



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การคัดแยกจุลินทรีย์ออโตโคโนสที่เกี่ยวข้องกับการหมักน้ำสับประดคั้นสด
เป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตน้ำผลไม้ น้ำตาลต่ำ

Isolation of autochthonous microorganisms associated with fermentation
of freshly crushed pineapple juice as starter culture
for low sugar fruit juice production

นางสาวอรอง จันทร์ประสาทสุข

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 354187
สัญญาเลขที่ 149/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การคัดแยกจุลินทรีย์ออโตโคโนสที่เกี่ยวข้องกับการหมักน้ำสับประดคั้นสด
เป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตน้ำผลไม้ น้ำตาลต่ำ

Isolation of autochthonous microorganisms associated with fermentation
of freshly crushed pineapple juice as starter culture
for low sugar fruit juice production

นางสาวอรอง จันท์ประสาทสุข
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 149/2560

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 149/2560)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักน้ำสับประรด กลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ น้ำสับประรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทองอายุในระยะเก็บเกี่ยวจาก จ.ตราด มาคั้นน้ำทิ้งเปลือกแล้วนำน้ำสับประรดคั้นสดมาปล่อยให้เกิดการหมักแบบธรรมชาติที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส) นาน 7 วัน ติดตามวิเคราะห์ผลทางจุลชีววิทยาทุกวัน แล้วนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาจัดจำแนกสายพันธุ์เบื้องต้นตามลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเซลล์ พบว่าจำนวนประชากรยีสต์และราในน้ำสับประรดคั้นสดมีค่าเริ่มต้นเท่ากับ $6.1 \pm 0.1 \log \text{ cfu/ml}$ จากนั้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วประมาณ $2 \log \text{ cycle}$ ในช่วง 4 วันแรกของการหมัก โดยมีประชากรยีสต์และราทั้งหมดเท่ากับ $8.2 \pm 0.1 \log \text{ cfu/ml}$ ในวันสุดท้ายของการหมัก เมื่อนำยีสต์และรามาคัดแยกเบื้องต้น สามารถแบ่งยีสต์และราได้เป็น 12 กลุ่ม คือ A B C D E F G H I J K และ L สำหรับจำนวนประชากรแบคทีเรียกรดแลคติกในน้ำสับประรดคั้นสดมีค่าเริ่มต้นเท่ากับ $5.0 \pm 2.4 \log \text{ cfu/ml}$ และเพิ่มขึ้น $3 \log \text{ cfu/ml}$ ในระหว่างวันที่ 0-3 ของการหมัก โดยมีจำนวนประชากรสูงสุดเท่ากับ $8.1 \pm 0.3 \log \text{ cfu/ml}$ ในวันที่ 3 ของการหมัก เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาคัดแยกเบื้องต้น สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ A E และ H อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถตรวจพบแบคทีเรียกรดอะซิติกในระหว่างการหมักน้ำสับประรดคั้นสดจากการศึกษา

Abstract

The main goal of this study is to undertake the investigation of microorganism associated with spontaneous Queen pineapple juice fermentation. Initially, Queen pineapple, Trad-seethong varieties, samples at harvesting stage were collected from Trad Province. The natural fermentation of whole fresh crushed pineapple juice was conducted at ambient temperature (28-30°C) for 7 days. The microbiological properties of pineapple juice were monitored everyday throughout the fermentation. The basically characteristics of microorganism isolates were identified including colony and cell morphologies. The initial population of yeast and mold was 6.1 ± 0.1 log cfu/ml and rapidly increased 2 log cycle in 4 days of fermentation. Yeast and mold population was 8.2 ± 0.1 log cfu/ml at the final of fermentation. Based on the results of characterization, Yeast and mold were divided to 12 groups, i.e. A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K and L. Lactic acid bacteria population were found to have an initial value of 5.0 ± 2.4 log cfu/ml and increased approximately 3 log cfu/ml during 1-3 days of fermentation. The maximum population was 8.1 ± 0.3 log cfu/ml on day 3 of fermentation. Based on the results of characterization, lactic acid bacteria isolates were divided to 3 groups, i.e. A, E and H. However, acetic acid bacteria population were not found in this study.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
เรื่อง	
1. เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	
1.1 สืบประวัติ	1
1.2 การหมัก	4
1.3 การหมักแบบธรรมชาติ	7
1.4 บทบาทของจุลินทรีย์ต่อการหมัก	8
2. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	13
3. วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	14
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	14
5. รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย	15
5.1 การเก็บตัวอย่างผลสืบประวัติ	15
5.2 การวิเคราะห์จุลินทรีย์การวิเคราะห์จุลินทรีย์	15
5.3 การวิเคราะห์จุลินทรีย์	15
5.4 การหมักน้ำสับประวัติขึ้นสดด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์	17

เรื่อง	หน้า
6. ผลการวิจัยและวิจารณ์	17
6.1 ลักษณะทางกายภาพของสับปรดกลุ่มควีน	17
6.2 การหมักน้ำสับปรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ	18
6.3 การจำแนกจุลินทรีย์เบื้องต้น	25
6.4 การจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล	26
7. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	27
7.1 ลักษณะทางกายภาพของสับปรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทอง	27
7.2 การหมักน้ำสับปรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทองคั้นสดแบบธรรมชาติ	27
ผลผลิต	30
รายงานสรุปการเงิน	31
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	38
ประวัตินักวิจัย	50

สารบัญตาราง (List of tables)

ตารางที่		หน้า
1.1	จุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์อาหารระหว่างการหมักแบบธรรมชาติ	9
6.1	จำนวนประชากรและลักษณะจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี ยีสต์และราที่คัดแยกได้ในระหว่างการหมักน้ำสับประรดพันธุ์ตราดสีทอง แบบธรรมชาติ	20
6.2	จำนวนประชากรและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีแบคทีเรีย กรดอะซิติกที่คัดแยกได้ในระหว่างการหมักน้ำสับประรดพันธุ์ตราดสีทอง แบบธรรมชาติ	22
6.3	จำนวนประชากรและลักษณะจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในระหว่างการหมักน้ำสับประรดพันธุ์ ตราดสีทองแบบธรรมชาติ	24
6.4	ผลการจัดจำแนกจุลินทรีย์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล	26

สารบัญภาพ (List of illustrations)

ภาพที่	หน้า	
1.1	สับปะรดกลุ่ม Smooth Cayanne	2
1.2	สับปะรดกลุ่ม Queen	3
1.3	สับปะรดกลุ่ม Red Spanish	3
1.4	แผนภาพแสดง alcoholic fermentation	6
1.5	แผนภาพแสดง Lactic acid fermentation	7
5.1	การหมักสับปะรดคั้นสดแบบธรรมชาติ	15
6.1	ผลสับปะรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทอง	18
6.2	จำนวนประชากรยีสต์และรา (log cfu/ml) ที่คัดแยกได้ในระหว่าง การหมักน้ำสับปะรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ	19
6.3	จำนวนประชากรแบคทีเรียกรดอะซิติก (log cfu/ml) ที่คัดแยกได้ ในระหว่างการหมักน้ำสับปะรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ	22
6.4	จำนวนประชากรแบคทีเรียกรดแลคติก (log cfu/ml) ที่คัดแยกได้ ในระหว่างการหมักน้ำสับปะรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ	24

บทนำ (Introduction)

1. เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

1.1 สับปะรด

สับปะรด (Pineapple; *Ananus comosus* (L.) Merr) เป็นไม้ผลในวงศ์ Bromeliaceae สับปะรดเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี (herbaceous perennial) อาจเป็นพืชบก (terrestrial plant) ที่ทนแล้งได้ดี เพราะใบมีเนื้อเยื่อเก็บสะสมน้ำหรือเป็นพืชอิงอาศัย (epiphyte) ใบมีขนาดใหญ่แข็ง และหนา (tough leaves) รูปแหลม เรียวยาว ออกเป็นพุ่ม (rosette) มีกลุ่มใบขนาดเล็กที่เกิดเป็นจุก (crown) อยู่บนยอดของผล ผล (pseudocarp fruit) เป็นผลรวมที่ประกอบด้วยผลย่อยที่เป็นผลเดี่ยวแบบมีเนื้อ (หลายเมล็ด) จำนวน 1-200 ผล อัดและเชื่อมกันสนิทอยู่บนแกนหรือก้านช่อดอก ผล รูปทรงกลม ทรงกระบอก เรียวยาว หรือรูปถังเปียร์ ขนาดเล็กประมาณ 0.5 กิโลกรัม ขนาดใหญ่ประมาณ 3.5 กิโลกรัม มีดอกแบบสมบูรณ์เพศ เมื่อผสมติดเมล็ดก็ขยายพันธุ์ต่ออีก หน่อ (sucker) เป็นส่วนยอดที่เกิดจากลำต้นจริง หน่อตะเกียง (silp) งอกมาจากลำต้นใต้ผล หน่อตะเกียงที่ติดอยู่กับต้นเดิมจะไม่ออกผล และงอกราก สับปะรดขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้ (จินดารัฐ วีระวุฒิ, 2541)

1.1.1 พันธุ์สับปะรด

พันธุ์สับปะรดที่ปลูกกันในประเทศไทยมีอยู่หลายพันธุ์ด้วยกัน ซึ่งอาจมีชื่อเรียกแตกต่างกัน ไปมากมายตามแต่ละท้องถิ่น แต่เมื่อได้ทำการศึกษาลักษณะเฉพาะของพันธุ์สับปะรดที่มีอยู่ใน ประเทศไทย โดยถือตามลักษณะของต้นที่มีขนาดโตเต็มที่ และแข็งแรงสมบูรณ์เป็นบรรทัดฐานแล้ว สามารถแบ่งออกได้ 5 กลุ่ม คือ Smooth Cayenne, Queen, Red Spanish, Abacaxi และ Pernambuco (จินดารัฐ วีระวุฒิ, 2541) สำหรับพันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทยพบเพียง 3 กลุ่ม คือ

- กลุ่ม Smooth Cayenne

สับปะรดกลุ่มนี้รู้จักกันแพร่หลายในนามสับปะรดศรีราชา สับปะรดปราณบุรี สับปะรดสามร้อยยอด เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกกันแพร่หลายที่สุด เนื่องจากเป็นที่นิยมของตลาดเพื่อใช้บริโภคผลสดและใช้เป็นวัตถุดิบในโรงงานอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋องและเป็นสับปะรดเพียงพันธุ์เดียวในปัจจุบันที่เหมาะสมสำหรับส่งโรงงานอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋อง เพราะมีคุณสมบัติสำหรับบรรจุกระป๋องที่ค่อนข้างดีหลายประการ นอกจากนี้ยังมีการปลูกกันทั่วไปเพื่อขายผลสดซึ่งได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย และมีรสชาติหวานฉ่ำถูกรสนิยมของคนไทย โดยสับปะรดพันธุ์ Smooth Cayenne หรือปัตตาเวีย จะมีลักษณะขอบใบเรียบมีหนามเพียงเล็กน้อยที่ส่วนปลายใบ ใบมีสีเขียวเข้ม ด้านบนเป็นมัน และมักมีเหลือบสีแดงในฤดูที่มีแสงแดดจัด ผลมีรูปร่างค่อนข้างทรงกระบอก

แต่ถ้าผลมีขนาดใหญ่มักจะมีส่วนปลายผลเล็กกว่าส่วนโคน (conical shape) น้ำหนักผลประมาณ 1.0-2.5 กิโลกรัม เนื้อข้างในมีสีเหลือง มีเส้นใย (fiber) ปานกลาง มีปริมาณกรด 0.3-0.7 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณน้ำตาล 12-16 บริกซ์ ลักษณะประจำพันธุ์ดั้งเดิมจะมีตะเกียง 1-2 ตะเกียง แต่ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทยมักไม่สร้างตะเกียง แหล่งเพาะปลูกที่สำคัญของพันธุ์ปัตตาเวีย คือ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชลบุรี ระยอง เพชรบุรี และลำปาง ตัวอย่างของสับปะรดในกลุ่มนี้แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1.1 สับปะรดกลุ่ม Smooth Cayenne

ที่มา : อรอน จันทรประสาทสุข

- กลุ่ม Queen

สับปะรดกลุ่มนี้มีลักษณะเด่นภายนอกคือ ขอบใบที่ต้นและขอบใบที่จุกผลมีหนามสั้นๆ แหลมคม ทรงโค้ง สีน้ำตาลแดง ผลเป็นรูปทรงกระบอก ผิวเปลือกเมื่อแก่สุกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มหรือเหลืองส้ม ตาใหญ่ ร่องตาลึก เปลือกหนา ตาลึก ทนทานต่อการขนย้ายลักษณะภายในนั้นมีความหวาน 16-20 บริกซ์ กลิ่นหอมมาก เนื้อสีเหลืองเข้ม เนื้อและไส้กรอบ เนื้อแห้งไม่ฉ่ำน้ำ เนื้อมีเส้นใยอ่อนนุ่ม เคี้ยวไม่ติดฟัน เป็นกลุ่มที่มีชื่อเรียกกันหลายชื่อ เช่น พันธุ์สวี พันธุ์ชุมพร พันธุ์ตราดสีทอง เป็นต้น เป็นพันธุ์ที่ปลูกกันมากในจังหวัดภูเก็ต ชุมพร นครศรีธรรมราช ตราด ตัวอย่างของสับปะรดในกลุ่มนี้แสดงดังภาพที่ 1.2

