รายงานการวิจัย

การเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกของ *Acetobacter aceti* WK ที่ตรึงเซลล์ด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศ

Increase of Acidification Efficiency by Using Immobilized *Acetobacter aceti* WK with Luffa Sponge in Airlift Fermenter

ชื่อผู้วิจัย 1. นายวราวุฒิ ครูส่ง

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้พิจารณาสนับสนุนงานวิจัยเรื่องนี้ พร้อมกันนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ น.ส.ณฐวรรณ บุญเพ็ง และ น.ส.ระพีพรรณ มูลคำ ที่ช่วยเหลือในการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

RCH
TP
445
ว3251ก

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 120323
วัน เดือน ปี 15 ก.ค. 2555

b 1231691x
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น รวมทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการ

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกของ *Acetobacter aceti* WK ที่ตรึงเซลล์ด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศ

(ภาษาอังกฤษ) Increase of Acidification Efficiency by Using Immobilized *Acetobacter aceti* WK with Luffa Sponge in Airlift Fermenter

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณ
ประจำปี 2553 จำนวนเงิน 250,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ เดือนตุลาคม พ.ศ. 2552 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2553

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

การหมักไวน์ข้าวโพดเพื่อใช้วัตถุดิบในการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก พบว่า ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จากไวน์ข้าวโพดด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 เท่ากับ 10.1% ภายในระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส ในถังหมักระบบหมุนวนเซลล์

ระบบการหมุนวนน้ำหมักในถังหมักระบบยกอากาศมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม *Acetobacter aceti* WK (ซึ่งต่อไปจะเรียกว่า หัวเชื้อน้ำส้ม WK)" โดยที่อัตราการหมุนวนน้ำหมัก 200 L/h ให้ผลดีที่สุด ในขณะที่การให้ออกซิเจนเข้าไปในถังหมักเพื่อรักษาระดับค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ในน้ำหมักไม่มีผลต่อการปรับตัวของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ตรึงบนใยบวบ

การตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" บนใยบวบ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดอะซิติกในระบบการหมักน้ำส้มสายชูในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส โดยช่วยลดระยะเวลาในการผลิตกรดอะซิติกความเข้มข้นประมาณ 6% จาก 14-15 วัน ในสภาพที่ไม่มีการตรึงเซลล์ เป็น 6-9 วัน ในสภาพที่มีการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK"

การศึกษาการเพิ่มแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูหมักในลักษณะ Fed-batch fermentation ด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" บนใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส พบว่า **สภาพที่มีการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" บนใยบวบ** ทำให้สามารถที่ผลิตกรดอะซิติกในระบบ Fed-batch ได้ถึง 2 ครั้ง ใช้ระยะเวลาการเปลี่ยนแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง 2% เท่ากับ 4 วัน

เอกสารนี้เป็นการเผยแพร่เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถทำการผลิตกรดอะซิติกได้เพิ่มขึ้นจาก 6.2% เป็น 7.5-7.8% ภายในระยะเวลา **20-21 วัน** ขณะที่ในสภาพที่ไม่ตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถที่จะผลิตกรดอะซิติกในระบบ Fed-batch ได้เพียง 1 ครั้งเท่านั้น ระยะเวลาที่แอลกอฮอล์ลดลงจาก 3.5% ถึง 2% เท่ากับ 6 วัน สามารถทำการผลิตกรดอะซิติกได้เพิ่มขึ้นจาก **6.2% เป็น 7.6%** ภายในระยะเวลา **36 วัน** เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพการผลิตจึงสรุปว่าระบบ Fed-Batch ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในระบบการหมักนี้

ผลการศึกษาถึงอัตราในการดึงน้ำหมักออกจากถังหมักในระหว่างการผลิตกรดอะซิติกในการหมักน้ำส้มสายชูด้วยระบบ Semi-continuous fermentation ด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ตรึงด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส พบว่า อัตราการดึงน้ำหมักที่ 50% สามารถสร้างกรดอะซิติกได้ 6.8-7.2% ภายในระยะเวลา 4-5 วัน โดยมีค่าอัตราการสร้างกรดที่สูงที่สุดอยู่ในช่วง 0.0183%/h ถึง 0.0260 %/h ทั้งนี้เนื่องจากสภาพการหมักดังกล่าวทำให้ปริมาณเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงบนใยบวบมีปริมาณสูงสุด

ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการขยายขนาดการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบในถังหมักระบบยกอากาศในระดับกึ่งโรงงาน ควรมีปริมาตรถังหมักอย่างต่ำ 600 ลิตร อัตราหมุนวนน้ำหมักต่ำสุดเท่ากับ 200 L/h ปริมาณใยบวบเท่ากับ 20-30% w/v ไม่จำเป็นต้องมีระบบการให้อากาศ ใช้ระบบการหมักแบบ Semi-continuous fermentation โดยอัตราการดึงน้ำหมัก / อัตราการให้ไวน์ใหม่ (Discharging rate / Charging rate) เท่ากับ 40-50%

Corn wine containing 10.1% v/v was prepared as substrate for vinegar fermentation. It was fermented by the yeast, *Saccharomyces cerevisiae* M30, for 5 d at 30-32°C by using recycle cell fermenter.

In this study, the **airlift fermenter with mash recycle (AF-MR)** was used for acetic acid production by the starter, *A. aceti* WK. The 200 L/h of mash recycle was recommended. In case of oxygen supply to the fermenting mash for maintaining the dissolved oxygen (DO) in fermenting mash, no effect of oxygen supply on adaptation of *A. aceti* WK fixed on surface of luffa sponge was found.

Immobilized cells of *A. aceti* WK on surface of luffa sponge (ICA-Luffa) could support the increase of acidification efficiency by AF-MR with 200 L/h of mash recycle at 30-32°C. Based on 6% acetic acid production, the 6-9 d of fermenting period was found in **ICA-Luffa** instead of 14-15 d by no **ICA-Luffa** condition.

The supply of alcohol during **fed-batch fermentation** of vinegar was studied by using **ICA-Luffa** in **AF-MR.** It was found that twice cycles of fed-batch was able to conduct within 20-21 d. The acetic acid was up from 6.2% to 7.5-7.8%. On the other hand, only one cycle of fed-batch fermentation was consumed for 36 d by **no ICA-Luffa process.** The acetic acid was increased from 6.2 to 7.6%. Finally, the fed-batch fermentation in **AF-MR** was not suitable for this study based on its more production period consumed.

The **semi-continuous fermentation** was designed for this vinegar production using **ICA-Luffa** in **AF-MR.** The suitable discharged rate was 50%. The 6.8-7.2% acid was produced within 4-5 d. The higher acetification rate (ETA) was 0.0183%/h to 0.0260 %/h when compared with the **ICA-Luffa** in stirred tank reactor as previously reported by Krusong *et al.* (2010). This was due to the high amount of free cells and immobilized cells of *A. aceti* WK in this fermentation process, the **ICA-Luffa** in **AF-MR.**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Factors concerning the scale-up of this vinegar pilot production process by **ICA-Luffa** in **AF-MR** was designed. The recommended factors was as follows: size of **AF-MR,** 600 L; rate of mash recycle, min. 200 L/h; amount of luffa sponge, 20-30%w/v; fermentation system, semi-continuous; discharging rate / charging rate, 40-50%.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	3
บทนำ	10
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	10
วิธีการทดลอง	13
ผลการทดลอง	17
การผลิตไวน์ข้าวโพด	17
ผลของการให้ออกซิเจนต่อการลดระยะแลค (Lag phase) ของการปรับสภาพเซลล์เมื่อเริ่มต้นระบบการหมักในระบบการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบ	17
ผลของการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในระบบการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบ	20
ผลของการเติมสารอาหารต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในระบบการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบ	21
ผลของใยบวบต่อปริมาณของน้ำหมักที่ดึงออกด้วยระบบ Semi-continuous fermentation ในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมัก	22
ต้นแบบกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เพื่อการขยายขนาดการผลิตเป็นระดับกึ่งโรงงาน	24
สรุปผลการทดลอง	25
บรรณานุกรม	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อัตราการสร้างกรด (Acidification rate) ของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ในน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโพดที่หมักด้วยระบบ Semi-continuous fermentation ในถังหมักระบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส จำนวน 11 รอบของการหมัก	23
2	ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการขยายขนาดการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบในถังหมักระบบยกอากาศ	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของใยบวบที่ใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ “หัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK” : (ก) ลักษณะต้นและผลบวบหอม; (ข) ใยบวบที่ตัดพร้อมใช้งาน; (ค) ใยบวบที่แช่ในน้ำส้มสายชูความเข้มข้นกรด 4%	13
2	รูปแบบของระบบการหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมัก : (1) ถังหมักขนาด 10 ลิตร; (2) ปั๊ม; (3) อุปกรณ์ควบคุมอัตราการหมุนวนน้ำหมัก; (4) อุปกรณ์กระจายน้ำหมัก; (5) ถังก๊าซออกซิเจน; (6) ชุดกรองอากาศ; (7) เครื่อง Oxygen Amplifier Model 170; (8) DO Probe	14
3	ลักษณะและอุปกรณ์ประกอบถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมัก : (ก) ถังหมักที่ติดตั้งอุปกรณ์พร้อมใช้งาน; (ข) อุปกรณ์กระจายน้ำหมักบริเวณส่วนบนของถังหมัก; (ค) อุปกรณ์ปรับปริมาณอากาศ / ออกซิเจน	15
4	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณน้ำตาล ค่า pH และค่าความเป็นกรดในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโพดด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	17
5	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโพดด้วย “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมัก ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส: ♦ Alc No, การหมักในสภาพนิ่งไม่มีการหมุนวนน้ำหมัก; ■ Alc 150 L/h, การหมักในสภาพหมุนวนน้ำหมักอัตรา 150 L/h; ▲ Alc 175 L/h, การหมักในสภาพหมุนวนน้ำหมักอัตรา 175 L/h; X Alc 200 L/h, การหมักในสภาพหมุนวนน้ำหมักอัตรา 200 L/h	18
6	ใยบวบและการตรึง “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” บนใยบวบเมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนด้วยเครื่อง JEOL รุ่น JSM-5410 LV Japan : (ก) ลักษณะใยบวบ (กำลังขยาย 350 เท่า); (ข) เซลล์ของ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ที่ตรึงอยู่บนผิวของใยบวบ (กำลังขยาย 3500 เท่า)	18
7	ลักษณะของใยบวบขณะที่อยู่ในน้ำหมักในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโพดด้วยการตรึง “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส : (ก) ใยบวบในน้ำหมัก; (ข) น้ำหมักที่ติดอยู่ที่ใยบวบภายหลังจากนำขึ้นมาจากน้ำหมัก	19
8	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรด แอลกอฮอล์ และค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโพดด้วยการตรึง “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส: (ก) ปริมาณกรดและแอลกอฮอล์; ♦ AA No O, ปริมาณกรดในสภาพที่ไม่มีการให้ออกซิเจน; ■ Alc No O, ปริมาณแอลกอฮอล์ในสภาพที่ไม่มีการให้ออกซิเจน; ▲ AA O supply, ปริมาณกรดในสภาพที่มีการให้ออกซิเจน; X Alc O supply, ปริมาณแอลกอฮอล์ในสภาพที่มีการให้ออกซิเจน; (ข) ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ใน; ■ O supply, ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ในสภาพที่มีการให้ออกซิเจน; ♦ No O, ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ในสภาพที่ไม่มีการให้ออกซิเจน	19
9	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในการหมักน้ำส้มสายชูด้วย “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ที่ตรึงและไม่ตรึงด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส: ♦ Acidity, ปริมาณกรดในสภาพที่ไม่ตรึงเซลล์; ■ Alcohol, ปริมาณแอลกอฮอล์ในสภาพที่ไม่ตรึงเซลล์; ▲ Acidity LS, ปริมาณกรดในสภาพที่มีการตรึงเซลล์; X Alcohol LS, ปริมาณแอลกอฮอล์ในสภาพที่มีการตรึงเซลล์	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ หน้า

