รายงานฉบับสมบูรณ์

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูระบบ Single Stage

คณะผู้วิจัย

รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

อ.สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา

นางอัสนี วิจิตระกะ

เสนอ

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรกฎาคม 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สารบัญ

	หน้า
รายละเอียดข้อเสนอโครงการวิจัย	1
การติดตาม Growth cycle ของเชื้อยีสต์ในระหว่างการผลิตไวน์สับปะรด	6
การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเจริญร่วมกันของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 และ แบคทีเรียอะซิติก *Acetobacter aceti* WK	8
การหมักน้ำส้มสายชูจากหัวเชื้อน้ำส้ม *Acetobacter aceti* WK ในไวน์สับปะรด	17
สรุปผลการทดลอง	21

RC1H
TP
A45
2525 ง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....75520
วัน,เดือน,ปี.....-6 พ.ย. 2550

b.....11736069
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 ในอาหารน้ำสับปะรด	6
2	ความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 กับการเปลี่ยนแปลง Total soluble solid (องศาบริกซ์) กรด(ในรูปของกรดแลคติก) และแอลกอฮอล์ในการหมักน้ำสับปะรดที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน	7
3	ความสัมพันธ์ของการเจริญของหัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK กับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด ปริมาณ Total soluble solid (องศาบริกซ์) และปริมาณแอลกอฮอล์ในการหมักไวน์สับปะรดที่อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส)	9
4	ลักษณะการหมักน้ำสับปะรดด้วยหัวเชื้อผสมของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 32 องศาเซลเซียส) โดยทำการให้อากาศภายหลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก	10
5	ความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK กับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด ปริมาณ Total soluble solid (องศาบริกซ์) และปริมาณแอลกอฮอล์ในการหมักในน้ำสับปะรดที่ถ่ายเชื้อทั้งสองพร้อมกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และหมักที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน โดยทำการให้อากาศภายหลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก	11
6	ความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK กับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด ปริมาณ Total soluble solid (องศาบริกซ์) และปริมาณแอลกอฮอล์ในการหมักในน้ำสับปะรดที่ถ่ายเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK หลังจากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 เป็นเวลา 1 วัน และหมักที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน	12
7	ความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK กับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด ปริมาณ Total soluble solid (องศาบริกซ์) และปริมาณแอลกอฮอล์ในการหมักในน้ำสับปะรดที่ถ่ายเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK หลังจากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 เป็นเวลา 2 วัน และหมักที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน	14
8	ความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK กับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด ปริมาณ Total soluble solid (องศาบริกซ์) และปริมาณแอลกอฮอล์ในการหมักในน้ำสับปะรดที่ถ่ายเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK หลังจากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 เป็นเวลา 3 วัน และหมักที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน	15
9	ความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK กับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด ปริมาณ Total soluble solid (องศาบริกซ์) และปริมาณแอลกอฮอล์ในการหมักในน้ำสับปะรดที่ถ่ายเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK หลังจากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 เป็นเวลา 4 วัน และหมักที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
10	ลักษณะของถังหมักไวน์สับปะรดขนาดความจุ 100 ลิตร : (ก) ลักษณะภายนอกของถังหมัก พร้อมทั้งเครื่องควบคุมอุณหภูมิ; (ข) ลักษณะภายในถังหมักซึ่งมีระบบระบายความร้อนและเทอร์โมมิเตอร์เพื่อควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการหมัก	18
11	ลักษณะของถังหมักที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูจากหัวเชื้อน้ำส้ม WK	19
12	การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด ปริมาณแอลกอฮอล์และค่า pH ในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์สับปะรดด้วยหัวเชื้อน้ำส้ม WK	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชู ระบบ Single Stage

เสนอต่อ

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

---

1. **คณะผู้ทำวิจัยและสัดส่วนการทำงานวิจัย**

นายวราวุฒิ ครูส่ง

รองศาสตราจารย์ ระดับ 9 สัดส่วนการทำงานร้อยละ 25 %

นางสาวสร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา

อาจารย์ระดับ4 สัดส่วนการทำงานร้อยละ 25%

นางอัสนี วิจิระกะ

นักวิทยาศาสตร์ ระดับ 5 สัดส่วนการทำงานร้อยละ 50%

2. **ประเภทโครงการวิจัย** การวิจัยประยุกต์
3. **กลุ่มสาขาวิชา** สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา
4. **คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย**

ภาษาไทย : ปฏิสัมพันธ์ ยีสต์ แบคทีเรียอะซิติก น้ำส้มสายชู

ภาษาอังกฤษ : Interaction, Yeast, Acetic acid Bacteria, Vinegar, Single Stage

5. **ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย**

น้ำส้มสายชูในปัจจุบันส่วนใหญ่จะเป็นน้ำส้มสายชูกลั่น เนื่องจากการผลิตน้ำส้มสายชูโดยวิธีการหมักนั้นมีราคาแพง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณภาพของวัตถุดิบที่นำมาผลิต(ไวน์) ที่จะนำมาใช้ อย่างไรก็ตาม จากความต้องการของลูกค้าในประเทศแถบยุโรปไม่นิยมน้ำส้มสายชูกลั่นมากเท่าน้ำส้มสายชูหมัก ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจะเริ่มจากการผลิตไวน์ โดยอาศัยการทำงานของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อสร้างแอลกอฮอล์จากน้ำตาล แล้วจึงถ่ายน้ำไวน์ที่ได้ลงในถังหมักจากนั้นจึงเติมเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* ทั้งนี้การหมักน้ำส้มสายชูในลักษณะนี้สามารถเรียกได้ว่าเป็น Two Stage Fermentation ซึ่งอัตราการผลิตน้ำส้มสายชูที่ได้จะเกี่ยวเนื่องกับประสิทธิภาพของการหมักทั้งสองขั้นตอน นอกจากนี้แล้วการผลิตน้ำส้มสายชูในอดีตนั้นเกิดจากการหมักอย่างต่อเนื่องในระหว่างการหมักไวน์ จนทำให้ได้ไวน์เปรี้ยวหรือที่เรียกกันในปัจจุบันว่าน้ำส้มสายชู ถึงแม้ว่าในไวน์จะมีปริมาณแอลกอฮอล์อยู่สูงก็ตาม (วราวุฒิ และ รุ่งนภา, 253_) ดังนั้นจึงเกิดแนวคิดที่จะทำการหมักโดยอาศัยแบคทีเรียกรดอะซิติกให้อยู่ร่วมกันกับเชื้อยีสต์ภายใต้ถังหมักเดียวกันโดยทำการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบื้องต้นถึงสภาพที่เหมาะสมต่อปฏิสัมพันธ์ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสอง โดยมุ่งเน้นช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักเพื่อให้เกิดปฏิสัมพันธ์ดังกล่าว

6. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อหาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรียอะซิติค *Acetobacter aceti* ในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชู

7. ขอบเขตของโครงงานวิจัย

เป็นการศึกษาความสามารถในการอยู่ร่วมกันของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรียอะซิติค *Acetobacter aceti* โดยการติดตามปริมาณของเชื้อทั้งสองในสภาพการหมักซึ่งผ่านการปรับสภาพที่เหมาะสม รวมถึงยังติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นและระยะเวลาในการเติมเชื้อ *Acetobacter aceti* ต่อการผลิตกรดอะซิติคหรือน้ำส้มสาย ชู ปริมาณแอลกอฮอล์ และการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสอง

8. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศน์นั้นมีหลากหลายรูปแบบ บางพวกอยู่ร่วมกันแบบแข่งขัน บางพวกอยู่ร่วมกันได้ประโยชน์ร่วมกัน ในการผลิตน้ำส้มสายชูนั้นจะทำจากการหมักน้ำตาลหรือผลไม้ที่มีน้ำตาลและข้าวเหนียวหมักด้วยยีสต์ให้เป็นแอลกอฮอล์แล้วจึงหมักต่อกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีธรรมชาติ ซึ่งจะเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกในสภาวะที่มีอากาศ

การผลิตสายโซ่สั้นๆของกรดไขมันเช่น hexanoic acid, octanoic acid และ decanoic acid ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ โปรตีนบางชนิดของยีสต์ในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์นั้นสามารถยับยั้งการเจริญจากเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในระหว่างการผลิตไวน์ได้ ในขณะที่การเกิด autolysis ของยีสต์หลังจากการหมักแอลกอฮอล์จะเกิดการปลดปล่อยสารอาหารซึ่งจะส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียได้ ถ้ายีสต์เจริญช้าแบคทีเรียจะเจริญเร็วและส่งผลยับยั้งต่อการเจริญของยีสต์ได้ทำให้การหมักแอลกอฮอล์เกิดช้าลง ซึ่งกลไกการยับยั้งของเชื้อยังมีรายงานอยู่น้อยมาก (Fleet, 2003) ในสภาวะการที่มีกรดอะซิติกและน้ำตาลกลูโคสยีสต์บางสายพันธ์เช่น *Zygosaccharomyces bailii* สามารถสลายกรดอะซิติกในระหว่างการเจริญ ทำให้สามารถทนต่อกรดได้มากกว่ายีสต์ *S. cereviase* (Ferreira และคณะ, 1997)

9. เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

Bisson, L.F., Block, D.E., 2002. Ethanol tolerance in *Saccharomyces*. In: Ciani, M. (Ed.), Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts. Research Signpost, Kerala, India. 85– 98.