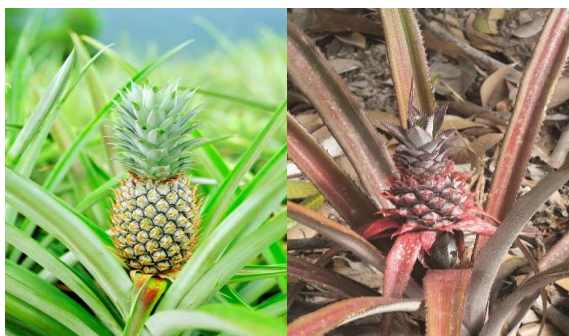


ภาพที่ 1.2 สับปะรดกลุ่ม Queen

ที่มา : อรอน จันทรประสาทสุข

- กลุ่ม Red Spanish

สับปะรดกลุ่มนี้มีลักษณะรูปทรงของต้นคล้ายกับพันธุ์ปตตาเวีย แต่ค่อนข้างจะโค้งงอมากกว่า ใบมีสีเขียวอ่อน ผิวใบด้านนอกไม่เป็นมัน ใบจะแผ่อกไม่เป็นร่องเด่นชัดเหมือนพันธุ์ปตตาเวีย ขอบใบจะมีหนามแหลมคมรูปโค้งงอ ขอบใบทั้งสองมีแถบสีแดงอมน้ำตาลตามแนวยาว ผลมีรูปร่างกลม น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 1.0-1.5 กิโลกรัม เนื้อข้างในมีสีเหลืองจาง และมีปริมาณเส้นใยปานกลาง แกนผลเหนียว กลิ่นและรสแตกต่างจากสองกลุ่มแรก ตัวอย่างสับปะรดในกลุ่มนี้ได้แก่ พันธุ์อินทรชิตหรืออินทรชิตแดง พันธุ์ขาวเหลืองเพาะปลูกที่สำคัญคือในจังหวัดฉะเชิงเทรา ตัวอย่างของสับปะรดในกลุ่มนี้แสดงดังภาพที่ 1.3



ภาพที่ 1.3 สับปะรดกลุ่ม Red Spanish

ที่มา : ฉะฉันท แก้วศรี, 2557

1.2 การหมัก

คำว่า การหมัก มาจากภาษาละติน คือ Fervere หมายถึงการเดือด (Boil) ซึ่งสื่อถึงลักษณะของฟองก๊าซที่เกิดขึ้นในการหมักผลไม้และข้าวมอลต์โดยยีสต์ การที่น้ำหมักที่ได้มีลักษณะเป็นฟองเนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลในผลไม้เป็นแหล่งอาหาร (แหล่งอาหารของยีสต์ นักวิชาการเรียกว่าแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน) ทำให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นี้เองที่ทำให้น้ำหมักที่ได้มีลักษณะเป็นฟอง ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ให้คำจำกัดความของการหมักกว้างขึ้น โดยเน้นว่าการหมักเป็นกระบวนการแปรสภาพทางชีวเคมีเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยกระบวนการดังกล่าวต้องอาศัยการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ (มาลินี อัครดิษฐเลิศ, 2551)

ปัจจุบันเทคโนโลยีการหมักนำมาใช้เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิดในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งเป็นประโยชน์และเป็นที่ต้องการของมนุษย์ เช่น เอนไซม์ วิตามิน ไวน์ เบียร์ กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ ยาปฏิชีวนะ และวัคซีน เป็นต้น โดยภาพรวมกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

- การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ให้บริสุทธิ์ การทดสอบคุณสมบัติและความสามารถด้านต่างๆ ของจุลินทรีย์ รวมถึงการดัดแปลงพันธุกรรมจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการ ซึ่งในขั้นตอนนี้ต้องอาศัยวิธีการที่เหมาะสมและจำเพาะแตกต่างกันไปตามชนิดของวัตถุดิบ จุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

- การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (Inoculum) ซึ่งคือการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ให้แข็งแรงและมีปริมาณมากเพียงพอต่อการหมัก และการเตรียมวัตถุดิบ (Raw material หรือ Substrate) สำหรับนำมาถ่ายลงในถังหมัก เพื่อให้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานของจุลินทรีย์ สำหรับภาชนะสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้เกิดการหมัก เรียกว่า ถังหมัก (Fermenter) หรือ ถังปฏิกรณ์ทางชีวภาพ (Bioreactor) สิ่งสำคัญในขั้นตอนนี้ คือการปรับสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมาณสูงในห้องปฏิบัติการ (Laboratory scale) โดยทั่วไปนิยมใช้ถังหมักขนาดเล็ก หรือในบางกรณีอาจใช้ขวดรูปชมพู่ (Flask) หากขั้นตอนนี้ประสบความสำเร็จได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและปริมาณสูง (Quality & Quantity of end product) ก็ดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

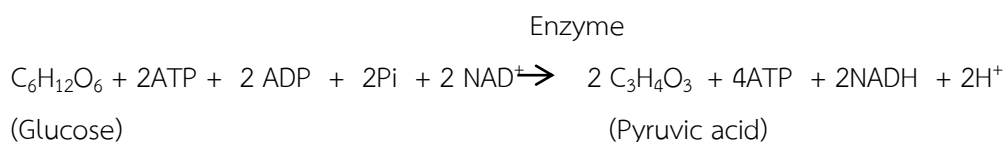
- การแยกผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นและการทำให้บริสุทธิ์ วิธีการยุ่งยากซับซ้อนเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดผลิตภัณฑ์ เช่น ผลิตภัณฑ์ที่ใช้เป็นยารักษาโรค ต้องอาศัยวิธีการทำให้บริสุทธิ์ มากกว่าผลิตภัณฑ์อื่นๆ

1.2.1 ประเภทของการหมัก

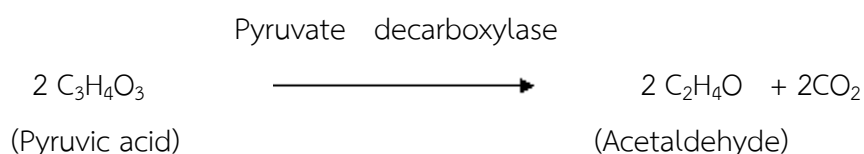
1.2.1.1 การหมักที่ทำให้เกิด แอลกอฮอล์ (Alcoholic Fermentation)

การหมักแบบนี้อาศัยยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่หมักน้ำตาลกลูโคสเพื่อให้ได้เอทิลแอลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยเริ่มจากไกลโคไลซิส เช่นเดียวกับการสลายกลูโคสโดยใช้ออกซิเจน และได้กรดไพรูวิก 2 โมเลกุล พร้อมปล่อย ATP 2 โมเลกุล และ 4 ไฮโดรเจน อะตอม เช่นกัน แต่ $\text{NADH} + \text{H}^+$ จะถ่ายทอดอะตอมของไฮโดรเจนไปยัง acetaldehyde ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 2 อะตอม ทำให้ไม่สามารถใช้พลังงานจากอิเล็กตรอนที่มีอยู่ในอะตอมของไฮโดรเจนมาสร้าง ATP ได้อีก ดังนั้นการสลายกลูโคส 1 โมเลกุลจึงได้ ATP เพียง 2 โมเลกุล เอทิลแอลกอฮอล์เป็นสารพิษเป็นอันตรายต่อเซลล์ ถ้ามีเอทิลแอลกอฮอล์มากๆ ยีสต์อาจทนไม่ได้และตายในที่สุด ในอุตสาหกรรมอาหารใช้เพื่อผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (alcoholic beverage) ได้แก่ เบียร์ (beer) ไวน์ (wine) วอดก้า (vodka) วิสกี้ (whiskey) บรั่นดี (brandy) และใช้ในการหมักขนมปัง (bread) เพื่อให้ขึ้นฟู (นิธิยา รัตนานนท์, 2554)

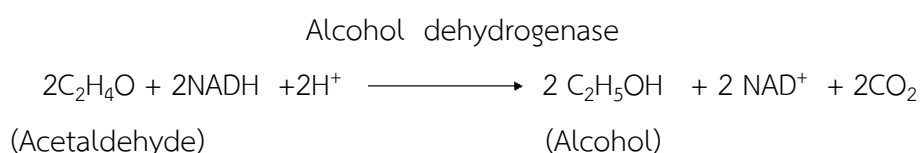
รวมสมการไกลโคไลซิส



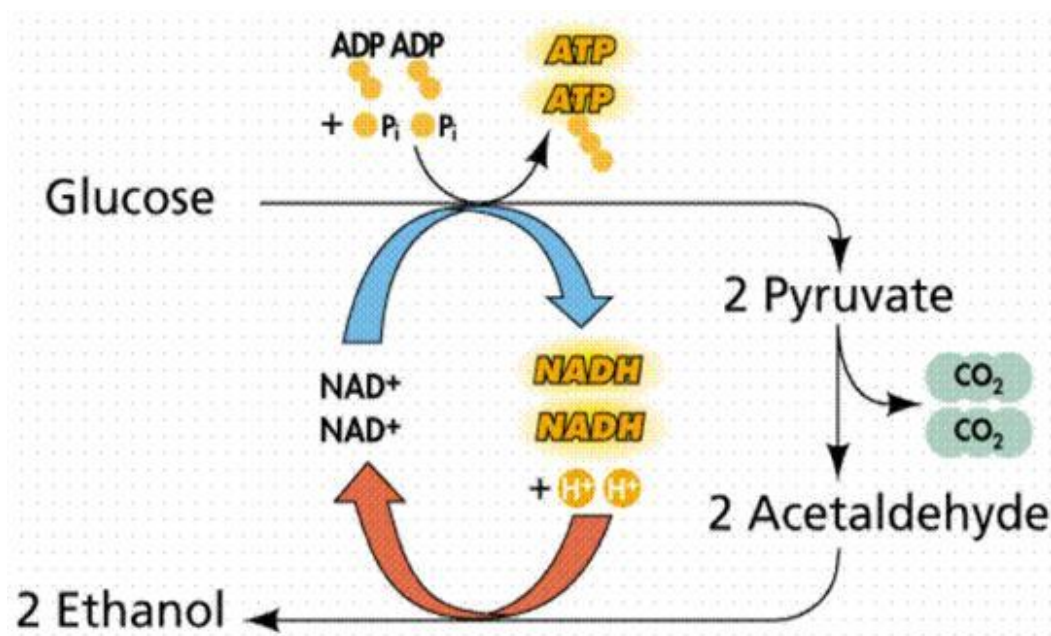
ต่อจากนั้นกรดไพรูวิกจะเปลี่ยนเป็นแอซีทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) เป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 2 อะตอม และได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส (Pyruvate decarboxylase) ดังสมการ



ปฏิกิริยาต่อไป แอซีทัลดีไฮด์จะถูกออกซิไดซ์ด้วย $\text{NADH} + \text{H}^+$ เป็นเอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอล โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase)



ดังนั้น การหมักเป็นการปลดปล่อยพลังงานแบบไม่ใช้ออกซิเจน เกิดขึ้นในไซโทพลาสซึมโดยใช้ไพรูเวตจากไกลโคไลซิสเป็นสารตั้งต้น ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการหมักจะมีการสร้าง NAD^+ ขึ้นมาใหม่ แต่จะไม่มีการสร้าง ATP เพิ่มอีก ดังนั้นการสลายกลูโคสแบบไม่ใช้ออกซิเจนจึงสร้าง ATP ได้เพียง 2 โมเลกุล จากไกลโคไลซิสเท่านั้น

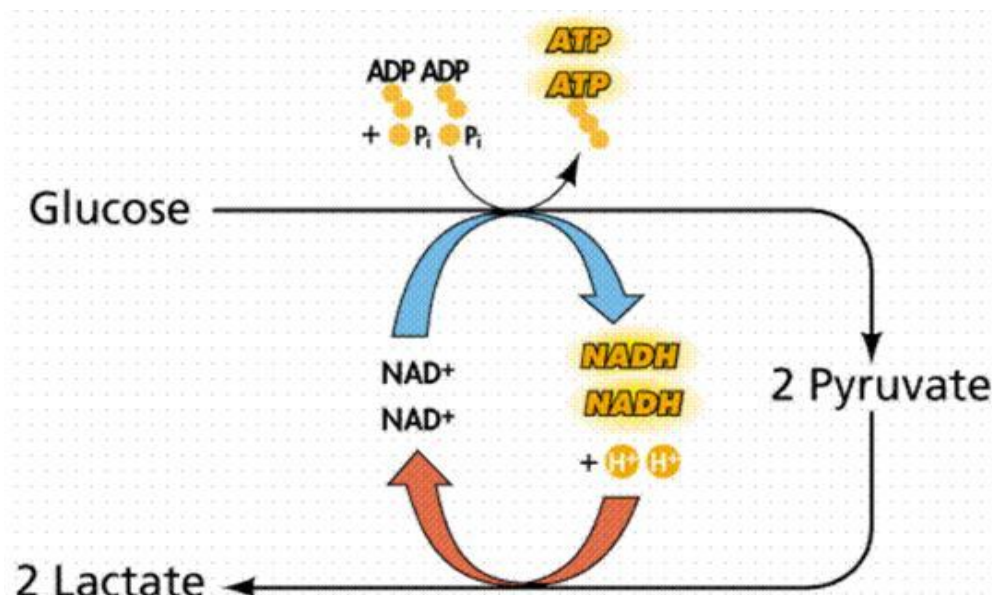


ภาพที่ 1.4 แผนภาพแสดง alcoholic fermentation

ที่มา : ศักดิ์อนันต์ อนันตสุข (2555)

1.2.2 การหมักที่ทำให้เกิดกรดแลคติก (lactic acid Fermentation)

ใช้แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ได้แก่ *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ที่สามารถหมัก (fermentation) ให้เกิดกรดแลคติก (lactic acid) โดยมีวัตถุดิบเป็นน้ำตาลแลคโทส (lactose) ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 1.5



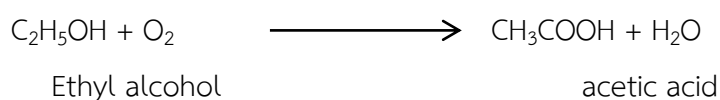
ภาพที่ 1.5 แผนภาพแสดง Lactic acid fermentation

ที่มา : ศักดิ์อนันต์ อนันตสุข (2555)