10 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในการหมักน้ำส้มสายชูด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ตรึงและไม่ตรึงด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส โดยอาศัยการเติมแอลกอฮอล์แบบ Fed batch fermentation: ♦ Acidity, ปริมาณกรดในสภาพที่ไม่ตรึงเซลล์; ■ Alcohol, ปริมาณแอลกอฮอล์ในสภาพที่ไม่ตรึงเซลล์; ▲ Acidity LS, ปริมาณกรดในสภาพที่มีการตรึงเซลล์; X Alcohol LS, ปริมาณแอลกอฮอล์ในสภาพที่มีการตรึงเซลล์ 21

11 การผลิตกรดอะซิติกด้วยระบบ Semi-continuous fermentation ในการหมักน้ำส้มสายชูด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ตรึงด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส: (ก) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดและแอลกอฮอล์; (ข) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์อิสระและเซลล์ที่ตรึงของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" บนใยบวบ; 40%, 50% และ 60% คือ อัตราในการดึงผลิตภัณฑ์ออก / การเติมน้ำไวน์ใหม่เข้าไปในถังหมัก; FC = Free cells (เซลล์อิสระ); IC = Immobilized cells (เซลล์ที่ตรึงบนใยบวบ) 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

สืบเนื่องจากผู้วิจัยได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 เป็นต้นมา ทำให้เกิดองค์ความรู้ตั้งแต่การคัดเลือก พัฒนา และเก็บรักษาหัวเชื้อน้ำส้มสายชู ซึ่งหัวเชื้อที่ได้พัฒนาขึ้นประกอบด้วยเชื้อ *Acetobacter aceti* สป5 และ *A. aceti* WK (ที่สามารถใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมได้แล้ว) รวมถึงองค์ความรู้เกี่ยวกับกระบวนการผลิตในถังหมักประเภทต่างๆ เช่น ถังหมักแบบให้อากาศ (Airlift fermenter) ถังหมักแบบมีใบพัดกวน (Stirred tank reactor) ถังหมักแบบหมุนวนน้ำหมัก (Recycled mash reactor) และ ถังหมักที่มีการกวนในอัตราสูง (High speed agitation) โดยมีเป้าหมายในการพัฒนาองค์ความรู้ของกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูเพื่อเชิงพาณิชย์ในระดับวิสาหกิจชุมชน ระดับกึ่งโรงงาน (Pilot scale) และระดับโรงงาน (Commercial scale) เป็นสำคัญ อย่างไรก็ตามเพื่อเพิ่มแนวทางเลือกที่เหมาะสมต่อขนาดการผลิตของแต่ละระดับรวมถึงการเลือกใช้วัสดุธรรมชาติมาใช้ในกระบวนการผลิต ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการพัฒนากระบวนการผลิตโดยเลือกใช้การตรึงเซลล์แบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติก (Acetic Acid Bacteria) บนใยบวบ (Luffa sponge) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาของผู้วิจัยพบว่า ใยบวบเป็นพืชที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์ดังกล่าว (Krusong *et al.*, 2007; 2010) แต่ประสิทธิภาพในการผลิตกรดอยู่ในเกณฑ์ 4-5% ภายในระยะเวลา 9-10 วัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกจากเชื้อ *A. aceti* WK ที่ตรึงอยู่บนใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศขนาด 10 ลิตร และสามารถดำเนินการผลิตในลักษณะ Semi-continuous fermentation ได้อย่างดี รวมถึงเป็นต้นแบบในการขยายขนาดการผลิตเป็นระดับกึ่งโรงงานต่อไป

ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกของเชื้อ *A. aceti* WK ในระบบการตรึงเซลล์บนใยบวบด้วย 2 วิธี วิธีแรก คือการให้ออกซิเจนโดยจะมุ่งเน้นผลของการให้อากาศในช่วงของการปรับสภาพเซลล์ในช่วงเริ่มต้นการหมักและผลของการให้อากาศในช่วงการหมักน้ำส้มสายชู ส่วนวิธีที่สองจะอาศัยการเติมสารอาหารในช่วงของการหมักในลักษณะของการหมักแบบ Fed batch fermentation

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ประกอบด้วย

1. ศึกษาผลของการให้ออกซิเจนต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกจากเชื้อ *A. aceti* WK ที่ตรึงอยู่บนใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศขนาด 10 ลิตร
2. ศึกษาผลของการให้สารอาหารต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกจากเชื้อ *A. aceti* WK ที่ตรึงอยู่บนใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศ
3. ผลของใยบวบต่อปริมาณของน้ำหมักที่ดึงออกด้วยระบบ Semi-continuous fermentation ในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมัก
4. กำหนดต้นแบบกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบการตรึงเซลล์เชื้อ *A. aceti* WK เพื่อการขยายขนาดการผลิตเป็นระดับกึ่งโรงงาน

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ดำเนินการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกของ "หัวเชื้อ *A. aceti* WK" ที่ตรึงเซลล์บนใยบวบในถังหมักยกอากาศ (Airlift fermenter) ที่มีระบบการหมุนวนของน้ำหมักต้นแบบขนาด 10 ลิตร (ทำจากสแตนเลส 304) โดยอาศัยการให้ออกซิเจน และการให้สารอาหาร รวมถึงการหมักในระบบ Semi-continuous fermentation และการกำหนดปัจจัยในการขยายขนาดการผลิตเป็นระดับกึ่งโรงงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

น้ำส้มสายชูหมักเกิดจากขั้นตอนการหมัก 2 ขั้นตอน ประกอบด้วย การหมักวัตถุดิบที่มีแป้งหรือน้ำตาลเป็นองค์ประกอบให้เป็นไวน์ด้วยเชื้อยีสต์ในสภาพที่ไม่มีอากาศ และขั้นตอนการหมักไวน์ที่ได้ในขั้นตอนแรกด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* ในสภาพที่ให้อากาศ (Adams, 1998)

ตามปกติแล้วการตรึงเซลล์ (Cell immobilization) เป็นเทคนิคในการเซลล์จุลินทรีย์ไว้กับตัวกลาง (Support) การตรึงเซลล์นิยมใช้ในการปรับปรุงกระบวนการหมักเนื่องจากช่วยในการเพิ่มชีวมวล (Biomass) ความสามารถในการใช้ซ้ำ (Reusability) รวมถึงการป้องกันเซลล์จากผลกระทบเชิงลบจากปัจจัยต่างๆซึ่งประกอบด้วยค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำ หรืออุณหภูมิ หรือ สารยับยั้ง (Inhibitors) (Brodelius and Vndamme, 1987) นอกจากนี้การตรึงเซลล์ยังเป็นขั้นตอนเบื้องต้นที่ช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์ใส สำหรับตัวอย่างของตัวกลางที่ได้มีการนำมาใช้ เช่น Monolithic support (European Patent EP0121981, 1981), Porous cellulose carrier (Sakurai *et al.*, 2000), Chitosan-treated polypropylene (Krishnan *et al.*, 2001), Fibrous inert support (WO/2002/068578, 2002) และ Polyurethane-based material (Romaskevic *et al.*, 2006) ขณะเดียวกันตัวกลางที่มีราคาถูกซึ่งสามารถช่วยลดต้นทุนของกระบวนการผลิต และเป็นสารธรรมชาติที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายภายหลังจากการใช้ก็ได้รับความสนใจมากเช่นกัน ตัวอย่างของตัวกลางในประเภทหลังนี้ อาทิ เช่น เศษไม้ (de Ory, 2003) ชานอ้อย (Kocher *et al.*, 2006) และใยบวบ (Ogbonna *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999; Hamdy, 2001; Akhtar *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Pekdemir *et al.*, 2003; Vignoli *et al.*, 2006; Ganguly *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2007; Krusong *et al.*, 2007, 2010)

บวบเป็นพืชตระกูลแตง จัดอยู่ใน Order: Cucurbitales, Family: Cucurbitaceae มีชื่อจีนัสว่า *Luffa* spp. (http://encyclopedia.thefreedictionary.com/dishcloth_gourd) สำหรับในประเทศไทยนั้นแต่เดิมส่วนใหญ่จะปล่อยให้บวบเลื้อยตามรั้วหรือปล่อยให้เลื้อยพันไปตามต้นไม้ แล้วคอยเก็บผลอ่อนมารับประทานเป็นผัก ส่วนบวบที่ไม่ได้เก็บจะปล่อยจนแก่แห้งเหลือแต่เป็นเส้นใยที่เรียกว่า "รังบวบ" หรือ "ใยบวบ" บวบที่สามารถปลูกในประเทศไทยประกอบด้วย บวบเหลี่ยม บวบงู และบวบหอม ทั้งนี้บวบเหลี่ยม (*Luffa acutangular* Roxb.) มีชื่อสามัญว่า Angeld loofah เป็นไม้เถาอายุปีเดียว ผลของบวบมีรูปทรงกระบอกมีเหลี่ยมตามความยาวของผล ขณะที่บวบงู (*Trichosanthes anguina* Linn.) มีชื่อสามัญว่า Snake gourd ผลลักษณะกลมยาวปลายผลแหลม ผิวเรียบ มีแถบสีขาวสลับเขียวทั้งผล เมื่อสุกมีสีส้มแดง ส่วนบวบหอม (*L. cylindrica* Roem.) มีชื่อสามัญว่า Smooth loofah หรือ Sponge gourd vegetable sponge ผลอ่อนสีเขียวมีลายเขียวเข้ม ผลแก่สีเขียวออกเหลืองจนถึงสีน้ำตาล มีเส้นใยเหนียวลักษณะเป็นร่างแห (สิริกุล, 2548; http://www.geocities.com/ dordek1/ Thailand_d5htm) ในต่างประเทศอาจเรียกบวบในลักษณะต่างๆ เช่น Dishcloth gourd (http://www.thefreedictionary.com/ dishcloth+gourd; http://ecobites.com/component/content/839? task =view), Chinese okra (http://plantanswers.tamu.edu/ vegetables/Chineseo.html) หรือ "Luffa sponge" ใยบวบนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ตั้งแต่ใช้ผลอ่อนมาประกอบอาหารโดยนิยมบริโภคในประเทศแถบเอเชียซึ่งรวมถึงประเทศไทย ขณะที่เส้นใยในผลแก่จะถูกนำมาใช้แทนฟองน้ำในการขัดตัวขณะอาบน้ำ หรือ ใช้เป็นอุปกรณ์ล้างจาน (Washing items) หรือ สบู่ใยบวบ (Luffa soap) นอกจากนี้แล้วยังมีการทำใยบวบให้เป็นผงและใช้เป็นยาจีน (Chinese herbal medicine) ด้วย (http://www.luffa.info/)

