รายงานการวิจัย

การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ให้ทนความเข้มข้นกรดสูง ด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch

Adaptation of Vinegar Starter- *Acetobacter aceti* WK on Tolerance of High Acid Concentration by Repeated Fed Batch Technique

ชื่อผู้วิจัย : นายวราวุฒิ ครูส่ง

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้พิจารณาสนับสนุนงานวิจัยเรื่องนี้ พร้อมกันนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ น.ส.สิตาภา วิทูรแก้วศิริ น.ส.อรสา สุดอุดม และนายอธิพงษ์ ทุติยาภรณ์ ที่ช่วยเหลือในการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

RC71
TP
645
.3255
ก.1

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 120413
วัน, เดือน, ปี 21 ก.พ. 2555

b.12371270
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการ

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ให้ทนความเข้มข้นกรดสูงด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch

(ภาษาอังกฤษ) Adaptation of Vinegar Starter-*Acetobacter aceti* WK on Tolerance of High Acid Concentration by Repeated Fed Batch Technique

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณ
ประจำปี 2554 จำนวนเงิน 308,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2554

หน่วยงานและผู้ดำเนินการวิจัยพร้อมหน่วยงานที่สังกัดและเลขหมายโทรศัพท์

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย)	นายวราวุฒิ ครูส่ง		
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ)	MR.WARAWUT KRUSONG		
ตำแหน่งทางวิชาการ	รองศาสตราจารย์	สัดส่วนการวิจัย	100%
สาขาวิชา	เทคโนโลยีการหมัก		
คณะ	อุตสาหกรรมเกษตร		
โทรศัพท์	02-329-8000 ต่อ 7278	โทรสาร	02-329-8527
E-mail	kkwaranu@kmitl.ac.th		

ส่วนที่ 2 บทคัดย่อ

ไวน์ข้าวโพดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักผลิตจากเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (30-32°ซ) ได้แอลกอฮอล์ 10.6% ภายในเวลา 160 ชั่วโมง

ถังหมักที่ใช้ในการศึกษาการปรับสภาพ "หัวเชื้อน้ำส้ม *Acetobacter aceti* WK" เป็นถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (mash-air mixing system; "MAMS") ขนาด 50 ลิตร ซึ่งมีการติดตั้งระบบปั๊มแอลกอฮอล์และควบคุมอัตราการไหลเข้ากับถังหมักเพื่อใช้ในการศึกษาระบบ Repeated Fed Batch

"หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการคัดเลือกเพื่อใช้ในการศึกษาเป็นหัวเชื้อสามารถที่ทนต่อสภาพของกรดสูง (high acid stress) อย่างสมบูรณ์ได้ที่ TC = 8

การปรับสภาพ **"หัวเชื้อน้ำส้ม WK"** ด้วยเทคนิค Repeated fed batch อาศัยการควบคุมระดับแอลกอฮอล์ในน้ำหมักที่ลดลงถึงระดับที่กำหนดให้กลับสู่ระดับสูง (เริ่มต้น) อย่างต่อเนื่อง กล่าวคือ อาศัยการปรับสภาพแอลกอฮอล์ที่ลดลงจากระดับเริ่มต้นที่ 3.5% ถึง 2% ให้กลับมาที่ 3.5% จำนวน 4 รอบของการหมัก และดำเนินการต่อเนื่องกับสภาพที่แอลกอฮอล์ลดลงถึง 1.75% และ 1.5% เช่นเดียวกัน ผลการศึกษา พบว่า เทคนิค Repeated Fed Batch สามารถทำให้ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" อยู่ในสภาพที่มีกรดสูงได้ 8.2-8.6% ตลอดช่วง 40 วัน ของการปรับสภาพในช่วงดังกล่าว และยังพบว่า "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถสร้างกรดในสภาพเครียดดังกล่าวได้ถึง 9.3% ในรอบการหมักสุดท้าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของการหมักน้ำส้มสายชูด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพทนกรดด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch พบว่า "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถทนสภาพการหมักทั้งสภาพ TC = 9 และ TC = 10 ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยมีอัตราการสร้างกรด (Acidification rate) สูงสุดถึง 0.0604 %/h ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับรอบของการหมักซึ่งจะสัมพันธ์โดยตรงต่อสภาพการเจริญของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่เกิดขึ้นในแต่ละรอบของการหมักเป็นสำคัญ

Corn wine containing 10.6% (v/v) as substrate for vinegar fermentation was fermented by the yeast, *Saccharomyces cerevisiae* M30, for 160 h at 30-32°C.

In this study, the 50L mash-air mixing system (MAMS) fermenter was specially designed for vinegar production by the starter, *A. aceti* WK. The pumping and flow meter for controlling alcohol medium was fixed into the MAMs for experimental study of adaptation of *A. aceti* WK by repeated fed batch.

The high acid tolerant *A. aceti* WK strain used in this study was obtained under the adaptation condition using high acid stress cultivation at total concentration (TC) at 8.

Adaptation of *A. aceti* WK by repeated fed batch technique was conducted by controlling alcohol content in fermenting mash. The 3.5% alcohol was initially prepared in mash when each cycle of vinegar fermentation was started. When the alcohol in mash was reduced to 2% by activity of *A. aceti* WK, the alcohol was re-adjusted to 3.5%. Four cycles was conducted in this step. Moreover, the reduction of alcohol to 1.75% and 1.5% was subsequently conducted. Results showed that the specific strain of high acid tolerant *A. aceti* WK was obtained within 12 cycles of this adaptation period, 40 d. It could be stable in mash containing 8.2-8.6% acid concentration. Additionally, it could produce 9.3% acid after the last cycle of this study.

The semi-continuous fermentation was prepared for vinegar production using the well-adapted, high acid tolerant strain in 50L MAMs fermenter. The discharged rate was recommended at 50%. The fermenting condition was subsequently set for TC at 9 and 10. The highest acetification rate (ETA) was 0.0604 %/h. However, ETA in each vinegar production cycle was different due to the stage of growth of *A. aceti* WK in fermenting mash.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	3
บทนำ	8
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	8
ขอบเขตของโครงการวิจัย	8
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	9
วิธีการทดลอง	10
ผลการทดลอง	13
การผลิตไวน์ข้าวโพดเพื่อใช้ในการปรับ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK"	13
การออกแบบระบบการให้แอลกอฮอล์เพื่อสนับสนุนระบบ Repeated fed batch fermentation ในถังหมักต้นแบบ "กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ" ขนาด 50 ลิตร	13
ผลการคัดเลือกเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เพื่อใช้ในการปรับสภาพด้วยการควบคุมความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration) เท่ากับ 8.0	14
ผลของการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch	15
ผลของการหมักน้ำส้มสายชูด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพทนกรด	16
สรุปผลการทดลอง	19
บรรณานุกรม	20
ภาคผนวก	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อัตราการสร้างกรด (Acidification rate) ของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch ในน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโพดที่หมักด้วยระบบกึ่งต่อเนื่องในถังหมักระบบผสมอากาศเข้ากับน้ำหมัก ("MAMS") ที่อุณหภูมิ 30°ซ จำนวน 12 รอบของการหมัก	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณเซลล์ยีสต์ ปริมาณน้ำตาล (invert sugar) ค่า pH และค่า acidity ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโพดด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (30-32°ซ)	13
2	การติดตั้งระบบปั๊มแอลกอฮอล์และควบคุมการไหลเข้าสู่ถังหมักต้นแบบของระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (mash-air mixing system; "MAMS") ขนาด 50 ลิตร : (ก) ระบบปั๊มแอลกอฮอล์และควบคุมการไหลเข้า; (ข) ถังหมัก "MAMS" ที่ติดตั้งระบบปั๊มแอลกอฮอล์และควบคุมการไหลเข้า; (ค) ท่อนำแอลกอฮอล์เข้าสู่ด้านล่างของถังหมัก "MAMS"	14
3	ผลของการปรับสภาพเพื่อคัดเลือก "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ในถังหมักต้นแบบของระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ ขนาด 50 ลิตร ในสภาพที่ใช้ TC = 8 ที่อุณหภูมิ 30°ซ	15
4	การปรับสภาพ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยเทคนิค Repeated fed batch โดยอาศัยการควบคุมการลดลงของแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง : (ก) 2.0%; (ข) 1.75%; (ค) 1.5%	16
5	ผลของการหมักน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์ข้าวโพดด้วย"หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิค Repeated fed batch ในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ ("MAMS") ที่อุณหภูมิ 30°ซ โดยปรับสภาพน้ำหมัก TC = 9 ในช่วงเริ่มต้นถึงวันที่ 22 และ TC = 10 ตั้งแต่วันที่ 22 ถึง 50	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

ในการพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักนั้น องค์ความรู้ของการออกแบบระบบการหมักมีความสำคัญควบคู่กับองค์ความรู้ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู การพัฒนาองค์ความรู้ทั้งสองด้านนี้ผู้วิจัยได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 เป็นต้นมา โดยในด้านการออกแบบระบบการหมักน้ำส้มสายชูหมักนั้น ผู้วิจัยได้ร่วมทำการวิจัยกับคุณประภาส ปิ่นวิเศษ และ คุณพนิต เพ็ชรน่วม จากบริษัท แอกโกรนิก้า จำกัด ภายใต้การสนับสนุนของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายอุตสาหกรรม และโครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย (iTAP) ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี (TMC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) จนสามารถพัฒนา **"กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ"** ซึ่งได้ยื่นจดสิทธิบัตรในนามสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อวันที่ 13 ตุลาคม พ.ศ. 2551 จากกระบวนการหมักที่พัฒนาขึ้นทำให้สามารถผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ได้ปริมาณกรดอะซิติกเท่ากับ 7-8% ได้ภายใน 24-36 ชั่วโมง (วราวุฒิ, 2553)

ในกรณีของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่กล่าวถึงนี้เป็นหัวเชื้อที่ผู้วิจัยได้คัดเลือกขึ้นมาและพัฒนาความสามารถในการสร้างกรดอะซิติกได้ตามต้องการ(กรดอะซิติกเท่ากับ 7-8%) ใช้เวลา 8 ปี (นับถึงปัจจุบัน) โดยอาศัยหลักการของ Spontaneous mutation ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือก *A. aceti* WK ภายหลังจากที่ผู้วิจัยสามารถคัดเลือกหัวเชื้อ *A. aceti* สป5 (จากโครงการวิจัยที่สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายอุตสาหกรรม ที่กล่าวถึงข้างต้นในระหว่างปี พ.ศ. 2544-45 และเป็นหัวเชื้อน้ำส้มสายชูที่ใช้เฉพาะกับบริษัท แอกโกรนิก้า จำกัด เท่านั้น) อย่างไรก็ตามเพื่อให้กระบวนการหมักที่พัฒนาขึ้นก้าวไปสู่ระดับการแข่งขันกับเทคโนโลยีจากต่างชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องพัฒนาให้หัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK สามารถผลิตกรดอะซิติกให้ได้ 8-10% แต่ในสภาพที่มีกรดอะซิติกสูงนี้ย่อมมีผลลบต่อหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK เอง ดังนั้นการปรับสภาพให้หัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK สามารถทนกรดได้ในระดับความเข้มข้นที่ต้องการ จึงเป็นจุดเริ่มต้นที่จะนำไปสู่เป้าหมายของการผลิตน้ำส้มสายชูหมักที่ต้องการ การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่ปรับสภาพความทนกรดอะซิติกความเข้มข้นสูงของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK โดยอาศัยเทคนิค Repeated Fed Batch

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ประกอบด้วย

1. การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้สามารถทนกรดอะซิติกความเข้มข้นสูงถึง 8-10% ในถังหมักต้นแบบ **"กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ"** ขนาด 50 ลิตร โดยอาศัยเทคนิค Repeated Fed Batch
2. ต้นแบบของกรรมวิธีในการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชูสำหรับการผลิตน้ำส้มสายชูจากวัตถุดิบประเภทต่าง ๆ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ดำเนินการศึกษาการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้สามารถทนกรดอะซิติกความเข้มข้นสูงถึง 8-10% ในถังหมักต้นแบบ **"กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ"** ขนาด 50 ลิตร โดยอาศัยเทคนิค Repeated Fed Batch อนึ่งในการศึกษานี้เลือกใช้ไวน์ข้าวโพดในการหมักน้ำส้มสายชูหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

น้ำส้มสายชูหมักเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนการหมักผลไม้หรือวัตถุดิบให้เป็นไวน์ด้วยเชื้อยีสต์ในสภาพที่ไม่มีอากาศ และขั้นตอนการหมักไวน์ที่ได้ในขั้นตอนแรกด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* ในสภาพที่ให้อากาศ (Adams, 1998)

แบคทีเรียอะซิติก (Acetic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ต้องการอากาศในการเจริญและมักพบในธรรมชาติ เช่น ผลไม้ ธัญชาติ สมุนไพร เป็นต้น (de Ley *et al.*, 1984) แบคทีเรียอะซิติกเป็นจุลินทรีย์หลักที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน เพื่อเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติกในเมตาบอลิซึมแบบใช้อากาศ (Aerobic metabolism) ซึ่งออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนสุดท้าย (terminal electron acceptor) (Deppenmeir *et al.*, 2002; Ilabaca *et al.*, 2008) ในกลุ่มของแบคทีเรียอะซิติกทั้ง *Acetobacter* spp. และ*Gluconobacter* spp. สามารถจำแนกออกจากกันได้โดยอาศัยความสามารถในการออกซิไดส์กรดอะซิติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ โดยที่เชื้อ *Acetobacter* spp. สามารถออกซิไดส์แอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก และยังสามารถออกซิไดส์กรดอะซิติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำในสภาพที่ไม่มีแอลกอฮอล์ ในขณะที่ *Gluconobacter* spp. ไม่สามารถออกซิไดส์กรดอะซิติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (Bartowsky and Henschke, 2008)

การผลิตน้ำส้มสายชูในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้ระบบ Submerged fermentation โดยอาศัยกระบวนการหมักกึ่งต่อเนื่อง หรือเรียกว่า Semi-continuous processes (Fregapane *et al.*, 1999, 2001; de Ory *et al.*, 2002, 2004; Krusong *et al.*, 2007, 2010, 2011; Ndoye *et al.*, 2007) โดยปัจจัยที่สำคัญของการผลิตน้ำส้มสายชู คือ ช่วงเริ่มต้นการหมัก (Start up) ซึ่งเป็นช่วงที่แบคทีเรียอะซิติกปรับสภาพเข้าสู่ระบบการหมัก โดยเป็นผลกระทบของความเข้มข้นของกรดอะซิติก หรือความเข้มข้นรวมของกรดอะซิติกและแอลกอฮอล์ในน้ำหมักต่อการเจริญของแบคทีเรียอะซิติก (de Ory *et al.*, 2002; Fregapane *et al.*, 2003) ทำให้การเริ่มต้นการหมักทำได้ช้า (หรือใช้เวลานาน) อนึ่งได้มีการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์หลายท่านรายงานถึงผลกระทบของกรดอะซิติกต่อแบคทีเรียอะซิติก ดังเช่น Soo Park *et al.* (1989) ระบุว่ากรดอะซิติกความเข้มข้นสูงกว่า 20 กรัม/ลิตร จะเริ่มส่งผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอะซิติก ขณะที่ความเข้มข้นสูงกว่า 40 กรัม/ลิตร จะส่งผลต้านการเจริญของแบคทีเรียอะซิติก อีกทั้งในสภาพที่มีกรดอะซิติกความเข้มข้นเท่ากับ 60 กรัม/ลิตร จะก่อให้เกิดการยับยั้งแบคทีเรียอะซิติกได้สูงถึง 70% ต่อมา Gomez *et al.* (1994) รายงานตามการคำนวณตามสมการจลศาสตร์ พบว่า ความเข้มข้นของกรดอะซิติกและแอลกอฮอล์มากกว่า 40 กรัม/ลิตร จะมีผลในการยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรียอะซิติกโดยตรง สำหรับแนวทางในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวแนวทางหนึ่ง คือ การปรับสภาพ (Adaptation) เซลล์แบคทีเรียอะซิติกให้อยู่สภาพที่ทนความเครียดจากกรด (acid stress) เพื่อควบคุมสภาพการยับยั้งจนทำให้แบคทีเรียอะซิติกสามารถก่อให้เกิดการหมักได้ (Arnold *et al.*, 2002)