ในอุตสาหกรรมอาหารการหมักประเภทนี้ เพื่อผลิตอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากนํ้านม เช่น โยเกิร์ต (yogurt) นมเปรี้ยว (fermented milk) เนยแข็ง (cheese) ผลิตภัณฑ์หมักจากเนื้อสัตว์ เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ซาลามิ (salami) ผลิตภัณฑ์หมักจากผักและผลไม้ เช่น ผักดอง กิมจิ (kimchi) ซาวเคราท์ (Sauerkraut) ผลไม้ดอง ผลิตภัณฑ์หมักจากถั่วเหลือง (soybean) เช่น ซีอิ๊ว (fermented soy sauce) เต้าเจี้ยว มิโซะ (miso)

1.2.3 การหมักที่ทำให้เกิดกรดอะซิติก (Acetic acid Fermentation)

ใช้แบคทีเรียในกลุ่ม acetic acid bacteria เช่น *Acetobacter* ซึ่งสามารถออกซิไดซ์เอทิลแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก (acetic acid) ในสภาวะที่มีอากาศ ในอุตสาหกรรมอาหารใช้เพื่อการผลิตน้ำส้มสายชู (vinegar)



1.3. การหมักแบบธรรมชาติ

เนื่องจากการศึกษาจุลินทรีย์ในผลไม้ต่างๆ พบว่าในผลไม้มียีสต์น้อย ส่วนใหญ่จะพบที่ผิวผลไม้ภายนอก โดยเฉพาะผลไม้ที่สุกจัด มีรสหวาน ดังนั้นเมื่อทำการคั้นเอาน้ำแล้วปล่อยให้ทิ้งไว้ น้ำผลไม้จะเกิดการหมักเองโดยจุลินทรีย์ที่ติดมากับผลไม้และอาศัยการ

ทำงานของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆเปลี่ยนสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ เริ่มต้นให้เป็นแอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้องค์ประกอบทางเคมีของอาหารเปลี่ยนแปลงไปจากวัตถุดิบเริ่มต้น แต่ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่แน่นอน แตกต่างตามสภาวะแวดล้อม อุณหภูมิและความชื้น เป็นต้น ซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ยังมีกลิ่นรสและรสชาติเปลี่ยนแปลงไปด้วย (ปิยะรัชต์ กุลเมธี, 2551) นอกจากนี้จะพบการหมักแบบธรรมชาติในผลไม้ต่างๆ แล้ว ยังพบการหมักแบบธรรมชาติในอาหารอื่นๆ ด้วย โดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในระหว่างการหมักแบบธรรมชาติ มีทั้งจุลินทรีย์ประเภทยีสต์ แบคทีเรีย และรา แสดงดังตารางที่ 1.1

1.4 บทบาทของจุลินทรีย์ต่อการหมัก (นิธิยา รัตนปนนท์, 2554)

1.4.1 ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้มากในอาหาร คือ *Saccharomyces cerevisiae* โดยยีสต์ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน เจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลมาก ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลฟรุคโตส ให้เป็นแอลกอฮอล์ และมีผลพลอยได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในการหมัก ยีสต์จะเจริญเติบโต อย่างรวดเร็วในช่วง 2 – 3 วันแรก หลังจากนั้นการเจริญเติบโต จะช้าลง จนถึงช่วงที่ไม่เพิ่มจำนวนขึ้น แต่ในช่วงนี้ ก็ยังมีการเพิ่มปริมาณแอลกอฮอล์ขึ้นเรื่อยๆ และปริมาณน้ำตาลก็ลดลง และมีการสร้างสารให้กลิ่นรสต่างๆ ในช่วงนี้ด้วย ดังนั้นจึงต้องหมักต่อไป แม้ยีสต์จะหยุดเพิ่มจำนวนแล้วก็ตาม นอกจากนี้ยีสต์มีเอนไซม์ที่ย่อยสลายกรดอินทรีย์ต่างๆ ที่ใช้ในการถนอมอาหาร เช่น กรดแลคติก (lactic acid) กรดอะซิติก (acetic acid) ได้ ทำอาหารหมักที่ต้องการให้เกิดกรดดังกล่าวมีความเป็นกรดลดลง ทำให้อาหารมีสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียและเน่าเสียได้

ไวน์เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ทำมาจากองุ่นหรือน้ำองุ่น โดยอาศัยการหมักองุ่นที่ผ่านการบีบหรือน้ำองุ่นด้วยเชื้อยีสต์โดยเชื้อยีสต์ที่พบในการผลิตไวน์คือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งยีสต์สายพันธุ์นี้จะพบอยู่โดยธรรมชาติตามผิวของผลไม้ โดยหลักการการหมักแอลกอฮอล์พบว่าน้ำตาลประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จะถูกเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ ตามปกติแล้ว ยีสต์สามารถทนผลิตภัณฑ์ที่มันสร้างขึ้นมา หรือแอลกอฮอล์ได้เพียงระดับหนึ่ง กล่าวคือ ถ้าความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำหมักมีประมาณ 17 เปอร์เซ็นต์ จะมีผลในการทำลายเซลล์ยีสต์ได้ นอกจากนี้ยีสต์ยังสร้างสารให้กลิ่นรสต่างๆอีกด้วย

ตารางที่ 1.1 จุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์อาหารระหว่างการหมักแบบธรรมชาติ

จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์อาหาร	เอกสารอ้างอิง
<p>แบคทีเรียกรดแลคติก</p> <p>- <i>Lb. plantarum</i>, <i>Lb. sakei</i>, <i>Lb. delbrueckii</i>, <i>Lb. buchneri</i>, <i>Lb. brevis</i>, <i>Lb. fermentum</i>, <i>Lc. Lactis</i></p> <p>- <i>Lb. brevis</i>, <i>Lb. plantarum</i>, <i>Lb. sakei</i></p> <p>- <i>Lb. farciminis</i>, <i>Lb. paracasei</i>, <i>Lb. biofermentans</i>, <i>Lb. plantarum</i>, <i>Lb. curvatus</i>, <i>Lb. fermentum</i>, <i>Lb. alimentarius</i>, <i>Lb. kefir</i>, <i>Lb. hilgardii</i>,</p> <p>- <i>Lb. plantarum</i>, <i>Lb. brevis</i></p>	<p>กิมจิ</p> <p>กะหล่ำปลีดอง</p> <p>แตงกวาดอง</p> <p>ແໜ້ມ</p>	<p>Chang et al., 2008; Nam et al., 2009; Jung et al., 2011</p> <p>Johanningsmeier et al., 2007</p> <p>Tamang et al., 2000</p> <p>Chokesajjawatee et al., 2009</p>
<p>แบคทีเรียกรดอะซิติก</p> <p>- <i>Acetobacter syzygii</i>, <i>A. pasteurianus</i>, <i>A. tropicalis</i></p> <p>- <i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>aceti</i>, <i>Acetobacter pasteurianus</i>, <i>Acetobacter polyxygenes</i>, <i>Acetobacter xylinum</i>, <i>Acetobacter malorum</i>, <i>Acetobacter pomorum</i></p>	<p>โกโก้</p> <p>น้ำส้มสายชู</p>	<p>Nielsen et al., 2007</p> <p>Haruta et al., 2006</p>
<p>ยีสต์</p> <p>- <i>H. uvarum</i>, <i>P. guilliermondii</i></p> <p>- <i>H. uvarum</i>, <i>P. guilliermondii</i>, <i>Z. florentinus</i>, <i>Cryptococcus</i> sp.</p> <p>- <i>H. uvarum</i>, <i>S. cerevisiae</i>, <i>I. terricola</i></p>	<p>น้ำส้มประดพันธุ์ Smooth Cayanne หมัก</p> <p>ไวน์ลูกพลับ</p> <p>น้ำส้มสายชูจากผลสตรอเบอร์รี่</p>	<p>Chanprasartsuk et al., 2010</p> <p>Hidalgo et al., 2012</p> <p>Hidalgo et al., 2013</p>
<p>รา</p> <p>- <i>Asp. oryzae</i>, <i>Rhiz. Oligosporus</i>, <i>Actinomucor elegans</i></p>	<p>ซีอิ๊ว</p>	<p>Zhu et al., 2008</p>

Chanprasartsuk et al. (2010) การศึกษานี้เป็นการศึกษายีสต์ท้องถิ่นและหน้าที่ของยีสต์ในการหมักแบบธรรมชาติของตัวอย่างน้ำสับประดคั้นสดที่ถูกเก็บรวบรวมจาก 2 พื้นที่ที่แตกต่างกันในประเทศไทยและประเทศออสเตรเลีย *Hanseniaspora uvarum* และ *Pichia guilliermondii* เป็นยีสต์สายพันธุ์หลักที่พบบนผิวของผลไม้จากตัวอย่างในประเทศไทย และพบในน้ำสับประดคั้นสดและน้ำสับประดหมักจากตัวอย่างทั้ง 2 ประเทศด้วย *Pichia guilliermondii* จะปรากฏตลอดเนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่สำคัญในตอนต้นของขั้นตอนการหมักในขณะที่ *Hanseniaspora uvarum* จะเด่นชัดต่อมาในวันที่ 6 ของการหมัก โดยประชากรที่เพิ่มขึ้นจากระดับเริ่มต้นประมาณ 5 log CFU/ml ถึงประมาณ 8 log CFU/ml ที่ช่วงสุดท้ายของการหมักระดับเอทานอลในตัวอย่างทั้ง 2 ประเทศ และพบว่า *Saccharomyces yeast* เป็นยีสต์หลักที่พบในการหมักไวน์อื่นๆ แต่ไม่พบในการหมักตัวอย่างน้ำสับประด ซึ่งแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำผลไม้อื่นๆ จากการทดลองพบว่า อาจจะเป็นไปได้ว่าสมบัติของน้ำสับประดคั้นสดมีผลต่อยีสต์หมักท้องถิ่นที่มีบทบาทสำคัญในการหมักแอลกอฮอล์

Hidalgo et al. (2012) จำแนกยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกที่แยกได้จากการหมักให้เกิดกรดอะซิติกของลูกพลับ โดยนำลูกพลับมาหมักไวน์ ทั้งการหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและหมักโดยเติมกล้าเชื้อ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า การหมักแอลกอฮอล์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยพบประชากรยีสต์ในเยื่อลูกพลับ (10^4 cells/ml) เป็นอย่างต่ำ แต่เซลล์มีจำนวนมากพอที่จะสามารถเกิดกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นเอง เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักแบบธรรมชาตินี้จะพบประชากรยีสต์มากถึง 10^8 cells/ml สำหรับยีสต์ที่จำแนกได้จากการหมักแบบธรรมชาติของลูกพลับ ได้แก่ *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia guilliermondii*, *Zygosaccharomyces florentinus* และ *Cryptococcus sp.*

Hidalgo et al. (2013) วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักน้ำส้มสายชูแบบดั้งเดิมของผลสตรอเบอร์รี่ ระหว่างกระบวนการธรรมชาติและการใช้กล้าเชื้อ ในกระบวนการหมักแบบธรรมชาติพบความหลากหลายทางชีวภาพไม่มากนัก โดยในกระบวนการหมักทั้งสองพบว่ามีทั้งแอลกอฮอล์และกรดเกิดขึ้น และได้ทำการนับจำนวนประชากรยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกทั้งหมดโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์และย้อมสี ซึ่งพบว่าในการหมักแบบธรรมชาติและในการใช้กล้าเชื้อมีประชากรยีสต์เริ่มต้น 10^6 cells/ml และ 10^5 cells/ml ตามลำดับ และตลอดกระบวนการหมักพบว่ามีประชากรเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งในตอนท้ายของกระบวนการหมักพบว่ามีประชากรเพิ่มขึ้นเป็น 10^7 cell/ml โดยในช่วงแรกของการหมักพบ *Hanseniaspora uvarum* เริ่มลดลง แต่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Issatchenkia terricola* เพิ่มจำนวนมากขึ้น จนกระทั่งถึงขั้นสุดท้ายของการหมักพบว่า *Hanseniaspora uvarum* ลดจำนวนลดแทบไม่เหลือนั้นเป็นเพราะ

Hanseniaspora uvarum ไม่สามารถทนแอลกอฮอล์ที่ *Saccharomyces cerevisiae* สร้างขึ้นได้ ส่วน และ *Issatchenkia terricola* มีปริมาณคงที่ แต่ *Saccharomyces cerevisiae* มีจำนวนเพิ่มขึ้นมาก ซึ่ง *Saccharomyces cerevisiae* นี้เองจะดำเนินหมักในขั้นสุดท้าย เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Bisson และ Kunkee, (1993) ที่ได้กล่าวไว้ว่า โดยปกติยีสต์ตามธรรมชาติที่ไม่ใช่ *Saccharomyces* จะดำเนินการหมักสองถึงสามวันแรกก่อนที่ *Saccharomyces* จะหมักต่อ ส่งผลทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในช่วง 2-3 วันเริ่มต้นของการหมัก ยีสต์ non-*Saccharomyces* ที่สามารถเจริญในระหว่างการหมักได้สามารถทนต่อเอทานอล และสร้างสารเคมีที่สำคัญจำนวนมากซึ่งจะมีผลต่อรสชาติ และกลิ่นหอมของไวน์

1.4.2 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB)

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) คือ กลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose) น้ำตาลแลคโทส (lactose) ให้เกิดกรดแลคติก (lactic acid fermentation) กรดอินทรีย์อื่น ได้แก่ กรดอะซิติก (acetic acid) และกรด โพรพิโอนิก (propionic acid) และสารอื่น เช่น hydrogen peroxide และ diacetyl ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นและรสของอาหารหมัก แบคทีเรียแลคติก สามารถสร้างแบคทีริโอซิน (bacteriocin) ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น แบคทีเรียแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria; GRAS status) นอกจากนี้การหมักด้วย lactic acid bacteria ยังได้ hydrogen peroxide และ diacetyl ที่มีฤทธิ์เป็นสารกันเสีย (preservative) อีกด้วย