ใยบวบได้ถูกเลือกให้เป็นตัวกลางเพื่อใช้ในการตรึงเซลล์ โดยเรียกว่าเป็น "Fibrous support" เนื่องจากโครงร่างที่เป็นเส้นใย ใยบวบที่นิยมใช้ในงานนี้ คือ ใยบวบหอม (*L. cylindrica*) และมักนิยมเรียกชื่อสามัญว่า "Loofa sponge" ทั้งนี้การประยุกต์ใช้ใยบวบมีหลากหลาย เริ่มตั้งแต่การผลิตผลิตภัณฑ์และการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในกระบวนการหมัก ดังเช่น การหมักแอลกอฮอล์โดยการตรึงเชื้อยีสต์ *Candida brassicae* (Ogbonna *et al.*, 1997) การตรึงสปอร์ของเชื้อรา *Penicillium cyclopium* NRRL 6233 เพื่อผลิต Compactin ซึ่งเป็นสาร Hypocholesteremic agent (Hamdy, 2001; US Patent 6261811) การตรึงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อผลิตไวน์และเบียร์ที่ใส (WO/2002/068578) การตรึงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* RBU2-10 เพื่อผลิตกรดแลคติก (Ganguly, 2006) การตรึงเซลล์ยีสต์ *Zymomonas mobilis* เพื่อผลิตซอบิทอล (Vignoli *et al.*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2006) และการตรึงเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* WK เพื่อผลิตน้ำส้มสายชูจากข้าวโพด (Krusong *et al.*, 2007; 2010) นอกจากนี้ยังมีการนำใยบวบ (Loofa sponge) ไปใช้ในทางการแพทย์ เช่น การเคลือบสารฆ่าเชื้อ (Germicide) บนใยบวบ (WO/2000/006210) การใช้ใยบวบเพื่อเป็นอุปกรณ์ในการรักษาความสะอาดในช่องปาก เพื่อช่วยลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เคลือบอยู่ที่ผิวฟันโดยใช้แทนแปรงสีฟัน (Schwartz *et al.*, 2007) ใยบวบยังมีการนำมาใช้ในงานที่เกี่ยวกับสิ่งแวดล้อมดังเช่น การเพิ่มประสิทธิภาพสารฆ่าสาหร่าย (Algicidal agent) ด้วยการตรึงแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* HYK0210-SK09 ที่มีฤทธิ์ในการสร้างสารฆ่าสาหร่าย *Stephanodiscus hantzschii* (Kang *et al.*, 2007) การใช้ใยบวบในการดึงโลหะหนักจากน้ำเสีย เช่น แคดเมียม (Akhtar *et al.*, 2003) และประจุเฟอรัส (Ferrous ion) (Pekdemir *et al.*, 2003) รวมถึงการใช้ใยบวบเป็นตัวกลางที่ใช้ในระบบการหมักมีเธน (Yang *et al.*, 2004) เป็นต้น

สำหรับกระบวนการตรึงเซลล์ได้มีการนำใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกโดยเรียกว่า "กระบวนการ Quick process" ซึ่งอาศัยหลักการในการเลือกใช้วัสดุประเภท Inert material เพื่อช่วยยึดเซลล์ของแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติก (Acetic acid bacteria) วัสดุต่างๆที่เลือกใช้ประกอบด้วย Ceramic support (Ghommidh *et al.*, 1982a, 1982b), เศษไม้ (de Ory *et al.*, 2003), ชานอ้อย (Kocher *et al.*, 2006) และใยบวบ (Krusong *et al.*, 2007; 2010) เป็นต้น อย่างไรก็ตามประเด็นปัญหาของกระบวนผลิตด้วยการตรึงแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติกด้วยตัวกลางนี้ คือ ประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกที่ยังไม่สูงมาก ดังนั้น ในการวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกจากเชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* WK โดยอาศัยการตรึงบนใยบวบซึ่งผู้วิจัยได้พิสูจน์แล้วว่าสามารถใช้เป็นตัวกลางในการยึดเซลล์แบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ ในการศึกษาจะมุ่งเน้นที่การให้ออกซิเจนเข้าสู่ระบบ และการให้สารอาหารในลักษณะของ Fed batch fermentation ในถังหมักระบบยกอากาศและมีระบบหมุนวนน้ำหมักเป็นสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30

เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์ 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 ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2545-ปัจจุบัน ที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

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

การเตรียมใยบวบ

ใยบวบที่ใช้ในการทดลองมาจากบวบหอม (*Luffa cylindrica* Roem.; ภาพที่ 1ก) มีลักษณะเป็นใยแห้ง ใยบวบแห้งที่ใช้เป็นวัสดุตรึง (Supporting material) ของเซลล์ **"หัวเชื้อน้ำส้ม WK"** จะถูกตัดให้มีขนาดความหนา 2.5 ซม. (Krusong *et al.*, 2007; ภาพที่ 1ข) ก่อนที่จะนำไปล้างและฆ่าเชื้อด้วยการแช่ในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 4% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วราวุฒิ ครูส่ง, 2551)

ภาพที่ 1 ลักษณะของใยบวบที่ใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK" : (ก) ลักษณะต้นและผลของบวบหอม; (ข) ใยบวบที่ตัดพร้อมใช้งาน; (ค) ใยบวบที่แช่ในน้ำส้มสายชูความเข้มข้นกรด 4% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การผลิตไวน์จากข้าวโพด

ทำการหมักไวน์ข้าวโพดตามวิธีการของ วราวุฒิ ครูส่ง (2545) โดยใช้ข้าวโพด 5% ปรับสภาพความหวานในน้ำหมักเท่ากับ 20% pH เท่ากับ 5.5 และเติมแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05% และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.2% (ดัดแปลงจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kumnuanta and Vongsuvanlert, 1982) ทำการฆ่าเชื้อด้วยการต้มเดือดเป็นเวลา 30 นาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปหมักด้วย **"เชื้อยีสต์ M30"** เป็นเวลา 5-7 วัน ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส

เมื่อการหมักสิ้นสุดให้นำน้ำไวน์ที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการพาสเจอไรส์ก่อนที่จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักน้ำส้มสายชูต่อไป

การหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโพด

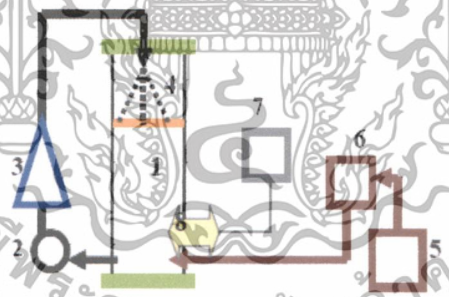
ทำการปรับสภาพน้ำไวน์ข้าวโพดด้วยน้ำส้มสายชูหมักให้มีความเข้มข้นของกรดอะซิติค 4.5% ปริมาณแอลกอฮอล์ 3.5% และเติมยีสต์สกัด 0.5% (วราวุฒิ ครูส่ง, Unpublished data) ก่อนที่จะถ่าย **"หัวเชื้อน้ำส้ม WK"** ที่ผ่านการปรับสภาพให้เหมาะสมกับไวน์ข้าวโพดแล้ว ทำการหมักในถังหมัก **"ระบบการหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมัก"** ขนาด 10 ลิตร ทำการหมักแบบ Semi-continuous fermentation ตามวิธีการของ Krusong *et al.* (2007) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Ebulliometer พร้อมทั้งวัดค่าความเป็นกรด (ในรูปของกรดอะซิติก) ด้วยการไตเตรชั่นตามวิธีการของ AOAC (1995) ตลอดระยะเวลาการหมัก

การออกแบบและปรับปรุงระบบการหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักเพื่อใช้ในการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบ

สืบเนื่องจากการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยดังแสดงใน Krusong *et al.* (2007) ได้ออกแบบระบบการหมักในถังหมัก Tower fermenter ขนาด 10 ลิตร ที่ทำจากพลาสติกแต่ให้ปริมาณกรดที่ไม่สูงนัก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องออกแบบและปรับปรุงถังหมักแบบยกอากาศ (Airlift fermenter) ที่มีการหมุนวนของน้ำหมักและเหมาะสมกับระบบบการให้ออกซิเจนและการให้สารอาหารเข้าไปในระบบการหมัก ถังหมักที่ใช้ทำจากสแตนเลส 304 ขนาด 10 ลิตร

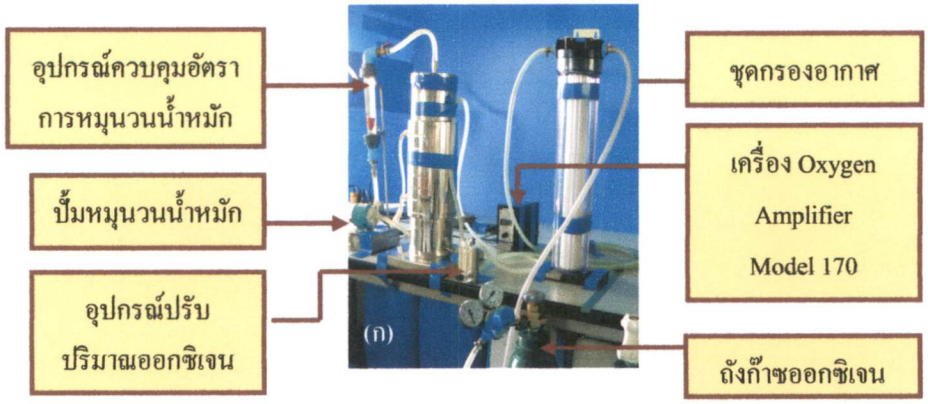
สำหรับภาพที่ 2 แสดงให้เห็นรูปแบบของระบบการหมักที่ได้รับการออกแบบ

