ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
5	MN2 MN3 MN4 MN5 MN6 MN7 MN8 MN9	โคโลนีมีสีขาว โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบโคโลนีหยัก พื้นผิวโคโลนีมีลักษณะเป็นแฉก เส้นใยมีสีขาว และสร้างสปอร์สีเขียวเข้ม	ลักษณะคล้ายไม้กวาด เส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกั้น ที่ปลายของเส้นใยมี sterigma ซึ่งทำหน้าที่ชูสปอร์และสร้างสปอร์ ซึ่งจากรูปสปอร์ของแต่ละไอโซเลต เป็นสปอร์แบบไม่มีสิ่งหุ้ม เรียกว่า conidia
6	MN10	โคโลนีสีขาว ลักษณะโคโลนีกลม ขอบโคโลนีเรียบ พื้นผิวโคโลนีมีรอยลึกลักษณะเป็นแฉกออกจากจุดศูนย์กลางโคโลนี เส้นใยมีสีขาว และสร้างสปอร์สีเหลืองอ่อน	เส้นใยและก้านชูสปอร์เป็นแบบไม่มีผนังกั้น ปลายก้านชูสปอร์โป่งออกลักษณะกลมคล้ายถุง มี sterigma ยื่นออกมารอบๆทำหน้าที่สร้าง conidia

7	MN11 MN12 MN13	ลักษณะโคโลนีกลม ขอบโคโลนีมีสีขาว เส้นใยมีสีขาว และสร้างสปอร์สีเขียวอมเหลือง	เส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้น ภายในมีนิวเคลียส ก้านชูสปอร์เป็นแบบไม่มีผนังกั้น ปลายก้านชูสปอร์โป่งออกคล้ายถุง มี sterigma ยื่นออกมาทำหน้าที่สร้าง conidia ซึ่งต่อกันเป็นโซ่
8	MN14	โคโลนีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน เส้นใยมีสีขาว และสร้างสปอร์สีดำ	ก้านชูสปอร์เป็นแบบไม่มีผนังกั้น ปลายก้านชูสปอร์โป่งออกคล้ายถุง มี sterigma ยื่นออกมาทำหน้าที่สร้าง conidia
9	MN15 MN16	โคโลนีสีขาว ลักษณะโคโลนีกลม เส้นใยมีสีขาวลักษณะปุย และสร้างสปอร์สีน้ำตาลอ่อนอมเหลือง	ก้านชูสปอร์เป็นแบบไม่มีผนังกั้น ปลายก้านชูสปอร์โป่งออกคล้ายถุง มี sterigma ยื่นออกมาสร้าง conidia ต่อกันเป็นสายโซ่

6.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งของราที่คัดแยกได้

การผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวหมักนั้นจำเป็นต้องอาศัยราที่มีสมบัติการย่อยแป้งไปเป็นน้ำตาล จึงทำการทดสอบความสามารถของการย่อยแป้งเบื้องต้นของราที่คัดแยกได้จากลูกแป้งเพื่อใช้เป็นเกณฑ์คัดเลือกราที่เหมาะสม โดยนำรามาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar ที่มีส่วนผสมของแป้งจากข้าวเหนียวซึ่งนิยมใช้เป็นวัตถุดิบหลักสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวหมัก หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วทดสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งโดยหยดสารละลายไอโอดีน 0.25% รอบโคโลนี ราที่สามารถย่อยแป้งได้จะมีบริเวณใสรอบโคโลนีปรากฏขึ้นให้เห็นได้ชัดเจนเนื่องจากสารละลายไอโอดีนทำปฏิกิริยากับอะไมโลสในแป้งที่มีโครงสร้างเป็นสายยาวและเมื่ออะไมโลสขดตัวอยู่รอบโมเลกุลของไอโอดีนทำให้เกิด Starch – Iodine Complex ที่มีสีม่วง - น้ำเงิน (บุญรอด วงษ์สวาท, 2551)

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งเบื้องต้น พบว่าราที่มีความสามารถย่อยแป้งได้สามารถสร้างบริเวณใสรอบโคโลนีที่เกิดจากการย่อยแป้งข้าวเหนียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar โดยเอนไซม์ที่ถูกปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ของรา (Extracellular enzyme) เช่น กลูโคอะไมเลส เบต้าอะไมเลส และ แอลฟากลูโคซิเดส (พักตร์ประไพ ประจำเมือง และ วิชัย ลีลาวัชรมาศ, 2546) ที่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลที่สามารถละลายน้ำได้ จึงทำให้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีและเกิดเป็นบริเวณใสล้อมรอบโคโลนีของรา ซึ่งจากการทดสอบพบว่า ราที่คัดแยกได้จากลูกแป้งสามารถสร้างบริเวณใสที่มีขนาดแตกต่างกันออกไป

(ตารางที่ 6.4) และเมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยแป้งโดยเปรียบเทียบกับขนาดของโคโลนี พบว่าสามารถจัดกลุ่มราตามประสิทธิภาพการย่อยแป้งได้เป็น 5 กลุ่ม (ตารางที่ 6.5) โดย MS1 เป็นราที่มีประสิทธิภาพการย่อยแป้งสูงสุดเท่ากับ 4.336±0.144 MN9 มีประสิทธิภาพการย่อยแป้งในกลุ่มที่ 2 มีค่าเท่ากับ 1.873±0.102 MN5, MN7 และ MN8 เป็นราที่มีประสิทธิภาพการย่อยแป้งในกลุ่มที่ 3 ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 1.359±0.016 ถึง 1.282±0.047 และส่วนที่เหลือจัดอยู่ในกลุ่มที่ 4 ที่มีประสิทธิภาพการย่อยแป้งต่ำสุด โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 1.082±0.003 ถึง 1.000±0.000 สำหรับ MN1 ไม่สามารถตรวจวัดผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งบน starch agar ได้ เนื่องจาก MN1 มีการเจริญอย่างรวดเร็วจนทำให้ไม่สามารถสังเกตเห็นบริเวณใสในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างชัดเจนอย่างไรก็ตาม จากผลการคัดแยกราในข้อ 6.1 พบว่า MN1 เป็นราสายพันธุ์หลักที่มีจำนวนประชากรสูงสุดในลูกแป้ง ข ซึ่งอาจมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาล นอกจากนี้ จากผลลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า MN1 มีโคโลนีเป็นเส้นใยฟูมีสีขาว สร้าง sporangium น้อยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของสุมัลลิกา โมรากุล (2545) ที่คัดแยกราที่มีเส้นใยแบบไม่มีผนังกั้น เจริญได้รวดเร็วสร้าง chlamydospore จำนวนมาก บนเส้นใย และสร้าง sporangium น้อยมากและไม่สมบูรณ์ และอาจมีหรือไม่มี rhizoid ซึ่งจากการระบุลักษณะทางสัณฐานวิทยาในเบื้องต้นคือรา *Amylomyces* sp.

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งและข้อมูลจากการจัดจำแนกเบื้องต้น จึงคัดเลือกรา MS1, MN5, MN9 และ MN1 ไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยข้าวในการทดลองขั้นต่อไป

6.3 การทดสอบการย่อยข้าวด้วยกล้าเชื้อราบริสุทธิ์

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งเบื้องต้นในข้อ 6.2 ได้ราที่มีประสิทธิภาพการย่อยแป้งสูงสุด 3 อันดับ ได้แก่ MS1, MN5 และ MN9 รวมทั้ง MN1 ที่เป็นประชากรหลักที่พบในลูกแป้ง ข จึงนำราทั้ง 4 สายพันธุ์ มาทดสอบการย่อยข้าวโดยนำกล้าเชื้อราผสมกับปลายข้าวเหนียวที่ผ่านการนึ่งสุก แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน พบว่า MN9 และ MN5 สร้างสปอร์สีเขียวเข้ม (รูปที่ 6.1) ซึ่งเป็นลักษณะของราที่ไม่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นกล้าเชื้อหมักผลิตภัณฑ์ข้าวหมัก (สุมัลลิกา โมรากุล, 2545) ในขณะที่ MS1 และ MN1 ไม่พบการสร้างสปอร์ตลอดระยะเวลาการบ่ม และจากการสังเกตพบว่า MN1 สามารถย่อยปลายข้าวเหนียวและให้น้ำเชื่อมข้าวออกมาปริมาณมาก ในขณะที่ MS1 ให้ปริมาณน้ำเชื่อมข้าวได้น้อยกว่า MN1 และจากการทดสอบหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าน้ำเชื่อมข้าวจาก MN1 และ MS1 มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดใกล้เคียงกัน แต่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกันอย่างชัดเจน อาจเนื่องมาจากความสามารถในการสร้างและปลดปล่อยเอนไซม์ที่ต่างกันของราสองสาย

พันธุ์ โดย MN1 อาจสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้มากกว่า MS1 ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถย่อยพอลิแซคคาไรด์หรือโอลิโกแซคคาไรด์ โดยตัดพันธะไกลโคสิดิก (glycosidic linkage) ที่ตำแหน่ง α-1,4 และ α-1,6 จากปลายสายด้าน non-reducing ให้ผลผลิตเป็นกลูโคสทีละ 1 โมเลกุล (บุญพา วณิชชาพลอย, 2548) ในขณะที่ MS1 อาจสร้างเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายแป้งโดยตัดพันธะไกลโคสิดิกที่ตำแหน่ง α-1,4 แบบสุ่มได้เป็น โอลิโกแซคคาไรด์ และไดแซคคาไรด์ (พัตร์ประไพ ประจำเมือง และ วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2546) จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเชื่อมข้าวของ MS1 น้อยกว่า MN1 ดังตารางที่ 6.6