Boddy, L., Wimpenny, J.W.T., 1992. Ecological concepts in food microbiology. J. Appl. Bact. 73: 23S–38S (supplement).

Ferreira, M.M., Loureiro-Dias, M.C., Louriro V. 1997. Weak acid inhibition of fermentation by *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*.36:145-153.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fleet , G.H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. International J. Microbiol.86:11-22.

Drysdale, G.S., Fleet, G.H., 1989. The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeast during the fermentation of grape juice. J.Appl.Bact. 67: 471-481.

Edwards, C.G., Reynolds, A.G., Rodriguez, A.V., Semon, M.J., Mills, J.M., 1999. Implication of acetic acid in the induction of slow/stuck grape juice fermentation and inhibition of yeast by *Lactobacillus* sp. Am. J. Enol. Viticulture. 50:204–210.

Viegas, C.A., Rosa, M.F., Sa-Correia, I., Novais, J.M., 1989. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. Appl.Env. Microbiol.55:21– 28.

10. ระเบียบวิธีวิจัย

10.1 การติดตาม Growth cycle ของเชื้อยีสต์ในระหว่างการผลิตไวน์สับปะรด

- การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ โดยเขี่ยเชื้อ *Saccharomyce cerevisiae* M30 ที่เลี้ยงในอาหาร MY agar นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ลงในอาหารเหลว MY 100 มล. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm นาน 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

- การหมักเพื่อติดตาม Growth cycle ของเชื้อยีสต์ โดยนำน้ำสับปะรดมาปรับความหวานเท่ากับ 18 องศาบริกซ์ ปรับ pH เท่ากับ 4.5 เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.02% นำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วย KMS (ความเข้มข้น 200 ppm) ก่อนการถ่ายหัวเชื้อยีสต์ปริมาณ 5% เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 – 4 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 6 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญของยีสต์ด้วยวิธี Spread plate technique บนอาหาร MY agar

10.2 การติดตาม Growth cycle ของเชื้อแบคทีเรียอะซิติคในระหว่างการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์สับปะรด

- การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติค *Acetobacter aceti* โดยเขี่ยเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร GYP agar นาน 2 – 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ลงในอาหารเหลว GYP broth 100 มล.นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm นาน 24 - 48 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

- นำไวน์สับปะรดที่ได้จากข้อ 10.1 มาทำการหมักด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติค โดยน้ำไวน์ต้องปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เท่ากับ 8% เติมน้ำส้มสายชู 1% และเติมหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติคปริมาณ 7.5% ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกวัน เพื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรียอะซิติค ด้วยวิธี Spread plate technique บนอาหาร GYP agar (ที่เติม 1% แคลเซียมคาร์บอเนต)

10.3 การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติค

- ทำการหมักน้ำสับปะรดที่เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 10.1 โดยนำน้ำหมัก 100 มล.บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ถ่ายเชื้อยีสต์ปริมาณ 5% ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง ทำการถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 5% เมื่อการหมักของเชื้อยีสต์ที่ 0 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ทำการติดตามการเจริญของเชื้อยีสต์บนอาหาร MY agar และแบคทีเรียอะซิติคบนอาหาร GYP agar (ที่เติม 1% แคลเซียมคาร์บอเนต) ทุกวัน พร้อมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ความเป็นกรด และปริมาณแอลกอฮอล์

10.4 การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติคในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชู

- ทำการหมักไวน์น้ำสับปะรดซึ่งเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 10.1 ทำการถ่ายเชื้อยีสต์และหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติคในช่วงเวลาและปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 10.3
- ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงของ Growth cycle ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติคทุกวันจนกระทั่งปริมาณกรดมีปริมาณอย่างน้อยเท่ากับ 4%
- ทำการเปรียบเทียบลักษณะของ Growth cycle กับยีสต์ (จากข้อ 10.1)และแบคทีเรียอะซิติค (จากข้อ 10.2)

10.6 สรุปและรายงานผล

11. สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร ตึกเจ้าคุณทหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

12. แผนการดำเนินงานวิจัย

การดำเนินการ	เดือน											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
การติดตาม Growth cycle ของเชื้อยีสต์ในระหว่างการผลิตไวน์สับปะรด												
การติดตาม Growth cycle ของเชื้อแบคทีเรียอะซิติคในระหว่างการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์สับปะรด												
การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติค												
การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติคในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชู												

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปและการจัดทำรายงาน

13. **ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

- เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน การอยู่ร่วมกันของเชื้อยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติก ซึ่งสามารถนำข้อมูลไปใช้ในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักเพื่อลดระยะเวลาในการหมักและปรับปรุงกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ได้

14. **งบประมาณของโครงการวิจัย**

11.1 ค่าวัสดุ

- ค่าเครื่องแก้ว	5,000	บาท
- ค่าสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	25,000	บาท

11.2 ค่าใช้สอย -

15. โครงการวิจัยนี้อยู่ระหว่างเสนอของบประมาณจากแหล่งเงินทุนอื่น หรือเป็นการวิจัยต่อยอดจาก โครงการวิจัยอื่น (ถ้ามี)

ไม่ได้ของบประมาณจากแหล่งทุนอื่น

(รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 23 เดือน กันยายน พ.ศ 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การติดตาม Growth cycle ของเชื้อยีสต์ในระหว่างการผลิตไวน์สับปะรด

การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

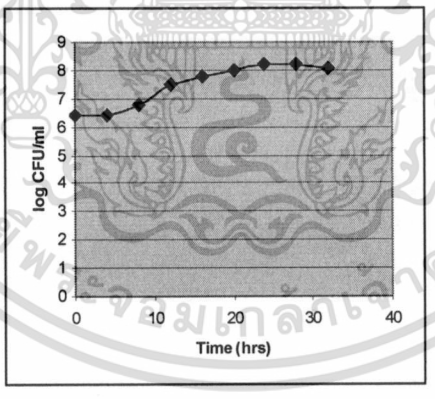
ทำการเขี่ยเชื้อยีสต์ *Saccharomyce cerevisiae* M30 ที่เลี้ยงในอาหาร MY agar slant นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ลงในอาหารเหลว MY 100 มล. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm นาน 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

การหมักเพื่อติดตาม Growth cycle และการหมักแอลกอฮอล์ของเชื้อยีสต์ M30

โดยการนำน้ำสับปะรดมาปรับความหวานเท่ากับ 18 องศาบริกซ์ ปรับ pH เท่ากับ 4.5 เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.02% นำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วย KMS (ความเข้มข้น 200 ppm) ก่อนการถ่ายหัวเชื้อยีสต์ปริมาณ 5% เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 6 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญของยีสต์ด้วยวิธี Spread plate technique บนอาหาร MY agar ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วย Ebulliometer กรดด้วยการไตเตรชั่นและคำนวณในรูปของกรดแลกติก และปริมาณ Total soluble solid ด้วยเครื่อง Refractometer

ผลการทดลอง

เนื่องจากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 เป็นเชื้อยีสต์สายพันธุ์ตกตะกอนและมีความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ได้เร็ว ทั้งนี้ในการกล่าวถึงต่อไปจะเรียกเชื้อยีสต์นี้ว่า " เชื้อยีสต์ M30 " เท่านั้น จากผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่า เชื้อยีสต์ M30 สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรก และปริมาณค่อนข้างคงที่ในช่วง ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป



ภาพที่ 1 ลักษณะการเจริญของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 ในอาหารน้ำสับปะรด