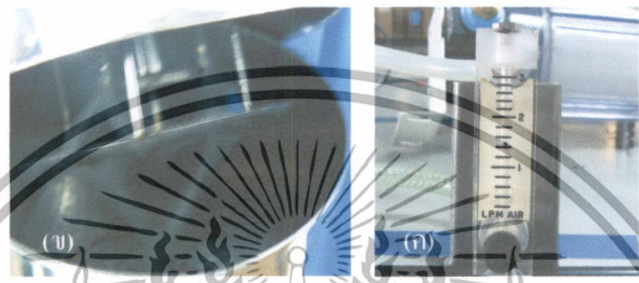


ภาพที่ 2 รูปแบบของระบบการหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมัก : (1) ถังหมักขนาด 10 ลิตร; (2) ปั๊ม; (3) อุปกรณ์ควบคุมอัตราการหมุนวนน้ำหมัก; (4) อุปกรณ์กระจายน้ำหมัก; (5) ถังก๊าซออกซิเจน; (6) ชุดกรองอากาศ; (7) เครื่อง Oxygen Amplifier Model 170; (8) DO Probe

การติดตั้งอุปกรณ์ของถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมักแสดงอยู่ในภาพที่ 3ก ทั้งนี้อากาศ / ออกซิเจนที่ส่งเข้าถังหมักจะผ่านการกรองก่อนที่จะผ่านการปรับด้วยอุปกรณ์ปรับปริมาณอากาศ / ออกซิเจน (ภาพที่ 3ค) อากาศจะถูกนำเข้าทางด้านล่างของถังเพื่อให้อากาศในระบบยกอากาศ (Airlift) ขณะเดียวกันน้ำหมักภายในถังจะถูกดูดออกจากถังหมักด้วยปั๊มก่อนที่จะผ่านอุปกรณ์ควบคุมอัตราการหมุนวนน้ำหมักเพื่อปรับอัตราการหมุนวนน้ำหมักกลับเข้าไปสู่ด้านบนของถังหมัก เมื่อน้ำหมักถูกปั๊มขึ้นด้านบนแล้วจะถูกพ่นผ่านอุปกรณ์กระจายน้ำหมัก (ภาพที่ 3ข) ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นตะแกรงเจาะรู เพื่อกระจายน้ำหมักให้สัมผัสกับอากาศบริเวณด้านบนของถัง อนึ่งปริมาณอากาศ / ออกซิเจนในระบบจะวัดด้วยค่าปริมาณอากาศที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen; DO) ด้วยเครื่อง Oxygen Amplifier Model 170 โดยมีหัววัด (DO probe) ติดตั้งอยู่ที่ถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





ภาพที่ 3 ลักษณะและอุปกรณ์ประกอบถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมัก : (ก) ถังหมักที่ติดตั้งอุปกรณ์พร้อมใช้งาน; (ข) อุปกรณ์กระจายน้ำหมักบริเวณส่วนบนของถังหมัก; (ค) อุปกรณ์ปรับปริมาณอากาศ / ออกซิเจน

ผลของการให้ออกซิเจนต่อการลดระยะแลค (Lag phase) ของการปรับสภาพเซลล์เมื่อเริ่มต้นระบบการหมักในระบบการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบ

ทำการศึกษาระยะเวลาในการให้ออกซิเจนต่อปรับสภาพของเซลล์ของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดอะซิติกและผ่านการคัดเลือกและปรับสภาพจากผู้วิจัยเป็นเวลานานมากกว่า 7 ปี อย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้ระยะเวลาในการให้ออกซิเจนจะเป็นช่วงๆ โดยมุ่งเน้นที่การควบคุมค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO) ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการปรับตัวของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู

อนึ่งทำการหมักโดยอาศัยการตรึงหัวเชื้อน้ำส้มสายชูบนใยบวบตามวิธีการของ Krusong *et al.* (2007)

ผลของการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในระบบการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบ

นำผลของการศึกษาผลของการให้ออกซิเจนต่อการลดระยะแลค (Lag phase) ของการปรับสภาพเซลล์เมื่อเริ่มต้นระบบการหมักในระบบที่มีและไม่มีการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบเพื่อพิจารณาถึงความจำเป็นที่ต้องเติมอากาศเข้าไปในระบบ

จากนั้นทำการหมักน้ำส้มสายชูในสภาพการศึกษาที่พิจารณาแล้ว โดยมุ่งเน้นประสิทธิภาพการเพิ่มผลผลิตกรดอะซิติกในระบบการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมัก

ผลของการเติมสารอาหารต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในระบบการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบ

ทำการศึกษาผลของการให้สารอาหารเพิ่มเติมในระหว่างขั้นตอนการหมักน้ำส้มสายชู โดยสารอาหารที่เลือกใช้ คือ แอลกอฮอล์ โดยในช่วงเริ่มต้นการหมักน้ำส้มสายชูจะทำการปรับความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration; TC) เท่ากับ 8 ซึ่งประกอบด้วย กรดอะซิติก 4.5% และ แอลกอฮอล์ 3.5% เมื่อทำการหมักไปจนถึงช่วงแอลกอฮอล์เหลือประมาณ 2% จึงทำการปรับแอลกอฮอล์ให้กลับมีความเข้มข้นเท่ากับ 3.5% อีกครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาในลักษณะนี้จะทำให้ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถใช้แอลกอฮอล์ (ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักสำหรับเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก) ที่มีความเข้มข้นที่สูงขึ้นได้

ผลของใยบวบต่อปริมาณของน้ำหมักที่ดึงออกด้วยระบบ Semi-continuous fermentation ในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมัก

นำผลการศึกษาในเรื่องการให้ออกซิเจนและการเพิ่มสารอาหารมาพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในถังหมักระบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมักของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ในสภาพที่มีการตรึงเซลล์หัวเชื้อน้ำส้มสายชูด้วยใยบวบ จากนั้นทำการศึกษาระบบการหมักในลักษณะ Semi-continuous fermentation ซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่นิยมใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในระดับอุตสาหกรรม

ต้นแบบกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบการตรึงเซลล์เชื้อ *A. aceti* WK เพื่อการขยายขนาดการผลิตเป็นระดับกึ่งโรงงาน

นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาออกแบบต้นแบบกระบวนการที่จำเป็นต้องคำนึงถึงเพื่อขยายขนาดการผลิตเป็นระดับกึ่งโรงงาน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) โดยวิธีวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS (Statistical Package for Social Science)

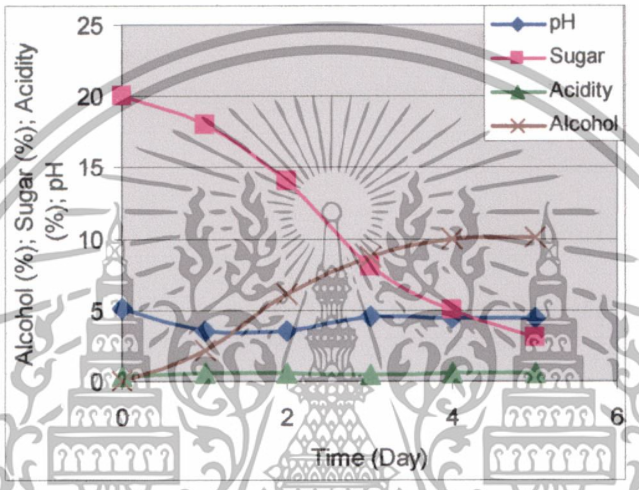
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลการทดลอง

การผลิตไวน์ข้าวโพด

ในการหมักไวน์ข้าวโพดตามวิธีของ Krusong *et al.* (2007; 2010) ด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 (**"เชื้อยีสต์ M30"**) ได้ผลการหมักดังแสดงในภาพที่ 4 พบว่า "เชื้อยีสต์ M30" สามารถทำการหมักได้อย่างรวดเร็วโดยสามารถผลิตไวน์ที่มีแอลกอฮอล์ 10.1% ภายใน 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (30-32 องศาเซลเซียส) อนึ่งการหมักไวน์ข้าวโพดนี้ทำในถังหมักระบบหมุนวนเซลล์ (Cell recycle reactor) เพื่อหมุนวนเซลล์ยีสต์ เนื่องจาก "เชื้อยีสต์ M30" เป็นยีสต์ตกตะกอน (Flocculating yeast) แต่การหมุนวนเซลล์นี้ต้องควบคุมมิให้มีการเพิ่มอากาศเข้าในซึ่งอาจจะกระทบต่อประสิทธิภาพการหมักไวน์ที่เป็นการหมักในสภาพที่ไม่ต้องการอากาศ



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณน้ำตาล ค่า pH และค่าความเป็นกรดในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโพดด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

ผลของการให้ออกซิเจนต่อการลดระยะแลค (Lag phase) ของการปรับสภาพเซลล์เมื่อเริ่มต้นระบบการหมักในระบบการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบ

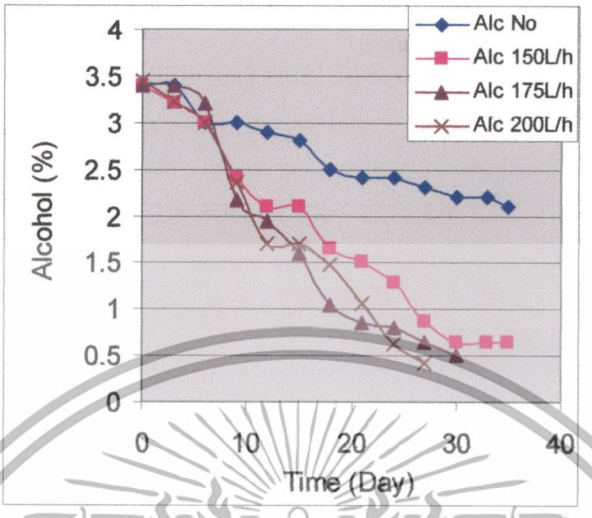
เนื่องจากในการศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในงานวิจัยนี้เลือกใช้ถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมัก (ภาพที่ 3) สามารถที่จะปรับการหมุนวนน้ำหมักได้ 3 อัตรา คือ (L/h) 150 175 และ 200 ดังนั้นจึงเริ่มทำการศึกษาถึงอัตราการหมุนวนน้ำหมักที่เหมาะสมที่มีต่อประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในการหมักน้ำส้มสายชูด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ทั้งนี้ทำการเปรียบเทียบกับการหมักในสภาพที่ไม่มีการหมุนวนน้ำหมัก