ตารางที่ 6.4 ผลการทดสอบการย่อยแป้งด้วย starch agar

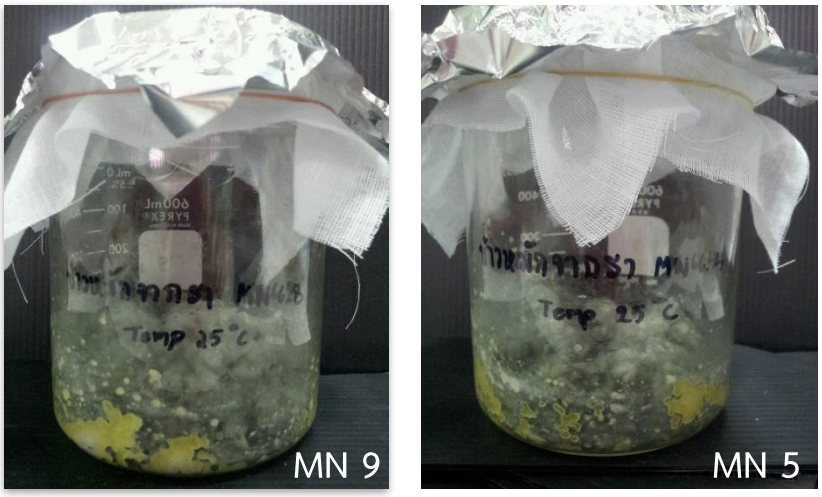
ชื่อ	ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)							
	โคโลนี			เฉลี่ย	บริเวณใสรอบโคโลนี			
	1	2	3		1	2	3	เฉลี่ย
MS1	0.560	0.563	0.572	0.565±0.066	2.395	2.473	2.482	2.450±0.180
MS2	1.000	1.000	1.000	1.000±0.000	1.000	1.000	1.000	1.000±0.000
MS3	1.000	1.000	1.000	1.000±0.000	1.000	1.000	1.000	1.000±0.000
MN1	*	*	*	-	*	*	*	-
MN5	1.143	1.072	1.100	1.044±0.082	1.535	1.484	1.493	1.918±0.051
MN7	1.095	1.072	1.092	1.086±0.109	1.467	1.485	1.477	1.476±0.173
MN8	1.008	1.015	1.010	1.013±0.006	1.295	1.272	1.288	1.285±0.069
MN9	1.033	1.042	1.056	1.105±0.083	1.892	1.935	1.909	1.504±0.059
MN10	2.373	2.395	2.398	2.389±0.034	2.470	2.452	2.443	2.455±0.040
MN11	3.225	3.241	3.246	3.238±0.032	3.445	3.502	3.505	3.484±0.072
MN12	3.500	3.575	3.549	3.541±0.119	3.692	3.730	3.720	3.714±0.090
MN13	3.238	3.238	3.258	3.245±0.068	3.490	3.542	3.502	3.511±0.093
MN14	1.000	1.000	1.000	1.000±0.000	1.000	1.000	1.000	1.000±0.000
MN15	2.463	2.462	2.466	2.464±0.065	2.587	2.555	2.565	2.569±0.058
MN16	2.533	2.525	2.513	2.524±0.028	2.600	2.575	2.606	2.594±0.023

* ไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางที่ 6.5 ประสิทธิภาพการย่อยแป้งของราที่คัดแยกได้จากลูกแป้ง

กลุ่มที่	ชื่อไอโซเลต	ประสิทธิภาพการย่อยแป้ง*
1	MS1	4.336±0.144[a]
2	MN9	1.873±0.102[b]
3	MN5	1.359±0.016[c]
	MN7	1.350±0.023[c]
	MN8	1.282±0.047[c]
4	MN13	1.082±0.003[d]
	MN11	1.079±0.011[d]
	MN12	1.051±0.010[d]
	MN15	1.043±0.005[d]
	MN10	1.027±0.001[d]
	MN16	1.023±0.003[d]
	MN14	1.000±0.000[d]
	MS2	1.000±0.000[d]
	MS3	1.000±0.000[d]
5	MN1	-

*a, b, c, d = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 6.2 MN9 และ MN5 สร้างสปอร์สีเขียวเข้มบนปลายข้าวเหนียวนึ่งสุก

ตารางที่ 6.6 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำเชื่อมข้าวจากปลายข้าวเหนียวที่ย่อยด้วยกล้าเชื้อราบริสุทธิ์

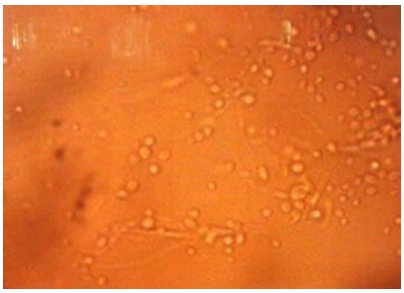
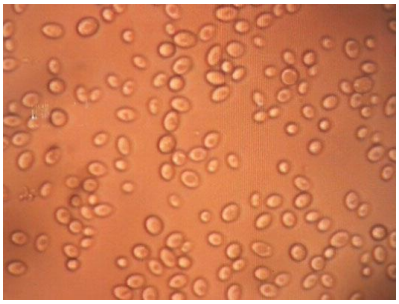
ชื่อ	ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์)				น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/กรัมข้าวหมัก)			
	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย
MS1	27.0	27.1	27.1	27.1±0.1	0.02	0.02	0.02	0.02±0.00
MN1	29.5	29.3	29.5	29.4±0.1	1.70	1.68	1.69	1.69±0.01

จากผลการทดสอบความสามารถในการย่อยข้าว จึงคัดเลือกรา MN1 ซึ่งเป็นราที่มีศักยภาพในการย่อยปลายข้าวให้น้ำเชื่อมข้าวที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงมาใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตไวน์ข้าวในขั้นตอนต่อไป

6.4 การคัดแยกยีสต์

จากการคัดแยกยีสต์จากลูกแป้งของตลาดศรีราชา และตลาดหนองมน จากน้ำเชื่อมข้าวที่ได้จากการย่อยปลายข้าวเหนียวด้วยลูกแป้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA หลังบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ไม่พบยีสต์จากน้ำเชื่อมข้าวที่ได้จากการหมักปลายข้าวเหนียวด้วยลูกแป้ง ก แต่พบโคโลนีของ YS1 ที่มีลักษณะโคโลนีเป็นเส้นใยขาว มีรอยหยักเป็นแฉกแนวรัศมีจากขอบโคโลนีถึงตรงกลางที่นูนขึ้น จากการสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่าโคโลนีมีลักษณะรูปร่างโคโลนีใกล้เคียงกับรา MS1 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC ในขั้นตอนการคัดแยกราจากลูกแป้ง (ตารางที่ 6.1) โดยมีจำนวนประชากรทั้งหมดเท่ากับ 6.18 log cfu/g และเมื่อนำไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า (ตารางที่ 6.7) พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับรา MS1 ส่วนน้ำเชื่อมข้าวที่ได้จากลูกแป้ง ข พบยีสต์เพียง 1 สายพันธุ์ ได้แก่ YN1 มีลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สีขาวนวล ตรงกลางโคโลนีโค้งนูน ขอบเรียบ มีจุดสีขาวนวลตรงกลางโคโลนีเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA มีจำนวนประชากรทั้งหมดเท่ากับ 5.83 log cfu/g และเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่าเซลล์มีลักษณะรีคล้ายรูปไข่และสืบพันธุ์ด้วยการแตกหน่อ (budding) ดังแสดงในตารางที่ 6.7

ตารางที่ 6.7 ลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์จากลูกแป้งของ ก และ ข

ชื่อ*	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา**
YS1		
YN1		

* YS แทนยีสต์จากลูกแป้ง ก, YN แทนยีสต์จากลูกแป้ง ข

** กำลังขยาย ×400

จากการสืบค้นรายงานวิจัยต่างๆ พบว่ามีผู้วิจัยหลายท่านสามารถคัดแยกยีสต์จากลูกแป้งได้เช่นเดียวกัน โดย ชัยวัฒน์ จาติกเสถียร (2520) พบ *Endomycopsis, Hansenula* และ *Saccharomyces* ในลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า วีระสิทธิ์ กัลยากฤต และ ทรงศักดิ์ บูรณเศวตธรรม (2548) พบ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida utilis* จากลูกแป้งในประเทศไทย Suzuki et al. (1987) แยกยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ได้จากข้าวหมาก ลูกแป้ง และน้ำส้มสายชู และ Savitree Limtong และคณะ (2002) พบ *Saccharomycopsis fibuligera* ในลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า อีกทั้งยังพบ *Pichia anomala, Issatchenkia orientalis, P. burtonii, P. fabianii, Candida rhagii, C. glabrata, Torulaspora globosa, P. Mexicana, P. heimii, Rhodotorula philyla, Saccharomyces cerevisiae, T. delbrueckii* และ *Trichosporon asahii* ในลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า พบยีสต์ที่มีสมบัติคล้ายกับ *Saccharomyces cerevisiae* จากกล้าเชื้อไวน์ข้าวของเวียดนามด้วย (Dung, Rombouts and Nout, 2005)

6.5 การทดสอบหมักไวน์ข้าวด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้

การผลิตไวน์ข้าวเป็นกระบวนการที่ต้องย่อยข้าวด้วยราเพื่อเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาล ตามด้วยการหมักโดยยีสต์ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ ในการทดลองได้ใช้รา MN1 ที่ได้จากขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยข้าวมาใช้ในการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาลในขั้นตอน Saccharification และใช้ยีสต์ YN1 ที่พบจากลูกแป้ง ข เพื่อหมักน้ำตาลให้เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ เปรียบเทียบกับยีสต์ *S. cerevisiae* angle® ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า โดยทำการย่อยปลายข้าวเหนียวด้วยรา MN1 เป็นเวลา 3 วันจากนั้นหมักน้ำเชื่อมข้าวที่ได้จากการย่อยด้วยยีสต์แต่ละสายพันธุ์ เป็นเวลา 5 วัน ติดตามผลทางจุลชีววิทยา, ค่า pH, ปริมาณของแข็งละลายได้ทั้งหมด (TSS), ปริมาณแอลกอฮอล์ และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลกติกทุกวัน ได้ผลการทดลองดังนี้