Cagno et al. (2010) ได้ศึกษาการจัดหมวดหมู่ของยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกในสับปะรด (*Ananas comosus* L. Merr.) และใช้กล้าเชื้อออโตโคโนสในกระบวนการแปรรูป ออโตโคโนสแบคทีเรียกรดแลคติก (Autochthonous lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกท้องถิ่นที่พบตามธรรมชาติที่ติดมากับวัตถุดิบซึ่งมีรายงานว่าจุลินทรีย์ที่เป็นออโตโคโนสของผลไม้อาจมีคุณสมบัติที่หลากหลาย เช่น 1. มีฤทธิ์ต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค 2. สร้างความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร 3. มีความเหมาะสมในการใช้ออโตโคโนสแบคทีเรียเป็นกล้าเชื้อ

Brashears et al. (2005) ได้ศึกษาหน้าที่ของแบคทีเรียกรดแลคติกและสารละลายน้ำเกลือต่อไปโอจินิคเอมีนซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในเนื้อปลาเทราท์ แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญต่ออาหารหมักเนื่องจากส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสและการยืดอายุของอาหาร ซึ่งจะช่วยให้อาหารเกิดความปลอดภัยจากการเจริญของเชื้อก่อโรค บทบาทหลักของแบคทีเรียกรดแลคติกคือ สามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดอินทรีย์อ่อน รูเทอริน ไดอะซิติก แลคโธริโอซิน และสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งจะช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้

1.4.3 แบคทีเรียกรดอะซิติก (Acetic acid bacteria; AAB)

แบคทีเรียกรดอะซิติกเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic bacteria) ไม่ใช่จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (non pathogen) แบคทีเรียกรดอะซิติกที่มีบทบาทสำคัญในอาหารได้แก่ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* ได้ถูกนำมาใช้ในการหมัก โดยออกซิโดซ์เอทิลแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก (acetic acid) ในสภาวะที่มีออกซิเจน อย่างไรก็ตามวัตถุประสงค์ที่ใช้จำเป็นต้องเป็นแอลกอฮอล์ ดังนั้นจึงต้องมีขั้นตอนการผลิตแอลกอฮอล์ โดยอาศัยการหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ด้วยเชื้อยีสต์ นอกจากนี้แบคทีเรียกรดอะซิติกสามารถทำให้อาหารเสื่อมเสียได้ (microbial spoilage) โดยทำให้เกิดรสเปรี้ยว

แบคทีเรียกรดอะซิติกจะเพิ่มกรดที่ระเหยได้ในไวน์ สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะการหมักแอลกอฮอล์ที่หลากหลาย และมีความสำคัญในการบ่งชี้คุณภาพของไวน์ (Gonzalez, et al., 2006) Du Toit และ Lambrechts (2002) ได้วิเคราะห์การเกิดของแบคทีเรียกรดอะซิติกในการหมักไวน์แดงของชาวแอฟริกาใต้ พบว่าปริมาณของแบคทีเรียกรดอะซิติกเริ่มต้นช่วง 10^6 ถึง 10^7 CFU/ml (หมักปี 1999) และลดลงเป็น 10^2 ถึง 10^3 CFU/ml ในถังหมักที่มี pH ต่ำ (≤ 3.6) และจะเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก

ธนขวัญ บุชบัน (2553) การคัดแยกแบคทีเรียที่มีผลิตรกรดน้ำส้มจากอาหารหมักดองในเขตคูสิต กรุงเทพมหานคร จำนวน 56 ตัวอย่าง พบแบคทีเรียที่ผลิตรกรด 419 ไอโซเลต เมื่อนำมาทำการทดสอบความต้องการใช้อากาศ (Oxidation/Fermentation test) พบว่าเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ 34 ไอโซเลต นำแบคทีเรียทั้ง 34 ไอโซเลต มาทดสอบการออกซิโดซ์อะซิเตทและแลคเตท ทดสอบการเจริญบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน ทดสอบการเจริญบนอาหารที่มีพีเอชต่างๆจากผลการทดลองสามารถ คัดแยกแบคทีเรียกรดน้ำส้มทั้งหมดได้ 31 ไอโซเลต ที่จัดอยู่ในสกุล *Gluconobacter* และเป็น non acetic acid bacteria 3 ไอโซเลต

De Ley et al. (1994) พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดอะซิติกทนร้อนในอาหารหมักบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 28 ไอโซเลต และเมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติพื้นฐานทางสรีรวิทยาพบว่าแบคทีเรียอะซิติกทนร้อนทั้งหมดที่แยกได้เป็นแกรมลบรูปร่างท่อน สร้างกรดบนอาหารที่มีเอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน และสร้างเอนไซม์อะซิเตสได้ซึ่งเป็นลักษณะพื้นฐานของเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียกรดอะซิติก จากนั้นนำไปศึกษาการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว potato dextrose broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีแบคทีเรียอะซิติกจำนวน 10 ไอโซเลต ที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ซึ่งโดยมากเป็นแบคทีเรียในกลุ่มของ *Acetobacter* sp. เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะทนร้อนได้ดีกว่าเชื้อในกลุ่ม *Gluconobacter* sp.

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สับปะรดเป็นผลไม้เขตร้อนเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกสับปะรดรวมทั้งผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสับปะรดเป็นอันดับหนึ่งของโลก สับปะรดกลุ่มควีนจัดเป็นสับปะรดที่นิยมเพาะปลูกเป็นอันดับสองรองจากปัตตาเวีย และเป็นที่ยูจกกันดี เช่น พันธุ์ตราดสีทอง ภูเก็ต สวี ภูแล เป็นต้น ลักษณะเด่นของสับปะรดพันธุ์ควีนภายนอกคือ ขอบใบที่ต้นและขอบใบที่จุกผลมีหนามสั้นๆ แหลมคม ทรงโค้ง สีน้ำตาลแดง ผลเป็นรูปทรงกระบอก ผิวเปลือกเมื่อแก่สุกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มหรือเหลืองส้ม ตาใหญ่ ร่องตาลึก เปลือกหนา ตาลึก ทนทานต่อการขนย้ายลักษณะภายในนั้นมีความหวาน 16-20 บริกซ์ กลิ่นหอมมาก เนื้อสีเหลืองเข้ม เนื้อและไส้กรอบ เนื้อแห้งไม่ฉ่ำน้ำ เนื้อมีเส้นใยอ่อนนุ่ม เคี้ยวไม่ติดฟัน (จินดารัฐ วีระวุฒิ, 2541) มีปริมาณวิตามินซีสูง เบต้าแคโรทีนและแมงกานีสที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และมีสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบ ฟลาโวนอยด์ มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (Terao, Piskula, & Yao, 1994) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดจากสับปะรดได้แก่ เอนไซม์โบรมีเลน (Bromelain) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอส ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆและกรดอะมิโนได้ มีประสิทธิภาพในการต้านการอักเสบในโรคไขข้ออักเสบ โรคลำไส้ใหญ่อักเสบ และโรคหอบหืด (Secor et al, 2005; Onken et al, 2008; Di Cagno et al, 2010)

การหมักเป็นกระบวนการแปรรูปอาหารโดยจุลินทรีย์ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ในอาหารเป็นสารประกอบอื่น ๆ เช่น แอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์ต่าง ๆ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ รวมทั้งสารระเหยที่ให้กลิ่นเฉพาะ ซึ่งมีผลทำให้สภาวะของผลิตภัณฑ์อาหารเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมและไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค จึงสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหารได้นานขึ้นโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการให้ความร้อนทำให้สามารถรักษาคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์อาหารไว้ได้และยังได้ผลิตภัณฑ์อาหารใหม่ที่มีความหลากหลายมากขึ้น สับปะรดกลุ่มควีนจัดเป็นผลไม้ที่เหมาะสมสำหรับเป็นวัตถุดิบในการหมักเนื่องจากมีปริมาณสารอาหาร เช่น น้ำตาล ไนโตรเจน วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการหมักโดยไม่ต้องเติมสารอาหารอื่น ๆ เพิ่ม (Callens and Desmet, 1991; Ruengrongpanya, 1996; Chanprasartsuk et al, 2010) จุลินทรีย์นับเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งในการหมัก ซึ่งมีรายงานว่าจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่ทำให้เกิดการหมักแบบธรรมชาติ (Autochthonous microorganism) สามารถเจริญและสร้างสารให้กลิ่นรสที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวในระหว่างการหมักได้ดีกว่าจุลินทรีย์ที่มาจากแหล่งอื่น ซึ่งสามารถพบจุลินทรีย์ที่ทำ

ให้เกิดการหมักแบบธรรมชาติทั้งยีสต์ แบคทีเรียกรดแลคติก และแบคทีเรียกรดอะซิติก ได้ตามวัตถุประสงค์จากธรรมชาติทั่วไป เช่น การคัดแยกยีสต์จากผลองุ่น (Fleet et al., 2002) ผลสับปะรด (Chanprasartsuk et al., 2010) การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้จากผลมะเขือเทศ (Di Cagno et al., 2009) และการคัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติกจากผลไม้เขตร้อน เช่น กล้วย องุ่น สับปะรด และมะม่วง เป็นต้น (Seearunruangchai et al., 2004) ดังนั้นหากนำจุลินทรีย์เหล่านี้จากธรรมชาติของผลสับปะรดมาใช้พัฒนาเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับหมัก อาจทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำสับปะรดหมักที่มีคุณภาพและเอกลักษณ์เฉพาะตัว อย่างไรก็ตามการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำสับปะรดหมักด้วยกล้าเชื้ออย่างเป็นระบบนั้นจำเป็นต้องทราบถึงจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักน้ำสับปะรดแบบธรรมชาติ ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานของจุลินทรีย์เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์น้ำสับปะรดหมักต่อไปได้ งานวิจัยนี้จึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงและความหลากหลายของจุลินทรีย์แล้วคัดแยกจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักน้ำสับปะรดแบบธรรมชาติ

3. วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในน้ำสับปะรดหมักแบบธรรมชาติ
2. เพื่อคัดแยกและจำแนกจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่เกี่ยวข้องกับการหมักแบบธรรมชาติของน้ำสับปะรดกลุ่มควิน พันธุ์ตราดสีทอง

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักน้ำสับปะรดกลุ่มควิน พันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ
2. จุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักน้ำสับปะรดกลุ่มควิน พันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ

5. รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

5.1 การเก็บตัวอย่างผลสับปะรด

เก็บตัวอย่างสับปะรดพันธุ์ตราดสีทองที่มีอายุประมาณ 4 เดือน (ระยะเก็บเกี่ยว) จากไร่ในจังหวัดตราด แล้วขนส่งมายังภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยบูรพา ภายใน 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะภายนอกของสับปะรดแล้วนำมาวัดความยาว เส้นรอบวงของผลและชั่งน้ำหนัก

5.2 การหมักน้ำสับปะรดแบบธรรมชาติ

นำผลสับปะรดมาหั่นลดขนาด โดยไม่ต้องปอกเปลือกแล้วคั้นน้ำสับปะรดและกรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นบรรจุน้ำสับปะรดคั้นสดที่ได้ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มิลลิลิตร แล้วปิดปากด้วยจุกสำลี ทำทุกขั้นตอนด้วยวิธีปลอดเชื้อ ปล่อยให้ น้ำสับปะรดเกิดการหมักแบบธรรมชาติ ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส) นาน 7 วัน (ดังภาพที่ 3-2) โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ เก็บตัวอย่างน้ำสับปะรดทุกวัน เพื่อติดตามวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา



ภาพที่ 5.1 การหมักสับปะรดคั้นสดแบบธรรมชาติ

5.3 การวิเคราะห์จุลินทรีย์

5.3.1 การคัดแยกยีสต์และรา

ปิเปตน้ำสับปะรดหมักมาเจือจาง ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเปปโตเน ความเข้มข้น 0.1% ให้มีระดับความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} ทำการเจือจางต่อให้มีระดับที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายเจือจางจากหลอดที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาณ 0.1 ml มา spread บน MEA agar ที่เติม Tetracycline 0.01 g/L ในจานเพาะเชื้อให้กระจายทั่วจานจนแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2-4 วัน นับจำนวนประชากรยีสต์ทั้งหมด และคำนวณในหน่วย CFU/ml (Chanprasartsuk et al., 2010)

5.3.2 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

ปิเปตน้ำสับประรดหมักมาเจือจาง ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเปปโตน ความเข้มข้น 0.1% ให้มีระดับความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} ทำการเจือจางต่อให้มีระดับที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายเจือจางจากหลอดที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาณ 0.1 ml มา spread บน MRS agar ที่เติม Cycloheximide 0.01 g/L ในจานเพาะเชื้อให้กระจายทั่วจานจนแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน นับจำนวนประชากรแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด และคำนวณในหน่วย CFU/ml (ดัดแปลงจาก Takahashi et al., 2014)

5.3.3 การคัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติก

ปิเปตน้ำสับประรดหมักมาเจือจาง ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเปปโตน ความเข้มข้น 0.1% ให้มีระดับความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} ทำการเจือจางต่อให้มีระดับที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายเจือจางจากหลอดที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาณ 0.1 ml มา spread บน AE agar ที่เติม Cycloheximide 0.01 g/L ในจานเพาะเชื้อให้กระจายทั่วจานจนแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน นับจำนวนประชากรแบคทีเรียกรดอะซิติกทั้งหมด และคำนวณในหน่วย CFU/ml (ยูโซะ ยามาเดะ และคณะ, 2550)

หลังจากตรวจนับจำนวนประชากรของจุลินทรีย์แต่ละประเภทแล้ว สังเกตลักษณะโคโลนีและจัดกลุ่มตามลักษณะโคโลนีที่สังเกตได้และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ บันทึกผล นำจุลินทรีย์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาสกัด DNA ตามวิธีของ Aljanabi and Martinez (1997) จากนั้นสุ่มคัดเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มไปจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีทางอณูวิทยา ดังนี้