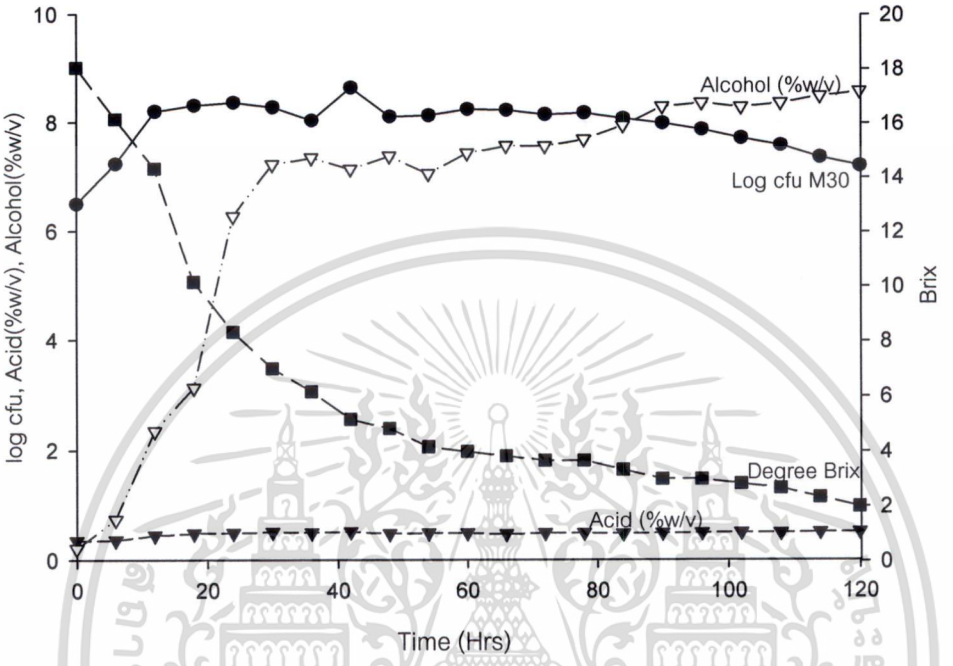
อย่างไรก็ตามการเจริญของเชื้อยีสต์ M30 ให้ผลในลักษณะเดียวกันกับในการหมักไวน์สับปะรดดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งพบว่า ในช่วง 24 - 48 ชั่วโมงแรกมีการเจริญของเชื้อยีสต์ M30 อย่างรวดเร็ว พร้อมทั้งเกิดการสร้างแอลกอฮอล์อย่างรวดเร็วเช่นกัน อนึ่งการหมักไวน์ที่ใช้นี้เป็นการหมักแบบ Batch fermentation จากความสัมพันธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ของปริมาณเซลล์ยีสต์ M30 และปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้แสดงให้เห็นว่า สภาพการสร้างแอลกอฮอล์ด้วยเชื้อยีสต์ M30 เป็นแบบ Growth Associated Product กล่าวคือ ปริมาณแอลกอฮอล์ที่สร้างได้สัมพันธ์กับปริมาณเซลล์ยีสต์ในน้ำหมัก

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณกรดที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักอยู่ในเกณฑ์ปกติ แสดงว่าไม่เกิดปัญหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียแลกติกในระหว่างการหมัก



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 กับการเปลี่ยนแปลง Totle soluble solid (องศาบริกซ์) กรด(ในรูปของกรดแลกติก) และแอลกอฮอล์ในการหมักน้ำสับปะรดที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน

75520

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเจริญร่วมกันของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisie* M30 และแบคทีเรียอะซิติก *Acetobacter aceti* WK

การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ M30

ทำการเขี่ยเชื้อยีสต์ M30 ที่เลี้ยงในอาหาร MY agar slant นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ลงในอาหารเหลว MY 100 มล. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm นาน 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติก *A. aceti* WK

ทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* WK ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE agar slant (Glucose 100 กรัม Yeast extract 10 กรัม Agar 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร) นาน 3 วัน ลงในอาหาร GYE broth 100 มล. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm นาน 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น**หัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติก WK หรือ หัวเชื้อน้ำส้ม WK**

การหมักน้ำส้มสายชูด้วยเชื้อแบคทีเรียอะซิติก WK

ทำการหมักไวน์สับปะรด(ที่หมักจากเชื้อยีสต์ M30) โดยนำน้ำหมัก 250 มล.บรรจุในฟลาสก์ขนาด 1000 มล. ทำการปรับสภาพน้ำหมักให้มีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 3.5% และปริมาณกรด(ในรูปของกรดอะซิติก)ปริมาณ 1% พร้อมทั้งเติมสารอาหารประกอบด้วย Yeast extract 1% KH_2PO_4 0.02% และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.05% ถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK ความเข้มข้น 5% ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง ทำการติดตามการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอะซิติกบนอาหาร GYE agar (ที่เติม 1% แคลเซียมคาร์บอเนต) ทุกวันเป็นเวลา 14 วัน พร้อมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด ปริมาณ Total soluble solid และปริมาณแอลกอฮอล์

การหมักผสมระหว่างเชื้อยีสต์ M30 และแบคทีเรียอะซิติก WK

ทำการหมักน้ำสับปะรดที่เติมสารอาหารประกอบด้วย Yeast extract 1% KH_2PO_4 0.02% และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.05% โดยนำน้ำหมัก 250 มล.บรรจุในฟลาสก์ขนาด 1000 มล. ถ่ายเชื้อยีสต์ M30 ปริมาณ 5% ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง ทำการถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK ความเข้มข้น 5% เมื่อการหมักของเชื้อยีสต์ที่ 0 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ทำการติดตามการเจริญของเชื้อยีสต์บนอาหาร MY agar และแบคทีเรียอะซิติกบนอาหาร GYE agar (ที่เติม 1% แคลเซียมคาร์บอเนต) ทุกวัน พร้อมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด ปริมาณ Total soluble solid และปริมาณแอลกอฮอล์

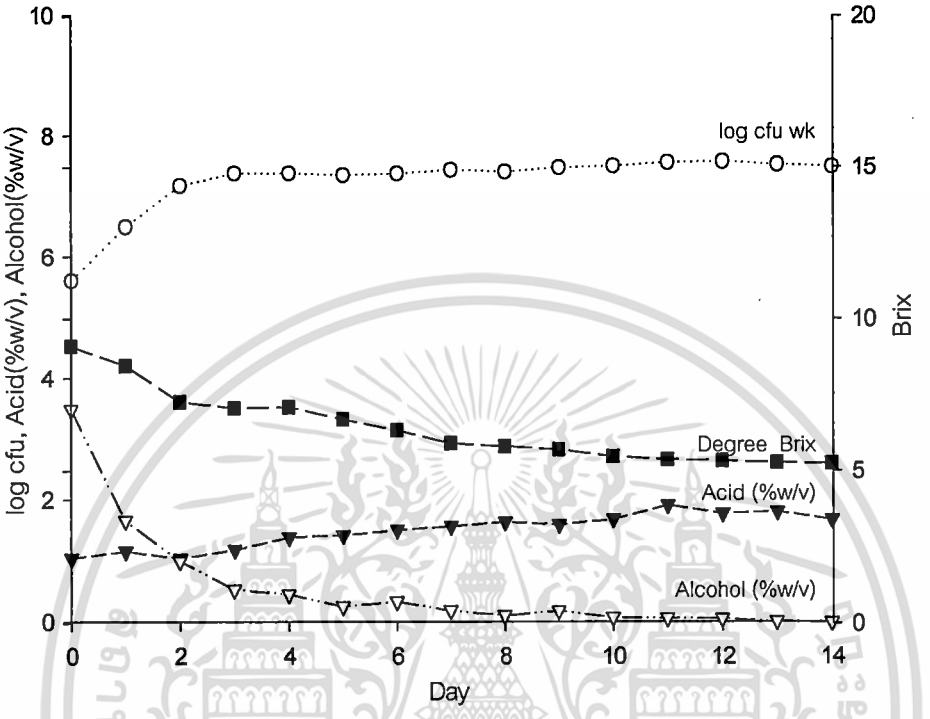
ผลการทดลอง

การหมักน้ำส้มสายชูด้วยเชื้อแบคทีเรียอะซิติก WK

ผลการหมักน้ำส้มสายชูด้วยหัวเชื้อน้ำส้ม WK ในไวน์สับปะรดที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 32 องศาเซลเซียส) ดังแสดงในภาพที่ 3 พบว่า หัวเชื้อน้ำส้ม WK สามารถใช้แอลกอฮอล์อย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการหมัก อย่างไรก็ตามเมื่อการหมักถึงวันที่ 4 หัวเชื้อน้ำส้ม WK ใช้แอลกอฮอล์เหลือประมาณ 0.4 – 0.6% ทำให้หัวเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำส้ม WK ไม่เพิ่มจำนวนต่อไป ทั้งนี้สังเกตได้จากเส้นกราฟของการเจริญของหัวเชื้อน้ำส้ม WK ค่อนข้างคงที่นับตั้งแต่วันที่ 4 เป็นต้นไป สำหรับปริมาณกรดที่สร้างขึ้นด้วยหัวเชื้อน้ำส้ม WK พบว่า มีปริมาณเพิ่มขึ้นประมาณ 1% ในช่วงวันที่ 11 ของการหมัก ซึ่งเป็นลักษณะการหมักปกติของเชื้อแบคทีเรียอะซิติกโดยทั่วไป



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ของการเจริญของหัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK กับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด ปริมาณ Total soluble solid (องศาบริกซ์) และปริมาณแอลกอฮอล์ในการหมักไวน์สับปะรดที่อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส)

การหมักผสมระหว่างเชื้อยีสต์ *S. cerevisie* M30 และแบคทีเรียอะซิติก *A. aceti* WK

ในการศึกษาการหมักผสมระหว่างเชื้อยีสต์ M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม WK มีเป้าหมายเพื่อติดตามการเจริญของเชื้อยีสต์ M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม WK ในระหว่างการหมักร่วมกัน โดยแบ่งสภาพการหมักออกเป็น 4 สภาพ กล่าวคือ (1) สภาพการหมักด้วยเชื้อยีสต์ M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม WK พร้อมกันตั้งแต่เริ่มต้น (2)สภาพการหมักด้วยเชื้อยีสต์ M30 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK แล้วทำการหมักต่อ (3)สภาพการหมักด้วยเชื้อยีสต์ M30 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK แล้วทำการหมักต่อ (4)สภาพการหมักด้วยเชื้อยีสต์ M30 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK แล้วทำการหมักต่อ และ (5)สภาพการหมักด้วยเชื้อยีสต์ M30 เป็นเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96 ชั่วโมง ก่อนถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK แล้วทำการหมักต่อ ทั้งนี้ทุกสภาพการศึกษาใช้ระยะเวลาการหมัก 20 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 32 องศาเซลเซียส)