ในการหมักน้ำส้มสายชูโดยทั่วไปจะทำการติดตาม**การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์**ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักที่มีผลโดยตรงต่อปริมาณกรดอะซิติกที่จะถูกสร้างขึ้นด้วย "หัวเชื้อน้ำส้มสายชู" โดยที่การหมักที่ปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ในน้ำหมักประมาณ 0.5% ถือได้ว่าการหมักนั้นสมบูรณ์แล้ว ดังนั้นในการเปรียบเทียบผลของอัตราการหมุนวนของน้ำหมักต่อประสิทธิภาพของการหมักน้ำส้มสายชูจึงสามารถใช้การติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์มาใช้เป็นดัชนีได้ ดังนั้นอัตราหมุนวนที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแอลกอฮอล์ถึง 0.5% ได้ก่อน ถือว่าเป็นอัตราหมุนวนที่มีประสิทธิภาพการหมักสูงที่สุด

จากผลการทดลองที่แสดงในภาพที่ 5 พบว่า สภาพการหมักในถังหมักแบบยกอากาศที่วางนิ่ง ไม่มีการหมุนวนของน้ำหมักให้ผลของการเปลี่ยนแปลงแอลกอฮอล์ในเกณฑ์ที่ต่ำที่สุด **จึงสรุปเป็นเบื้องต้นได้ว่าระบบการหมุนวนน้ำหมักช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เป็นสำคัญ**

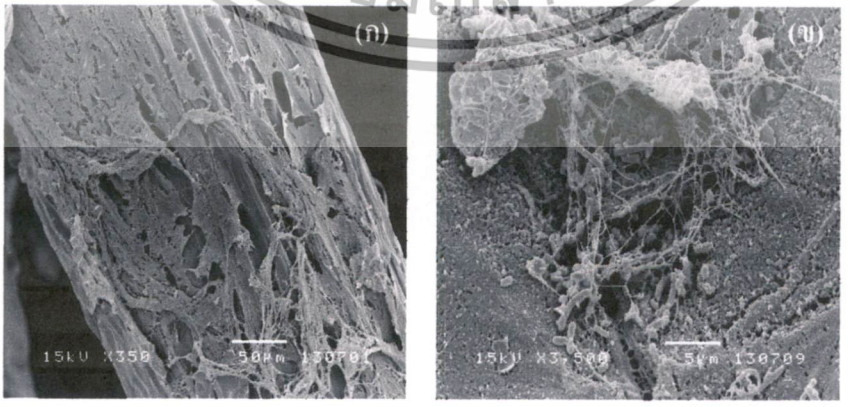
ลิขสิทธิ์นี้เป็นของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง ให้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
120323

สำหรับผลการศึกษาอัตราการหมุนวนน้ำหมักที่เหมาะสม พบว่า อัตราหมุนวนน้ำหมัก 200 L/h ช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแอลกอฮอล์เร็วที่สุด (27 วัน) รองลงคือ ที่อัตรา 175 L/h (30 วัน) และ 150 L/h (30 วัน) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า **อัตราการหมุนวนน้ำหมักที่เหมาะสมในการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโพดด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK"** คือ **"200 L/h"**



ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโพดด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมัก ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส: ◆ Alc No, การหมักในสภาพนิ่งไม่มีการหมุนวนน้ำหมัก; ■ Alc 150 L/h, การหมักในสภาพหมุนวนน้ำหมักอัตรา 150 L/h; ▲ Alc 175 L/h, การหมักในสภาพหมุนวนน้ำหมักอัตรา 175 L/h; X Alc 200 L/h, การหมักในสภาพหมุนวนน้ำหมักอัตรา 200 L/h

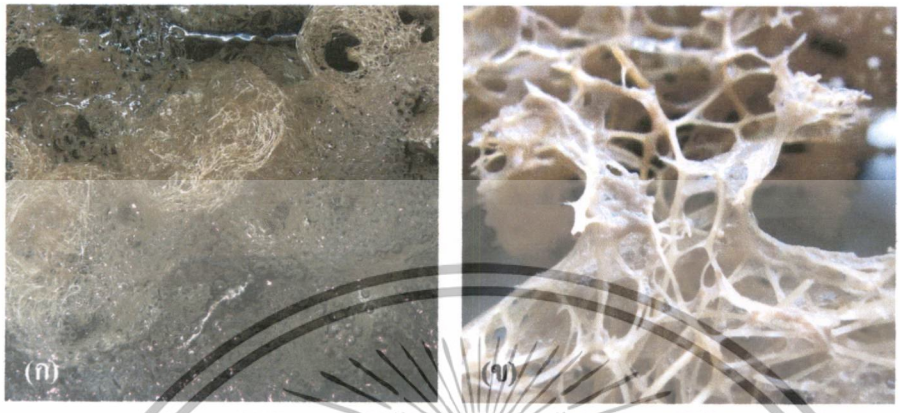
ในการศึกษาผลของการให้ออกซิเจนต่อการลดระยะแลค (Lag phase) ของการปรับสภาพเซลล์เมื่อเริ่มต้นการหมักน้ำส้มสายชูในระบบที่มีการตรึงและไม่ตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h นั้น จากการศึกษาของผู้วิจัยดังแสดงในรายงาน Krusong *et al.* (2007; 2010) พบว่า ใยบวบเป็นวัสดุธรรมชาติที่มีความเหมาะสมต่อการใช้เป็นวัสดุตรึง (Supporting material) ที่ดีสำหรับ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะของใยบวบมีพื้นที่ผิวที่ขรุขระและมีเส้นใยที่เหมาะต่อการยึดจับของเชื้อได้ดี (ภาพที่ 6ก) สำหรับภาพที่ 6ข แสดงให้เห็นถึงการยึดเกาะของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" บนพื้นผิวของใยบวบ



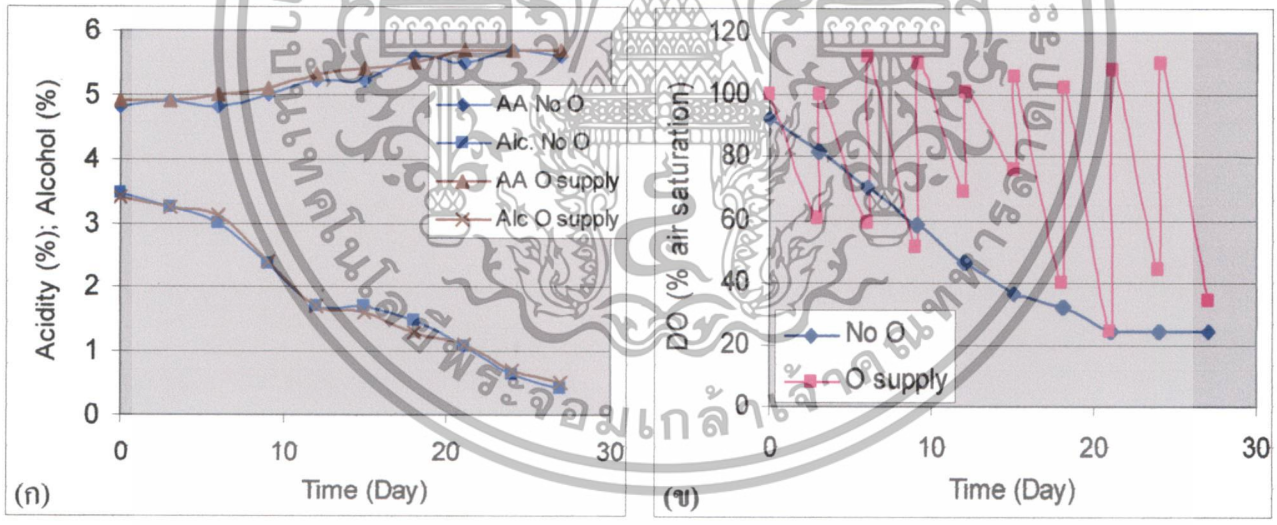
ภาพที่ 6 ใยบวบและการตรึง "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" บนใยบวบเมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนด้วยเครื่อง JEOL รุ่น JSM-5410 LV Japan : (ก) ลักษณะใยบวบ (กำลังขยาย 350 เท่า); (ข) เซลล์ของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ตรึงอยู่บนผิวของใยบวบ (กำลังขยาย 3500 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับลักษณะของใยบวบขณะที่อยู่ในน้ำหมักและน้ำหมัก (ที่มี "หัวเชื้อน้ำส้ม WK") ที่ติดอยู่กับใยบวบแสดงอยู่ในภาพที่ 7ก และ 7ข ตามลำดับ ขณะที่ภาพที่ 8ก และ 8ข แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรด แอลกอฮอล์ และค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ในระหว่างช่วงแรกของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโพด (ซึ่งเป็นระยะแลค; Lag phase) ด้วยการตรึง "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 7 ลักษณะของใยบวบขณะที่อยู่ในน้ำหมักในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโพดด้วยการตรึง "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส : (ก) ใยบวบในน้ำหมัก; (ข) น้ำหมักที่ติดอยู่ที่ใยบวบภายหลังจากนำขึ้นมาจากน้ำหมัก



ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรด แอลกอฮอล์ และค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโพดด้วยการตรึง "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส: (ก) ปริมาณกรดและแอลกอฮอล์; ♦ AA No O, ปริมาณกรดในสภาพที่ไม่มีการให้ออกซิเจน; ■ Alc No O, ปริมาณแอลกอฮอล์ในสภาพที่ไม่มีการให้ออกซิเจน; ▲ AA O supply, ปริมาณกรดในสภาพที่มีการให้ออกซิเจน; X Alc O supply, ปริมาณแอลกอฮอล์ในสภาพที่มีการให้ออกซิเจน; (ข) ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ใน; ■ O supply, ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ในสภาพที่มีการให้ออกซิเจน; ♦ No O, ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ในสภาพที่ไม่มีการให้ออกซิเจน