จากการติดตามปริมาณเชื้อยีสต์เริ่มต้นตั้งแต่วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนประชากรยีสต์ในแต่ละวัน แสดงได้ดังรูปที่ 4.2 พบว่า จำนวนประชากรยีสต์ *S. cerevisiae* และ YN1 ในวันที่ 1 มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีจำนวนมากที่สุดเท่ากับ 7.2 และ 7.0 log cfu/g ตามลำดับ วันที่ 2 จำนวนประชากรของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ยังคงมีค่าใกล้เคียงกับวันที่ 1 โดยมีจำนวนประชากรเท่ากับ 7.2 และ 7.1 ตามลำดับ ในวันที่ 3 สังเกตเห็นได้ว่าจำนวนประชากรของยีสต์ *S. cerevisiae* และ YN1 ลดลงจากวันที่ 2 ลดลงเล็กน้อยโดยมีจำนวนประชากรเท่ากับ 7.0 log cfu/g ในวันที่ 4 พบว่าจำนวนประชากรยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดโดยมีจำนวนประชากรเท่ากับ 6.1 และ 5.9 log cfu/g ตามลำดับ และในวันที่ 5 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของขั้นตอนการหมักแอลกอฮอล์พบว่าจำนวนประชากรยีสต์ของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์เริ่มคงที่โดยมีจำนวนประชากรประมาณ 6.0 log cfu/g ตามลำดับ ซึ่งการที่ยีสต์เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วและค่อยๆ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไปเนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์สารอาหารจึงลดลงร่วมกับปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นจะมีผลยังยั้งการเจริญของยีสต์จำนวนประชากรยีสต์จึงค่อยๆ ลดลง (สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา, 2546)

- ค่า pH

ค่า pH เป็นค่าที่แสดงความเป็นกรด – ด่าง ของผลิตภัณฑ์ โดยมีค่าตั้งแต่ 0-14 สามารถวัดค่าได้หลายวิธี ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้ pH meter ในการวัดค่า pH โดยเก็บตัวอย่างไวน์ข้าวตั้งแต่วันที่ 0–5 ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4-3 จะเห็นว่าค่า pH ของไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* มีค่าลดลงเรื่อยๆ ซึ่งอยู่ในช่วง 3.3-4.3 ส่วนค่า pH ของไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ YN1 พบว่ามีค่าลดลงเช่นกันแต่จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 2 จากนั้นจะลดลงเรื่อยๆ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 3.3-4.3 เช่นเดียวกับไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* จะเห็นได้ว่ายีสต์บริสุทธิ์ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ให้ค่า pH อยู่ในช่วงที่ไม่ต่างกันมากนัก โดยการที่ไวน์มีค่า pH ต่ำลงเรื่อยๆนั้นอาจเป็นเพราะมีปริมาณกรดในไวน์เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การ

เปลี่ยนแปลงของค่า pH จะเกิดขึ้นน้อยมากเนื่องจากเกิด buffer capacity (ความสามารถในการต้านทานการเปลี่ยนแปลงค่า pH) ขึ้นในไวน์ (Amerrine และคณะ, 1974)

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) และปริมาณแอลกอฮอล์

ในช่วงของ Alcoholic Fermentation ซึ่งเป็นช่วงของการหมักแอลกอฮอล์ ยีสต์จะใช้น้ำตาลที่ได้จากช่วง Saccharification ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ดังนั้นเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณของแข็งที่ละลายได้จึงลดลงโดยน้ำตาลส่วนหนึ่งจะถูกยีสต์นำไปใช้เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ และบางส่วนถูกนำไปเปลี่ยนให้เป็นแอลกอฮอล์ จากผลการศึกษาการหมักไวน์ข้าวด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* angle® และยีสต์ YN1 ที่แยกได้จากลูกแป้ง ปริมาณของของแข็งละลายได้ทั้งหมดของไวน์ที่หมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* angle® และยีสต์ YN1 มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ โดยมีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 20.17 และ 20.03 °Brix ตามลำดับ และลดลงเรื่อยๆ จนถึงวันสุดท้ายของการหมัก คือวันที่ 5 โดยมีปริมาณของแข็งละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 12.4 และ 13.4 °Brix ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา (2546) อีกทั้งยังพบว่าไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า *S.cerevisiae* angle® มีปริมาณของแข็งละลายได้ทั้งหมดต่ำกว่าไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ YN1 ขณะที่ปริมาณแอลกอฮอล์ของไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า *S.cerevisiae* angle® และยีสต์ YN1 เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 1-3 และมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 4 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.82 % และ 7.12 % โดยปริมาตร ตามลำดับ จากนั้นอัตราการเพิ่มจะลดลงและเริ่มคงที่ในวันที่ 5 เนื่องมาจากในช่วงต้นของการหมักนั้นยีสต์ได้ใช้น้ำตาลจากการย่อยแป้งให้เป็นแอลกอฮอล์อย่างรวดเร็ว และเมื่อแอลกอฮอล์มีปริมาณสูงขึ้น จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ และแอลกอฮอล์อาจเปลี่ยนไปเป็นสารเอสเทอร์อื่นๆ จึงทำให้ช่วงสุดท้ายของการหมักนั้นมีแอลกอฮอล์ลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา (2546) และ สุมัลลิกา โมรากุล (2545)

- ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก

ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะการการหมัก และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 1-3 และเริ่มคงที่ในวันที่ 4-5 โดยไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* angle® มีปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.12 – 0.31 กรัม/100 มล. ในขณะที่ไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ YN1 มีปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ในช่วง 012 – 0.27 กรัม/100 มล. จะเห็นว่าไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า *S.cerevisiae* angle® มีปริมาณกรดทั้งหมดมากกว่าไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ YN1 โดยกรดจะเกิดจากการที่รา ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลและกรดแลคติก (Ellis และคณะ, 1976) ซึ่งยีสต์จะใช้น้ำตาลในขั้นตอนการหมักได้เป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนหนึ่งจะละลายน้ำให้กรดคาร์บอกนิก และยังมีกรดต่างๆ ที่เกิดขึ้นใน Kreb’s cycle ของยีสต์ได้แก่ กรดซัคซินิก กรดมาลิก และกรดซิตริก (Fleet, 1992) ทำให้ปริมาณกรดในไวน์เพิ่มขึ้นในช่วงแรกแล้วจากนั้นปริมาณ

กรดจะลดลงเล็กน้อย เนื่องจากกรดอินทรีย์บางตัวเช่น กรดอะซีติกจะเปลี่ยนไปเป็นเอสเทอร์ได้โดยการทำงานของ esterase จากยีสต์ (Yoshizawz, 1999) โดยปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นจะมากหรือน้อยจะขึ้นกับสายพันธุ์ของยีสต์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ สุมัลลิกา โมรากุล (2545) ที่กล่าวว่า ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวปริมาณกรดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 5 วันแรกของการหมัก และจากนั้นจะเริ่มคงที่

- คุณสมบัติทางเคมีของไวน์ข้าวเมื่อเทียบกับไวน์ข้าวยี่ห้อสาโทสยาม

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* angle® และยีสต์ YN1 เมื่อสิ้นสุดการหมัก เทียบกับไวน์ข้าวยี่ห้อสาโทสยาม (ตารางที่ 6.8) พบว่า ปริมาณแอลกอฮอล์ของไวน์ข้าวที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* angle® ยีสต์ YN1 เมื่อเทียบกับไวน์ข้าวยี่ห้อสาโทสยามมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 6.73 % 7.06 % และ 8.09 % โดยปริมาตรตามลำดับ ซึ่งจากมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.3/2546) ได้กล่าวถึงคุณสมบัติทางเคมีของสาโทในด้านปริมาณแอลกอฮอล์ทั้งหมดที่มีต้องไม่เกิน 15±1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ดังนั้นปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จึงอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์สาโท สอดคล้องกับงานวิจัยของ วีระสิทธิ์ กัลยากฤต และคณะ (2554) ที่ พบว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอทานอลตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 14 ของการหมักอยู่ในช่วง 3.95 – 7.82% โดยปริมาตร และมนตรี เชาว์สังเกตุ (2520) พบว่าในสาโทที่ปล่อยให้เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์จะมีปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ในช่วง 6.8 – 14.8 % โดยปริมาตร

ปริมาณกรดของไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* angle® และยีสต์ YN1 เมื่อสิ้นสุดการหมัก เทียบกับไวน์ข้าวยี่ห้อสาโทสยาม (ตารางที่ 6.8) พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 0.312, 0.267 และ 0.570 กรัม/100 มล. โดยไวน์ข้าวที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* angle® และยีสต์ YN1 จะมีปริมาณกรดต่ำกว่าไวน์ข้าวยี่ห้อ สาโทสยาม ซึ่งจากมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนได้กล่าวถึงคุณสมบัติทางเคมีของสาโทในด้านปริมาณกรดทั้งหมดที่มีต้องไม่เกิน 2.5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นผลิตภัณฑ์ไวน์ที่ได้จึงเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน สอดคล้องกับงานวิจัยของ วีระสิทธิ์ กัลยากฤต และคณะ (2554) ที่พบว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดตลอดระยะเวลาในการหมัก 0 ถึง 14 วัน มีปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.55 – 0.87 เปอร์เซ็นต์ และสุมัลลิกา โมรากุล (2545) พบว่าปริมาณกรดสูงสุดเมื่อสิ้นสุดการหมักไวน์ข้าวมีค่าเท่ากับ 0.98 และ 0.82 กรัม/100 มล.