ตามปกติการหมักในระบบ Fed batch fermentation ซึ่งเป็นกรรมวิธีในการเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ในปริมาณสูง ในกรณีของการผลิตน้ำส้มสายชูนั้นได้มีการนำระบบการหมักนี้มาใช้เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบของกรดอะซิติกและแอลกอฮอล์ในน้ำหมักโดย อาศัยการควบคุมปริมาณกรดอะซิติกและแอลกอฮอล์ให้อยู่ในระดับที่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอะซิติก (Berraud, 2000; Arnold *et al.*, 2002) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้เทคนิค Fed batch fermentation เพื่อใช้ปรับสภาพความทนกรดของแบคทีเรียอะซิติก *A. aceti* WK เพื่อให้สามารถผลิตน้ำส้มสายชูหมักให้มีปริมาณกรดอะซิติก 8-10% บนพื้นฐานของหลักการว่าแบคทีเรีย อะซิติก *A. aceti* WK จะต้องสามารถทนกรดอะซิติกในระดับความเข้มข้น 8-10% ได้ก่อนจึงจะสามารถผลิตน้ำส้มสายชูที่มีปริมาณกรด 8-10% ได้ตามต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30

เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์ข้าวโพดที่ใช้ในการศึกษา คือ เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ซึ่งต่อไปในรายงานจะเรียกว่า **"เชื้อยีสต์ M30"** เป็นเชื้อยีสต์ในกลุ่มเชื้อยีสต์ตกตะกอน (Flocculate yeast) ซึ่งได้รับอนุเคราะห์จาก ดร.จรูญ คำนวนตา อดีตผู้อำนวยการ สกว. ฝ่ายอุตสาหกรรม และ ศ.ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในการเตรียมหัวเชื้อยีสต์ทำโดยการเขี่ย **"เชื้อยีสต์ M30"** ที่เลี้ยงในอาหาร MY agar slant นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ลงในอาหารเหลว MY 100 มล. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm นาน 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักไวน์ต่อไป

แบคทีเรีย *Acetobacter aceti* WK

หัวเชื้อที่ใช้ คือ *A. aceti* WK (ซึ่งต่อไปจะเรียกว่า **"หัวเชื้อน้ำส้ม WK"**) เป็นหัวเชื้อน้ำส้มสายชูที่คัดเลือกและปรับปรุง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546-ปัจจุบัน (ประมาณ 8 ปี ในปี พ.ศ. 2554) ที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนึ่ง **"หัวเชื้อน้ำส้ม WK"** ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้ผ่านการพัฒนาปรับปรุงให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกจากไวน์ข้าวโพด (Corn vinegar) แล้วดังรายงานวิจัยของ Krusong *et al.* (2007; 2010; 2011) ดังนั้นจึงสามารถใช้ **"หัวเชื้อน้ำส้ม WK"** ในการศึกษาได้

การผลิตไวน์จากข้าวโพด

ทำการหมักไวน์ข้าวโพดตามวิธีการของ วราวุฒิ ครูส่ง (2545) โดยใช้ข้าวโพด 5% ปรับสภาพความหวานในน้ำหมักเท่ากับ 20% pH เท่ากับ 5.5 และเติมแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05% และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.2% (ดัดแปลงจาก Kumnuanta and Vongsuvanlert, 1982) ทำการฆ่าเชื้อด้วยการต้มเดือดเป็นเวลา 30 นาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปหมักด้วย **"เชื้อยีสต์ M30"** เป็นเวลา 5-7 วัน ที่อุณหภูมิ 30-32°ซ

เมื่อการหมักสิ้นสุดให้นำน้ำไวน์ที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการพาสเจอไรส์ก่อนที่จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักน้ำส้มสายชูต่อไป

การออกแบบระบบการให้แอลกอฮอล์เพื่อสนับสนุนระบบ Repeated fed batch fermentation ในถังหมักต้นแบบ "กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ" ขนาด 50 ลิตร

สืบเนื่องจากหัวหน้าผู้วิจัยและทีมงานของบริษัท แอกโกรนิก้า จำกัด ได้ประดิษฐ์ถังหมักต้นแบบ **"กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ"** ซึ่งได้ยื่นจดสิทธิบัตรในนามของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อวันที่ 13 ตุลาคม พ.ศ. 2551 ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้**ถังหมักต้นแบบของระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (mash-air mixing system)** หรือเรียกโดยย่อว่า **"MAMS"** ขนาด 50 ลิตร ซึ่งเป็นถังสแตนเลสลักษณะ Double jacket โดยควบคุมอุณหภูมิการหมักให้เท่ากับ 30±1°ซ ด้วยระบบหล่อเย็น อนึ่งระบบการหมักที่พัฒนาขึ้นสามารถก่อให้เกิดการให้อากาศที่เพียงพอต่อการทำงานของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK"

ทำการออกแบบระบบการให้สารอาหารที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์เข้าสู่น้ำหมัก จากนั้นจึงทำการติดตั้งระบบดังกล่าวเข้าไปในถังหมัก "MAMS" ต้นแบบขนาด 50 ลิตร ซึ่งประกอบด้วยระบบปั๊มและระบบควบคุมอัตราการไหล ทั้งนี้เพื่อให้สามารถควบคุมความเข้มข้นของกรดอะซิติกในระหว่างน้ำหมักได้อย่างแน่นอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคัดเลือกเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เพื่อใช้ในการปรับสภาพด้วยการควบคุมความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration) เท่ากับ 8.0

ทำการเตรียมสภาพการหมักโดยการปรับปริมาณความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 8.0 ตามวิธีการที่ระบุใน Krusong *et al.* (2007) ซึ่งประกอบด้วย กรดอะซิติกและแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 4.5% และ 3.5% ตามลำดับ การเลือกใช้ระดับความเข้มข้นนี้เพื่อให้ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ได้รับสภาพที่เครียดตั้งแต่เริ่มต้น อนึ่งไวน์ที่ใช้ในการศึกษา คือ ไวน์ข้าวโพด และ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ได้ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นที่เหมาะสมต่อไวน์ข้าวโพดมาแล้ว สำหรับปริมาตรน้ำหมักที่ใช้ในถังหมัก เท่ากับ 30-35 ลิตร