สภาพการหมักด้วยเชื้อยีสต์ M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม WK พร้อมกันตั้งแต่เริ่มต้น

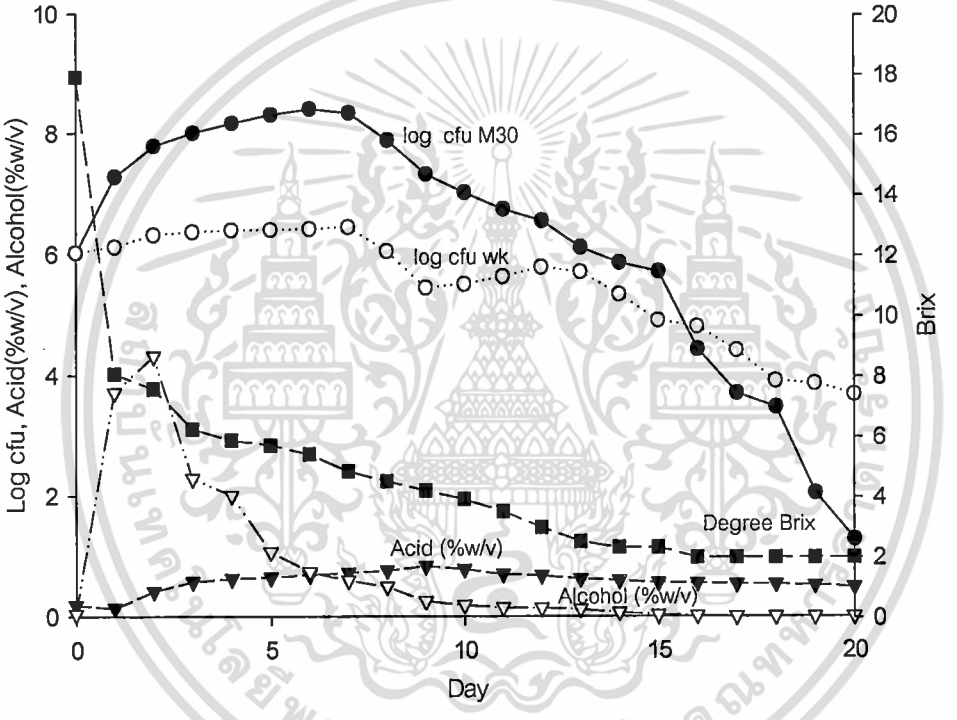
ในสภาพการหมักที่ไม่เติมแอลกอฮอล์ในน้ำหมักที่จะเกื้อหนุนการสร้างกรดอะซิติกจากหัวเชื้อน้ำส้ม WK แต่จะอาศัยการสร้างแอลกอฮอล์จากเชื้อยีสต์ M30 ที่ใช้ในการหมักผสม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องกำหนดสภาพการหมักที่ชัดเจน เนื่องจากสภาพที่เหมาะสมต่อการหมักแอลกอฮอล์ด้วยเชื้อยีสต์ M30 คือ สภาพที่ไม่ต้องการอากาศหรือไม่มีการเติมอากาศเข้าไปในระบบ ในขณะที่สภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างกรดอะซิติกด้วยหัวเชื้อน้ำส้ม WK คือ สภาพที่ต้องการอากาศหรือต้องมีการให้อากาศ

ในการศึกษาจึงเลือกทำการหมักในช่วง 48 ชั่วโมงแรกด้วยการไม่เติมอากาศ ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการหมักแอลกอฮอล์ด้วยเชื้อยีสต์ M30 พบว่า อัตราการสร้างแอลกอฮอล์จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก เมื่อเกิดการสร้างแอลกอฮอล์ในระบบแล้วจึงทำการให้อากาศเพื่อเกื้อหนุนให้หัวเชื้อน้ำส้ม WK ลักษณะของการหมักในฟลาสก์ที่ศึกษาแสดงในภาพที่ 4

ภาพที่ 4 ลักษณะการหมักน้ำสับปะรดด้วยหัวเชื้อผสมของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 32 องศาเซลเซียส) โดยทำการให้อากาศภายหลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 5 พบว่า หัวเชื้อยีสต์สามารถสร้างแอลกอฮอล์ขึ้นได้ในช่วง 48 ชั่วโมงแรก แต่หลังจากนั้นปริมาณแอลกอฮอล์จะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากสภาพการหมักเปลี่ยนจากสภาพที่ไม่มีการให้อากาศมาเป็นสภาพที่มีการให้อากาศ ทำให้เชื้อยีสต์ M30 ไม่สร้างแอลกอฮอล์แต่จะสร้างเซลล์แทน ดังนั้นจึงพบว่ามีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การลดลงของแอลกอฮอล์ยังมีสาเหตุจากหัวเชื้อน้ำส้ม WK นำมาใช้ในการหมักกรดอะซิติกด้วย ในการติดตามการเจริญของหัวเชื้อน้ำส้ม WK ในการหมักร่วมนี้ พบว่า หัวเชื้อน้ำส้ม WK มีอัตราการเพิ่มจำนวนที่ต่ำพร้อมทั้งมีอัตราในการสร้างกรดอะซิติกที่ต่ำเช่นกัน และเมื่อสภาพการหมักมีปริมาณแอลกอออล์ที่ต่ำมากตั้งแต่วันที่ 15 เป็นต้นมา ทั้งหัวเชื้อน้ำส้ม WK ก็ลดปริมาณลงอย่างต่อเนื่องในขณะที่เชื้อยีสต์ M30 ลดลงอย่างรวดเร็ว จากผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าในสภาพการทดลองนี้เชื้อทั้งสองชนิดนี้ไม่สามารถพัฒนากระบวนการหมักเพื่อเอื้อต่อการเจริญของกันและกันได้

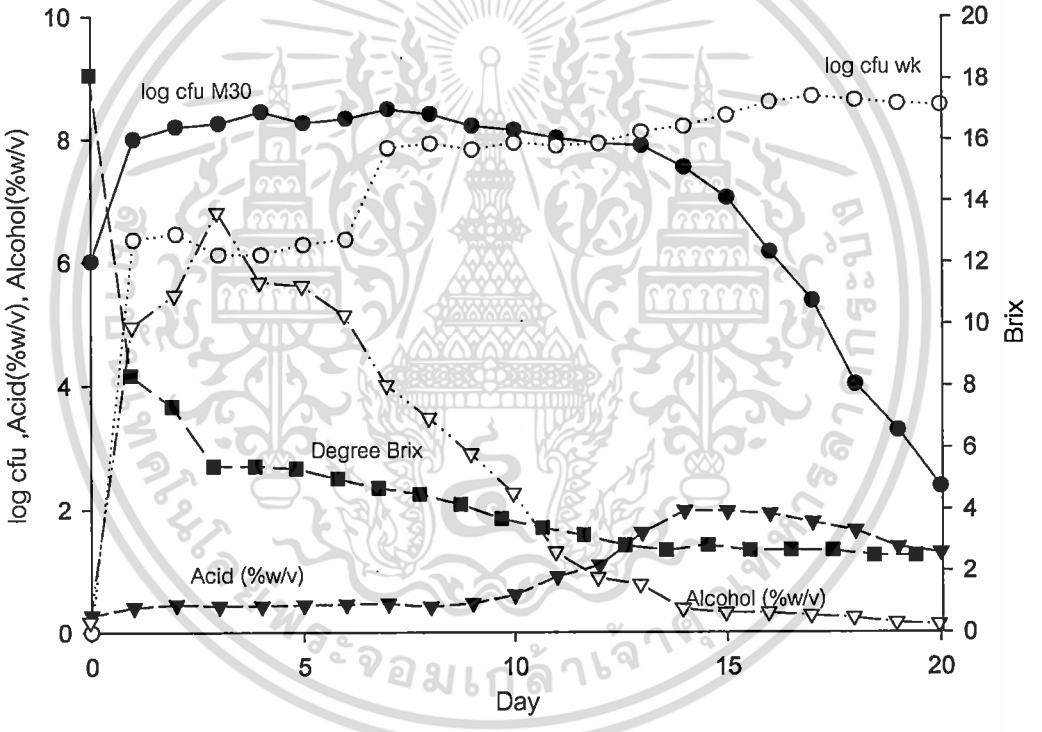


ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์การเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK กับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด ปริมาณ Total soluble solid (องศาบริกซ์) และปริมาณแอลกอฮอล์ในการหมักในน้ำสับปะรดที่ถ่ายเชื้อทั้งสองพร้อมกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และหมักที่อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน โดยทำการให้อากาศภายหลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาพการหมักด้วยเชื้อยีสต์ M30 เป็นเวลา 1 วัน ก่อนถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK แล้วทำการหมักต่อ