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ของไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* angle® และยีสต์ YN1 เมื่อสิ้นสุดการหมัก เปรียบเทียบกับไวน์ข้าวยี่ห้อสาโทสยามพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยไวน์ข้าวที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* angle® มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) เท่ากับ

ตารางที่ 6.8 ผลวิเคราะห์ทางเคมีของไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* angle® และยีสต์ YN1 เทียบกับไวน์ยี่ห้อสาโทสยาม

ตัวอย่าง	แอลกอฮอล์ (% โดยปริมาตร)	ปริมาณกรด (กรัม/100 มล.)	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) (°Brix)	pH
YN1	7.06[b]	0.267[c]	13.4[a]	3.33[b]
S.serevisiae angle®	6.73[c]	0.312[b]	12.4[b]	3.39[a]
สาโทสยาม	8.09[a]	0.570[a]	12.1[c]	3.33[b]

12.40 °Brix ในขณะที่ไวน์ข้าวที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ YN1 มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) เท่ากับ 13.40°Brix และไวน์ข้าวยี่ห้อสาโทสยามมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) เท่ากับ 12.07 °Brix ซึ่งจากผล จะเห็นว่าไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* angle® และยีสต์ YN1 มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) มากกว่าไวน์ข้าวยี่ห้อสาโทสยาม และไวน์ข้าวที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ YN1 มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) สูงที่สุด ซึ่งมนตรี เชาว์สังเกตุ (2520) พบว่าในสาโทที่ปล่อยให้เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์จะมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) อยู่ในช่วง 7.8 – 15.6 °Brix สอดคล้องกับงานวิจัยของ จิราภรณ์ ยอดเถื่อน, วลัยรัตน์ จันทรปานนท์ และ หทัยรัตน์ ริมคีรี (2553) ที่พบว่าในน้ำข้าวหมากมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) 7.8 °Brix

ค่าพีเอชของไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* angle® และยีสต์ YN1 เมื่อสิ้นสุดการหมัก เทียบกับไวน์ข้าวยี่ห้อสาโทสยาม (ตารางที่ 4-8) พบว่าไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ YN1 กับไวน์ข้าวยี่ห้อสาโทสยาม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยไวน์ข้าวที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ YN1 มีค่าพีเอชเท่ากับ 3.33 และไวน์ข้าวยี่ห้อสาโทสยามมีค่าเท่ากับ 3.33 ในขณะที่ไวน์ข้าวที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* angle® มีค่าพีเอช มากที่สุดเท่ากับ 3.39 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) เมื่อเทียบกับไวน์ข้าวที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ YN1 และไวน์ข้าวยี่ห้อสาโทสยาม โดย มนตรี เชาว์สังเกตุ (2520) พบว่าในสาโทที่ปล่อยให้เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์จะมีค่าพีเอช อยู่ในช่วง 3.17 – 4.0 สอดคล้องกับงานวิจัยของ สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา (2546) พบว่าไวน์ที่หมักจากข้าวต่างชนิดกันมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.5-3.7

7. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการคัดแยกราและยีสต์จากลูกแป้ง 2 แหล่งได้แก่ ตลาดศรีราชาและตลาดหนองมน เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์สำหรับหมักข้าวหมาก ได้ผลดังนี้

7.1 การคัดแยกรา

จากการคัดแยกราในลูกแป้งของตลาดศรีราชาและตลาดหนองมน เมื่อตรวจนับจำนวนประชากรราทั้งหมดพบว่ามีจำนวนประชากรเท่ากับ 7.84 และ 5.97 log cfu/g ตามลำดับ MS1 และ MN1 เป็นราประชากรหลักที่พบในลูกแป้งจากตลาดศรีราชาและตลาดหนองมนโดยมีจำนวนประชากรทั้งหมดเท่ากับ 7.82 และ 5.91 log cfu/g ตามลำดับ นอกจากนี้สามารถจำแนกราตามลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันออกได้เป็น 9 กลุ่ม และจากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่า MN1 มีลักษณะใกล้เคียงกับราในสกุล *Amylomyces* MN5, MN7, MN8 และ MN9 มีลักษณะใกล้เคียงกับราในสกุล *Penicillium* MN11, MN12, MN13, MN14, MN15 และ MN16 มีลักษณะใกล้เคียงกับราในสกุล *Aspergillus*

7.2 การตรวจประสิทธิภาพการย่อยแป้งของราที่คัดแยกได้

จากการตรวจสอบการย่อยแป้งของราที่คัดแยกได้สามารถแบ่งราตามประสิทธิภาพการย่อยแป้งได้เป็น 5 กลุ่ม โดยพบว่า MS1 มีประสิทธิภาพการย่อยแป้งสูงสุดเท่ากับ 4.336±0.144 รองลงมาคือ MN9 และ MN5 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.873±0.102 และ 1.359±0.016 ตามลำดับ และไม่สามารถตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งของรา MN1 ซึ่งเป็นราที่มีจำนวนประชากรมากที่สุดในลูกแป้งจากตลาดหนองมนได้

7.3 การย่อยข้าวด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์

จากการทดสอบการย่อยปลายข้าวเหนียวนึ่งด้วยราที่ได้จากข้อ 5.2 พบว่ารา MS1 และ MN1 สามารถสร้างน้ำเชื่อมข้าวที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) เท่ากับ 27.07±0.06 และ 29.43±0.12 °Brix ตามลำดับ และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.02±0.00 และ 1.69±0.01 กรัม/กรัมข้าวหมัก ตามลำดับ สำหรับรา MN9 และ MN5 พบว่าไม่สามารถสร้างน้ำเชื่อมข้าวและสร้างสปอร์สีเขียวเข้ม

7.4 การคัดแยกยีสต์

จากการคัดแยกยีสต์โดยใช้ลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อสำหรับการย่อยข้าว (Saccharification) แล้วปล่อยให้เกิดการหมัก (Alcoholic Fermentration) พบยีสต์เพียง 1 ไอโซเลตจากลูกแป้งของตลาดหนองมน คือ YN1 โดยมีจำนวนประชากรทั้งหมดเท่ากับ 5.83 log cfu/g และไม่พบยีสต์จากลูกแป้งของตลาดศรีราชา

7.5 การหมักไวน์ข้าวด้วยกล้าเชื้อราและยีสต์บริสุทธิ์

จากการตรวจวิเคราะห์ผลทางจุลชีววิทยาและทางเคมี พบว่าจำนวนประชากรจำนวนยีสต์มีเพิ่มขึ้นในวันแรกและลดจำนวนลงเรื่อยๆเมื่อสิ้นสุดการหมัก ปริมาณของแข็ง

ละลายได้ทั้งหมดมีค่าลดลงในขณะที่ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นและมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 4 ทั้งไวน์ที่หมักได้จากยีสต์ *S. cerevisiae* angle® และยีสต์ YN1 มีค่าเท่ากับ 6.82 และ 7.12 % โดยปริมาตร ตามลำดับ ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติกมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อสิ้นสุดการหมัก และพบว่า ยีสต์ *S. cerevisiae* angle® สามารถสร้างกรดได้มากกว่า ยีสต์ YN1 ในขณะที่ค่าพีเอช ของไวน์ที่ได้จากยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีค่าอยู่ในช่วง 3.3 – 4.3 เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของไวน์ข้าวที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์กับไวน์ข้าวยี่ห้อสาโทสยาม พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในทุกๆ องค์ประกอบ ยกเว้นค่าพีเอช ที่พบว่าไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ YN1 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับไวน์ข้าวยี่ห้อสาโทสยาม แต่ไวน์ข้าวที่หมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* angle® มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ข้อเสนอแนะ

ในการทดลองนี้ การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของราและยีสต์สามารถจำแนกราและยีสต์ได้ในระดับสกุลเท่านั้น ซึ่งในการจำแนกราในระดับสปีชีส์จะต้องใช้เทคนิคขั้นสูงขึ้น เช่น การตรวจสอบในระดับชีวโมเลกุล DNA หรือ RNA เป็นต้น

ผลผลิต (Output)

On-ong Chanprasartsuk, Supawan Chitsombat, Teerapong Nualdet (2018) Indigenous Fungi Associated with Loog-pang and Their Behaviors of Broken Glutinous Rice Wine Fermentation. In: Proceedings of the 6th HCU National and International Conference: Research to serve society, pp.232-237. 22 June 2018, Huachiew Chalermprakiet University, Samutprakarn, Thailand.