ทำการปรับสภาพการหมักด้วยระบบ Semi-continuous processes โดยเลือกใช้การดึงผลิตภัณฑ์ (น้ำส้มสายชู) ออกจากถังหมัก 40-50% (ตาม Krusong *et al.*, 2007; 2010; 2011) เมื่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สุดท้ายในน้ำหมัก (Final alcohol value) ลดลงถึง 0.3-0.5% (Arnold *et al.*, 2002; Fregapane *et al.*, 2003; de Ory *et al.*, 2002, 2004; Krusong *et al.*, 2007, 2010, 2011; Ndoye *et al.*, 2007) จึงเติมไวน์ข้าวโพดเข้าไปในถังหมักในปริมาณเดียวกันกับที่นำน้ำส้มสายชูออกจากถังหมัก โดยควบคุมความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 8.0 เช่นเดิม ทำการทดลองเช่นนี้จำนวน 3 รอบ ทำการเก็บ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไปในรอบสุดท้าย อนึ่งในการควบคุมปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักเท่ากับ 0.3-0.5% นั้นเพื่อก่อให้เกิดผลของกรดอะซิติกที่มีต่อ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เพียงอย่างเดียว

ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณกรดอะซิติกตลอดการศึกษา

การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch

ทำการเตรียมสภาพการหมักโดยการปรับปริมาณความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 8.0 ตามวิธีการที่ระบุใน Krusong *et al.* (2007; 2010; 2011) และเริ่มต้นการหมักด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK"

เมื่อปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักถึง 2% จึงทำการปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำหมักให้กลับมาเท่ากับ 3.5% จากนั้นทำการหมักจนกระทั่งปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักลดลงถึง 2% จึงดำเนินการเช่นเดิม ดำเนินการหมักเช่นนี้ 3 รอบ

จากนั้นจึงเริ่มต้นการหมักใหม่ ทำการหมักจนปริมาณแอลกอฮอล์ลดลง 1.75% จึงทำการปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำหมักให้กลับมาเท่ากับ 3.5% จากนั้นทำการหมักจนกระทั่งปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักลดลงถึง 1.75% จึงดำเนินการเช่นเดิม ดำเนินการหมักเช่นนี้ 3 รอบ

ขั้นตอนสุดท้ายด้วยทำการหมักจนปริมาณแอลกอฮอล์ลดลง 1.50% จึงทำการปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำหมักให้กลับมาเท่ากับ 3.5% จากนั้นทำการหมักจนกระทั่งปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักลดลงถึง 1.50% จากนั้นจึงทำการเก็บหัวเชื้อเพื่อใช้ในการหมักต่อไป

ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณกรดอะซิติก ตลอดการศึกษา

ผลของการหมักน้ำส้มสายชูด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพทนกรด

ทำการเตรียมสภาพการหมักโดยการปรับปริมาณความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 10.0 ตามวิธีการที่ระบุใน Krusong *et al.* (2007; 2010; 2011) เนื่องจากต้องการทดสอบประสิทธิภาพของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพให้สามารถทนกรดอะซิติกได้ 8-10% โดยปรับความเข้มข้นของกรดอะซิติกและแอลกอฮอล์เท่ากับ 4.5% และ 5.5% ตามลำดับ ทำการหมักด้วยระบบ Semi-continuous fermentation ในถังหมัก "MAMS" ต้นแบบขนาด 50 ลิตร ทำการหมักจำนวน 3 รอบ โดยทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณกรดอะซิติก ตลอดการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถานที่การทดลอง / เก็บข้อมูล

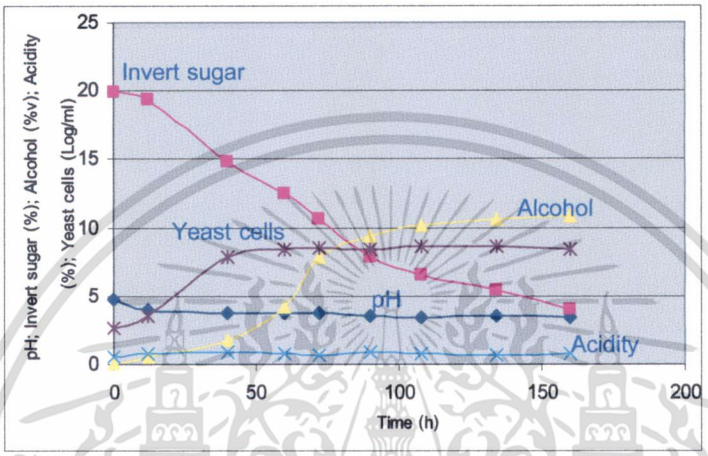
ทำการศึกษาที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก (D312- 313) อาคารเจ้าคุณทหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

การผลิตไวน์ข้าวโพดเพื่อใช้ในการปรับ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK"

ในการหมักไวน์ข้าวโพดตามวิธีของ Krusong *et al.* (2007; 2010) ด้วย "เชื้อยีสต์ M30" ซึ่งเป็นยีสต์ตกตะกอน (flocculating yeast) ในถังหมักขนาด 100 ลิตร ได้ผลการหมักดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่า "เชื้อยีสต์ M30" สามารถทำการหมักได้อย่างรวดเร็วโดยสามารถผลิตไวน์ที่มีแอลกอฮอล์ 10.6% ภายในเวลา 160 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (30-32°ซ) น้ำไวน์ที่ได้จะนำไปผ่านการกรองและใช้ตลอดการศึกษาการปรับสภาพ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK"

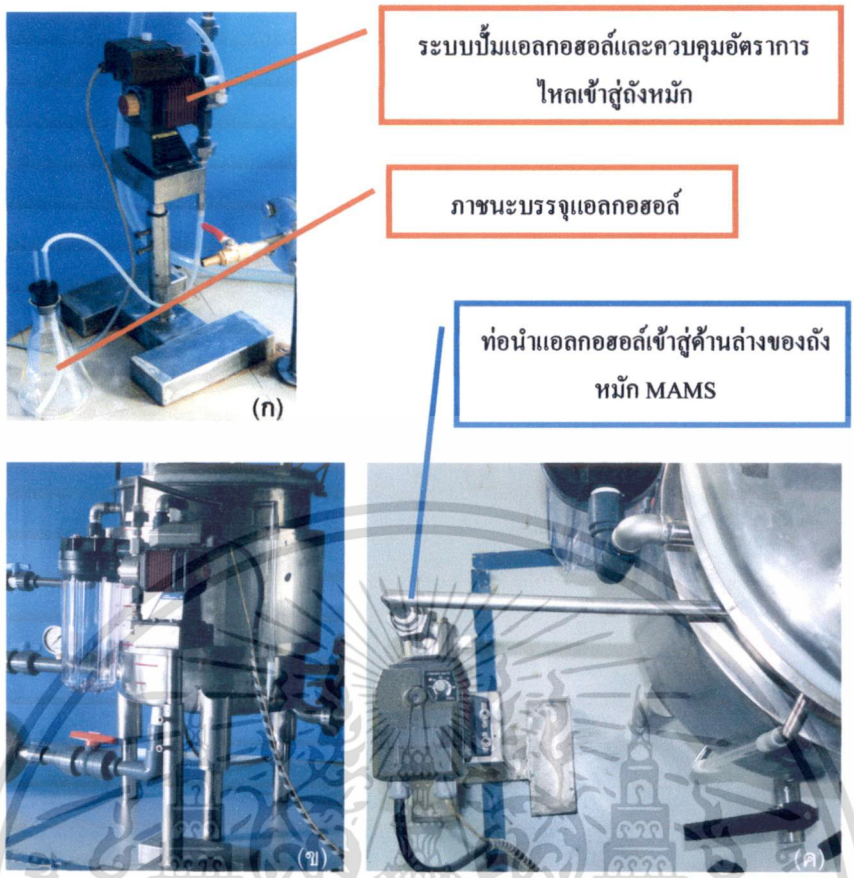


ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณเซลล์ยีสต์ ปริมาณน้ำตาล (invert sugar) ค่า pH และค่า acidity ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโพดด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (30-32°ซ)