ในสภาพการหมักที่มีการถ่ายเชื้อยีสต์ M30 ลงในน้ำหมักเป็นเวลา 1 วัน (ภาพที่ 6) พบว่า เชื้อยีสต์ M30 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงกว่าที่พบในการหมักร่วมกับหัวเชื้อน้ำส้ม WK ตั้งแต่แรก นอกจากนี้แล้วยังพบอีกว่าเชื้อยีสต์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรกซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการสร้างแอลกอฮอล์รวดเร็วตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกเช่นกัน และเชื้อยีสต์ยังคงสามารถสร้างแอลกอฮอล์ได้เพิ่มอีกอย่างรวดเร็วภายหลังจากที่ถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK ลงไปภายหลัง 24 ชั่วโมงของการหมัก จนกระทั่งถึงช่วงชั่วโมงที่ 72 ทั้งนี้เนื่องจากในช่วงดังกล่าว หัวเชื้อน้ำส้ม WK ยังปรับตัวกับสภาพน้ำหมักใหม่ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าในสภาพที่มีการเติมหัวเชื้อน้ำส้ม WK นั้นก็เริ่มมีการให้อากาศเข้าไปน้ำหมักด้วย แต่ในช่วงดังกล่าวเชื้อยีสต์ M30 ได้เจริญเต็มที่แล้วจึงยังสามารถสร้างแอลกอฮอล์ได้อีกต่อไป (ประมาณ 2 วัน)



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์การเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK กับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด ปริมาณ Total soluble solid (องศาบริกซ์) และปริมาณแอลกอฮอล์ในการหมักในน้ำสับปะรดที่ถ่ายเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK หลังจากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 เป็นเวลา 1 วัน และหมักที่อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวเชื้อยีสต์ยังคงสามารถรักษาปริมาณเชื้อได้จนถึงประมาณ 15 วัน ของการหมัก ในขณะที่หัวเชื้อน้ำส้ม WK ปรับตัวให้เข้ากับสภาพการหมักเรื่อยๆจนกระทั่งผ่านการหมักวันที่ 3 (หรือชั่วโมงที่ 72) ไป ทั้งนี้สังเกตจากการลดลงของปริมาณแอลกอฮอล์ หลังจากนั้นหัวเชื้อน้ำส้ม WK เจริญเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆโดยในช่วงวันที่ 7 – 8 หัวเชื้อน้ำส้ม WK สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้อีกประมาณ 2 log cycle และยังสามารถรักษาปริมาณเชื้อในระดับดังกล่าวจนสิ้นสุดการหมัก (20 วัน) ในขณะที่เชื้อยีสต์ M30 กลับเริ่มลดจำนวนลงตั้งแต่วันที่ 12 – 13 ของการหมัก ซึ่งช่วงดังกล่าวปริมาณกรดอะซิติกในน้ำหมักเริ่มเพิ่มสูงขึ้นถึงประมาณ 2% จึงเริ่มส่งผลกระทบโดยตรงต่อการรอดชีวิตของเชื้อยีสต์ เนื่องจากกรดอะซิติกมีสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อราได้นั่นเอง

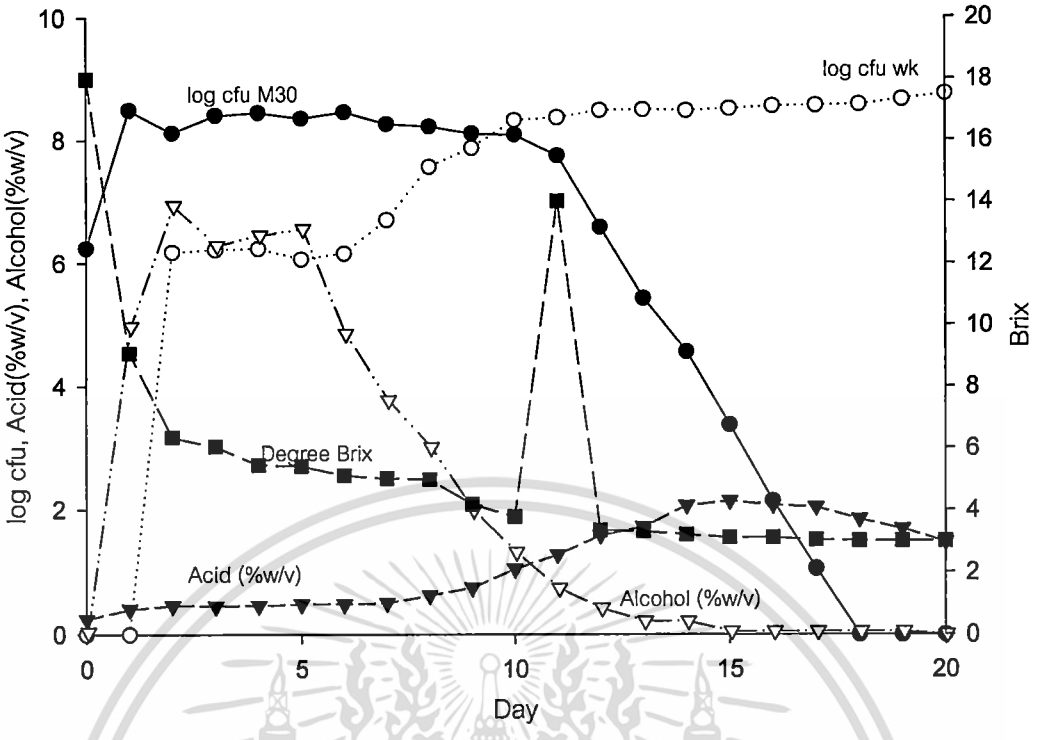
สภาพการหมักด้วยเชื้อยีสต์ M30 เป็นเวลา 2 วัน ก่อนถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK แล้วทำการหมักต่อ

จากผลการทดลองที่แสดงในภาพที่ 7 ในสภาพการหมักที่มีการถ่ายเชื้อยีสต์ M30 ลงในน้ำหมักเป็นเวลา 2 วัน ก่อนที่จะทำการถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK พบว่า เชื้อยีสต์ M30 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้รวดเร็วกว่าที่พบในการหมักร่วมกับหัวเชื้อน้ำส้ม WK ตั้งแต่แรก (ภาพที่ 5) และในสภาพการหมักที่มีการถ่ายเชื้อยีสต์ M30 ลงในน้ำหมักเป็นเวลา 1 วัน ก่อนที่จะทำการถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK (ภาพที่ 6) อย่างไรก็ตามปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ใกล้เคียงกับสภาพการหมักที่มีการถ่ายเชื้อยีสต์ M30 ลงในน้ำหมักเป็นเวลา 1 วัน ก่อนที่จะทำการถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK เชื้อยีสต์ M30 สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรกเช่นกัน ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการสร้างแอลกอฮอล์รวดเร็วตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกและเชื้อยีสต์สามารถรักษาระดับแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ต่อไปอีกจนถึงวันที่ 5 ก่อนที่จะลดลงอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามหัวเชื้อยีสต์ยังคงสามารถรักษาปริมาณเชื้อได้จนถึงประมาณ 10 วัน ของการหมักซึ่งลดลงกว่าที่พบในสภาพการหมักที่มีการถ่ายเชื้อยีสต์ M30 ลงในน้ำหมักเป็นเวลา 1 วัน ก่อนที่จะทำการถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK

ในขณะที่หัวเชื้อน้ำส้ม WK สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพการหมักได้เป็นอย่างดี โดยใช้เวลาในการปรับตัวประมาณ 3 วันภายหลังจากที่ถ่ายเชื้อลงในน้ำหมัก (หรือประมาณวันที่ 5 ของการหมัก) ทั้งนี้สังเกตจากการลดลงของปริมาณแอลกอฮอล์ หลังจากนั้นหัวเชื้อน้ำส้ม WK เริ่มเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆจนถึงช่วงวันที่ 10 โดยหัวเชื้อน้ำส้ม WK สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้อีกประมาณ 2 log cycle และยังสามารถรักษาปริมาณเชื้อในระดับดังกล่าวจนสิ้นสุดการหมัก (20 วัน) ในขณะเดียวกันที่เชื้อยีสต์ M30 กลับเริ่มลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 11 ของการหมัก และไม่พบเชื้อยีสต์ M30 เหลือในน้ำหมักตั้งแต่วันที่ 18 ของการหมัก

จากผลการทดลองที่ได้รับสามารถสรุปได้ว่า เมื่อการหมักหัวเชื้อผสมผ่านวันที่ 10 เชื้อยีสต์ M30 ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่หัวเชื้อน้ำส้ม WK สามารถสร้างกรดอะซิติกในน้ำหมักเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ พร้อมทั้งหัวเชื้อน้ำส้ม WK ยังสามารถเจริญอยู่ได้ในน้ำหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์การเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK กับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด ปริมาณ Total soluble solid (องศาบริกซ์) และปริมาณแอลกอฮอล์ในการหมักในน้ำสับปะรดที่ถ่ายเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK หลังจากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 เป็นเวลา 2 วัน และหมักที่อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน

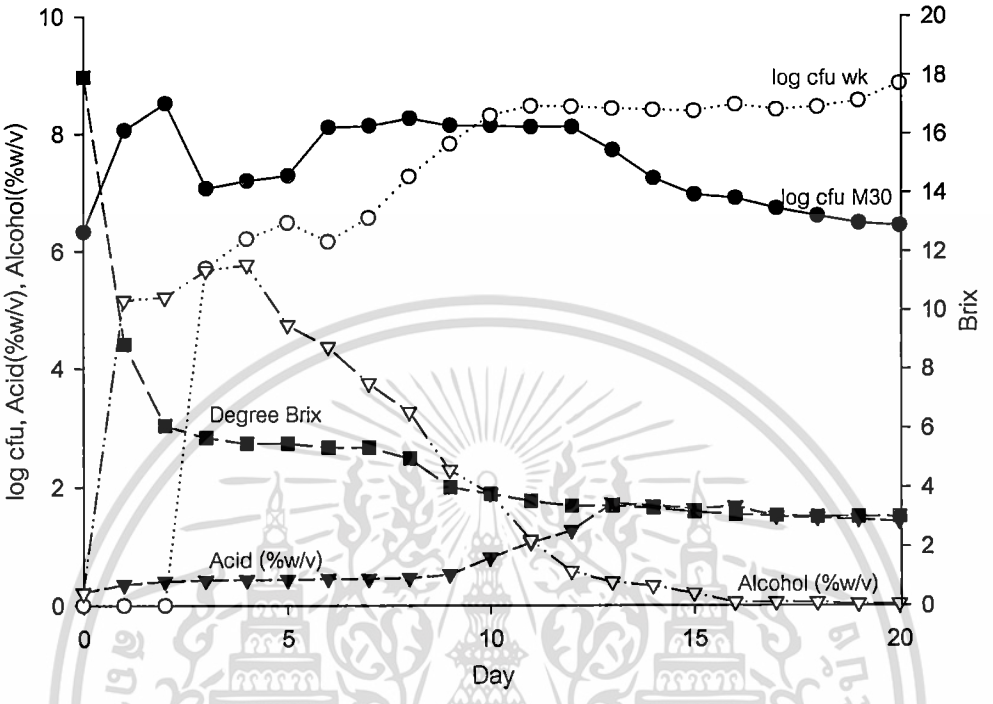
สภาพการหมักด้วยเชื้อยีสต์ M30 เป็นเวลา 3 วัน ก่อนถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK แล้วทำการหมักต่อ

ในสภาพการหมักที่มีการถ่ายเชื้อยีสต์ M30 ลงในน้ำหมักเป็นเวลา 3 วัน ก่อนที่จะทำการถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK ดังแสดงในภาพที่ 8 พบว่า เชื้อยีสต์ M30 สามารถทำการหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ได้ในลักษณะการหมักที่กล่าวถึงข้างต้น เพียงแต่เชื้อยีสต์ M30 ลดลงในช่วงวันที่ 2 – 5 ซึ่งน่าจะเกิดจากข้อผิดพลาดในการวิเคราะห์เนื่องจากปริมาณเชื้อยีสต์กลับมาใกล้เคียงเดิมในวันที่ 6 ของการหมัก สำหรับหัวเชื้อน้ำส้ม WK ยังคงมี Profile ของการเจริญและการสร้างกรดอะซิติกในลักษณะเดิม

อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าในสภาพการหมักที่มีการถ่ายเชื้อยีสต์ M30 ลงในน้ำหมักเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 3 วัน ก่อนที่จะทำการถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK นี้ เชื้อยีสต์ M30 มีการลดจำนวนลงเพียงประมาณ 2 log cycle เมื่อการหมักครบ 20 วัน ทั้งนี้อาจจะเกิดจากข้อผิดพลาดในการตรวจนับเซ่นเดิม ส่วนปริมาณแอลกอฮอล์ถูกใช้ไปจนหมดภายใน 18 วัน ปริมาณกรดอะซิติกที่ถูกสร้างจากหัวเชื้อน้ำส้ม WK ยังคงอยู่ประมาณ 2%

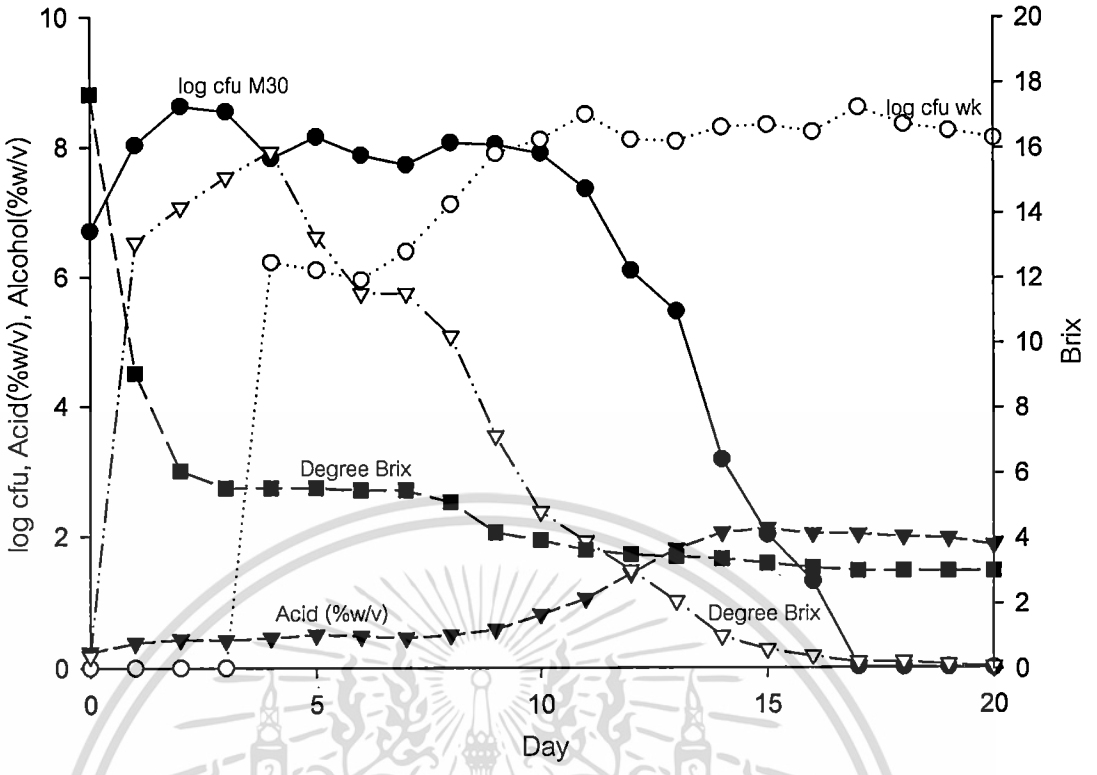


ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์การเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK กับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด ปริมาณ Total soluble solid (องศาบริกซ์) และปริมาณแอลกอฮอล์ในการหมักในน้ำสับปะรดที่ถ่ายเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK หลังจากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 เป็นเวลา 3 วัน และหมักที่อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน

สภาพการหมักด้วยเชื้อยีสต์ M30 เป็นเวลา 4 วัน ก่อนถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK แล้วทำการหมักต่อ

ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม WK ให้ผลเช่นเดียวกับในสภาพการหมักที่มีการถ่ายเชื้อยีสต์ M30 ลงในน้ำหมัก เป็นเวลา 2 วัน ก่อนที่จะทำการถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK นอกจากนี้แล้วยังคงพบว่า เชื้อยีสต์ M30 จะลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วภายหลังจากการหมักผ่านวันที่ 10 ในขณะที่หัวเชื้อน้ำส้ม WK ได้สร้างกรดอะซิติกสูงขึ้นเรื่อยๆ ทั้งนี้ผลการทดลองแสดงอยู่ในภาพที่ 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์การเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK กับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด ปริมาณ Total soluble solid (องศาบริกซ์) และปริมาณแอลกอฮอล์ในการหมักในน้ำสับปะรดที่ถ่ายเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK หลังจากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 เป็นเวลา 4 วัน และหมักที่อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน

จากผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า การหมักผสมของเชื้อยีสต์ M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม WK สามารถดำเนินการได้ประมาณ 10 – 12 วัน โดยในช่วงแรกเชื้อยีสต์ M30 สามารถเจริญและสร้างแอลกอฮอล์ได้ แต่เมื่อหัวเชื้อน้ำส้ม WK ที่ถ่ายลงในน้ำหมักภายหลังสามารถปรับตัวได้แล้ว หัวเชื้อน้ำส้ม WK จะสามารถเจริญและใช้แอลกอฮอล์ในการเจริญและสร้างกรดอะซิติกออกมาได้ ในขณะที่เชื้อยีสต์ M30 จะไม่เพิ่มจำนวนและไม่สามารถสร้างแอลกอฮอล์ต่อไปอีก ทั้งนี้เนื่องจากสภาพการหมักเปลี่ยนแปลงเป็นสภาพที่เติมอากาศภายหลังจากที่ถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK เป็นสำคัญ นอกจากนี้ในขณะที่หัวเชื้อน้ำส้ม WK สร้างกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนความเข้มข้นสูงถึง 2% ขึ้นไป เชื้อยีสต์ M30 จะลดจำนวนลงอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากกรดอะซิติกที่หัวเชื้อน้ำส้ม WK สร้างขึ้นมีผลกระทบต่อเซลล์ยีสต์โดยตรง