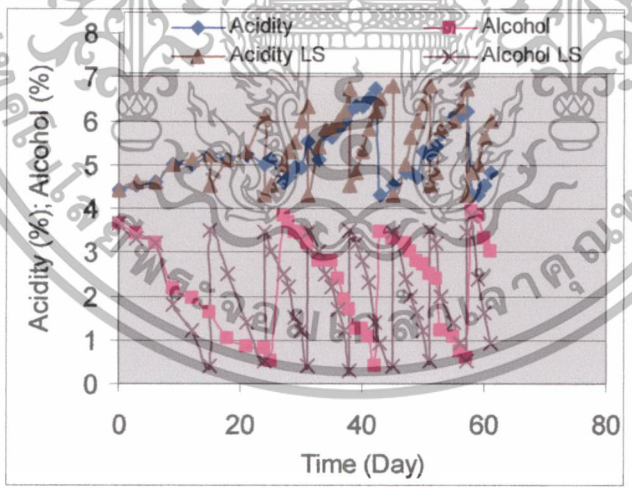
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 8ก พบว่า การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดและแอลกอฮอล์ในน้ำหมักทั้งสภาพที่มีและไม่มีการให้ออกซิเจนไม่มีความแตกต่างกัน อีกทั้ง "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ใช้ระยะเวลาในการปรับตัว (ระยะแลค; Lag phase) ที่เท่ากัน คือ 27 วัน ส่วนภาพที่ 8ข แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved oxygen, DO; วัดค่าในหน่วย % air saturation) ในสภาพที่มีการให้ออกซิเจนนั้นได้มีการปรับให้ค่า DO อยู่ในระดับสูง (100-120% air saturation) ตลอดช่วงของการปรับตัวของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ส่วนสภาพที่ไม่มีการให้ออกซิเจนมีค่า DO ลดลงอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตาม**ผลของการให้และไม่ให้ออกซิเจนลงในน้ำหมักให้ผลในการปรับตัวของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ใกล้เคียงกัน จึงสามารถสรุปได้ว่าการให้ออกซิเจนเข้าไปในถังหมักเพื่อรักษาระดับค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ในน้ำหมักไม่มีผลต่อการปรับตัวของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK"** แสดงว่า **ปริมาณอากาศ / ออกซิเจนในน้ำหมักในถังหมักระบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมักในอัตรา 200 L/h เพียงพอต่อการปรับตัวของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK"**

ผลของการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในระบบการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบ

แต่เดิมผู้วิจัยได้วางแผนในการศึกษาผลของการให้อากาศต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในระบบการตรึง "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบ แต่จากผลการศึกษาข้างต้น พบว่า การให้ออกซิเจนไม่มีผลต่อการลดระยะแลค (Lag phase) ของการปรับสภาพเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เมื่อเริ่มต้นระบบการหมัก ดังนั้นจึงได้มุ่งเน้นการศึกษาถึงการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในระบบการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมักที่อัตรา 200 L/h แทน อนึ่งในการศึกษานี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลของระบบการหมุนวนน้ำหมักทั้งในสภาพที่มีและไม่มีการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" บนใยบวบ

จากผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 9 แสดงให้เห็นถึง ผลดีของการใช้การตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบในถังหมักระบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักที่อัตรา 200 L/h



ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในการหมักน้ำส้มสายชูด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ตรึงและไม่ตรึงด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส: ♦ Acidity, ปริมาณกรดในสภาพที่ไม่ตรึงเซลล์; ■ Alcohol, ปริมาณแอลกอฮอล์ในสภาพที่ไม่ตรึงเซลล์; ▲ Acidity LS, ปริมาณกรดในสภาพที่มีการตรึงเซลล์; X Alcohol LS, ปริมาณแอลกอฮอล์ในสภาพที่มีการตรึงเซลล์

ในระบบการหมักน้ำส้มสายชูในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส พบว่า **ในสภาพที่ไม่มีการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" บนใยบวบ** "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถที่จะผลิตกรดอะ

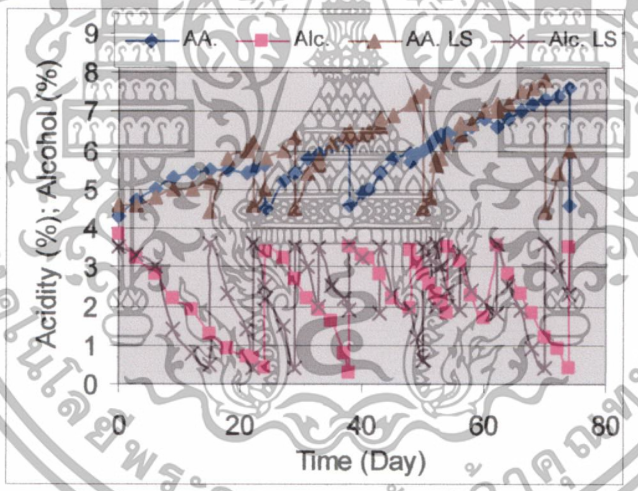
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซิติกได้ 6.2-6.7% ภายในระยะเวลา 14-15 วัน โดยสามารถทำการหมักได้ 3 รอบของการหมักในเวลาที่ทำการศึกษา 58 วัน ส่วนในสภาพที่มีการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" บนใยบวบนั้น พบว่า "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถที่จะผลิตกรดอะซิติกได้ 6.1-6.8% ภายในระยะเวลา 6-9 วัน โดยสามารถทำการหมักได้ 7 รอบของการหมักในเวลาที่ทำการศึกษา 58 วัน

จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า การตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตกรดอะซิติกในระบบการหมักน้ำส้มสายชูในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h

ผลของการเติมสารอาหารต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในระบบการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบ

สารอาหารหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดอะซิติกในการหมักน้ำส้มสายชู คือ แอลกอฮอล์ การศึกษานี้มุ่งเน้นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกโดยอาศัยการเพิ่มปริมาณแอลกอฮอล์ เนื่องจากการเติมแอลกอฮอล์ในปริมาณสูงตั้งแต่เริ่มต้นการหมักจะทำให้ความเข้มข้นโดยรวม (Total concentration; TC; ความเข้มข้นของกรดอะซิติกรวมกับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์) ของน้ำหมักสูงจะส่งผลกระทบต่อการผลิตกรดอะซิติกของแบคทีเรียอะซิติก ดังนั้นการเพิ่มแอลกอฮอล์ด้วยการเติมเป็นช่วง ๆ ที่เหมาะสมจะลดผลกระทบของ TC (จากการเพิ่มความเข้มข้นของแอลกอฮอล์) ลงได้ การดำเนินการเช่นนี้เรียกว่า การพัฒนากระบวนการหมักแบบ Fed-batch fermentation สำหรับการศึกษานี้ทำการเปรียบเทียบผลของการเติมแอลกอฮอล์ในระบบการหมักน้ำส้มสายชูในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส ทั้งในสภาพที่มีการตรึงและไม่ตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" บนใยบวบ ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในการหมักน้ำส้มสายชูด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ตรึงและไม่ตรึงด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส โดยอาศัยการเติมแอลกอฮอล์แบบ Fed batch fermentation: ♦ Acidity, ปริมาณกรดในสภาพที่ไม่ตรึงเซลล์; ■ Alcohol, ปริมาณแอลกอฮอล์ในสภาพที่ไม่ตรึงเซลล์; ▲ Acidity LS, ปริมาณกรดในสภาพที่มีการตรึงเซลล์; X Alcohol LS, ปริมาณแอลกอฮอล์ในสภาพที่มีการตรึงเซลล์

การเติมแอลกอฮอล์ในระบบการหมักแบบ Fed-batch fermentation จะเริ่มต้นภายหลังจาก "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ผ่านช่วงการปรับตัว (ช่วงแรก) และผ่านการผลิตกรดอะซิติกในรอบที่ 1-2 ของการหมักแล้ว ทั้งนี้เพื่อให้มั่นใจได้ว่า "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" มีความพร้อมที่จะสร้างกรดอะซิติกแล้ว ในรอบที่ทำการเติมแอลกอฮอล์ในลักษณะ Fed-batch นั้น จะเติมแอลกอฮอล์ในขณะที่แอลกอฮอล์ในน้ำหมักลดลงจาก 3.5% (ตอนเริ่มต้น) มาเป็น 2% แล้วจึงเติมแอลกอฮอล์เพื่อปรับให้แอลกอฮอล์มีปริมาณ 3.5% เช่นเดิม ทำเช่นนี้ 3 รอบ ในรอบที่ 3 จะควบคุมให้การหมักสิ้นสุด (แอลกอฮอล์ลดลงถึง 0.5%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองในภาพที่ 10 พบว่า ในสภาพที่ไม่มีการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" บนใยบวบ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถที่จะผลิตกรดอะซิติกในระบบ **Fed-batch ได้เพียง 1 ครั้ง** ระยะเวลาที่แอลกอฮอล์ลดลงจาก 3.5% ถึง 2% เท่ากับ 6 วัน สามารถทำการผลิตกรดอะซิติกได้พิ่มขึ้นจาก **6.2% เป็น 7.6%** ภายในระยะเวลา **36 วัน** ส่วนในสภาพที่มีการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" บนใยบวบนั้น พบว่า "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สามารถที่จะผลิตกรดอะซิติกในระบบ **Fed-batch ได้ถึง 2 ครั้ง** ระยะเวลาที่แอลกอฮอล์ลดลงจาก 3.5% ถึง 2% เท่ากับ 4 วัน สามารถทำการผลิตกรดอะซิติกได้พิ่มขึ้นจาก **6.2% เป็น 7.5-7.8%** ภายในระยะเวลา **20-21 วัน**

ผลการทดลองที่ได้นี้สามารถยืนยันถึง**ข้อดีของการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบที่สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตกรดอะซิติกในระบบการหมักน้ำส้มสายชูในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h**

อย่างไรก็ตามผลการศึกษาชี้บ่งว่าระบบ Fed-batch fermentation ที่อาศัยการเติมแอลกอฮอล์เป็นช่วง ๆ จำนวน 3 ช่วงนี้ สามารถ**ช่วยเพิ่มการสร้างกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นอีกประมาณ 1.2-1.4%** ทั้งในสภาพที่มีการตรึงและไม่ตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" แต่เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้ในช่วงการหมักดังกล่าว พบว่า **ระบบการหมักนี้ก่อให้เกิดความไม่คุ้มทุน เนื่องจากใช้ระยะเวลาที่มากขึ้น จำนวนรอบในการหมักลดลงย่อมส่งผลกระทบโดยตรงต่อปริมาณของน้ำส้มสายชูที่ผลิตได้** ดังนั้นจึงสรุปที่จะไม่ใช้ระบบ Fed-batch fermentation ในการศึกษาต่อไป