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 2559A10802188

สัญญาเลขที่ 110/2559

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙ มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การคัดแยกและจำแนกจุลินทรีย์จากลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวหมัก

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร.อรอง จันทร์ประสาทสุข

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ต.ค. 2558 **ถึงวันที่** 30 พ.ค. 2562

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี 7 เดือน **ตั้งแต่วันที่** 1 ต.ค. 2558

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 632,700 **บาท เมื่อวัน เดือน ปี** 5 ก.พ. 2559

งวดที่ 2 (40%) 506,160 **บาท เมื่อวัน เดือน ปี** 27 ก.ย. 2559

งวดที่ 3 (10%) 126,540 **บาท**

รวม 1,265,400 **บาท**

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	**งบประมาณที่ตั้งไว้**	**งบประมาณที่ใช้จริง**	**จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน**
1. ค่าตอบแทน	60,000	60,000	**-**
2. ค่าจ้าง	100,000	96,500	+ 3,500
3. ค่าวัสดุ	910,050	895,000	+ 8,500
4. ค่าใช้สอย	43,000	55,000	-12,000
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	**-**
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ (โปรดระบุเป็นข้อย่อย)			
- ค่าจ้างนิสิตชั่วคราว	152,350	152,350	**-**
- ค่าธรรมเนียมการอุดหนุนสถาบัน	140,600	140,600	**-**

รวม	1,406,000	1,406,000	-

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง (Reference)

กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2554). *สถานการณ์การผลิตและการตลาดข้าวของโลก ปีการผลิต 2554/2555.* วันที่ค้นข้อมูล 23 พฤศจิกายน 2554, เข้าถึงได้จาก http:// www .ricethailand.go.th/rice%20web/Rice%20Situation/data/5455/ Sep11.pdf

จิราภรณ์ ยอดเถื่อน, วลัยรัตน์ จันทรปานนท์ และหทัยรัตน์ ริมคีรี. (2553). การคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์โดยทดสอบการย่อยแป้งและการผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำข้าวหมาก. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จำรัส โปร่งศิริวัฒนา. (2534). *ความรู้เรื่องข้าว*. สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

โชคชัย วนภู, นันทกร บุญเกิด และลำไพ ดิษฐ์วิบูลย์. (2546). การผลิตไวน์ข้าวของประเทศในแถบเอเชีย. *คนทำไวน์(Winemaker)*. นครราชสีมา: สมบูรณ์พริ้นติ้ง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. (2552). *จุลชีววิทยาทั่วไป*. พิมพ์ครั้งที่ 7. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นภา โล่ห์ทอง. (2534). *กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต*. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

บุญรอด วงษ์สวาท. (2551). *Starch Iodine Test*. วันที่สืบค้นข้อมูล 6 เมษายน 2555, เข้าถึงได้จาก http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd_site/starch _iodine_test.htm

ประดิษฐ์ ครุวัณณา. (2535). *สาเกและสาโท*. อาหาร. 14 (1): 14-19.

ประดิษฐ์ ครุวัณณา. (2546). *ไวน์ : ศาสตร์และศิลป์* (2). กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พักตร์ประไพ ประจำเมือง และ วิชัย ลีลาวัชรมาศ. (2546). เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง. *วารสารศูนย์บริการวิชาการ*, 11(4), 29-30.

มณชัย เดชสังกรานนท์. (2546). *คุณสมบัติของยีสต์และราที่มีบทบาทในการหมักข้าวหมากและสาโท*. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มนตรี เชาว์สังเกตุ. (2521). *การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และราเพื่อหมักไวน์ข้าว*. วิทยานิพนธ์

ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มูลนิธิข้าวไทย ในพระราชนูปถัมภ์. (ม.ป.ป.). *การบริโภคข้าว*. วันที่สืบค้นข้อมูล 23 พฤศจิกายน 2554, เข้าถึงได้จาก ttp://www.thairice.org/html/aboutrice/about_rice7.htm

ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์. (2535). *จากข้าวสู่ไวน์*. วารสารอุตสาหกรรมเกษตร. 8 (1) : 49-54.

วีระสิทธิ์ กัลป์ยากฤต และ ทรงศักดิ์ บูรณเศวตธรรม. (2004). การคัดเลือกจุลินทรีย์จากลูกแป้งที่ผลิตเอนไซม์และแอลกอฮอล์เพื่ออุตสาหกรรมสาโท, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วีระสิทธิ์ กัลยากฤต, วรศักดิ์ ช่างภา, มังกร โรจน์ประภากร และ ปราโมทย์ ศิริโรจน์. (2554). การศึกษาการใช้จุลินทรีย์หัวเชื้อผสมเพื่อการผลิตลูกแป้งสาโท, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร และ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริโฉม ทุ่งเก้า. (2546). *เอกสารประกอบการสอน วิชา 305312 จุลชีววิทยาทางอาหาร 1* (เฉพาะปฏิบัติการ). ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี. (2548). *การหาความหนาแน่นของแพลงตอนพืช*, วันที่สืบค้นข้อมูล 19 เมษายน พ.ศ. 2555, เข้าถึงได้จาก http://web.agri.cmu.ac.th/ppath/course/360301/ lesson5_inoculation_prepare.htm

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2549), *ตำราจุลชีววิทยาทางอาหาร* (2). กรุงเทพฯ: จามจุรีโปรดักท์

สุมัลลิกา โมรากุล. (2545). *การพัฒนากรรมวิธีการผลิตไวน์ข้าว*. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สร้อยสุดา พรภัคดีวัฒนา. (2546). *การผลิตไวน์ข้าวจากข้าวนาปรัง*. ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรอนงค์ นัยวิกุล. (2538). *เคมีทางธัญญาหาร*. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Amerine, M.A. and C.S. Ough. (1974). Wine and Must Analysis. *John Willey & Sons*, New York.

Kim,Hye Ryun, Jae-Ho Kim, Dong-Hoon Bae, and Byung-Hak Ahn, (2010). Characterization of *Yakju* Brewed from Glutanous Rice and Wild-Type Yeast Stains Isolated from *Nuruks. Journal of Microbiology and Biotechnology, (2010)* (20(12)), 1702-1710.

N.Thitisararak, S. Plumcharoen, and V. Rungsardthong. (2003). The Use of Dry Starter Cultures for the Fermentation of Sato, a Traditional Thai Rice Wine. Proceedings of the 1st international symposium and workshop on insight into the world of indigenous fermented foods for technology development and food safety (IWIFF), 231-238.

N.T.P. Dung, F.M. Rombouts, M.J.R. Nout. (2005 a). Characteristics of some traditional Vietnamese starch-based rice wine fermentation starter *(men)*. *LWT-Food science and Technology, 40(2007)*, 130-135.

N.T.P. Dung, F.M. Rombouts, M.J.R. Nout. (2005 b). Functionality of selected strains of moulds and yeasts from Vietnamese rice wine starters. *Food Microbiology, 23 (2006)*, 331-340.

Krejcie, R.V.,and Morgan D.W. (1970). Determining Sample Size for Research Activities. *Educational and Psychological Measurement*, 30, 607-610.

Sakai, H. and Caldo G.A.. (1985). Microbiological and chemical changes in tapuy fermention. *Journal Ferment Technol. 63* (1) : 11-16.

Platt, G.C. 1987. Fermented foods of the world. Butterworths, UK.

Limtong, S. et al. (2002). Yeast Diversity in Thai Traditional Fermentation Starter (Loog-pang). *Kasetsart Journal: Natural Science*, 36(2), 149-158.

Siyoung Yang et al. (2011). Fungi Associated with the Traditional Starter Cultures Used for Rice Wine in Korea. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*, 54(6), 933-943.

Yoshizawa, K. 1999. Sake : production and flavor. *Food Rev. Int., 15 (1)* : 83-107.

Ueda, S., T. Ueki, R. Ohba, Y. Teramoto and K. Yoshizawa. 1990. Ethanol fermentation of aromatic red rice wine without cooking studies on red wine brewing (Part I). *Journal Ferment Bioeng. 70 (5)* : 326-328.

ภาคผนวก (Appendix)

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Agar (HIMEDIA, India)

ละลาย PDA 39 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงจนกระทั่งมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เติมสารละลายกรดทาร์ทาลิกเข้มข้น 10% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ใช้ประมาณ 14 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) เพื่อปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 3.5

2. 0.1% Peptone Water (Lab-Scan Analytical sciences, Ireland)

ละลาย Peptone 1 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Dichloran Rose Bengal Chloramphenical (DRBC) (Oxoid, England)

ละลาย DRBC 15.75 กรัม ลงในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอาหารละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้เย็นจนกระทั่งมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติม Chloramphenicol Supplement SR0078 ผสมให้เข้ากัน

4. Chloramphenicol Supplement (Oxoid, England)

ละลายคลอแรมฟีนิคอล ในเอทานอล 95% ปริมาณ 3 มิลลิลิตร

5. Malt Extract Agar (MEA) (Oxoid, England)

ละลาย MEA 50 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

6. Starch Agar

ผสมแป้งข้าวเหนียว 0.5% w/v peptone 0.1% w/v และ agar 1.5% w/v ในน้ำกลั่น แล้วละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายน้ำเกลือปลอดเชื้อ (0.85% w/v NaCl) (Dung et al., 2005)

ละลาย NaCl 0.85 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลายไอโอดีนความเข้มข้น 0.25%

ละลายไอโอดีน 0.0317 กรัม และโปแทสเซียมไอโอไดด์ 0.1 กรัมในน้ำกลั่นที่มีกรด
ไฮโดคลอริกเข้มข้น 10% ปริมาตร 50 ml ละลายอยู่ ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่น (ลลิต ขำวงษ์รัตนโยธิน, 2548)

3. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

2.1 สารละลาย Fehling reagent ประกอบด้วย Fehling's solution no.1 และ no.2

- Fehling's solution no.1 เตรียมโดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 69.278 กรัมในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรโดยใช้ volumetric flask

- Fehling's solution no.2 เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 100 กรัม และโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท ($NaKC_4O_6.4H_2O$) Rochelle salt 346 กรัมในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร โดยใช้ volumetric flask

- สารละลายทั้งสองตัวนี้ต้องเตรียมแยกกันและเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล เมื่อต้องการใช้ให้ผสมสารละลายทั้งสองตัวนี้ด้วยปริมาตรเท่ากันทันทีก่อนใช้

2.2 สารละลาย 1% Methylene blue ในน้ำกลั่น

2.3 สารละลาย Zinc ferrocyanide : ประกอบด้วย Carrez I & II

- สารละลาย Carrez I เตรียมโดยละลาย zinc acetate dehydrate 21.9 กรัมในน้ำกลั่น ที่มีกรดอะซิติก (glacial acetic) 3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นใน volumetric flask

- สารละลาย Carrez II เตรียมโดยละลายโปแตสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ 10.6 กรัมในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรใน volumetric flask

4. NaOH ความเข้มข้น 0.1 N

เตรียมโดยชั่ง NaOH 4 กรัม ละลายกับน้ำปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 250 ml แล้วทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml ด้วยน้ำปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์