การออกแบบระบบการให้แอลกอฮอล์เพื่อสนับสนุนระบบ Repeated fed batch fermentation ในถังหมักต้นแบบ "กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ" ขนาด 50 ลิตร

เนื่องด้วยในการศึกษานี้มุ่งเน้นเรื่องการปรับสภาพ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ให้สามารถทนและสร้างกรดได้ที่ระดับ 8-10% โดยอาศัยเทคนิคด้าน Fed-batch กล่าวคือ อาศัยการให้สารอาหารที่จำเป็นเป็นช่วง ๆ ซึ่งในที่นี้สารอาหารที่จำเป็นต่อการสร้างกรด คือ แอลกอฮอล์ ดังนั้นในการศึกษาจึงจำเป็นต้องทำการออกแบบระบบการให้แอลกอฮอล์เข้าไปในถังหมักต้นแบบของระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (mash-air mixing system; "MAMS") ขนาด 50 ลิตร ทั้งนี้ระบบของการให้แอลกอฮอล์เข้าสู่น้ำหมักแสดงในภาพที่ 2ก ซึ่งประกอบด้วยระบบปั๊มแอลกอฮอล์และควบคุมอัตราการไหล จากนั้นจึงทำการติดตั้งระบบดังกล่าวเข้าไปในถังหมักต้นแบบ "MAMS" (ภาพที่ 2ข และ 2ค) โดยมีท่อนำแอลกอฮอล์เข้าสู่ด้านล่างของถังหมักต้นแบบ "MAMS" อนึ่งระบบปั๊มและระบบควบคุมอัตราการไหลที่ติดตั้งกับถังหมัก "MAMS" เพื่อให้สามารถควบคุมความเข้มข้นของกรดอะซิติกในระหว่างน้ำหมักให้แน่นอน เนื่องจากกรดอะซิติกเกิดจากการเปลี่ยนแอลกอฮอล์ในน้ำหมักภายใต้สภาพที่มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ ดังนั้นการควบคุมระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์จะส่งผลโดยตรงต่อความเข้มข้นของกรดอะซิติก (Arnold *et al.*, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 การติดตั้งระบบปั๊มแอลกอฮอล์และควบคุมการไหลเข้าสู่ถังหมักต้นแบบของระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (mash-air mixing system; "MAMS") ขนาด 50 ลิตร : (ก) ระบบปั๊มแอลกอฮอล์และควบคุมการไหลเข้า; (ข) ถังหมัก "MAMS" ที่ติดตั้งระบบปั๊มแอลกอฮอล์และควบคุมการไหลเข้า; (ค) ท่อนำแอลกอฮอล์เข้าสู่ด้านล่างของถังหมัก "MAMS"

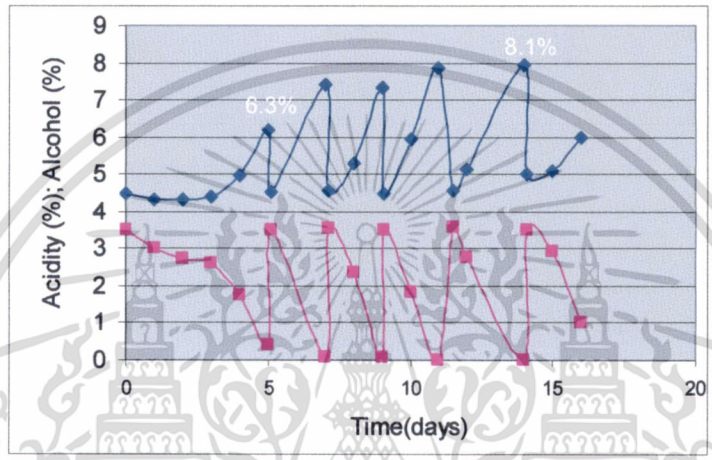
ผลการคัดเลือกเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เพื่อใช้ในการปรับสภาพด้วยการควบคุมความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration) เท่ากับ 8.0

เนื่องด้วยเป้าหมายหลักต้องการปรับสภาพ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ให้สามารถทนและสร้างกรดได้ในช่วง 8-10% ดังนั้นจึงจำเป็นต้องได้ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เบื้องต้นที่สามารถที่จะทนและสร้างกรดที่ 8% ให้ได้ก่อน อนึ่งตามปกติแล้วสภาพที่จะทำให้ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถทนและสร้างกรดได้ 8% ต้องมาจากสภาพที่ใช้เลี้ยง "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" นั้นจะต้องอยู่ในสภาพที่มีปริมาณความเข้มข้นทั้งหมด (total concentration; TC) เท่ากับ 8.0 ก่อน ดังนั้นในการศึกษาในขั้นตอนนี้จึงทำการเตรียมสภาพการหมักโดยการปรับปริมาณความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 8.0 ตามวิธีการที่ระบุใน Krusong *et al.* (2007) ซึ่งประกอบด้วย กรดอะซิติกและแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 4.5% และ 3.5% ตามลำดับ โดยทำการปรับสภาพการหมักด้วยระบบ Semi-continuous processes โดยเลือกใช้การดึงผลิตภัณฑ์ (น้ำส้มสายชูหรือกรดอะซิติก) ออกจากถังหมัก 40-50% (Krusong *et al.*, 2007; 2010; 2011) เมื่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สุดท้ายในน้ำหมัก (final alcohol value) ลดลงถึง 0.3-0.5% (Arnold *et al.*, 2002; Fregapane *et al.*, 2003; de Ory *et al.*, 2002, 2004; Krusong *et al.*, 2007, 2010, 2011; Ndoye *et al.*, 2007) จึงเติมไวน์ข้าวโพดเข้าไปในถังหมักในปริมาณเดียวกันกับที่นำน้ำส้มสายชูออกจากถังหมัก โดยควบคุมความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 8.0 เช่นเดิม ทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองเช่นนี้จำนวน 5 รอบ (จากเดิมที่ระบุไว้ในแผนการศึกษาเพียง 3 รอบ) ภายหลังจากที่ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ปรับตัวเข้ากับสภาพที่ใช้ในการปรับสภาพเริ่มต้น (สังเกตได้จากปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักลดลงถึง 0.3-0.5%)

จากผลการปรับสภาพ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" (ดังภาพที่ 3) แสดงให้เห็นว่า "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพมาเป็นเวลา 8 ปี สามารถที่จะปรับสภาพที่ TC = 8 ได้อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้สังเกตได้จากที่ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถปรับตัวได้ในระยะเวลาเพียง 5 วัน เท่านั้น ซึ่งรวดเร็วกว่าที่พบโดยทั่วไปที่หัวเชื้อน้ำส้มสายชู หรือ Acetic acid bacteria ใช้ระยะเวลาประมาณ 7-15 วันในการปรับตัวเข้ากับสภาพน้ำหมักใหม่ ผลการทดลองนี้บ่งชี้เป็นเบื้องต้นได้ว่า "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถที่ทนต่อสภาพของกรดสูง (high acid stress) อย่างสมบูรณ์ได้ที่ TC = 8 แล้ว นอกจากนี้แล้วเมื่อทำการปรับสภาพให้มีการหมักในรอบที่ 2-5 ถัดไป พบว่า "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถที่จะสร้างกรดได้สูงขึ้นเรื่อยๆ จาก 6.3% ในรอบที่ 1 เป็น 8.1% ในรอบที่ 5 ดังนั้นจึงทำการปรับสภาพในรอบที่ 6 จากนั้นจึงเก็บ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เมื่อเริ่มรอบที่ 6 ได้ 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป