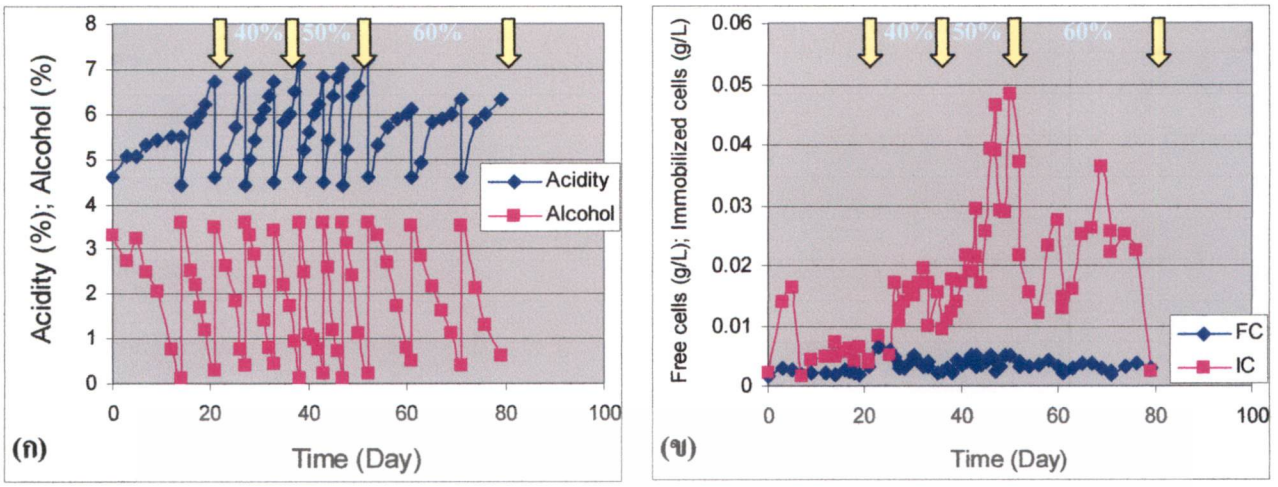
ผลของใยบวบต่อปริมาณของน้ำหมักที่ดึงออกด้วยระบบ Semi-continuous fermentation

จากแผนการทดลองเดิมได้ระบุที่จะทำการศึกษา "ผลร่วมของการให้อากาศ (ออกซิเจน) และการเพิ่มสารอาหารต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในระบบการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบ" แต่เมื่อพิจารณาถึงผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 8 และ 10 จึงสามารถสรุปว่าทั้งระบบการให้ออกซิเจนและระบบเติมแอลกอฮอล์ในลักษณะ Fed-batch fermentation ไม่เหมาะสมที่จะปฏิบัติในการหมักในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาในประเด็นของการใช้ใยบวบในการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สำหรับการหมักในระบบ Semi-continuous fermentation ที่นิยมใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมแทน ทั้งนี้ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 11ก และ 11ข

จากการศึกษาของผู้วิจัยที่ผ่านมาดังแสดงในรายงานของ Krusong *et al.* (2007) ได้ใช้ใยบวบในการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ในถังหมัก fermenter ขนาด 10 ลิตร และทำการหมักแบบ Semi-continuous fermentation สามารถใช้อัตราการดึงน้ำหมัก (หรือ ผลิตภัณฑ์; Discharging rate) ได้ถึง 40% ซึ่งจะต้องเติมไนน์ใหม่เข้าไปในถังหมัก (Charging rate) ในอัตราเดียวกัน อัตราการดึงน้ำหมักในระดับนี้สอดคล้องกับรายงาน Fregapane *et al.* (2001) และ de Ory *et al.* (2003) ขณะที่รายงาน Krusong *et al.* (2010) ระบุว่าอัตราการดึงน้ำหมักออกจากถังหมัก Stirred tank reactor ขนาด 50 ลิตร ในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูในระบบที่ใช้ใยบวบเป็นวัสดุตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เท่ากับ 30% เท่านั้น ดังนั้นในการหมักในถังหมักระบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักที่อัตรา 200 L/h นี้จึงทำการศึกษาถึงอัตราในการดึงน้ำหมักออกจากถังหมักในอัตรา 40% 50% และ 60% โดยไม่พิจารณาที่อัตรา 30% เนื่องจากให้ปริมาณของผลผลิตที่ต่ำจนเกินไป

ผลการศึกษาถึงอัตราในการดึงน้ำหมักออกจากถังหมักในระหว่างการผลิตกรดอะซิติกในการหมักน้ำส้มสายชูด้วยระบบ Semi-continuous fermentation ด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ตรึงด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส แสดงในภาพที่ 11ก และตารางที่ 1 พบว่า ที่อัตราการดึงน้ำหมัก **40%** สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ 6.7-7.1% ภายในระยะเวลา **5-7 วัน** (ระยะเวลาในการหมักระหว่างวันที่ 21-38) ขณะที่อัตราการดึงน้ำหมัก **50%** ได้กรดอะซิติก 6.8-7.2% ภายในระยะเวลา **4-5 วัน** (ระยะเวลาในการหมักระหว่างวันที่ 38-52) ส่วนอัตราการดึงน้ำหมัก **60%** ผลิตกรดอะซิติก 6.1-6.3% ภายในระยะเวลา **9-10 วัน** (ระยะเวลาในการหมักระหว่างวันที่ 52-79)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 การผลิตกรดอะซิติกด้วยระบบ Semi-continuous fermentation ในการหมักน้ำส้มสายชูด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ตรึงด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส: (ก) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดและแอลกอฮอล์; (ข) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์อิสระและเซลล์ที่ตรึงของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" บนใยบวบ; 40%, 50% และ 60% คือ อัตราในการดึงผลิตภัณฑ์ออก / การเติมน้ำไวน์ใหม่เข้าไปในถังหมัก; FC = Free cells (เซลล์อิสระ); IC = Immobilized cells (เซลล์ที่ตรึงบนใยบวบ)

ตารางที่ 1 อัตราการสร้างกรด (Acidification rate) ของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ในน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโพดที่หมักด้วยระบบ Semi-continuous fermentation ในถังหมักระบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส จำนวน 11 รอบของการหมัก

รอบการหมัก	อัตราการดึงน้ำหมัก[2] (%)	ปริมาณกรดเมื่อการหมักเริ่มต้น (%)	ปริมาณกรดเมื่อการหมักสิ้นสุด (%)	ระยะเวลาในการสร้างกรด (วัน)	Acidification rate[3] (%/h)
1[1]	-	4.6	5.5	14	0.0027
2	-	4.4	6.7	7	0.0137
3	40	4.6	6.9	6	0.0160
4	40	4.4	6.7	7	0.0137
5	40	4.5	7.1	5	0.0217
6	50	4.6	6.8	5	0.0183
7	50	4.5	7.0	4	0.0260
8	50	4.4	7.2	5	0.0233
9	60	4.6	6.1	9	0.0069
10	60	4.6	6.3	10	0.0071
11	60	4.6	6.3	10	0.0071

[1] รอบการหมักที่ 1 เป็นระยะเวลาที่ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ใช้ในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพการหมัก (Lag phase)

[2] อัตราการดึงน้ำหมัก (Discharging rate) คือ อัตราในการดึงน้ำหมักหรือผลิตภัณฑ์ออกจากถังหมักในระบบการหมักแบบ Semi-continuous fermentation

[3] Acidification rate (ETA) คำนวณจากปริมาณกรดที่สร้างขึ้นในรอบการหมักหารด้วยระยะเวลาที่ใช้ในการสร้างกรดในแต่ละรอบการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการติดตามปริมาณเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ทั้งในน้ำหมักที่เรียกว่า "เซลล์อิสระ (Free cells; FC)" และ "เซลล์ที่ถูกตรึงบนใยบวบ (Immobilized cells; IC)" ในการหมักน้ำส้มสายชูด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ตรึงด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส พบว่า การผลิตกรดอะซิติกได้มากสัมพันธ์โดยตรงกับทั้งเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงที่มีปริมาณสูงในน้ำหมักซึ่งสามารถสังเกตได้จากผลที่แสดงในภาพที่ 11ข ทั้งนี้**ปริมาณเซลล์อิสระในช่วงที่มีการดึงน้ำหมักออกจากถังหมักในอัตรา 50% มีปริมาณสูงที่สุด** รองลงมาได้แก่ที่อัตรา 40% และ 60% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม**ปริมาณของเซลล์ที่ถูกตรึงที่ระดับอัตรา 50% มีปริมาณสูงที่สุดเช่นกัน** รองลงมา คือ ที่ 60% ทั้งนี้เนื่องจากระยะการหมักที่นานขึ้นย่อมส่งผลให้มีปริมาณเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผิวของใยบวบเพิ่มมากขึ้น

เมื่อพิจารณาถึง**อัตราการสร้างกรด (Acidification rate; ETA)** ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า ที่อัตราการดึงน้ำหมักออกจากถังหมัก **50%** มีค่าอัตราการสร้างกรดที่สูงที่สุดอยู่ในช่วง **0.0183%/h** ถึง **0.0260 %/h** รองลงมา คือ ที่อัตรา 40% เท่ากับ 0.0137 %/h ถึง 0.0217 %/h ส่วนที่อัตราการดึงน้ำหมักออกจากถังหมัก 60% มีค่าอัตราการสร้างกรด 0.0069 %/h ถึง 0.0071 %/h ทั้งนี้เนื่องจากที่อัตราการดึงน้ำหมักจากถังหมักที่ 60% ทำให้ระบบการหมักสูญเสียสภาพสมดุลย์ของปริมาณเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่อยู่ในน้ำหมักทำให้ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" จะต้องใช้เวลาในการผลิตกรดอะซิติกที่นานขึ้นซึ่งส่งผลกระทบต่ออัตราการสร้างกรดที่ได้ อนึ่งอัตราการสร้างกรดที่ได้รับที่อัตราการดึงน้ำหมักออกจากถังหมัก 50% ถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่สูงโดยมีค่ามากกว่าที่ **"หัวเชื้อน้ำส้ม WK"** ผลิตได้ใน corn vinegar ที่ผลิตในสภาพที่มีใยบวบเป็นวัสดุตรึงเซลล์ในถังหมัก Stirred tank reactor ขนาด 50 ลิตร ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.0028%/h ถึง 0.0067%/h (Krusong *et al.*, 2010)

ต้นแบบกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เพื่อการขยายขนาดการผลิตเป็นระดับกึ่งโรงงาน

จากผลการทดลองที่ได้ในการศึกษาทั้งหมด สามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการขยายขนาดการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบในถังหมักระบบยกอากาศ

ปัจจัย	ข้อมูลที่กำหนด
ขนาดของถังหมัก	ปริมาตรต่ำสุดเท่ากับ 600 ลิตร
ระบบหมุนวนน้ำหมัก	อัตราหมุนวนต่ำสุดเท่ากับ 200 L/h
ระบบการให้ออกซิเจน (เพิ่มเติม)	ไม่มีความจำเป็น
ระบบการหมัก	Semi-continuous fermentation
อัตราการดึงน้ำหมัก / อัตราการให้ไวน์ใหม่ (Discharging rate / Charging rate)	40-50%
ปริมาณใยบวบ	20-30% w/v