5. สารละลายฟีนอฟธาลีน (ปรับปรุงจาก AOAC, 1980)

เตรียมโดยชั่งฟีนอฟธาลีน 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวัดปริมาณของแข็งละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid ; TSS)

นำน้ำเชื่อมข้าว มาตรวจวัด TSS ด้วยเครื่อง Portable refractometer โดยใช้น้ำกลั่นในการสอบเทียบ (calibrate)

2. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Lane and Eynon (คู่มือปฏิบัติการรายวิชาการวิเคราะห์อาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยบูรพา)

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

- ชั่งตัวอย่างอาหารมา 25 กรัม ทำให้ใสโดยใช้สารละลาย zinc ferrocyanide ซึ่งประกอบด้วย Carrez I & II อย่างละ 5 มิลลิลิตร โดยเติม Carrez I 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเติม Carrez II ลงไปอีก 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอีกครั้งแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นใน volumetric flask ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งก่อนอินเวอร์ชั่น

- เตรียมสารละลายกลูโคส ความเข้มข้น 0.2 กรัม/100 มิลลิลิตร ใน volumetric flask 250 มิลลิลิตร โดยชั่งกลูโคส 0.50 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตรใน volumetric flask

2.2 การวิเคราะห์

แบ่งออกเป็น 2 ขั้นคือ 1. Preliminary titration และ 2. Accurate titration

1. Preliminary titration

นำลารละลายกลูโคสที่เตรียมไว้ใส่ในบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลาย Mixed fehling reagent มาอย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่ฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปต้มบนเตาจนเดือดแล้วจึงไทเทรตกับสารละลายกลูโคสจนสีน้ำเงินจางลง หยดสารละลาย Methylene blue 1-2 หยด ไทเทรตจนสีน้ำเงินหายไปหมด ให้เหลือตะกอนสีส้มแดง ทำซ้ำ และบันทึกปริมาณสารละลายกลูโคสที่ใช้ไทเทรต

2. Accurate titration

ปิเปตสารละลาย Mixed fehling reagent มาอย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกลูโคสจากบิวเรต โดยใช้ปริมาตรน้อยกว่าที่ใช้ในการทำ Preliminary titration ประมาณ 1-2 มิลลิลิตร แล้วต้มทันทีบนเตาจนเดือด เมื่อสีน้ำเงินจางหายไป หยดสารละลาย Methylene blue 1-2 หยด แล้วไทเทรตต่อโดยใช้อัตราเร็ว 0.25 มิลลิลิตรต่อวินาที ไทเทรตให้เสร็จภายใน 3 นาที ตั้งแต่เริ่มเดือดจนสีฟ้าจางหายไป

หมดเหลือแต่ตะกอนสีส้มของคิวปรัสออกไซด์ (ขณะไทเทรตสารละลายต้องเดือดอยู่ตลอดเวลา) บันทึกปริมาตรของสารละลายที่ใช้ไทเทรต ทำซ้ำอีก 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างโดยรายงานผลเป็นหน่วย กรัม/กรัมข้าวหมัก

3. การวัดปริมาณแอลกอฮอล์โดย Vinomerter

1. เทไวน์ลงในไวโนมิเตอร์ ปล่อยให้ไวน์ไหลลงจนถึงด้านล่าง ดูให้แน่ใจว่า ไม่มีฟองอากาศอยู่ในท่อ

2. คว่ำไวโนมิเตอร์ลง ไวน์จะไหลย้อนกลับ จนกระทั่งมาหยุดอยู่ที่จุดๆหนึ่งในท่อ

3. อ่านค่าปริมาณแอลกอฮอลล์เป็น % (โดยปริมาตร) ได้จากขีด (scale) ของเครื่อง ณ จุดที่น้ำไวน์ในท่อหยุดไหล

* ในกรณีที่มีฟองอากาศอยู่ในท่อ ให้ใช้ปากเป่าหรือใช้ลูกยางเป่าเพื่อช่วยให้ไวน์ไหล และดันฟองอากาศให้เคลื่อนออกจากท่อ

ภาพ ค-3 Vinometer

4. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (ปรับปรุงจาก AOAC, 1980)

นำตัวอย่างไวน์ 5 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล จนกระทั่งถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู คำนวณปริมาณกรดในรูปกรัมกรดแลคติกต่อปริมาตรไวน์ 100 มิลลิลิตร

$$\text{ปริมาณกรด (กรัม/100 มล.)} = \frac{\text{ปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์} \times \text{ความเข้มข้น} \times 90 \times 100}{1000 \times \text{ปริมาตรไวน์}}$$

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

1. การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.1 หยดสารละลาย lactophenol cotton blue ลงบริเวณตรงกลางของแผ่นสไลด์

1.2 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยส่วนของเส้นใยและสปอร์ราหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน วางลงบนหยดของสารละลาย lactophenol cotton blue

1.3 นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า สังเกตลักษณะเส้นใยและสปอร์ของรา บันทึกผล

2. การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.1 หยดสารละลายเมทิลีนบลูลงบริเวณตรงกลางของแผ่นสไลด์

2.2 ใช้ลูปนำยีสต์เพียงเล็กน้อยกระจายลงบนหยดของเมทิลีนบลูให้ทั่ว

2.3 แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์

2.4 นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 200 เท่า สังเกตลักษณะรูปร่างเซลล์ การแตกหน่อ การสร้างเส้นใย

3. การหาความเข้มข้นของกล้าเชื้อสปอร์รา

3.1 ปิเปตสารละลายสปอร์รา 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบน Haemacytometer (ภาพ ง-1)

3.2 วาง cover glass ลงบนหยดของตัวอย่างให้ตัวอย่างไหลทั่วแผ่น cover glass

3.3 นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 200 เท่า แล้วนับจำนวนสปอร์

3.4 การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ Haemacytometer

- ในกรณีที่สปอร์หรือเซลล์ที่ต้องการนับมีขนาดเล็ก การนับควรใช้บริเวณ E ตรงกลาง ซึ่งประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก (Small squares) ทั้งหมด 25 ช่อง และแต่ละช่องเล็กนั้นจะประกอบด้วยช่องขนาดเล็กที่สุด (Smallest squares) อยู่ 16 ช่อง การนับสปอร์จำนวนทั้งหมดที่อยู่ในบริเวณนี้ จะรวมทั้งสปอร์ที่อยู่บริเวณขอบของตารางทุกช่องด้วย (ภาพ ง-2)

- พื้นที่บริเวณ E เท่ากับ 25 x 16 x 1/400 ตารางมิลลิเมตรคิดเป็นปริมาตร (มีความลึก 1/10 มิลลิเมตร) จะเท่ากับ 25 x 16 x 1/400 x 1/10 ลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิลิตร

- สมมุตินับสปอร์ในบริเวณ E ได้รวมทั้งหมดเท่ากับ Y สปอร์ ใน 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตรต้องการเทียบความเข้มข้นในหน่วย ลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ 1 มิลลิลิตร ซึ่ง 1 มิลลิลิตร เท่ากับ 1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

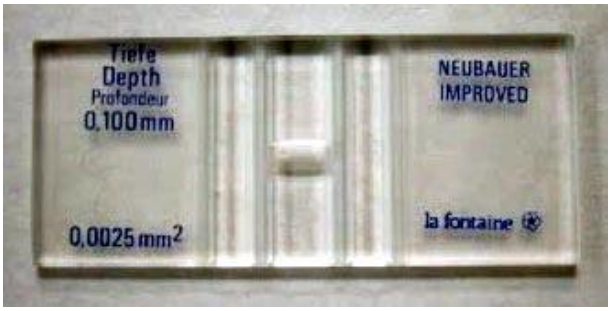
ดังนั้น ในปริมาตร 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตรนับสปอร์ได้ = Y สปอร์

ถ้าใน 1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร(1 มิลลิลิตร) จะมีสปอร์ = Y x 1000 x 1/0.1 สปอร์

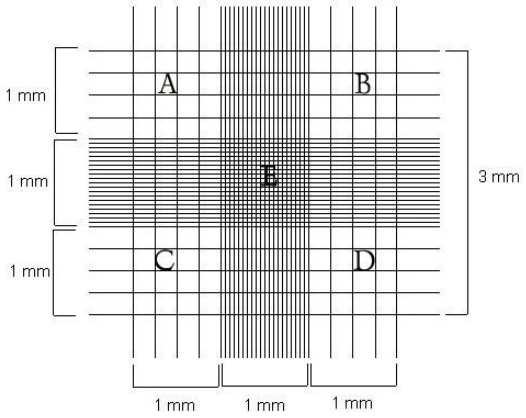
= Y x 1 x 10^4 สปอร์ / มิลลิลิตร

- ในกรณีสปอร์ หรือ เซลล์มีขนาดใหญ่ ควรนับจำนวนสปอร์หรือเซลล์ทุกบริเวณ A B C D และ E จากนั้นนำค่าที่ได้มารวมกัน และหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วย 5 อีกครั้ง ก่อนนำไปคำนวณความเข้มข้น เช่น สมมุตินับจำนวนสปอร์ได้รวมกันเท่ากับ Z สปอร์ ดังนั้นความเข้มข้นของสปอร์ต่อ 1 มิลลิลิตร . = Z/5 x 1 x 10 4 สปอร์ / มิลลิลิตร

-



ภาพ ง-1 Haemacytometer



ภาพ ง-2 บริเวณ A, B, C, D และ E (Counting areas) ที่ใช้นับจำนวนสปอร์รา

ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากตาราง Anova ด้วยโปรแกรม SPSS version 15.0 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ได้ผลการวิเคราะห์ดังตาราง ฉ-1 ถึง ฉ-5

ตารางที่ ฉ-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของประสิทธิภาพการย่อยแป้ง