อนึ่งช่วงเวลาที่เหมาะสมในการการหมักผสมของเชื้อยีสต์ M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม WK คือ สภาพการหมักที่มีการถ่ายเชื้อยีสต์ M30 ลงในน้ำหมักเป็นเวลา 2 - 4 วัน ก่อนที่จะทำการถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักน้ำส้มสายชูจากหัวเชื้อน้ำส้ม *Acetobacter aceti* WK ในไวน์สับปะรด

แต่เดิมนั้นหัวข้อที่จะศึกษานี้กำหนดให้ศึกษาเรื่อง " **การเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชู** " แต่จากผลการศึกษาของการเจริญร่วมกันของเชื้อยีสต์ M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม WK แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญร่วมกันในช่วงระยะแรกเท่านั้น โดยระยะดังกล่าวเป็นช่วงที่เชื้อยีสต์สามารถสร้างแอลกอฮอล์ซึ่งหัวเชื้อน้ำส้ม WK จะนำไปใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดอะซิติกหรือน้ำส้มสายชูต่อไป อย่างไรก็ตามในระยะดังกล่าวหัวเชื้อน้ำส้ม WK กำลังอยู่ในช่วงของการปรับตัวให้เข้ากับสภาพการหมักผสม แต่เมื่อหัวเชื้อน้ำส้ม WK สามารถปรับตัวได้แล้วและเริ่มผลิตกรดอะซิติกจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยการเปลี่ยนแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักนั้น ก่อให้เกิดผลกระทบในเชิงลบต่อเชื้อยีสต์ M30 โดยพบว่า เมื่อปริมาณกรดอะซิติกและปริมาณหัวเชื้อน้ำส้ม WK เพิ่มมากขึ้น ปริมาณการลดลงของเชื้อยีสต์ M30 ก็เพิ่มสูงขึ้นด้วย ดังนั้นเมื่อสิ้นสุดการหมักร่วมกันของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า หัวเชื้อน้ำส้ม WK ยังคงเจริญและมีปริมาณเซลล์ที่สูงในขณะที่เชื้อยีสต์กลับลดลงจนไม่พบในน้ำหมักนั้น ผลการทดลองที่ได้นี้บ่งชี้ว่าการเจริญร่วมกันของเชื้อยีสต์และแบคทีเรียในระบบ Single phase มีข้อจำกัด ดังนั้นในการทดลองต่อไปนี้จึงทำการหมักในลักษณะ Double phase แทน โดยแยกการหมักไวน์สับปะรดด้วยเชื้อยีสต์ M30 (เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบ) และการหมักน้ำส้มสายชูจากหัวเชื้อน้ำส้ม WK ออกจากกัน

การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ M30

ทำการเขี่ยเชื้อยีสต์ M30 ที่เลี้ยงในอาหาร MY agar slant นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ลงในอาหารเหลว MY 100 มล. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm นาน 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

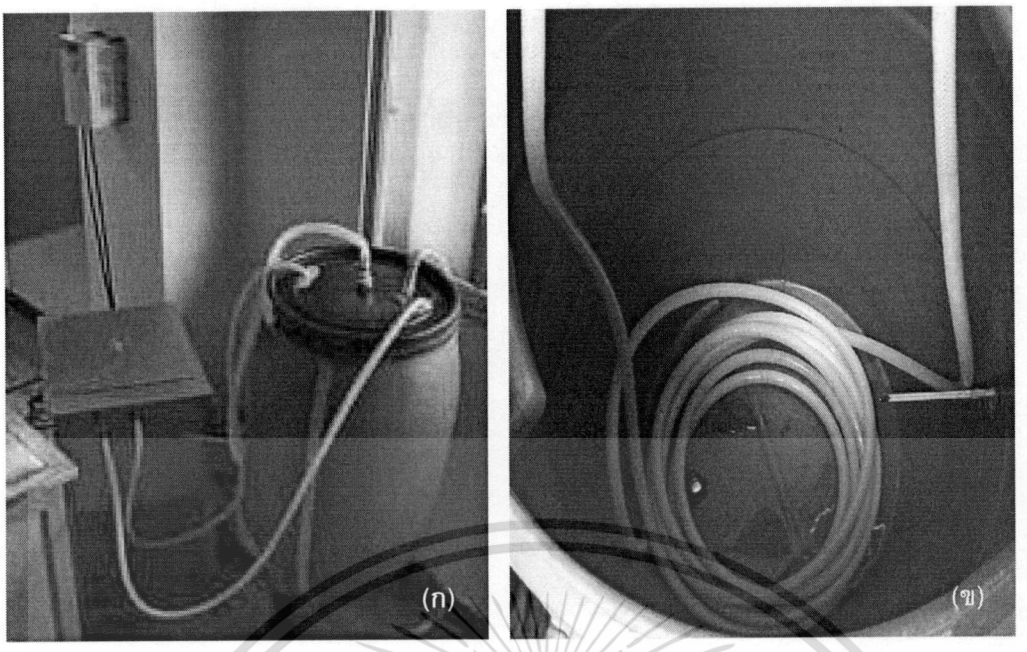
การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติก *A. aceti* WK

ทำการเขี่ยหัวเชื้อน้ำส้ม WK ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE agar slant (Glucose 100 กรัม Yeast extract 10 กรัม Agar 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร) นาน 3 วัน ลงในอาหาร GYE broth 100 มล. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm นาน 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น**หัวเชื้อน้ำส้ม WK**

การหมักไวน์สับปะรดด้วยเชื้อยีสต์ M30

โดยการนำน้ำสับปะรดมาปรับความหวานเท่ากับ 18 องศาบริกซ์ ปรับ pH เท่ากับ 4.5 เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.02% ทำการหมักในถังหมักขนาด 100 ลิตร (ซึ่งทำด้วยถังพลาสติก Food grade สีน้ำเงิน) โดยใช้น้ำหมัก 50 ลิตร ทำการฆ่าเชื้อน้ำหมักก่อนการหมักเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ด้วยโปแตสเซียม เมตาไบซัลไฟท์ (KMS) ความเข้มข้น 200 ppm รถ่ายหัวเชื้อยีสต์ปริมาณ 5% ทำการหมักที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน น้ำหมักที่ได้ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักน้ำส้มสายชูด้วยหัวเชื้อน้ำส้ม WK ทั้งนี้ลักษณะของถังหมักที่ใช้แสดงในภาพที่ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



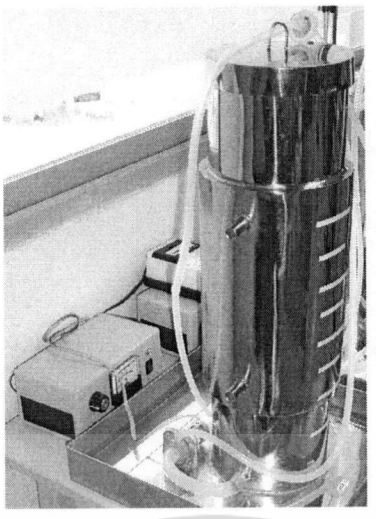
ภาพที่ 10 ลักษณะของถังหมักไวน์สับปะรดขนาดความจุ 100 ลิตร : (ก) ลักษณะภายนอกของถังหมักพร้อมทั้งเครื่องควบคุมอุณหภูมิ; (ข) ลักษณะภายในถังหมักซึ่งมีระบบระบายความร้อนและเทอร์โมมิเตอร์เพื่อควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการหมัก

การหมักน้ำส้มสายชูด้วยหัวเชื้อน้ำส้ม WK

ทำการหมักไวน์สับปะรด(ที่หมักจากเชื้อยีสต์ M30) โดยนำน้ำหมัก 6 ลิตร บรรจุในถังหมักขนาด 10 ลิตร ทำการปรับสภาพน้ำหมักให้มีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 3% และปริมาณกรด(ในรูปของกรดอะซิติก)ปริมาณ 3% พร้อมทั้งเติมสารอาหารประกอบด้วย Yeast extract 1% KH_2PO_4 0.02% และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.05% ถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK ความเข้มข้น 5% ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง ทำการติดตามค่าความเป็นกรด (Acidity) ในรูปของกรดอะซิติก ปริมาณแอลกอฮอล์และค่า pH ตลอดระยะเวลาการหมักเป็นเวลา 90 วัน