วิเคราะห์ลำดับเบสของยีสต์และราบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ด้วย Primer NL1 และ NL4 โดยใช้สภาวะที่อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นตามด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้จำนวนรอบทั้งหมด 35 รอบ (Chanprasartsuk et al., 2010) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR (amplicon) จะนำไปตรวจสอบโดยแยกผ่านเจลอะกาโรสในสารละลายบัฟเฟอร์ 1XTBE ด้วยเครื่อง electrophoresis และนำมาย้อมสีด้วย Ethidium bromide แล้วตรวจสอบแถบ DNA ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator จากนั้นนำ amplicon ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Sequencing แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

วิเคราะห์ลำดับเบสของแบคทีเรียบริเวณ V6-V8 ของ 16S rDNA ด้วย Primer 27F และ 1512R โดยใช้สภาวะอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นตามด้วย อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที อุณหภูมิ 49 องศาเซลเซียส

นาน 45 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที โดยจำนวนรอบทั้งหมด 25 รอบ (Lazzi et al., 2004) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR (amplicon) จะนำไปตรวจสอบ โดยแยกผ่านเจลอะกาโรสในสารละลายบัฟเฟอร์ 1XTBE ด้วยเครื่อง electrophoresis และ นำมาย้อมสีด้วย Ethidium bromide แล้วตรวจสอบแถบ DNA ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator จากนั้นนำ amplicon ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Sequencing แล้วนำ ข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

5.4. การหมักน้ำสับประรดคั้นสดด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์

5.4.1 การเตรียมน้ำสับประรดสำหรับการหมัก

นำสับประรดมาปอกเปลือก และหั่นลดขนาด คั้นน้ำสับประรดแล้วกรองด้วยผ้าขาว บาง นำน้ำสับประรดที่ได้มาพลาสเจอไรส์ที่อุณหภูมิระหว่าง 60-80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีแล้วทิ้งไว้ให้เย็น

5.4.2 การเตรียมน้ำสับประรดสำหรับกรดแลคติก

นำกล้าเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์มาใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบ ต่อนาที นาน 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (ล้างซ้ำ 2 ครั้ง) เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ได้กล้าเชื้อเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป (Rathore et al., 2012)

5.4.3 การหมักน้ำสับประรดคั้นสดด้วยกล้าเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

นำกล้าเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ได้มาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีน้ำสับประรด โดยใช้กล้าเชื้อปริมาณ 1% จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ตรวจสอบและวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีต่างๆ ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด ค่า pH และปริมาณกรดในรูปของกรดซิตริกในวันสุดท้ายของการหมัก

6. ผลการวิจัยและวิจารณ์ (Results and discussion)

6.1 ลักษณะทางกายภาพของสับประรดกลุ่มควีน

จากการสุ่มเก็บสับประรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทองที่มีอายุประมาณ 4 เดือน (ระยะเก็บเกี่ยว) จากไร่ในจังหวัดตราด พบว่าลักษณะภายนอก ของผลสับประรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทองเป็นรูปทรงกระบอก เปลือกค่อนข้างหนา มีสีเหลือง ตาใหญ่ ร่องตาสีดำ ฉ่ำน้ำ และมีกลิ่นหอมหวาน (ภาพที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ จินดารัฐ วีระวุฒิ (2550) ที่กล่าวว่า สับประรดกลุ่มควีนมีรูปร่างทรงกระบอก ตาค่อนข้างนูน เปลือกหนา เมื่อผลสุกเปลือกจะมีสี

เหลือง เนื้อข้างในมีสีเหลืองเข้ม รสหวานกรอบ มีเส้นใยน้อย และมีกลิ่นหอม แก่นผลอ่อนนุ่มกว่าพันธุ์ปัตตาเวีย เมื่อนำมาตรวจสอบลักษณะทางกายภาพโดยการชั่งน้ำหนัก วัดความยาว และเส้นรอบวงของผล พบว่าสับปะรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทองมีน้ำหนัก ความยาว และเส้นรอบวงโดยเฉลี่ยเท่ากับ 1397.97 ± 65.27 กรัม 20.70 ± 0.84 เซนติเมตร และ 35.60 ± 1.19 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับรายงานที่กล่าวว่าสับปะรดพันธุ์ตราดสีทองมีน้ำหนัก ความยาว ความกว้าง และเส้นรอบวงโดยเฉลี่ยเท่ากับ 1024.50 กรัม 16.30 เซนติเมตร 10.30 เซนติเมตร และ 32.34 เซนติเมตร ตามลำดับ (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2552)



ภาพที่ 6.1 ผลสับปะรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทอง

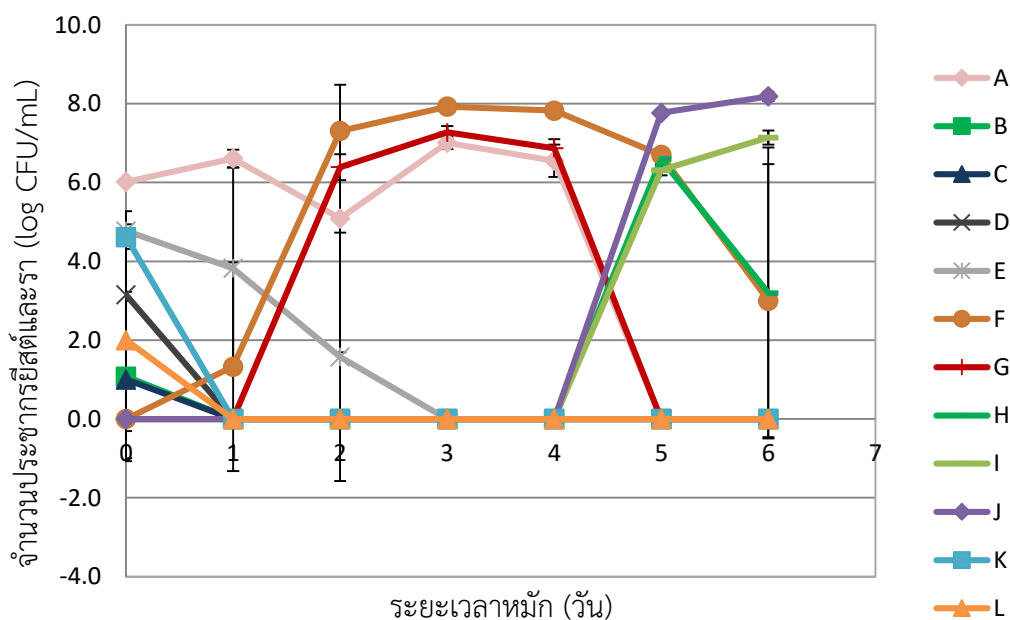
6.2 การหมักน้ำสับปะรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ

หลังจากเก็บตัวอย่างน้ำสับปะรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทองคั้นสดเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าทางเคมีต่างๆแล้ว นำน้ำสับปะรดคั้นสดปริมาตร 800 มิลลิลิตร บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วปิดด้วยจุกสำลี ทำทุกขั้นตอนด้วยวิธีปลอดเชื้อ จากนั้นปล่อยให้เกิดการหมักแบบธรรมชาติที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เก็บตัวอย่างน้ำสับปะรดทุกวันเพื่อติดตามวิเคราะห์ผลทางจุลชีววิทยา

6.2.1 ผลการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

หลังปล่อยให้ น้ำสับปะรดเกิดการหมักแบบธรรมชาติที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 7 วัน (ภาพที่ 6.2) เก็บตัวอย่างน้ำสับปะรดทุกวันเพื่อติดตามวิเคราะห์ผลทางจุลชีววิทยา แล้วจัดจำแนกยีสต์เบื้องต้นตามจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่สังเกตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA และลักษณะทางสัณฐาน

วิทยาของเซลล์ พบว่าจำนวนประชากรยีสต์ทุกกลุ่มมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการหมัก โดยยีสต์กลุ่ม A เป็นยีสต์ที่มีความสำคัญในช่วงแรกของการหมักเนื่องจากเป็นกลุ่มยีสต์ที่มีจำนวน ประชากรสูงสุดที่พบในช่วง 2 วันแรกของการหมักน้ำสับประรดพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ โดยมี จำนวนประชากรสูงถึง 6.1 log cfu/ml และ 6.7 log cfu/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์กลุ่ม E สามารถเจริญได้ในช่วง 3 วันแรกของการหมัก และมีจำนวนลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบพบได้ หลังจากวันที่ 4 จนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก อาจเนื่องมาจากเกิดการสะสมของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ถูก สร้างขึ้นโดยยีสต์ในระหว่างการหมักทำให้ยีสต์กลุ่ม E ไม่สามารถทนต่อปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงขึ้นได้และลดจำนวนลง อย่างไรก็ตามยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญและดำเนินการหมักน้ำสับประรดพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติจนกระทั่งสิ้นสุดการหมักได้แก่ยีสต์กลุ่ม F โดยสามารถตรวจสอบพบได้ทุกวันในระหว่างการหมักและมีจำนวนประชากรอยู่ระหว่าง 1.3-7.9 log cfu/ml นอกจากนี้ยังพบยีสต์กลุ่ม H I และ J ในช่วงสุดท้ายของการหมักซึ่งอาจเนื่องมาจากเป็นกลุ่มของยีสต์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของน้ำสับประรดหมักพันธุ์ตราดสีทองโดยมีประชากรอยู่ในช่วงระหว่าง 3.2-8.2 log cfu/ml (ตารางที่ 6.1) จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า ยีสต์กลุ่ม A และ F เป็นยีสต์กลุ่มที่มีความสำคัญต่อการหมักมากที่สุดเพราะสามารถตรวจสอบได้ตลอดทั้งการหมัก



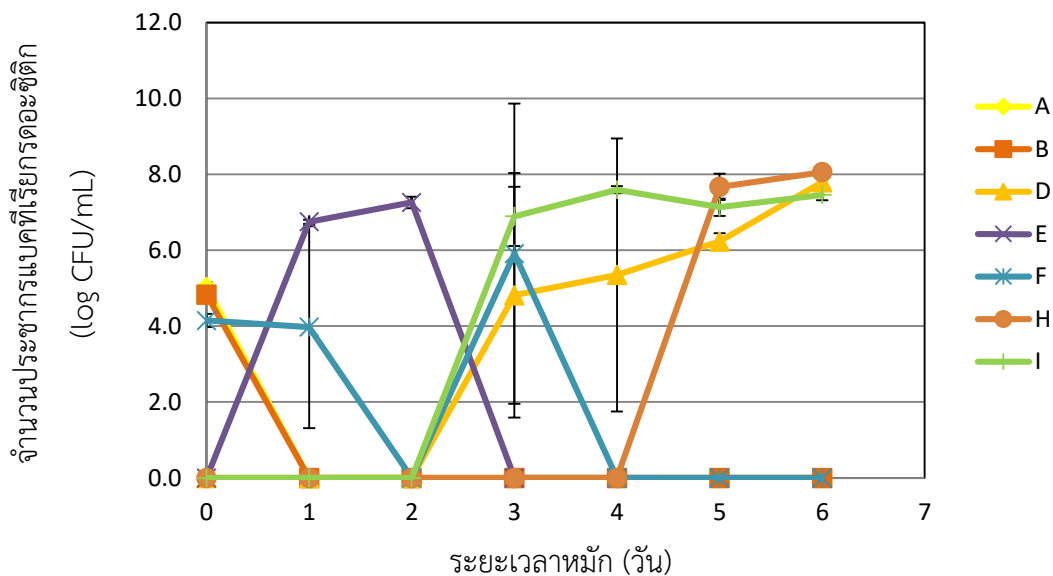
ภาพที่ 6.2 จำนวนประชากรยีสต์และรา (log cfu/ml) ที่คัดแยกได้ในระหว่างการหมักน้ำสับประรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ

ตารางที่ 6.1 จำนวนประชากรและลักษณะจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนียีสต์และราที่คัดแยกได้ในระหว่างการหมักน้ำสับประรดพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ

วันที่หมัก	กลุ่ม	จำนวน (log CFU/mL)	ลักษณะโคโลนี
0	A	6.0±0.1	สีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ
	B	1.1±2.2	สีขาว ขอบหยัก
	C	1.0±2.0	สีขาว ตรงกลางโคโลนีแยกเป็นแฉกคล้ายดอกไม้
	D	3.2±2.1	สีโอลด์โรสอ่อน มีจุดอยู่ตรงกลาง มีเส้นใยเล็กๆ รอบโคโลนี
	E	4.8±0.2	ปุยสีขาว มีจุดตรงกลางสีขาว
	K	4.6±0.1	ปุยสีขาว มีจุดตรงกลางสีดำ
	L	2.0±2.3	ราสีแดง ปุยสีขาว จุดตรงกลางสีแดง
1	A	6.6±0.2	สีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ
	E	3.8±2.6	สีขาว ปุย มีจุดตรงกลางสีขาว
	F	1.3±2.7	สีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก
2	A	5.1±3.4	สีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ
	E	1.6±3.2	สีขาว ปุย มีจุดตรงกลางสีขาว
	F	7.3±0.1	สีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก
	G	6.4±0.3	สีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ
3	A	7.0±0.2	สีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ
	F	7.9±0.2	สีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก
	G	7.3±0.2	สีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ
4	A	6.6±0.4	สีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ
	F	7.8±0.2	สีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก
	G	6.9±0.2	สีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ
5	F	6.7±0.1	สีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก
	H	6.6±0.1	สีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ผิวเรียบ
	I	6.3±0.1	สีขาวด้าน รูปร่างไม่แน่นอน ขนาดใหญ่ ขอบหยัก
	J	7.8±0.1	สีขาวครีมอ่อน รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบ

วันที่ หมัก	กลุ่ม	จำนวน (log CFU/mL)	ลักษณะโคโลนี
6	F	3.0±3.5	สีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก
	H	3.2±3.7	สีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ผิวเรียบ
	I	7.1±0.2	สีขาวด้าน รูปร่างไม่แน่นอน ขนาดใหญ่ ขอบหยัก
	J	8.2±0.1	สีขาวครีมอ่อน รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบ

จากการจำแนกแบคทีเรียกรดอะซิติกเบื้องต้นตามจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่สังเกตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ AE พบว่าจำนวนประชากรแบคทีเรียกรดอะซิติกมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการหมัก โดยแบคทีเรียกรดอะซิติกกลุ่ม E เป็นแบคทีเรียกรดอะซิติกที่มีความสำคัญในช่วงแรกของการหมักเนื่องจากเป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดอะซิติกที่มีจำนวนประชากรสูงสุดที่พบในช่วงวันที่ 1 และ 2 ของการหมักน้ำสับประรดพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ โดยมีจำนวนประชากรสูงถึง 6.8 log cfu/ml และ 7.3 log cfu/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกรดอะซิติก กลุ่ม F ที่สามารถเจริญได้ในช่วง 4 วันแรกของการหมักเช่นเดียวกับแบคทีเรียกรดอะซิติกกลุ่ม E และมีจำนวนลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบพบได้หลังจากวันที่ 4 จนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก อาจเนื่องมาจากเกิดการสะสมของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ถูกสร้างขึ้นโดยยีสต์ในระหว่างการหมักทำให้แบคทีเรียกรดอะซิติก กลุ่ม E ไม่สามารถทนต่อปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงขึ้นได้ ในช่วง stationary phase หลังวันที่ 3 ตลอดจนถึงสิ้นสุดการหมักพบแบคทีเรียกรดอะซิติกกลุ่ม D และ I ซึ่งอาจเนื่องมาจากเป็นกลุ่มของแบคทีเรียกรดอะซิติกที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีแอลกอฮอล์สูงได้ โดยมีประชากรอยู่ในช่วงระหว่าง 4.8-7.8 log cfu/ml ในช่วงสุดท้ายของการหมักพบแบคทีเรียกรดอะซิติกกลุ่ม H ซึ่งอาจเนื่องมาจากเป็นกลุ่มของแบคทีเรียกรดอะซิติกที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียและกลิ่นรสเปรี้ยวของน้ำสับประรดหมักพันธุ์ตราดสีทองโดยมีประชากรเท่ากับ 8.1 log cfu/ml (ภาพที่ 6.3 และ ตารางที่ 6.2)



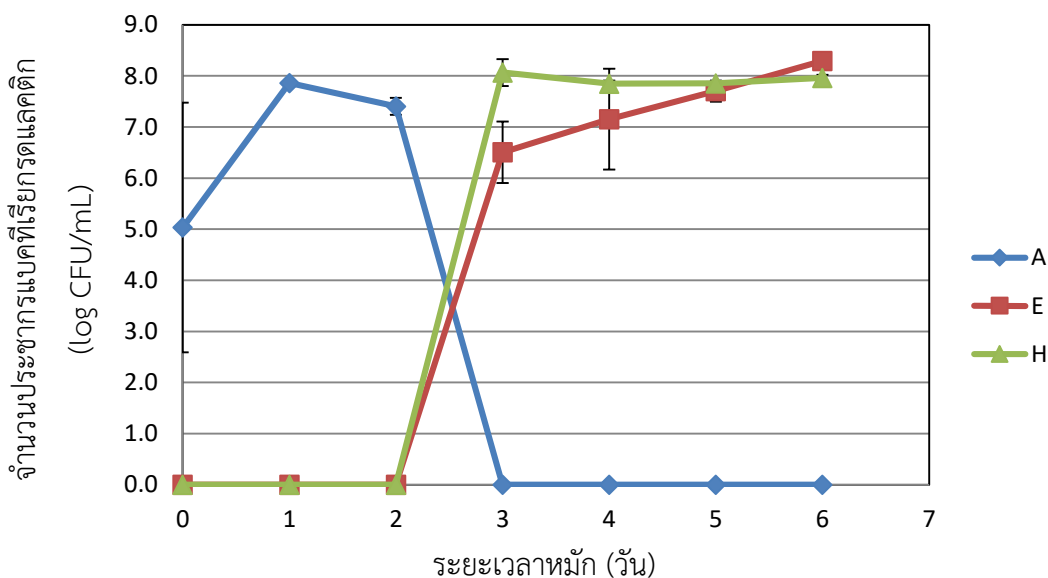
ภาพที่ 6.3 จำนวนประชากรแบคทีเรียกรดอะซิติก (log cfu/ml) ที่คัดแยกได้ในระหว่างการหมักน้ำสับประรดกลุ่มควินพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ

ตารางที่ 6.2 จำนวนประชากรและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีแบคทีเรียกรดอะซิติก ที่คัดแยกได้ในระหว่างการหมักน้ำสับประรดพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ

วันที่หมัก	กลุ่ม	จำนวน (log CFU/mL)	ลักษณะโคโลนี
0	A	5.0±0.1	สีเหลืองอ่อน รูปร่างไม่แน่นอน ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ ผิวขรุขระ
	B	4.8±0.2	สีเหลืองเข้ม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบ
	F	4.2±0.2	สีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบใส
1	E	6.8±0.1	สีเหลืองอ่อน รูปร่างกลม ขนาดปานกลาง ผิวขรุขระ
	F	4.0±2.7	สีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบใส
2	E	7.3±0.2	สีเหลืองอ่อน รูปร่างกลม ขนาดปานกลาง ผิวขรุขระ
3	D	4.8±3.2	สีเหลืองครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก
	F	5.9±4.0	สีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบใส
	I	6.9±0.8	สีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบใส ผิวเรียบ
4	D	5.4±3.6	สีเหลืองครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก
	I	7.6±0.1	สีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบใส ผิวเรียบ

วันที่ หมัก	กลุ่ม	จำนวน (log CFU/mL)	ลักษณะโคโลนี
5	D	6.2±0.2	สีเหลืองครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก
	H	7.7±0.3	สีเหลืองหม่น รูปร่างกลม ขนาดเล็ก
	I	7.1±0.2	สีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบใส ผิวเรียบ
6	D	7.8±0.1	สีเหลืองครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก
	H	8.1±0.0	สีเหลืองหม่น รูปร่างกลม ขนาดเล็ก
	I	7.5±0.1	สีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบใส ผิวเรียบ

จากการจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกเบื้องต้นตามจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่สังเกตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พบว่าจำนวนประชากรแบคทีเรียกรดแลคติกมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการหมัก โดยแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม A เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสำคัญในช่วงแรกของการหมักเนื่องจากเป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีจำนวนประชากรสูงสุดที่พบในช่วง 3 วันแรกของการหมักน้ำสับประรดพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ โดยมีจำนวนประชากรสูงถึง 5 log cfu/ml 7.7 log cfu/ml และ 7.4 log cfu/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 6.4 และ ตารางที่ 6.3) และมีจำนวนลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบพบได้หลังจากวันที่ 3 จนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก อาจเนื่องมาจากเกิดการสะสมของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ถูกสร้างขึ้นโดยยีสต์ในระหว่างการหมักทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม A ไม่สามารถทนต่อปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงขึ้นได้ นอกจากนี้ในช่วง stationary phase หลังวันที่ 3 ตลอดจนสิ้นสุดการหมักพบแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม E และ H ซึ่งอาจเนื่องมาจากเป็นกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีแอลกอฮอล์สูงได้โดยมีประชากรอยู่ในช่วงระหว่าง 6.5-8.3 log cfu/ml



ภาพที่ 6.4 จำนวนประชากรแบคทีเรียกรดแลคติก (log cfu/ml) ที่คัดแยกได้ในระหว่างการหมักน้ำสับประรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ

ตารางที่ 6.3 จำนวนประชากรและลักษณะจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในระหว่างการหมักน้ำสับประรดพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ

วันที่หมัก	กลุ่ม	จำนวน (log CFU/mL)	ลักษณะโคโลนี
0	A	5.0±2.4	สีเหลืองอ่อน รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ผิวขรุขระ ขอบเรียบ
1	A	7.7±0.0	สีเหลืองอ่อน รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ผิวขรุขระ ขอบเรียบ
2	A	7.4±0.2	สีเหลืองอ่อน รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ผิวขรุขระ ขอบเรียบ
3	E	6.5±0.6	สีเหลืองครีม รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ผิวขรุขระ
	H	8.1±0.3	สีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ มีจุดสีขาวตรงกลาง
4	E	7.2±1.0	สีเหลืองครีม รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ผิวขรุขระ
	H	7.8±0.1	สีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ มีจุดสีขาวตรงกลาง
5	E	7.7±0.2	สีเหลืองครีม รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ผิวขรุขระ
	H	7.9±0.0	สีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ มีจุดสีขาวตรงกลาง
6	E	8.3±0.1	สีเหลืองครีม รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ผิวขรุขระ
	H	8.0±0.1	สีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ มีจุดสีขาวตรงกลาง

6.3 การจำแนกจุลินทรีย์เบื้องต้น

จากการตรวจนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ในแต่ละวันและจัดจำแนกยีสต์เบื้องต้น โดยสังเกตลักษณะจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี พบลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน 12 กลุ่ม ได้แก่

- กลุ่ม A ลักษณะโคโลนีสีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ
- กลุ่ม B ลักษณะโคโลนีสีขาว ขอบหยัก
- กลุ่ม C ลักษณะโคโลนีสีขาว รูปร่างไม้
- กลุ่ม D ลักษณะโคโลนีสีโอลด์โรสอ่อน มีจุดอยู่ตรงกลาง มีเส้นใยเล็กๆ รอบโคโลนี
- กลุ่ม E ลักษณะโคโลนีสีขาว ปุย มีจุดตรงกลางสีขาว
- กลุ่ม F ลักษณะโคโลนีสีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก
- กลุ่ม G ลักษณะโคโลนีสีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ
- กลุ่ม H ลักษณะโคโลนีสีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ผิวเรียบ
- กลุ่ม I ลักษณะโคโลนีสีขาวด้าน รูปร่างไม่แน่นอน ขนาดใหญ่ ขอบหยัก
- กลุ่ม J ลักษณะโคโลนีสีขาวครีมอ่อน รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบ
- กลุ่ม K ลักษณะโคโลนีสีขาว ปุย มีจุดตรงกลางสีดำ
- กลุ่ม L ลักษณะโคโลนีราสีแดง ปุยสีขาว จุดตรงกลางสีแดง

จากการตรวจนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ AE ในแต่ละวันและจัดจำแนกแบคทีเรียกรดอะซิติกเบื้องต้นจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี พบลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน 7 กลุ่ม ได้แก่

- กลุ่ม A ลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน รูปร่างไม่แน่นอน ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ ผิวขรุขระ
- กลุ่ม B ลักษณะโคโลนีสีเหลืองเข้ม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบ
- กลุ่ม D ลักษณะโคโลนีสีเหลืองครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก
- กลุ่ม E ลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน รูปร่างกลม ขนาดปานกลาง ผิวขรุขระ
- กลุ่ม F ลักษณะโคโลนีสีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบใส
- กลุ่ม H ลักษณะโคโลนีสีเหลืองหม่น รูปร่างกลม ขนาดเล็ก
- กลุ่ม I ลักษณะโคโลนีสีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบใส ผิวเรียบ

และจากการตรวจนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ในแต่ละวันและจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกเบื้องต้น โดยสังเกตจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี พบลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน 3 กลุ่ม ได้แก่

- กลุ่ม A ลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ผิวขรุขระ ขอบเรียบ
- กลุ่ม E ลักษณะโคโลนีสีเหลืองครีม รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ผิวขรุขระ
- กลุ่ม H ลักษณะโคโลนีสีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ มีจุดสีขาวตรงกลาง

6.4 การจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบส ของยีสต์และราบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และวิเคราะห์ลำดับเบสของแบคทีเรียบริเวณ V6-V8 ของ 16S rDNA ด้วยวิธี Sequencing แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 6.4

ตารางที่ 6.4 ผลการจัดจำแนกจุลินทรีย์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

จุลินทรีย์	กลุ่ม	สายพันธุ์
ยีสต์และรา	A	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>Pichia guilliermondii</i>)
	B	unidentified
	C	<i>Sporisorium elionuri</i>
	D	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	E	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>
	F	<i>Tortispora caseinolytica</i> (<i>Candida caseinolytica</i>)
	G	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
	H	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
	I	<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i>)
	J	<i>Candida nivariensis</i>
	K	<i>Aspergillus japonicus</i>
	L	<i>Fusarium oxysporum</i>
แบคทีเรียกรดอะซิติก	A	unidentified
	B	unidentified
	D	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	E	unidentified
	F	unidentified
	H	<i>Lactobacillus brevis</i>
	I	<i>Lactobacillus plantarum</i>
แบคทีเรียกรดแลคติก	A	unidentified
	E	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	H	<i>Lactobacillus brevis</i>

7. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

7.1 ลักษณะทางกายภาพของสับปะรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทอง

จากการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของสับปะรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทอง พบว่า สับปะรดมีน้ำหนัก ความยาว และเส้นรอบวงโดยเฉลี่ย เท่ากับ 1397.97 ± 65.27 กรัม 20.70 ± 0.84 เซนติเมตร และ 35.60 ± 1.19 เซนติเมตร ตามลำดับ

7.2 การหมักน้ำสับปะรดกลุ่มควีนพันธุ์ตราดสีทองคั้นสดแบบธรรมชาติ

7.2.1 การวิเคราะห์ประชากรยีสต์และราทั้งหมด พบว่าจำนวนประชากรยีสต์และราทั้งหมดเริ่มต้นที่ $6.1 \pm 0.1 \log \text{ cfu/ml}$ จากนั้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วประมาณ $2 \log \text{ cycle}$ ในช่วง 4 วันแรกของการหมัก และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันสุดท้ายของการหมักโดยมีประชากรยีสต์และราทั้งหมดเท่ากับ $8.2 \log \text{ cfu/ml}$ และการจำแนกยีสต์และราเบื้องต้นตามรูปร่างลักษณะโคโลนีและสีของเซลล์ที่แตกต่างกันสามารถแบ่งยีสต์และราออกได้เป็น 12 กลุ่ม ได้แก่ A B C D E F G H I J K และ L โดย