Source of variation	df	SS	MS	F	Sig.
บริเวณใส	13	30.228	2.325	948.564	.000*
Error	28	.069	.002		
Total	42	111.820			

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตาราง ฉ-2 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยบริเวณใสที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บริเวณใส					
Duncan					
Type	**N**	**Subset**			
		1	**2**	**3**	**4**
Mn14	3	1.0000			
Ms2	3	1.0000			
Ms3	3	1.0000			
Mn16	3	1.0230			
Mn10	3	1.0266			
Mn15	3	1.0433			
Mn13	3	1.0510			
Mn111	3	1.0786			
Mn12	3	1.0823			

ตาราง ฉ-2 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยบริเวณใสที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ต่อ)

บริเวณใส					
Duncan					
Type	**N**	**Subset**			
		1	**2**	**3**	**4**
Mn8	3		1.2820		
Mn7	3		1.3500		
Mn5	3		1.3590		
Mn9	3			1.8730	
Ms1	3				4.3360
Sig.		.091	.081	1.000	1.000

ตารางที่ ฉ-3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณของแข็งละลายได้ทั้งหมด (TSS)

Source of variation	df	SS	MS	F	Sig.
°Brix	2	2.889	1.444	68.421	.000*
Error	6	.127	.021		
Total	9	1436.900			

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ ฉ-4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณแอลกอฮอล์

Source of variation	df	SS	MS	F	Sig.
Alcohol	2	7.018	3.509	52.636	.000*
Error	18	1.200	.067		
Total	21	1124.390			

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ ฉ-5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกรดในรูปกรดแลคติก

Source of variation	df	SS	MS	F	Sig.
Total Acids	2	0.160	0.080	1485.167	.000*
Error	6	0.000	0.000		
Total	8	0.161			

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ภาคผนวก ฉ
การสุ่มจำนวนประชากรและตัวอย่าง

ตาราง ช-1 จำนวนประชากรและจำนวนกลุ่มตัวอย่าง ของ Krejcie and Morgan

จำนวนประชากร	จำนวนกลุ่มตัวอย่าง	จำนวนประชากร	จำนวนกลุ่มตัวอย่าง	จำนวนประชากร	จำนวนกลุ่มตัวอย่าง
10	10	220	140	1200	291
15	14	230	144	1300	297
20	19	240	148	1400	302
25	24	250	152	1500	306
30	28	260	155	1600	310
35	32	270	159	1700	313
40	36	280	162	1800	317
45	40	290	165	1900	320
50	44	300	169	2000	322
55	48	320	175	2200	327
60	52	340	181	2400	331
65	56	360	186	2600	335
70	59	380	191	2800	338
80	63	400	196	3000	341
85	66	420	201	3500	346
90	70	440	205	4000	351
95	73	460	210	4500	354
100	76	480	214	5000	357
110	80	500	217	6000	361
120	86	550	226	7000	364
130	92	600	234	8000	367
140	97	650	242	9000	368
150	103	700	248	10000	370

ตาราแสดง จำนวนประชากรและจำนวนกลุ่มตัวอย่าง ของ Krejcie and Morgan (ต่อ)

จำนวนประชากร	จำนวนกลุ่มตัวอย่าง	จำนวนประชากร	จำนวนกลุ่มตัวอย่าง	จำนวนประชากร	จำนวนกลุ่มตัวอย่าง
160	108	750	254	15000	375
170	113	800	260	20000	377
180	118	850	265	30000	379
190	123	900	269	40000	380
200	127	950	274	50000	381
210	132	1000	278	75000	382

ภาคผนวก ช

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน เรื่อง สาโท (มผช.๓/๒๕๔๖)

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน

สาโท

๑. ขอบข่าย

๑.๑ มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ไม่ครอบคลุมถึงสุราแช่ชนิดเบียร์ และสุราแช่อื่นที่ได้มีการกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนขึ้น

๒. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ มีดังต่อไปนี้

๒.๑ สาโท หมายถึง สุราแช่ชนิดหนึ่งที่ทำจากการนำข้าวมาผ่านกรรมวิธีการผลิตสาโท แล้วมีแรง

แอลกอฮอล์ไม่เกิน ๑๕ ดีกรี/ร้อยละโดยปริมาตร

๒.๒ สุราแช่ หมายถึง สุราที่ไม่ได้กลั่น และให้หมายรวมถึงสุราแช่ที่ได้ผสมกับสุรากลั่นแล้วแต่ยังมี

แรงแอลกอฮอล์ไม่เกิน ๑๕ ดีกรี/ร้อยละโดยปริมาตร

๒.๓ กรรมวิธีการผลิตสาโท หมายถึง การหมักข้าวต่างๆ ด้วยเชื้อราและยีสต์ หรือลูกแป้งเพื่อเปลี่ยน

แป้งให้เป็นแอลกอฮอล์ซึ่งหมักไว้ระยะหนึ่งจากนั้นเติมน้ำสะอาดในอัตราส่วนที่เหมาะสม และ

อาจมีการเติมน้ำตาลทรายขาวให้เหมาะสมกับการหมักสาโท หมักต่ออีกระยะหนึ่งเพื่อให้ได้แรง

แอลกอฮอล์ตามต้องการ

๒.๔ ลูกแป้ง หมายถึง เชื้อสุรา แป้งเชื้อสุรา แป้งข้าวหมัก หรือเชื้อใดๆ เมื่อนำมาหมักกับวัตถุหรือ

ของเหลวอื่นๆ แล้วสามารถทำให้เกิดแอลกอฮอล์ที่ใช้ทำสุรา ลูกแป้งอาจผสมสมุนไพร หรือ

เครื่องเทศด้วยหรือไม่ก็ได้

๒.๕ รา หมายถึง จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ใช้ในการหมักสาโท มีหน้าที่เปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล

๒.๖ ยีสต์ หมายถึง จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ใช้ในการหมักสาโท มีหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์

๓. คุณลักษณะที่ต้องการ

๓.๑ คุณลักษณะทางเคมี

๓.๑.๑ แรงแอลกอฮอล์ต้องไม่เกิน ๑๕ ดีกรี/ร้อยละโดยปริมาตร และมีเกณฑ์ความคลาดเคลื่อน

จากที่ระบุไว้ที่ฉลากได้ไม่เกิน ± ๑ ดีกรี/ร้อยละโดยปริมาตร

๓.๑.๒ เมทิลแอลกอฮอล์ ต้องไม่เกิน ๔๒๐ มิลลิกรัมต่อลิตร

๓.๑.๓ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมด ต้องไม่เกิน ๓๐๐ มิลลิกรัมต่อลิตร

๓.๑.๔ กรดซอร์บิกหรือเกลือของกรดซอร์บิก(คำนวณเป็นกรดซอร์บิก) ต้องไม่เกิน ๒๐๐ มิลลิกรัม

ต่อลิตร

๓.๑.๕ กรดเบนโซอิกหรือเกลือของกรดเบนโซอิก(คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก) ต้องไม่เกิน ๒๕๐

มิลลิกรัมต่อลิตร

๓.๑.๖ ทองแดง ต้องไม่เกิน ๕ มิลลิกรัมต่อลิตร

๓.๑.๗ เหล็ก ต้องไม่เกิน ๑๕ มิลลิกรัมต่อลิตร

๓.๑.๘ ตะกั่ว ต้องไม่เกิน ๐.๒ มิลลิกรัมต่อลิตร

๓.๑.๙ สารหนู ต้องไม่เกิน ๐.๑ มิลลิกรัมต่อลิตร

๓.๑.๑๐ เฟอร์โรไซยาไนด์ ต้องไม่พบ

๓.๒ คุณลักษณะทางกายภาพ

๓.๒.๑ ความใส/ขุ่น

ให้เป็นไปตามลักษณะการผลิตเฉพาะของสาโทที่ผลิตได้

๓.๒.๒ สี

มีสีเป็นไปตามธรรมชาติของวัตถุดิบที่ใช้ทำ และเป็นไปตามที่ระบุไว้ที่ฉลาก

๓.๒.๓ กลิ่น

มีกลิ่นหอมตามธรรมชาติของวัตถุดิบที่ใช้ทำ

๓.๒.๔ รสชาติ

กลมกล่อมตามธรรมชาติของวัตถุดิบที่ใช้ทำ

๓.๒.๕ คุณภาพโดยรวมของสาโท

มีความใส/ขุ่น สี กลิ่น และรสชาติ เป็นที่ยอมรับ

เมื่อตรวจสอบโดยวิธีให้คะแนนตามข้อ ๘.๒ แล้ว ต้องได้คะแนนเฉลี่ยของแต่ละลักษณะจากผู้

ตรวจสอบทุกคนไม่น้อยกว่าร้อยละ ๖๐ และไม่มีลักษณะใดได้น้อยกว่าร้อยละ ๓๐

ของคะแนน

เต็ม จากผู้ตรวจสอบคนใดคนหนึ่ง

๓.๓ สิ่งแปลกปลอม

ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่วัตถุดิบที่ใช้ทำ

๓.๔ ความเสถียร

ต้องไม่ปรากฏฟองในภาชนะบรรจุอันเนื่องมาจากการหมักซ้ำ

๔. สุขลักษณะ

๔.๑ สุขลักษณะในการทำสาโท ให้เป็นไปตามคำแนะนำตามภาคผนวก ก.