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

- ไวน์ข้าวโพดที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 มีปริมาณแอลกอฮอล์ เท่ากับ 10.1% ในถังหมักระบบหมุนวนเซลล์
- ระบบการหมักน้ำส้มสายชูด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม *A. aceti* WK" ในถังหมักระบบยกอากาศ ได้มีการออกแบบให้มีการหมุนวนน้ำหมักเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดด้วย พบว่า อัตราการหมุนวนน้ำหมัก 200 L/h ให้ผลการผลิตกรดอะซิติกดีที่สุด
- การให้ออกซิเจนเข้าไปในถังหมักระบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h เพื่อรักษาระดับค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ในน้ำหมักไม่มีผลต่อการปรับตัวของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ตรึงด้วยใยบวบ แสดงว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำที่มีอยู่ในถังหมักนี้เพียงพอต่อการปรับตัวของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ในระบบที่ทำการศึกษา
- การตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดอะซิติกในระบบการหมักน้ำส้มสายชูในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส โดยช่วยลดระยะเวลาในการผลิตกรดอะซิติกประมาณ 6% จาก 14-15 วัน ในสภาพที่ไม่มีการตรึงเซลล์ เป็น 6-9 วัน ในสภาพที่มีการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK"
- การศึกษาการเพิ่มแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูหมักในลักษณะ Fed-batch fermentation ในระบบที่มีการตรึง "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" บนใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส พบว่า สภาพที่มีการตรึงเซลล์ **"หัวเชื้อน้ำส้ม WK" บนใยบวบ** ช่วยให้สามารถผลิตกรดอะซิติกในระบบ Fed-batch ได้ถึง 2 ครั้ง ใช้ระยะเวลาที่แอลกอฮอล์ลดลงจาก 3.5% ถึง 2% เท่ากับ 4 วัน กรดอะซิติกผลิตได้เพิ่มขึ้นจาก 6.2% เป็น 7.5-7.8% ภายในระยะเวลา 20-21 วัน ขณะที่ในสภาพที่ไม่ตรึงเซลล์ **"หัวเชื้อน้ำส้ม WK"** สามารถที่จะผลิตกรดอะซิติกในระบบ Fed-batch ได้เพียง 1 ครั้ง ระยะเวลาที่แอลกอฮอล์ลดลงจาก 3.5% ถึง 2% เท่ากับ 6 วัน สามารถทำการผลิตกรดอะซิติกได้พิ่มขึ้นจาก 6.2% เป็น 7.6% ภายในระยะเวลา 36 วัน เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพการผลิตจึงสรุปว่า ระบบ Fed-Batch ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในระบบการหมักนี้
- ในการผลิตน้ำส้มสายชูด้วยระบบ Semi-continuous fermentation ด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ตรึงด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักในอัตรา 200 L/h ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส พบว่า อัตราการดึงน้ำหมัก (Discharge rate) ที่ 50% สามารถทำให้ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" สร้างกรดอะซิติกได้ 6.8-7.2% ภายในระยะเวลา 4-5 วัน โดยมีค่าอัตราการสร้างกรดที่สูงที่สุดอยู่ในช่วง 0.0183%/h ถึง 0.0260 %/h ทั้งนี้เนื่องจากสภาพการหมักดังกล่าวทำให้ปริมาณเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงบนใยบวบมีปริมาณสูงสุด
- ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการขยายขนาดการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบการตรึงเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ด้วยใยบวบในถังหมักระบบยกอากาศในระดับกึ่งโรงงาน ควรมีปริมาตรถังหมักอย่างต่ำ 600 ลิตร อัตราหมุนวนน้ำหมักต่ำสุดเท่ากับ 200 L/h ปริมาณใยบวบเท่ากับ 20-30% w/v ไม่จำเป็นต้องมีระบบการให้อากาศ ใช้ระบบการหมักแบบ Semi-continuous fermentation โดยอัตราการดึงน้ำหมัก / อัตราการให้ไวน์ใหม่ (Discharging rate / Charging rate) เท่ากับ 40-50%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

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

วราวุฒิ ครูส่ง. 2551. การบริหารจัดการจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหาร. สถาบันอาหาร. 184 หน้า.

สิริกุล วะสี. 2548. สารพัดบวบ. นิทรรศการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ "เกษตรนำชาติ ศาสตร์ที่ยั่งยืน คืนทรัพยากรสู่ชุมชน" ในงานวันเกษตรแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2548. วันที่ 28 มกราคม – 5 กุมภาพันธ์ 2548. Available at http://www.rdi.ku.ac.th/exhibition/Year2548/01-KasetNational/Project/index_84.htm. Accessed Date 18 January 2008.

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

Akhtar, N., A. Saeed and M. Iqbal. 2003. Chlorella Sorokiniana Immobilized on the Biomatrix of Vegetable Sponge of *Luffa cylindrical*: A New System to remove Cadmium from Contaminated Aqueous Medium. Bioresour. Technol. 88: 163-165.

AOAC. 1995. Official Method of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Virginia.

Brodelius, P. and E.J. Vndamme. 1987. Immobilized Cell Systems. In. H.J. Rehm and G. Reed (Eds). Biotechnology. Vol.7A. (pp. 405-464). Verlag Chemie. Germany.

Chen, J.P., S.C. Yu, B.R.S. Hsu, S.H. Fu and H.S. Liu. 2003. Loofa Sponge as a Scaffold for the Culture of Human Hepatocyte Cell Line. Biotechnol. Prog. 19: 522-527.

de Ory, I., L.E. Romero and D. Cantero. 2003. Optimization of Immobilization Conditions for Vinegar Production. Siran, Wood Chips and Polyurethan Foam as Carriers for *Acetobacter aceti*. Process Biochem. 39: 547-555.

European Patent EP0121981. 1981. Immobilized Cell Composite and Process Using Said Composite. Available at http://www.freepatentsonline.com/EP0121981A1.html. Accessed Date 14 August 2008.

Fregapane, G., Rubio-Fernandez, H. and Salvador, M.D. 2001. Influence of fermentation temperature on semi-continuous acetification for wine vinegar production, Eur Food Res Tech. 213: 61-66.

Ganguly, R., P. Dwivedi and R.P. Singh. 2006. Production of Lactic acid with Loofa Sponge Immobilized *Rhizopus oryzae* RBU2-10. Bioresour. Technol. June 19. Available at http://lib.bioinfo.pl/pmid: 16790343. Accessed Date 18 Jananury 2008.

Ghommidh, C., J.M. Navarro and G. Durand. 1982a. A Study of Acetic Acid Production by Immobilized Acetobacter Cells: Oxygen Transfer. Biotech.Bioeng. 24: 605-617.

Ghommidh, C., J.M. Navarro and R.A. Messing. 1982b. A Study of Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter* Cells: Product Inhibition Effects. Biotech.Bioeng. 24: 1991-1999.

Hamdy, M.K. 2001. Synthesis of Natural Product Metabolites Using Immobilized Fungal Spores. US Patent 6261811. Available at http://www.freepatentsonline.com/6261811html. Accessed Date 14 August 2008.

http://ecobites.com/component/content/839?task=view. The Loofah or Dishcolth Gourd. Accessed Date 18 January 2008.

http://encyclopedia.thefreedictionary.com/dishcloth_gourd. Dishcloth Gourd. Accessed Date 18 January 2008.

http://www.geocities.com/dordek1/Thailand_d5htm. Accessed Date 18 January 2008.

http://plantanswers.tamu.edu/vegetables/Chineseo.html. Chinese Okra, (Dishcloth Gourd, Luffa). Accessed Date 18 January 2008.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://www.luffa.info/. Luffa info. Accessed Date 18 January 2008.

Kang, Y.H., B.R. Kim, H.J. Choi, J.G. Seo, B.H. Kim and M.S. Han. 2007. Enhancement of Algicidal Activity by Immobilization of Algicidal Bacteria Antagonistic to *Stephanodiscus hantzschii* (Bacillariophyceae). J.Appl.Microbiol. 103: 1983-1994.

Kocher, G.S., K.L. Kalra and R.P. Phutela. 2006. Comparative Production of Sugarcane Vinegar by Different Immobilization Techniques. J.Inst.Brew. 112: 264-266.

Krishnan, S., M.K. Gowthaman, M.C. Misra and N.G. Karanth. 2001. Chitosan-treated Polypropylene Matrix as Immobilization Support for Lactic Acid Production Using *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084. J.Chem.Tech.Biotech. 76: 461-468.

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.

Krusong, W., Petch-nom, P. and Pinviset, P. 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.

Kumnuanta, J. and Vongsuvanlert, V. 1982. Ethanol fermentation by flocculating yeast at high temperature. *Proceedings Fifth Inter. Alc. Fuel. Technol. Symposium.* Vol.1, Auckland, New Zealand. P.1-205-1-215.

Liu, K., M. Seki, S. Furusaki. 1999. Plant Cell Immobilization in Loofa Sponge Using Two-way Bubble Circular System. J.Chem.Eng. 32: 8-14.

Ogbonna, J.C., S. Tomiyama, Y. Liu and H. Tanaka. 1997. Efficient Production of Ethanol by Cells Immobilized in Loofa (*Luffa cylindrical*) Sponge. J.Ferment.Biotech. 84: 271-274.

Pekdemir, T., B. Keskinler, E. Yildiz and G. Akay. 2003. Process Intensification in Wastewater Treatment: Ferrous Iron Removal by a Sustainable Membrane Bioreactor System. J.Chem.Tech.Biotech. 78: 773-780.

Romaskevic, T., S. Budriene, K. Pielichowski and J. Pielichowski. 2006. Application of Polyurethane-based Materials for Immobilization of Enzymes and cells: A Review. Chemija. 17: 74-89.

Sakurai, A., Y. Nishida, H. Saito and M. Sakakibara. 2000. Ethanol Production by Repeated Batch Culture Using Yeast Cells Immobilized within Porous Cellulose Carriers. J.Biosci.Bioeng. 90: 526-529.

Schwartz, J.P., J.A.D. Souza Jr., E.B.D. Santos and V.A. Kozlowski Jr. 2007. Biofilm Control in Total Dentures with Vegetable Sponge. Available at http://iadr.confex.com/iadr/2007orleans/techprogram/ abstract_90078.htm. Accessed Date 14 August 2008.

Vignoli, J.A., M.A.P.C. Celligoi and R.S.F. Silva. 2006. Development of a Statistical Model for Sorbitol Production by Free and Immobilized *Zymomonas mobilis* in Loofa Sponge *Luffa cylindrical*. Process Biochem. 41: 240-243.

WO/2000/006210. 2000. Method for the Manufacture of Antimicrobial Articles. Available at http://www.wipo.int./pctdb/en/wo.jsp?IA=WO2000%2F06210&WO=2000%2F06210&DISPLAY=DESC. Accessed Date 18 January 2008.

WO/2002/068578. 2002. Fibrous Inert Support for Fermentation of Clear Beer and Wine. Available at http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?IA=US2002005188&DISPLAY=DESC. Accessed Date 18 January 2008.

Yang, Y., C. Tada, M.S. Miah, K. Tsukahara, T. Yagishita and S. Sawayama. 2004. Influence of Bed Materials on Methanogenic Characteristics and Immobilized Microbes in Anaerobic Digester. Material Sci. Engineer. 24: 413 – 419.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้