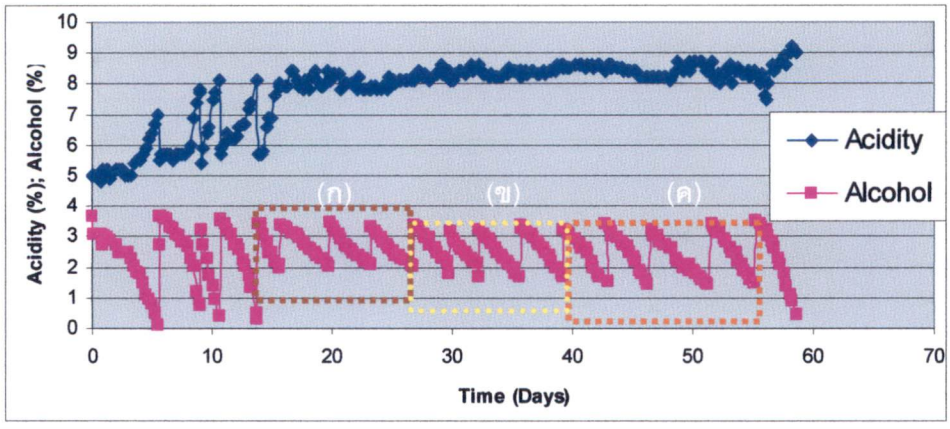
ภาพที่ 3 ผลของการปรับสภาพเพื่อคัดเลือก "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ในถังหมักต้นแบบของระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ ขนาด 50 ลิตร ในสภาพที่ใช้ TC = 8 ที่อุณหภูมิ 30°ซ

ผลของการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch

ในการปรับสภาพ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยเทคนิค Repeated fed batch นั้นอาศัย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านขั้นตอนการคัดเลือกที่ผ่านมา ดังนั้นในการปรับสภาพจึงเริ่มต้นที่ TC = 8 เช่นเดิม

เนื่องด้วยวัตถุดิบหลักที่มีผลต่อการสร้างกรดของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" คือ แอลกอฮอล์ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่การใช้แอลกอฮอล์เป็นวัตถุดิบสำหรับควบคุมให้เกิดสภาพการทนกรดที่สูง (Acid stress) โดยอาศัยการควบคุมปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักซึ่งจะเริ่มต้นที่ 3.5% จากนั้นเมื่อปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักลดลงถึง 2% จึงทำการปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำหมักให้กลับมาเท่ากับ 3.5% ทำการหมักต่อไปจนกระทั่งปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักลดลงถึง 2% จึงดำเนินการเช่นเดิม ดำเนินการหมักเช่นนี้ 4 รอบ (จากเดิมที่ระบุไว้ 3 รอบ ในแผนการทดลอง) หลังจากการควบคุมการลดลงของแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง 2.0% จากนั้นจึงเริ่มต้นการควบคุมการลดลงของแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง 1.75% จนถึงขั้นตอนสุดท้ายที่ควบคุมการลดลงของแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง 1.5% ทั้งนี้ทั้งสองสภาพการศึกษาดำเนินการเช่นเดียวกับกรณีแรกทุกประการ สำหรับผลของการปรับสภาพ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch แสดงในภาพที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 การปรับสภาพ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยเทคนิค Repeated fed batch โดยอาศัยการควบคุมการลดลงของแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง : (ก) 2.0%; (ข) 1.75%; (ค) 1.5%

จากภาพที่ 4 พบว่า ในช่วงแรกก่อนที่จะทำการปรับสภาพได้ทำการหมักในสภาพ TC = 8 จำนวน 4 รอบของการหมัก ในรอบแรกของการหมักบ่งชี้ว่า "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่คัดเลือกมาสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพการหมักได้อย่างดี สังเกตได้จากระยะเวลาในการลดลงของแอลกอฮอล์จนถึงระดับ 0.3-0.5% เกิดขึ้นเพียง 6 วัน ในขณะที่รอบที่ 2 ถึง 4 สังเกตเห็นการพัฒนาในการผลิตกรดของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" จาก 7.1% ถึง 8.2% ภายในช่วงวันที่ 6 ถึง 14

กรณีของ**การปรับสภาพด้วยการควบคุมการลดของแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง 2.0%** (ภาพที่ 4ก) ดำเนินการ 4 รอบ โดยรอบแรกใช้เวลา 2 วัน จากนั้นรอบที่ 2-4 ใช้เวลา 3-4 วัน สภาพที่เกิดขึ้นก่อให้เกิดกรดอยู่ระหว่าง 7.8-8.6% และทำให้ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถทนสภาพกรดดังกล่าวได้ ทั้งนี้สังเกตได้จากปริมาณกรดที่สูงขึ้นเรื่อย ๆ จากนั้นจึงทำ**การปรับสภาพด้วยการควบคุมการลดของปริมาณแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง 1.75%** (ภาพที่ 4ข; วันที่ 26 - 40) จำนวน 4 รอบ โดยแต่ละรอบใช้ระยะเวลาเพียง 3-4 วัน กรดที่เกิดขึ้นในช่วงนี้อยู่ในระหว่าง 8.2-8.6 อย่างต่อเนื่อง ในช่วงนี้ช่วยทำให้เกิดสภาพความทนกรดของ"หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เพิ่มขึ้น สำหรับช่วงสุดท้ายของการปรับสภาพเริ่มตั้งแต่วันที่ 40 จนถึงวันที่ 55 เป็นช่วง**การปรับสภาพด้วยการควบคุมการลดของปริมาณแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง 1.50%** (ภาพที่ 4ค) จำนวน 4 รอบ โดยแต่ละรอบใช้ระยะเวลาเพียง 3-5 วัน ในช่วงนี้ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถทนสภาพกรดสูงระหว่าง 8.2-8.7%

การปรับสภาพในช่วง 55 วัน โดยอาศัยเทคนิค Repeated fed batch พบว่า "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถทนต่อสภาพกรดสูงได้อย่างต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้สามารถใช้งานได้จริง นอกจากนี้แล้วในช่วงท้ายสุดของการหมัก (วันที่ 55 – 59) "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพสามารถที่จะสร้างกรดได้สูง 9.3% ซึ่งเป็นดรรชนียืนยันว่า "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถปรับตัวได้อย่างแท้จริง ดังนั้นจึงนำ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ปรับได้นี้ไปผ่านขั้นตอนการผลิตน้ำส้มสายชูต่อไป

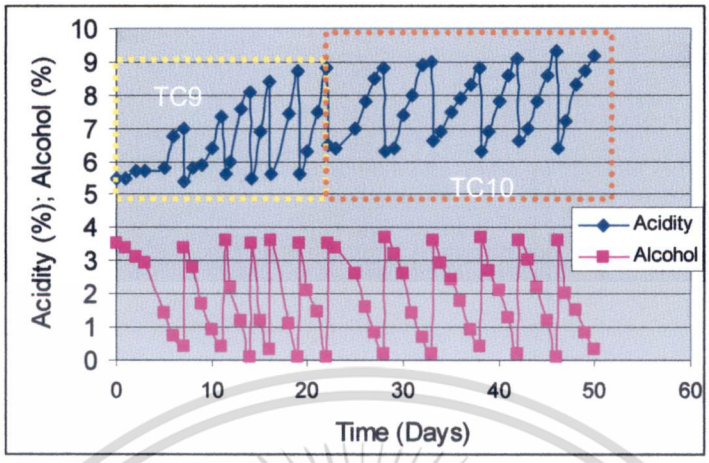
ผลของการหมักน้ำส้มสายชูด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพทนกรด

ในการศึกษาในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะดำเนินการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์ข้าวโพดที่ใช้ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิค Repeated fed batch โดยทำการหมักในถังหมัก "MAMS" ต้นแบบขนาด 50 ลิตร ทั้งนี้สภาพการหมักที่ระบุไว้ในแผนการศึกษาจะใช้สภาพที่มีความเข้มข้นทั้งหมด (TC) เท่ากับ 10 หรือ เขียนโดยย่อว่า "TC = 10" แต่เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาในการปรับสภาพนั้นได้ใช้สภาพที่ TC = 8 ดังนั้นจึงได้ตัดสินใจเลือกดำเนินการหมักเป็น 2 สภาพ กล่าวคือ สภาพแรกทำการปรับให้ TC = 9 ก่อน โดยดำเนินการหมักเป็นจำนวน 6 รอบ จากนั้นจึงปรับสภาพเป็น TC = 10 แล้วดำเนินการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

หมักต่ออีกจำนวน 6 รอบ อนึ่งการหมักใช้ระบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous fermentation) โดยอาศัยการดึงน้ำหมัก (discharge) ออกจากถังหมักในอัตรา 50% ตามวิธีการที่ระบุใน Krusong *et al.* (2010) สำหรับผลการศึกษาแสดงอยู่ในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ผลของการหมักน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์ข้าวโพดด้วย"หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิค Repeated fed batch ในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ ("MAMS") ที่อุณหภูมิ 30°ซ โดยปรับสภาพน้ำหมัก TC = 9 ในช่วงเริ่มต้นถึงวันที่ 22 และ TC = 10 ตั้งแต่วันที่ 22 ถึง 50

ผลของการหมักน้ำส้มสายชูจากจากไวน์ข้าวโพดด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิค Repeated fed batch ในถังหมัก "MAMS" ที่อุณหภูมิ 30°ซ (ดังแสดงในภาพที่ 5) แสดงให้เห็นว่า "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนกรด (acid stress) นั้นสามารถทนต่อสภาพกรดที่ TC = 9 ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักนี้ได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้สังเกตได้จากที่ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถปรับตัวเข้ากับน้ำหมักใหม่ได้ในระยะเวลาเพียง 7 วัน เท่านั้น หลังจากนั้นจะพบว่า "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถที่จะพัฒนาการสร้างกรดเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในระหว่างรอบการหมักที่ 2-6 โดย**อัตราการสร้างกรด (Acidification rate; ETA) เพิ่มขึ้นจาก 0.0074 %/h ถึง 0.0604 %/h** ดังแสดงในตารางที่ 1 หลังจากนั้นจึงทำการปรับสภาพน้ำหมักขึ้นเป็น TC = 10 พบว่า ระยะเวลาในการหมักแต่ละรอบเพิ่มขึ้นเป็น 4-5 วัน ต่อรอบ (ดังแสดงในภาพที่ 5 และ ตารางที่ 1) พร้อมกับมีปริมาณกรดที่สร้างขึ้นจาก "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ได้ถึงระดับ 9-9.3% อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงอัตราในการสร้างกรด (ETA) ในสภาพการหมักที่ TC = 10 กลับน้อยกว่าที่ได้รับจากในสภาพการหมักที่ TC = 9 ทั้งนี้เนื่องจากสภาพ TC = 10 เป็นสภาพที่มีความเครียดต่อ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่สูงนั่นเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

120413

ตารางที่ 1 อัตราการสร้างกรด (Acidification rate) ของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch ในน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโพดที่หมักด้วยระบบกึ่งต่อเนื่องในถังหมักระบบผสมอากาศเข้ากับน้ำหมัก ("MAMS") ที่อุณหภูมิ 30°ซ จำนวน 12 รอบของการหมัก

รอบการหมัก	TC ในน้ำหมัก	ปริมาณกรด เมื่อการหมักเริ่มต้น (%)	ปริมาณกรด เมื่อการหมักสิ้นสุด (%)	ระยะเวลาในการสร้างกรด (วัน)	Acidification rate[2] (%/h)
1[1]	9	5.5	6.75	7	0.0074
2	9	5.4	7.36	4	0.0204
3	9	5.6	8.1	3	0.0347
4	9	5.5	8.4	2	0.0604
5	9	5.6	8.7	3	0.0431
6	9	5.6	8.8	3	0.0444
7	10	6.5	8.5	5	0.0167
8	10	6.3	9.0	5	0.0225
9	10	6.6	8.8	5	0.0183
10	10	6.3	9.1	4	0.0292
11	10	6.6	9.3	4	0.0281
12	10	6.4	9.2	4	0.0292

[1] รอบการหมักที่ 1 เป็นระยะเวลาที่ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ใช้ในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพการหมัก (Lag phase); [2] Acidification rate (ETA) คำนวณจากปริมาณกรดที่สร้างขึ้นในรอบการหมักหารด้วยระยะเวลาที่ใช้ในการสร้างกรดในแต่ละรอบการหมัก; อัตราการดึงน้ำหมัก (Discharging rate) ออกจากน้ำหมักจากถังหมักในระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง เท่ากับ 50%

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

- ไวน์ข้าวโพดที่ใช้ในการศึกษาได้จากการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (30-32°ซ) โดย "เชื้อยีสต์ M30" สามารถทำการหมักได้ไวน์ที่มีแอลกอฮอล์ 10.6% ภายในเวลา 160 ชั่วโมง
- ถังหมักที่ใช้ในการศึกษาการปรับสภาพ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เป็นถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (mash-air mixing system) หรือเรียกโดยย่อว่า "MAMS" ขนาด 50 ลิตร ซึ่งถังหมักระบบดังกล่าวได้ยื่นจดสิทธิบัตรในนามของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อวันที่ 13 ตุลาคม พ.ศ. 2551 ทั้งนี้ได้ทำการติดตั้งระบบปั๊มแอลกอฮอล์และควบคุมอัตราการไหลเพื่อใช้ในการศึกษาระบบ Fed batch fermentation
- การคัดเลือก "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เพื่อใช้ในการเริ่มต้นการปรับสภาพเชื้ออาศัยเทคนิคการสร้างสภาพเครียดให้แก่ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" โดยอาศัยการปรับสภาพความเข้มข้นโดยรวม (ซึ่งเป็นการปรับผสมระหว่างความเข้มข้นของกรดและความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำหมัก) เท่ากับ 8 หรือเรียกโดยย่อว่า "TC = 8" พบว่า **"หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถที่ทนต่อสภาพของกรดสูง (high acid stress) อย่างสมบูรณ์ได้ที่ TC = 8** โดยสามารถทนและสร้างกรดได้สูงขึ้นเรื่อยๆ จาก 6.3% ในรอบที่ 1 เป็น 8.1% ในรอบที่ 5 ของการปรับสภาพ
- การปรับสภาพ **"หัวเชื้อน้ำส้ม WK"** ด้วยเทคนิค Repeated fed batch อาศัยการควบคุมระดับแอลกอฮอล์ในน้ำหมักที่ลดลงถึงระดับที่กำหนดให้กลับสู่ระดับสูง (เริ่มต้น) อย่างต่อเนื่อง กล่าวคือ อาศัยการปรับสภาพแอลกอฮอล์ที่ลดลงจากระดับเริ่มต้นที่ 3.5% ถึง 2% ให้กลับมาที่ 3.5% จำนวน 4 รอบของการหมัก และดำเนินการต่อเนื่องกับสภาพที่ลดลงถึง 1.75% และ 1.5% เช่นเดียวกัน ผลการศึกษา พบว่า เทคนิค Repeated Fed Batch สามารถทำให้ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" อยู่ในสภาพที่มีกรดสูงได้ 8.2-8.6% ตลอดช่วง 40 วันของการปรับสภาพในช่วงดังกล่าว และยังพบว่า "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถสร้างกรดในสภาพเครียดดังกล่าวได้ถึง 9.3% ในรอบการหมักสุดท้าย
- ผลของการหมักน้ำส้มสายชูด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพทนกรดด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch พบว่า "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถทนสภาพการหมักทั้งสภาพ TC = 9 และ TC = 10 ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยมีอัตราการสร้างกรด (Acidification rate) เริ่มต้นที่ 0.0074 %/h และสูงสุดที่ 0.0604 %/h ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับรอบของการหมักซึ่งจะสัมพันธ์โดยตรงต่อระยะการเจริญของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ในวงจรการเติบโต (growth cycle) ที่เกิดขึ้นในแต่ละรอบของการหมักเป็นสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

วราวุฒิ ครูส่ง. 2545. การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำอ้อย. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายอุตสาหกรรม. ปี 2544-2545. 113 หน้า.