๕. การบรรจุ

๕.๑ ให้บรรจุสาโทในในภาชนะบรรจุที่เหมาะสม สะอาด แห้ง ปิดได้สนิท และไม่ทำปฏิกิริยากับสาโทที่บรรจุอยู่

๕.๒ ขนาดบรรจุของสาโทในแต่ละภาชนะบรรจุต้องไม่น้อยกว่าที่ระบุไว้ที่ฉลาก

๖. เครื่องหมายและฉลาก

๖.๑ ที่ภาชนะบรรจุสาโททุกหน่วย อย่างน้อยต้องมี เลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียด

ต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่ายชัดเจน

(๑) ชื่อเรียกผลิตภัณฑ์ เช่น สาโทข้าวเหนียว

(๒) แรงแอลกอฮอล์ เป็นดีกรี หรือ ร้อยละโดยปริมาตร

(๓) ขนาดบรรจุ

(๔) ส่วนประกอบหลัก หรือวัตถุดิบที่ใช้ทำ

(๕) คำเตือนตามกฎหมายที่เกี่ยวข้องกำหนด เช่น การดื่มสุราทำให้ความสามารถในการขับขี่

ยานพาหนะลดลง

(๖) วัน เดือน ปีที่บรรจุ

(๗) ชื่อผู้ทำ หรือสถานที่ทำ พร้อมสถานที่ตั้ง หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน

ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศ ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้ข้างต้น ยกเว้น

ข้อ (๕) ต้องเป็นภาษาไทย

๗. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

๗.๑ รุ่น ในที่นี้ หมายถึง สาโทที่ทำจากวัตถุดิบและกรรมวิธีเดียวกัน ที่ทำหรือซื้อขายหรือส่งมอบใน

ระยะเวลาเดียวกัน

๗.๒ การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้

๗.๒.๑ การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบคุณลักษณะทางเคมี สิ่งแปลกปลอม

ความเสถียรการบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน

จำนวน ๓ หน่วยภาชนะบรรจุ เมื่อตรวจสอบแล้วทุกตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ ๓.๑ ข้อ ๓.๓

ข้อ ๓.๔ ข้อ ๕. และข้อ ๖. จึงจะถือว่าสาโทรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

๗.๒.๒ การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบคุณลักษณะทางกายภาพ ให้ชักตัวอย่าง

โดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน ๕ หน่วยภาชนะบรรจุ เมื่อตรวจสอบแล้วทุกตัวอย่างต้อง

เป็นไปตามข้อ ๓.๒จึงจะถือว่าสาโทรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

๗.๓ เกณฑ์ตัดสิน

ตัวอย่างสาโทต้องเป็นไปตามข้อ ๗.๒.๑ และข้อ ๗.๒.๒ ทุกข้อ จึงจะถือว่าสาโทรุ่นนั้นเป็นไปตาม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้

๘. การทดสอบ

๘.๑ การทดสอบคุณลักษณะทางเคมี และขนาดบรรจุ ให้ปฏิบัติตามวิธีวิเคราะห์ที่หน่วยตรวจสอบใช้ปฏิบัติอยู่เป็นประจำ

๘.๒ การทดสอบคุณลักษณะทางกายภาพ

๘.๒.๑ ให้แต่งตั้งคณะผู้ตรวจสอบ ๑๐ คน แต่ละคนจะแยกกันตรวจและให้คะแนนโดยอิสระ

๘.๒.๒ คุณสมบัติของคณะผู้ตรวจสอบ ให้เป็นไปตามภาคผนวก ข.

๘.๒.๓ หลักเกณฑ์การให้คะแนน ให้เป็นไปตามภาคผนวก ค.

๘.๓ การทดสอบสิ่งแปลกปลอม ความเสถียร ภาชนะบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก ให้ตรวจพินิจ

ภาคผนวก ก.

สุขลักษณะ

(ข้อ ๔.๑)

ก.๑ สถานที่ตั้งและอาคารผลิต

ก.๑.๑ สถานที่ตั้งตัวอาคารและที่ใกล้เคียง ควรอยู่ในที่ที่จะไม่ทำให้สาโทที่ผลิตเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายโดย

ก.๑.๑.๑ สถานที่ตั้งตัวอาคารและบริเวณโดยรอบ สะอาด ไม่มีน้ำขังแฉะและสกปรก

ก.๑.๑.๒ ควรอยู่ห่างจากบริเวณหรือสถานที่ที่มีฝุ่นมากผิดปกติ

ก.๑.๑.๓ ไม่ควรอยู่ใกล้เคียงกับสถานที่น่ารังเกียจ

ก.๑.๒ อาคารผลิตมีขนาดเหมาะสม มีการออกแบบและก่อสร้างในลักษณะที่ง่ายแก่การบำรุงรักษา การทำความสะอาด และสะดวกในการปฏิบัติงาน โดย

ก.๑.๒.๑ พื้น ฝาผนัง และเพดานของอาคารสถานที่ผลิต ควรก่อสร้างด้วยวัสดุที่คงทน ทำความสะอาด และซ่อมแซมให้อยู่ในสภาพที่ดีตลอดเวลา

ก.๑.๒.๒ ควรแยกบริเวณผลิตสาโทออกเป็นสัดส่วน ไม่ควรอยู่ใกล้ห้องสุขา ไม่ควรมีสิ่งของที่ไม่ใช้แล้วหรือไม่เกี่ยวข้องกับการผลิตอยู่ในบริเวณผลิต

ก.๑.๒.๓ พื้นที่ปฏิบัติงาน ควรมีบริเวณเพียงพอ แสงสว่าง และการระบายอากาศที่เหมาะสม

ก.๒ เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ในการผลิต

ก.๒.๑ ภาชนะหรืออุปกรณ์ในการผลิตที่สัมผัสกับสาโท ทำจากวัสดุมีผิวเรียบ ไม่เป็นสนิม ไม่กัดกร่อนหรือทำปฏิกิริยากับสาโท ล้างทำความสะอาดได้ง่าย

ก.๒.๒ เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ที่ใช้ สะอาด และเหมาะสมกับการใช้งาน ไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนติดตั้งได้ง่าย มีปริมาณเพียงพอ รวมทั้งสามารถทำความสะอาดได้ง่ายและทั่วถึง

ก.๓ การควบคุมกระบวนการผลิต

ก.๓.๑ วัตถุดิบและส่วนผสมในการผลิตสาโท สะอาด มีคุณภาพดี มีการล้างหรือทำความสะอาดก่อนนำไปใช้

ก.๓.๒ น้ำที่ใช้ในการผลิต สะอาด มีคุณภาพดี ให้ผ่านการต้มหรือกรองก่อนนำมาใช้ในการผลิตสาโท

ก.๓.๓ การผลิต การเก็บรักษา ขนย้าย และขนส่งสาโท มีการป้องกันการปนเปื้อนและการเสื่อมเสียของสาโท

ก.๔ การสุขาภิบาล การบำรุงรักษา และการทำความสะอาด

ก.๔.๑ น้ำที่ใช้ล้างทำความสะอาดเครื่องมือ เครื่องจักร อุปกรณ์ และมือผู้ประกอบสาโท ควรเป็นน้ำสะอาดและมีปริมาณเพียงพอ

ก.๔.๒ มีวิธีการป้องกันและกำจัดสัตว์นำเชื้อ แมลงและฝุ่นผง ไม่ให้เข้าในบริเวณผลิตตามความเหมาะสม

ก.๔.๓ มีการกำจัดขยะ สิ่งสกปรก และน้ำทิ้ง อย่างเหมาะสม เพื่อไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนกลับลงสู่สาโท

ก.๔.๔ สารเคมีที่ใช้ล้างทำความสะอาด และใช้กำจัดสัตว์นำเชื้อและแมลง ควรใช้ในปริมาณที่เหมาะสม และเก็บแยกจากบริเวณที่ผลิตสาโท เพื่อไม่ให้ปนเปื้อนลงสู่สาโทได้

ก.๕ บุคลากรและสุขลักษณะผู้ปฏิบัติงาน

ผู้ทำสาโททุกคนต้องรักษาความสะอาดส่วนบุคคลให้ดี เช่น สวมเสื้อผ้าที่สะอาด ควรมีผ้าคลุมผมเพื่อป้อกันไม่ให้เส้นผมหล่นลงในอาหาร ไม่ไว้เล็บยาว และล้างมือให้สะอาดก่อนสัมผัสสาโททุกครั้ง

ภาคผนวก ข.
คุณสมบัติของคณะผู้ตรวจสอบ
(ข้อ ๘.๒.๒)

ข.๑. คุณสมบัติของคณะผู้ตรวจสอบ

ข.๑.๑ มีความชำนาญในการตรวจสอบสาโท

ข.๑.๒ ประกอบด้วยผู้แทนจากกลุ่มบุคคลต่างๆ จำนวน ๑๐ คน ดังนี้

ข.๑.๒.๑ ผู้ผลิต ๒ คน

ข.๑.๒.๒ นักวิชาการ/ผู้ทรงคุณวุฒิ ๓ คน

ข.๑.๒.๓ ผู้บริโภค ๔ คน

ข.๑.๒.๔ ภาครัฐที่เกี่ยวข้อง ๑ คน

ภาคผนวก ค.

หลักเกณฑ์การให้คะแนนในการทดสอบ ความใส/ขุ่น สี กลิ่น รสชาติ และคุณภาพโดยรวมของสาโท

(ข้อ ๘.๒.๓)

ลักษณะที่ตรวจสอบ	เกณฑ์ที่กำหนด	คะแนนเต็ม
ความใส/ขุ่น	เป็นไปตามลักษณะการผลิตเฉพาะของสาโทที่ผลิตได้	๑๐
สี	สีเป็นไปตามธรรมชาติของวัตถุดิบที่ใช้ทำและเป็นไปตามที่ระบุไว้ที่ฉลาก	๑๐
กลิ่น	มีกลิ่นหอมตามธรรมชาติของวัตถุดิบที่ใช้ทำ	๓๐
รสชาติ	กลมกล่อมตามธรรมชาติของวัตถุดิบที่ใช้ทำ	๓๐
คุณภาพโดยรวมของสาโท	มีความใส/ขุ่น สี กลิ่น และรสชาติ เป็นที่ยอมรับ	๒๐