- กลุ่ม A ลักษณะโคโลนีสีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ พบในช่วง 4 วันแรกของการหมัก
- กลุ่ม B ลักษณะโคโลนีสีขาว ขอบหยัก พบเฉพาะในวันแรกของการหมัก
- กลุ่ม C ลักษณะโคโลนีสีขาว ตรงกลางโคโลนีแยกเป็นแฉกคล้ายดอกไม้ พบเฉพาะในวันแรกของการหมัก
- กลุ่ม D ลักษณะโคโลนีสีโอลด์โรสอ่อน มีจุดอยู่ตรงกลาง มีเส้นใยเล็กๆ รอบโคโลนี พบเฉพาะในวันแรกของการหมัก
- กลุ่ม E ลักษณะโคโลนีสีปุยสีขาว มีจุดตรงกลางสีขาว พบในช่วง 3 วันแรกของการหมัก
- กลุ่ม F ลักษณะโคโลนีสีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก พบตลอดทั้ง 6 วันของการหมัก
- กลุ่ม G ลักษณะโคโลนีสีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ พบในช่วงวันที่ 2-4 ของการหมัก
- กลุ่ม H ลักษณะโคโลนีสีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ผิวเรียบ พบในช่วงวันที่ 4-6 ของการหมัก
- กลุ่ม I ลักษณะโคโลนีสีขาวด้าน รูปร่างไม่แน่นอน ขนาดใหญ่ ขอบหยัก พบในช่วงวันที่ 4-6 ของการหมัก
- กลุ่ม J ลักษณะโคโลนีสีขาวครีมอ่อน รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบพบในช่วงวันที่ 4-6 ของการหมัก

- กลุ่ม K ลักษณะโคโลนีปุยสีขาว มีจุดตรงกลางสีดำ พบเฉพาะในวันแรกของการหมัก

- กลุ่ม L ลักษณะโคโลนีราสีแดง ปุยสีขาว จุดตรงกลางสีแดง พบเฉพาะในวันแรกของการหมัก

7.2.2 การวิเคราะห์ประชากรแบคทีเรียกรดอะซิติกทั้งหมด พบว่าจำนวนประชากรแบคทีเรียกรดอะซิติกทั้งหมดเริ่มต้นที่ $5.3 \pm 0.1 \log \text{ cfu/ml}$ และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วประมาณ 2 log cycle ในระหว่างวันที่ 0-1 ของการหมัก และเพิ่มขึ้นอีกประมาณ 1 log cfu/ml ในระหว่างวันที่ 1-3 ของการหมัก โดยจำนวนประชากรสูงสุดมีค่าเท่ากับ $8.0 \pm 1.0 \log \text{ cfu/ml}$ ในวันที่ 3 ของการหมัก และเริ่มเข้าสู่ stationary phase หลังวันที่ 3 ตลอดจนถึงสิ้นสุดการหมัก โดยมีจำนวนประชากรในวันที่ 6 ของการหมักเท่ากับ $8.3 \pm 1.0 \log \text{ cfu/ml}$ และการจำแนกแบคทีเรียกรดอะซิติกเบื้องต้นตามรูปร่าง ลักษณะโคโลนีและสัญญาณวิทยาของเซลล์ที่แตกต่างกันสามารถแบ่งแบคทีเรียกรดอะซิติกออกได้เป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ A B D E F H และ I โดย

- กลุ่ม A ลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน รูปร่างไม่แน่นอน ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ ผิวขรุขระ พบเฉพาะในวันแรกของการหมัก

- กลุ่ม B ลักษณะโคโลนีสีเหลืองเข้ม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบพบเฉพาะในวันแรกของการหมัก

- กลุ่ม D ลักษณะโคโลนีสีเหลืองครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก พบในช่วงวันที่ 3 ตลอดจนถึงสิ้นสุดการหมัก

- กลุ่ม E ลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน รูปร่างกลม ขนาดปานกลาง ผิวขรุขระ พบในช่วงวันที่ 1-2 ของการหมัก

- กลุ่ม F ลักษณะโคโลนีสีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบใส พบในช่วง 4 วันแรกของการหมัก

- กลุ่ม H ลักษณะโคโลนีสีเหลืองหม่น รูปร่างกลม ขนาดเล็ก พบในช่วง 2 วันสุดท้ายของการหมัก

- กลุ่ม I ลักษณะโคโลนีสีขาวครีม รูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบใส ผิวเรียบ พบในช่วง 2 วันสุดท้ายของการหมัก

7.2.3 การวิเคราะห์ประชากรแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด พบว่าจำนวนประชากรแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดเริ่มต้นที่ $5.0 \pm 2.4 \log \text{ cfu/ml}$ และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วประมาณ 3 log cycle ในระหว่างวันที่ 0-1 ของการหมัก และเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในระหว่างวันที่ 1-3 ของการหมัก โดยจำนวนประชากรสูงสุดมีค่าเท่ากับ $8.1 \pm 0.3 \log \text{ cfu/ml}$ ในวันที่ 3 ของการหมัก และเริ่มเข้าสู่ stationary phase หลังวันที่ 3 ตลอดจนถึงสิ้นสุดการหมัก โดยมีจำนวนประชากรในวันที่ 6 ของการหมักเท่ากับ $8.5 \pm 0.1 \log \text{ cfu/ml}$ และการจำแนก

แบคทีเรียกรดแลคติกเบื้องต้นตามรูปร่าง ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่แตกต่างกันสามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ E และ H โดย

- กลุ่ม A ลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ผิวฉุน ขอบเรียบพบในช่วง 3 วันแรกของการหมัก

- กลุ่ม E ลักษณะโคโลนีสีเหลืองครีม รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ผิวฉุน พบในช่วงวันที่ 3 ตลอดจนถึงสิ้นสุดการหมัก

- กลุ่ม H ลักษณะโคโลนีสีขาวหม่น รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ มีจุดสีขาวตรงกลาง พบในช่วงวันที่ 3 ตลอดจนถึงสิ้นสุดการหมัก

ข้อเสนอแนะ

เมื่อทราบสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้แล้ว ควรทดสอบความสามารถในการหมักน้ำสับปะรดของจุลินทรีย์เพื่อให้ทราบถึงสมบัติการหมักน้ำสับปะรดของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ และอาจสามารถนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อสำหรับหมักเครื่องดื่มน้ำสับปะรดเพื่อสุขภาพต่อไป

ผลผลิต (Output)

Chanprasartsuk, O., Chantasri, K., Piriyauppakit. N. (2019). Autochthonous yeasts and lactic acid bacteria associated with natural fermentation of pineapple juice and their ability to ferment. In: Proceedings of the 21th Food Innovation Asia Conference 2019: Future Food Innovation for Better Health and Wellness, pp.456-462. 13-15 June 2019, BITEC, Bangkok, Thailand.

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 2560A10802084

สัญญาเลขที่ 149/2560

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐ มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การคัดแยกจุลินทรีย์อโตโคเนสที่เกี่ยวกับการหมักน้ำสับปรดคั้นสด

เป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตน้ำผลไม้ น้ำตาลต่ำ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร.อรอง จันทร์ประสาทสุข

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ต.ค. 2559 ถึงวันที่ 30 พ.ค. 2562

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี 7 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ต.ค. 2559

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 454,860 บาท เมื่อวันที่ ๓ เดือน ปี 3 ก.พ. 60

งวดที่ 2 (40%) 363,888 บาท เมื่อวันที่ ๑๖ เดือน ปี 16 ส.ค. 60

งวดที่ 3 (10%) 90,972 บาท

รวม 909,720 บาท

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงิน คงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	60,000	60,000	-
2. ค่าจ้าง	45,000	50,000	-5,000
3. ค่าวัสดุ	648,920	643,920	+5,000
4. ค่าใช้สอย	46,000	46,000	
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ (โปรดระบุเป็นข้อย่อย) - ค่าจ้างนิสิตชั่วคราว	109,800	109,800	-

- ค่าธรรมเนียมการ อุดหนุนสถาบัน	101,080	101,080	-
รวม	1,010,800	1,010,800	-

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง (Reference)

- จินดารัฐ วีระวุฒิ. (2541). *สับปะรดและสรีรวิทยาการเจริญเติบโตของสับปะรด*. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ณัฏชนันท์ แก้วศรี. (2557). *พันธุ์สับปะรด*. วันที่สืบค้นข้อมูล 3 มกราคม 2560. เข้าถึงได้จาก <http://nutcnan.blogspot.com/2014/10/blog-post.html>
- ธนขวัญ บุขบ้น. (2553). *ความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียกรดน้ำส้มที่พบในอาหารหมักดองในเขตอุตสาหกรรม กรุงเทพมหานคร*. วันที่สืบค้นข้อมูล 3 มกราคม 2560. เข้าถึงได้จาก http://www.ssruir.ssru.ac.th/bitstream/ssruir/860/1/029_53.pdf
- นิธิยา รัตนাপนนท์ และ พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. (2554). การหมัก. วันที่สืบค้นข้อมูล 24 ธันวาคม 2559. เข้าถึงได้จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0316/fermentation-การหมัก>
- นิธิยา รัตนাপนนท์ และ พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. (2554). *แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก*. วันที่สืบค้นข้อมูล 25 ธันวาคม 2559. เข้าถึงได้จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/782/lactic-acid-bacteria-แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก>
- นิธิยา รัตนাপนนท์ และ พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. (2554). *แบคทีเรียกรดอะซิติก*. วันที่สืบค้นข้อมูล 25 ธันวาคม 2559. เข้าถึงได้จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1960/acetic-acid-bacteria>
- นิธิยา รัตนাপนนท์ และ พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. (2554). *ยีสต์*. วันที่สืบค้นข้อมูล 25 ธันวาคม 2559. เข้าถึงได้จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0555/yeast-ยีสต์>
- ปิยะรัชช กุลเมธี. (2551). *ปฏิบัติการจุลชีววิทยาสำหรับอุตสาหกรรมเกษตร*. วันที่สืบค้น 25 ธันวาคม 2559. เข้าถึงได้จาก <http://www.agro.kmutnb.ac.th/e-learning/521302/plan.php>
- มาลินี อัครดิษฐเลิศ. (2551). *เทคโนโลยีการหมัก*. วันที่สืบค้น 24 ธันวาคม 2559. เข้าถึงได้จาก <http://www.gotoknow.org/posts/209467>
- ศักดิ์อนันต์ อนันตสุข. (2555). *การสลายอาหารระดับเซลล์*. วันที่สืบค้นข้อมูล 3 มกราคม 2560. เข้าถึงได้จาก <http://biologe-knowledge.blogspot.com/2012/06/atp-cellular-respiration-aerobic.html>

- ศรีสุตา ธรรมวิชูกร. (ม.ป.ป.). เทคนิค PCR-DGGE การวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรม โดยใช้ 16S rRNA gene. วันที่สืบค้นข้อมูล 25 ธันวาคม 2559. เข้าถึงได้จาก web.yru.ac.th/~dolah/notes/4034605-2-48/PTR-13/PRT_404652055-13.doc
- สาวิตรี ลิ้มทอง. (2556). พันธุศาสตร์ของยีสต์และแนวทางการใช้ประโยชน์. กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สุปรินา อินทรีย์ และ คณะ. (ม.ป.ป.). การจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ป่าที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเบียร์ลาเกอร์. วันที่สืบค้นข้อมูล 3 มกราคม 2560. เข้าถึงได้จาก <http://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/data53/KC4806035.pdf>
- สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ. (ม.ป.ป.). สืบประวัติ. วันที่สืบค้นข้อมูล 3 มกราคม 2560. เข้าถึงได้จาก http://www.biogang.net/plant_view.php?uid=20109&id=138193
- ยูโซะ ยามาตะ และคณะ. (2550). แบคทีเรียกรดน้ำส้มสายชู (*Acetic Acid Bacteria*). ปทุมธานี : ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย.
- อภิญญา จันทรวัดนะ. (2556). เทคนิคทางจุลชีววิทยา. วันที่สืบค้นข้อมูล 25 ธันวาคม 2559. เข้าถึงได้จาก http://anonmicrobiology.blogspot.com/2013_07_01_archive.html
- Brashears, Mindy M., Amezcuita, A., & Jaroni, D. (2005). Lactic Acid Bacteria and Their Uses in Animal Feeding to Improve Food Safety, *Advances in Food and Nutrition Research*, 50, 1-31.
- Caggia Cinzia, Pitino Iole, Randazzo Cinzia. L., Ribbera Angela, & Romeo Flora. V. (2012). Diversity of bacterial population of table olives assessed by PCR-DGGE analysis. *Food Microbiology*, 32, 87-96.
- Cagno, R. D., Coda, R., Angelis, M. D., & Gobbetti, M., (2013). *Food Microbiology*, Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation: pp.1-10.
- Chanprasartsuk O., Fleet, Graham. H., Prakitchaiwattana C., & Sanguandeeikul R. (2010). Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits,

freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation, *Bioresource Technology*, 101, 7500-7509.

- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., & Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina, *Food Microbiology*, 99, 237-243.
- De Vuyst, L., Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Perre, V V., Vancanneyt, M., et al. (2008). Validation of the (GTG)5-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans, *International Journal of Food Microbiology*, 125, 79-90.
- Di Cagno, R., Cardinali, G., Minervini, G., Antonielli, L., Rizzello, C. G., Ricciuti, P., & Gobbett, M. (2010). Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. *Food Microbiology*, 27 (3), 381–389.
- Fleet, G..H. (2002). Yeast interactions and wine flavour, *International Journal of Food Microbiology*, 86 (1-2), 11-22.
- Goto-Yamamoto, N., Masaki, K., Mizuno, A., Ohta, T., & Takahashi, M. (2014). Evaluation of microbial diversity in sulfite-added and sulfite-free wine by culture-dependent and independent methods, *Bioscience and Bioengineering*, 117 (5), 569-575.
- Helena, J., Lucena-Padrós, E., Maldonado-Barragán, A., Rodríguez, Juan. M., & Ruiz-Barba, J. (2015). PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity in Spanish-style green table-olive fermentations, *Food Microbiology*, 205, 47-53.
- Hidalgo, C., Mas, A., Mateo, E., & Torija, M.J. (2012). Identification of yeast and acetic acid bacteria isolated from the fermentation and acetification of persimmon (*Diospyros kaki*), *Food Microbiology*, 30, 98-104.

- Hidalgo, C., Mas, A., Mateo, E., & Torija, M.J. (2013). Effect of inoculation on strawberry fermentation and acetiification processes using native strains of yeast and acetic acid bacteria, *Food Microbiology*, 34 (1), 88-94.
- Meile, J., Montet D., & Shobaky, A. EL. (2015). New traceability strategies based on a biological Bar Code by PCR-DGGE using bacterial and yeast communities for determining farming type of peach, *Basic and Applied Sciences*, 2, 327-333.
- Onken, Jane. E., Greer, P. K., Calingaert, B., & Hale, L. P. (2008). Bromelain treatment decreases secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by colon biopsies *in vitro*. *Clinical Immunology*, 126 (3), 345–352.
- Piskula, M., Terao, J., & Yao, Q. (1994). Protective Effect of Epicatechin, Epicatechin Gallate, and Quercetin on Lipid Peroxidation in Phospholipid Bilayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 308 (1), 278-284.
- Rathore, S., Salmerón, I., Pandiella, Severino. S. (2012). Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures, *Food Microbiology*, 30 (1), 239-244.
- Sakai, K. (2008). *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)*. Retrieved January 3, 2017, from http://www.lsse.kyutech.ac.jp/~asiacore/japanese/log/2008/data/0707/sakai_02.pdf
- Saxena, R. (2015). *Familiarize with culture media-the growth and survival media of microorganisms*. Retrieved January 3, 2017, from ab-training.com/2015/02/14/familiarize-culture-media-growth-survival-media-microorganisms/
- Secor Jr., Eric. R., Carson IV, William F., Cloutier, Michelle. M., Guernsey, L. A., Schramm, Craig. M., Wu, Carol. A., & Thrall, Roger. S. (2005). Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. *Cellular Immunology*, 237 (1), 68–75.
- Seearunruangchai, A., Tanasupawat, S., Keeratipibul S., Thawai C., Itoh, T., & Yamada, Y. (2004). Identification of acetic acid bacteria isolate from fruits

collected in Thailand. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50 (1), 47-53.

Sinensoidal. (2015). *PCR – Polymerase Chain Reaction เทคนิคที่สำคัญใน Molecular Biology*. Retrieved January 7, 2017, from <https://sinensoidal.wordpress.com/2015/03/14/pcr-for-molecular-biology/#more-3>

Tamang, J. P., Watanabe K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages, *Microbiology of Fermented Foods and Beverages*, 7, 377.

ภาคผนวก (Appendix)

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Malt extract agar (MEA)

ประกอบด้วย

- Malt extract	20	กรัม
- Peptone	10	กรัม
- Glucose	20	กรัม
- Agar	20	กรัม
- Distilled water	1000	มิลลิลิตร
- Tetracycline	0.01	กรัม/มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติม Tetracycline แล้วผสมให้เข้ากัน

2. de Man Rogosa and Sharp agar (MRS) และ MRS broth

ประกอบด้วย

- Bromocresol purple	0.4	กรัม
- Peptone	10	กรัม
- Beef extract	10	กรัม
- Yeast extract	5	กรัม
- Glucose	20	กรัม
- K_2HPO_4	2	กรัม
- Tween 80	1	มิลลิกรัม
- Sodium acetate.3H ₂ O	5	กรัม
- Diammonia citrate	2	กรัม
- MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2	กรัม
- MnSO ₄ .4H ₂ O	0.05	กรัม
- Agar	15	กรัม
- Distilled water (pH 6.0)	1000	มิลลิลิตร
- Cycloheximide	0.01	กรัม/มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติม Cycloheximide แล้วผสมให้เข้ากัน สำหรับการเตรียม MRS broth เตรียมเหมือนกับ MRS agar แต่ไม่ต้องเติม agar

3. Acetic acid Ethanol Agar (AE) (Yamada et al., 1999)

ประกอบด้วย

- 10 % Glucose
- 0.5 % Absolute ethanol
- 0.5 % Peptone
- 0.8 % Yeast extract
- 0.7 % Calcium carbonate
- 1.5 % Agar
- 0.01 g/ml Cycloheximide

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เติม Absolute ethanol และ Cycloheximide แล้วผสมให้เข้ากัน

4. Yeast Mold broth (YM)

ประกอบด้วย

- | | | |
|-------------------|------|----------------|
| - Malt extract | 3 | กรัม |
| - Yeast extract | 3 | กรัม |
| - Peptone | 5 | กรัม |
| - Glucose | 10 | กรัม |
| - Distilled water | 1000 | มิลลิลิตร |
| - Oxytetracycline | 0.01 | กรัม/มิลลิลิตร |

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติม Oxytetracycline แล้วผสมให้เข้ากัน

5. Acetic acid Ethanol Broth (AE Broth) (Yamada et al., 1999)

ประกอบด้วย

- 2.0 % Glucose
- 0.5 % Peptone
- 0.8 % Yeast extract
- 0.5 % Absolute ethanol

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติม Absolute ethanol แล้วผสมให้เข้ากัน

6. Peptone water ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยละลาย Peptone 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง NaCl 1 กรัม ละลายกับน้ำปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 250 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ในเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 10X TBE buffer ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง Tris base 108 กรัม, Boric acid 55 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติม 0.5 M EDTA pH 8 ลงไป 40 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

3. การเตรียม Lysis buffer ปริมาตร 1 ลิตร

เตรียมโดยผสมสารละลาย 1M tris HCl 10 มิลลิลิตร, 0.5M EDTA 50 มิลลิลิตร, NaCl 1.16 กรัม และ 10% SDS 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. การเตรียม 1M Tris HCl buffer pH 8.0 ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง Tris 121.1 กรัม ละลายในน้ำ Milli Q แล้วปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1M HCl ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. การเตรียม 0.5M EDTA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลาย EDTA 18.612 กรัม ในน้ำ Milli Q 80 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างด้วย NaOH (ใช้แบบเป็นเม็ด) ให้ pH เท่ากับ 8.0 ให้ความร้อนด้วย Hot plate จนสารละลาย ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. การเตรียม 10% SDS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำ Milli Q 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. การเตรียม 1M HCl ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมโดยปิเปต HCl ปริมาตร 8.35 มิลลิลิตร ลงในน้ำ Milli Q ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

8. การเตรียม 70% Ethanol

ฆ่าเชื้อน้ำ Milli Q 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้ว แล้วนำมาเติม 99.99% Ethanol ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นแล้วเขย่าให้เข้ากัน

9. การเตรียม Agarose gel 1.5%

เตรียมโดยนำ Agarose gel 1.5 กรัม มาละลายใน 1X TBE buffer 98.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้ใสด้วยการนำไปเข้าไมโครเวฟประมาณ 1 นาที แล้วนำมาคนและเข้าไมโครเวฟอีก จนกว่าเจลจะมีลักษณะใส

10. การเตรียม Polyacrylamide gel 8%

ประกอบด้วย - TBE buffer (5xstock)	9 มิลลิลิตร
- Acrylamide : Bis (30%stock)	12 มิลลิลิตร
- Tetramethylethylenediamine	25 ไมโครลิตร
- Ammonium persulfate (10%stock)	286 ไมโครลิตร
- Sterile deionized water	24 มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มให้เดือดปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

1. การหาจำนวนประชากรยีสต์

ปิเปตน้ำสับประรดหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเจือจางในสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 % ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นประมาณ $5 \log$ cfu/ml จากนั้นนำไปปั่นผสม แล้วปิเปตสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 วัน นับจำนวนโคโลนียีสต์และรายงานผลในหน่วย \log cfu/ml บันทึกลักษณะโคโลนี และจัดกลุ่มตามลักษณะของโคโลนี

$$\text{จำนวนประชากรยีสต์} = n \times df \times 10$$

เมื่อ n คือ จำนวนโคโลนีเฉลี่ยในหนึ่งจาน (25-250)

df คือ dilution factor หรือส่วนกลับของความเจือจางของตัวอย่างที่นำมาเพาะใน จานที่หาค่าได้

จำนวนที่หาค่าได้จะมีหน่วยเป็น colony forming unit (cfu) ต่อกรัม/มิลลิลิตร

2. การหาจำนวนประชากรแบคทีเรียกรดอะซิติก

ปิเปตน้ำสับประรดหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเจือจางในสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 % ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นประมาณ $5 \log$ cfu/ml จากนั้นนำไปปั่นผสม แล้วปิเปตสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ AE นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน นับจำนวนโคโลนียีสต์และรายงานผลในหน่วย \log cfu/ml บันทึกลักษณะโคโลนี และจัดกลุ่มตามลักษณะของโคโลนี

$$\text{จำนวนประชากรยีสต์} = n \times df \times 10$$

เมื่อ n คือ จำนวนโคโลนีเฉลี่ยในหนึ่งจาน (25-250)

df คือ dilution factor หรือส่วนกลับของความเจือจางของตัวอย่างที่นำมาเพาะใน จานที่หาค่าได้

จำนวนที่หาค่าได้จะมีหน่วยเป็น colony forming unit (cfu) ต่อกรัม/มิลลิลิตร

3. การหาจำนวนประชากรแบคทีเรียกรดแลคติก

ปิเปตน้ำสับประรดหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเจือจางในสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 % ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นประมาณ $5 \log$

cfu/ml จากนั้นนำไปปั่นผสม แล้วเปิดสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน นับจำนวนโคโลนียีสต์และรายงานผลในหน่วย log cfu/ml บันทึกลักษณะโคโลนี และจัดกลุ่มตามลักษณะของโคโลนี

$$\text{จำนวนประชากรยีสต์} = n \times df \times 10$$

เมื่อ n คือ จำนวนโคโลนีเฉลี่ยในหนึ่งจาน (25-250)

df คือ dilution factor หรือส่วนกลับของความเจือจางของตัวอย่างที่นำมาเพาะใน จานที่หาค่าได้

จำนวนที่หาค่าได้จะมีหน่วยเป็น colony forming unit (cfu) ต่อกรัม/มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง
ข้อมูลผลการทดลอง

ตาราง ง-1 แสดงลักษณะทางกายภาพของสับปะรดกลุ่มควินพันธุ์ตราดสีทอง

ผลที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	เส้นรอบวง (เซนติเมตร)
1	1372.31	22	36.5
2	1501.42	20.5	37
3	1407.05	21	35.5
4	1384.72	21	34
5	1324.34	20	35
เฉลี่ย	1397.97± 65.27	20.70± 0.84	35.60± 1.19

ตารางที่ ง-2 จำนวนประชากรยีสต์และราในระหว่างการหมักน้ำสับปรดพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ

วันที่ หมัก	จำนวนประชากรยีสต์ (log cfu/ml)												
	ทั้งหมด	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
0	6.1±0.1	6.0±0.1	1.1±2.2	1.0±2.0	3.2±2.1	4.8±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	4.6±0.1	2.0±2.3
1	6.7±0.2	6.6±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	3.8±2.6	1.3±2.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
2	7.5±0.1	5.1±3.4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.6±3.2	7.3±0.1	6.4±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
3	8.1±0.1	7.0±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	7.9±0.2	7.3±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
4	7.9±0.2	6.6±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	7.8±0.2	6.9±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
5	7.8±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	6.7±0.1	0.0±0.0	6.6±0.1	6.3±0.1	7.8±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0
6	8.2±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	3.0±3.5	0.0±0.0	3.2±3.7	7.1±0.2	8.2±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0

ตารางที่ ง-3 จำนวนประชากรแบคทีเรียกรดแลคติกในระหว่างการหมักน้ำสับปะรดพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ

วันที่หมัก	จำนวนประชากรแบคทีเรียกรดแลคติก (log cfu/ml)			
	ทั้งหมด	A	E	H
0	5.0±2.4	5.0±2.4	0.0±0.0	0.0±0.0
1	7.9±0.0	7.9±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
2	7.4±0.2	7.4±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0
3	8.1±0.2	0.0±0.0	6.5±0.6	8.1±0.3
4	8.1±0.2	0.0±0.0	7.2±1.0	7.8±0.1
5	8.1±0.0	0.0±0.0	7.7±0.2	7.9±0.0
6	8.5±0.1	0.0±0.0	8.3±0.1	8.0±0.1

ตารางที่ ง-4 จำนวนประชากรแบคทีเรียกรดอะซิติกในระหว่างการหมักน้ำสับประรดพันธุ์ตราดสีทองแบบธรรมชาติ

วันที่หมัก	จำนวนประชากรแบคทีเรียกรดอะซิติก (log cfu/ml)							
	ทั้งหมด	A	B	D	E	F	H	I
0	5.3±0.1	5.0±0.1	4.8±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	4.2±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0
1	6.8±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	6.8±0.1	4.0±2.7	0.0±0.0	0.0±0.0
2	7.3±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	7.3±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
3	8.0±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	4.8±3.2	0.0±0.0	5.9±4.0	0.0±0.0	6.9±0.8
4	7.7±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	5.4±3.6	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	7.6±0.1
5	7.9±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	6.2±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	7.7±0.3	7.1±0.2
6	8.3±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	7.8±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	8.1±0.0	7.5±0.1