วราวุฒิ ครูส่ง พนิต เพ็ชรน่วม และ ประภาส ปิ่นวิเศษ. 2553. เส้นทางวิจัยกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก : การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อทดแทนการนำเข้า...สู่การยอมรับของภาคเอกชนไทย. บทความเชิงทัศนวิสัยวารสารวิจัยและนวัตกรรมเพื่ออุตสาหกรรมไทย ปีที่ 1 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน 2553. หน้า 14-21.

Adachi, O., D. Moonmangmee, H. Toyama, M. Yamada, E. Shinagawa and K. Matsushita. 2003. New developments in oxidative fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 60: 643-653.

Adams, M.R. 1998. Vinegar. In. J.B. Wood (Ed.). Microbiology of Fermented Food. (pp. 1 – 44). Blackie Academic and Professional. London.

Arnold, S., T. Becker, A. Delgado, F. Emde and A. Enenkel. 2002. Optimizing high strength acetic acid bioprocess by cognitive methods in an unsteady state cultivation. *Journal of Biotechnology.* 97: 133-145.

Bartowsky, E.J. and P.A. Henschke. 2008. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine-A review. *International Journal of Food Microbiology.* 125: 60–70.

Berraud, C. 2000. Production of highly concentrated vinegar in fed-batch culture. *Biotechnology Letter.* 22: 451-454.

de Lay, J., M. Gillis and J. Swings. 1984. Acetobacteriaceae. In. N.R. Krieg and J.G. Holt (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. pp.267-278. Williams and Wilkins. Baltimore.

de Ory, I., L.E. Romero and D. Cantero. 2002. Optimum starting protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering.* 52: 31-37.

de Ory, I., L.E. Romero and D. Cantero. 2004. Operation n semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering.* 63: 39-45.

Deppenmeir, U., M. Hoffmeister and C. Prust. 2002. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 60: 233-242.

Fregapane, G., H. Rubio-Fernandez, J. Nieto and M.D. Salvador. 1998. Wine vinegar production using a noncommercial 100-litre bubble column reactor equipped with a novel type of dynamic sparger. *Biotechnology and Bioengineering.* 63: 141-146.

Fregapane, G., H. Rubio-Fernandez and M.D. Salvador. 2001. Influence of fermentation temperature on semi-continuous acetification for wine vinegar production. *European Food Research and Technology.* 213: 62-66.

Fregapane, G., H. Rubio-Fernandez and M.D. Salvador. 2003. Continuous production of wine vinegar in bubble column reactors of up to 60-litre capacity. *European Food Research and Technology.* 216: 63-67.

Gomez, J.M., L.E. Romero, I. Caro and D. Cantero. 1994. Cinetica de crecimiento de *Acetobacter aceti* sobre sustrato alcoholico. *Informacion Technologica.* 5: 55-63.

Ilabaca, C., P. Navarrete, P. Mardones, J. Romero and A. Mas. 2008. Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *International Journal of Food Microbiology.* 126: 245-249.

Krusong, W., A. Vichitraka and S. Pornpakdeewattana. 2007. Luffa Sponge as Supporting Material of *Acetobacter aceti* WK for Corn Vinegar Production in Semi-continuous Process. KMITL Sci. J. 7: 63 - 68.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Krusong, W., P. Petch-nom and P. Pinviset. 2010. Semi-continuous production process of corn vinegar in stirred tank reactor using fixation of *Acetobacter aceti* WK on surface of loofa sponge. Kasetsart J.: Natural Sci. 44(3): 454-461.

Krusong, W. and A. Vichitraka. 2011. An air-lift acetifier with mash recycling system for corn vinegar production by adsorbed cells of *Acetobacter aceti* WK on surface of loofa sponge. 2011 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science (ICBFS 2011). 1-3 April 2011. Bali Island. Indonesia. pp.86-90.

Nanba, A., A. Tamura and N. Shiro. 1984. Synergistic effect of acetic acid and ethanol on the growth of *Acetobacter* sp. *Journal of Fermentation Technology.* 62: 501-505.

Ndoye, B., S. Lebecque, J. Destain, A.T. Guiro and P. Thonart. 2007. A new pilot plant scale acetifier designed for vinegar production in sub-saharan Africa. *Process Biochemistry.* 42: 1561-1565.

Soo Park, Y., H. Ohtake, M. Fukaya, Y. Kawamura and K. Toda. 1989. Effect of dissolved oxygen and acetic acid concentration culture of *Acetobacter aceti. Journal of Fermentation and Bioengineering.* 68: 96-101.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

การวิเคราะห์ทางเคมี

1. ปริมาณกรด (Total acidity)

มีขั้นตอนดังนี้

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน

น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์	1	ลิตร
สารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH	4	กรัม

ผสมให้เข้ากันเก็บในขวดพลาสติก นำมาหาความเข้มข้นมาตรฐานก่อนใช้

การหาความเข้มข้นมาตรฐาน 0.1 N NaOH ทำได้โดยชั่ง acid potassium phthalate (potassium hydrogen phthalate $COOH.C_6H_4.COOK$ analytical reagent) อบ 2 ชั่วโมง ที่ 120°ซ แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้งชั่งอย่างละเอียดประมาณ 0.6000 - 0.7000 กรัม เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 90-100 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล์ฟธาลีน 2 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลาย 0.1 N NaOH ความเข้มข้นมาตรฐานคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (N)} = \frac{\text{กรัมของ COOH.C6H4.COOK x 1000}}{\text{มิลลิลิตรของ NaOH x 204.22}}$$

2. Phenolphthalein

ฟีนอล์ฟธาลีน (Phenolphthalein)	1	กรัม
แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด (Total acids)

ปิเปตตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 20 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล์ฟธาลีน 3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึง end point สีชมพู

<u>การคำนวณปริมาณกรดทั้งหมด</u>

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด (\%)} = \frac{(V)(N)(eq.Wt)(100)}{(1000)(v)}$$

กำหนดให้ V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน NaOH

N = Normality ของ สารละลายมาตรฐาน NaOH

v = ปริมาตรของสารละลายอาหารตัวอย่าง (5 มิลลิลิตร)

eq. Wt. = น้ำหนักสมมูลย์ของกรด เป็นกรัม

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Lane & Eynon

3.1 เตรียมสารละลาย Fehling ประกอบด้วย

สารละลาย A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลาย $CuSO_4$. 5H20	34.64	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น	500	มิลลิลิตร

สารละลาย B

$KnaC_4H_4O_6$. 4H2O	173	กรัม
NaOH	50	กรัม ในน้ำกลั่น
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น	500	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน ที่อุณหภูมิห้อง

ชั่งตัวอย่างน้ำหมัก ประมาณ 5 กรัม ในบีกเกอร์ที่แห้ง (m_0) ถ่ายใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรตามขีดปรับปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน นำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปไตเตรทสารละลายกลูโคสมาตรฐานจดปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

<u>การคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์</u>

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์} = \frac{250 \times A\ \%}{V \times m_0}$$

กำหนดให้

A = ปริมาตรของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ที่ใช้ในการหาค่ามาตรฐานของ Fehling solution (มิลลิลิตร)

V = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

m_0 = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้เตรียมสารละลาย (กรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้