อนึ่งทำการหมักในลักษณะ Semi – continuous fermentation โดยทำการเติมน้ำหมักใหม่ทุกครั้งเมื่อปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักลดลงถึงระดับ 0.5% สำหรับภาพที่ 11 แสดงลักษณะของถังหมักที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูจากหัวเชื้อน้ำส้ม WK

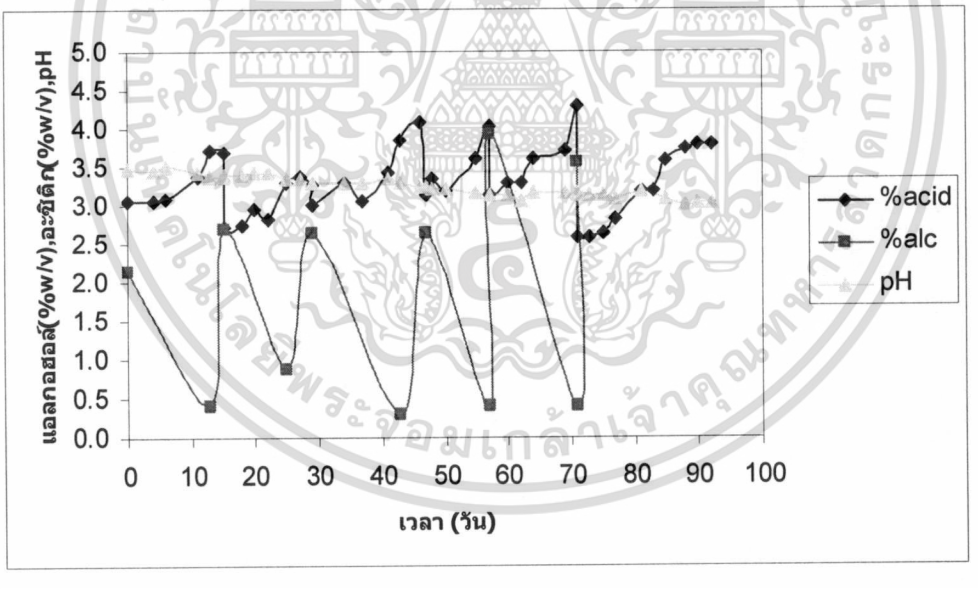
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 ลักษณะของถังหมักที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูจากหัวเชื้อน้ำส้ม WK

ผลการทดลอง

ผลของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์สับปะรด(ซึ่งเตรียมจากเชื้อยีสต์ M30) ด้วยหัวเชื้อน้ำส้ม WK แสดงอยู่ในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด ปริมาณแอลกอฮอล์และค่า pH ในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์สับปะรดด้วยหัวเชื้อน้ำส้ม WK

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสภาพเริ่มต้นการหมัก พบว่า ปริมาณ Total concentration (TC; ค่าผลรวมของปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณกรดอะซิติกในน้ำหมัก) ประมาณ TC = 5.2 ซึ่งต่ำกว่าที่กำหนดไว้ คือ TC = 6 เนื่องจากข้อผิดพลาดในการเตรียมส่วนผสมในน้ำหมักเริ่มต้น อย่างไรก็ตามหัวเชื้อน้ำส้ม WK สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพการหมัก โดยใช้เวลาในการปรับตัวประมาณ 7 วัน ทั้งนี้ตามปกติแล้วระยะเวลาในการปรับตัวของหัวเชื้อน้ำส้มอยู่ในช่วงระหว่าง 7 – 15 วัน ซึ่งในช่วงการปรับตัวนี้จะสังเกตได้จากค่าปริมาณแอลกอฮอล์ถูกใช้ไปน้อย เมื่อหัวเชื้อน้ำส้ม WK ปรับตัวได้แล้วจึงเริ่มทำการหมักเพื่อผลิตกรดอะซิติกหรือน้ำส้มสายชู ทำให้ปริมาณแอลกอฮอล์ถูกใช้ไปจนกระทั่งเหลือประมาณ 0.5% จึงทำการเติมน้ำหมักใหม่เข้าไปในระบบ

การเติมน้ำหมักใหม่เข้าไปในระบบได้ทำการทดลองเติมในระดับ TC = 6 จำนวน 3 cycle โดยผลการหมักอยู่ในเกณฑ์ลักษณะเดียวกัน หลังจากนั้นจึงได้ทำการทดลองโดยการเพิ่มค่า TC = 7 ใน 2 cycle หลัง ซึ่งพบว่า หัวเชื้อน้ำส้ม WK ยังคงสามารถดำเนินการหมักได้ดีโดยให้ผลผลิตของน้ำส้มสายชูที่มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้นด้วย ผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าหัวเชื้อน้ำส้ม WK สามารถปรับตัวให้เข้ากับไวน์สับปะรดที่ผลิตจากเชื้อยีสต์ M30 ได้เป็นอย่างดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

1. การหมักเพื่อติดตาม Growth cycle และการหมักแอลกอฮอล์ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 พบว่า เชื้อยีสต์ M30 ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์สายพันธุ์ตกตะกอนสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ได้เร็วในช่วง 24 – 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก
2. การหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์สับปะรดด้วยหัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK พบว่า หัวเชื้อน้ำส้ม WK สามารถใช้แอลกอฮอล์อย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการหมัก หัวเชื้อน้ำส้ม WK ไม่เพิ่มจำนวนต่อไป
3. การหมักผสมระหว่างเชื้อยีสต์ M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม WK ในสภาพการหมักด้วยเชื้อยีสต์ M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม WK พร้อมกันตั้งแต่เริ่มต้น พบว่า อัตราการสร้างแอลกอฮอล์จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก(ซึ่งไม่มีการเติมอากาศ แต่เมื่อสภาพการหมักเปลี่ยนแปลงโดยมีการเติมอากาศ เชื้อยีสต์ M30 ไม่สร้างแอลกอฮอล์ในขณะที่หัวเชื้อน้ำส้ม WK สามารถสร้างกรดได้เพียงเล็กน้อย แต่หัวเชื้อทั้งสองไม่สามารถสร้างสภาพที่เอื้อการเจริญซึ่งกันและกัน
4. การหมักผสมระหว่างเชื้อยีสต์ M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม WK ในสภาพการหมักด้วยเชื้อยีสต์ M30 เป็นเวลา 1 2 3 และ 4 วัน ก่อนถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK แล้วทำการหมักต่อ พบว่า การหมักผสมของเชื้อยีสต์ M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม WK สามารถดำเนินการได้ประมาณ 10 – 12 วัน โดยในช่วงแรกเชื้อยีสต์ M30 สามารถเจริญและสร้างแอลกอฮอล์ได้ แต่เมื่อหัวเชื้อน้ำส้ม WK ที่ถ่ายลงในน้ำหมักภายหลังสามารถปรับตัวได้แล้ว หัวเชื้อน้ำส้ม WK จะสามารถเจริญและใช้แอลกอฮอล์ในการเจริญและสร้างกรดอะซิติกออกมาได้ ในขณะที่เชื้อยีสต์ M30 จะไม่เพิ่มจำนวนและไม่สามารถสร้างแอลกอฮอล์ต่อไปอีก ทั้งนี้เนื่องจากสภาพการหมักเปลี่ยนแปลงเป็นสภาพที่เติมอากาศภายหลังจากที่ถ่ายหัวเชื้อน้ำส้ม WK เป็นสำคัญ นอกจากนี้ในขณะที่หัวเชื้อน้ำส้ม WK สร้างกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนความเข้มข้นสูงถึง 2% ขึ้นไป เชื้อยีสต์ M30 จะลดจำนวนลงอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากกรดอะซิติกที่หัวเชื้อน้ำส้ม WK สร้างขึ้นมีผลกระทบต่อเซลล์ยีสต์โดยตรง
5. การดำเนินการหมักร่วมกันของเชื้อยีสต์ M30 และหัวเชื้อน้ำส้ม WK ในการผลิตน้ำส้มสายชูในระบบ Single phase ไม่สามารถดำเนินการได้ เนื่องจากเมื่อหัวเชื้อน้ำส้ม WK สร้างกรดอะซิติกที่เป็นผลิตภัณฑ์ออกมาจากน้ำหมักจะก่อให้เกิดผลกระทบเชิงลบต่อเชื้อยีสต์ M30 ทำให้เชื้อยีสต์ M30 ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว
6. การดำเนินการหมักน้ำส้มสายชูจากหัวเชื้อน้ำส้ม WK จึงควรผลิตในลักษณะ Double phase กล่าวคือ Phase แรกเป็นการหมักไวน์สับปะรดจากเชื้อยีสต์ M30 เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับหมักน้ำส้มสายชู ส่วน Phase ที่สองเป็นการหมักน้ำส้มสายชูด้วยหัวเชื้อน้ำส้ม WK
7. หัวเชื้อน้ำส้ม WK สามารถหมักน้ำส้มสายชูในลักษณะ Semi – continuous fermentation ได้อย่างดี โดยสามารถหมักได้ในสภาพที่ปรับค่า Total concentration เท่ากับ 6 และที่ 7 ได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้การหมักสามารถดำเนินการต่อเนื่องได้มากกว่า 90 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้