การหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวด้วยวิธีการตรึงเซลล์

Vinegar fermentation from rice wine by using cell Immobilization method

พัทธมน สุพรรณวงศ์

มลทิรา อ่องคำ

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมอาหาร

คณะอุตสาหกรรมอาหาร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พ.ศ. 2566

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวด้วยวิธีการตรึงเซลล์

Vinegar fermentation from rice wine by using cell Immobilization method

จัดทำโดย

พัทธมน สุพรรณวงศ์ รหัสนักศึกษา 62080119

มลทิรา อ่องคำ รหัสนักศึกษา 62080124

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

วิรามศรี

.....

(ผศ.ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ การหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวด้วยวิธีการตรึงเซลล์
ชื่อนักศึกษา พัทธมน สุพรรณวงศ์ รหัสนักศึกษา 62080119
มลทิรา อ่องคำ รหัสนักศึกษา 62080124
หลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมอาหาร
พ.ศ. 2566
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ

บทคัดย่อ

การผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโดยใช้วิธีการตรึงเซลล์ เป็นเทคนิคที่มุ่งเน้นปรับปรุงการอยู่รอดของจุลินทรีย์และกิจกรรมภายใต้สภาวะความเครียด งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาประสิทธิภาพของการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวด้วยวิธีการตรึงเซลล์โดยใช้ใยบวบ เปรียบเทียบกับวิธีการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวด้วยวิธีการไม่ตรึงเซลล์โดยใช้วิธีการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous culture) ในช่วงเริ่มต้นของการหมักน้ำส้มสายชูจะทำการปรับความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration; TC) ให้ได้เท่ากับ 8 ซึ่งประกอบด้วยกรดอะซิติก 4.5% เอทานอล 3.5% ลงในถังหมัก 10 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรการหมัก 7 ลิตร เติมสารอาหารและใส่หัวเชื้อ *A.aceti* WK หมักที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส โดยให้อากาศ ผลที่ได้พบว่าวิธีการตรึงเซลล์โดยใช้ใยบวบมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการไม่ตรึงเซลล์ โดยดูจากค่าอัตราการผลิตกรดอะซิติก (ETA) วิธีการตรึงเซลล์มีอัตราการผลิตกรดอะซิติกเท่ากับ 1.37 กรัม/ลิตร/วัน ซึ่งมีค่ามากกว่าวิธีการไม่ตรึงเซลล์ที่มีอัตราการผลิตกรดอะซิติกเท่ากับ 0.65 กรัม/ลิตร/วัน นอกจากนี้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากวิธีการหมักแบบตรึงเซลล์มีปริมาณเซลล์แห้งอยู่ที่ 191.18 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าปริมาณเซลล์แห้งที่ได้จากวิธีการหมักแบบไม่ตรึงเซลล์ที่มีค่าเท่ากับ 169.32 มิลลิกรัม/ลิตร เนื่องจากใยบวบมีลักษณะเป็นเส้นใยที่เหมาะสมต่อการยึดจับของเชื้อได้ดี และมีลักษณะเป็นรูพรุนทำให้ออกซิเจนสามารถกระจายผ่านได้ดี ดังนั้นเมื่อทำการหมักด้วยวิธีการตรึงเซลล์จะทำให้มีเชื้อ *A. aceti* WK มากขึ้น จึงส่งผลให้มีการอัตราการผลิตกรดอะซิติกสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title Vinegar fermentation from rice wine by using cell immobilization Method

Student name Pattamon Supannawong 62080119

Montira Ongkham 62080124

Program Bachelor of Science in Fermentation Technology

Year 2023

Advisor Asst. Prof. Dr. Wiramsri Sriphochanart

ABSTRACT

Production of vinegar from rice wine using cell immobilized method is a technique that aims to improve microbial survival and activity under stress conditions. This research focused on an efficiency of rice wine vinegar production by cell immobilization. Luffa sponges were used as carrier for immobilization of *Acetobacter aceti* WK. The experiment was compared with the fermentation of rice wine vinegar by free cell. Semi-continuous fermentation was employed. At the beginning of the vinegar fermentation, the total concentration (TC) was adjusted to 8, consisting of 4.5 % acetic acid and 3.5 % ethanol in 10 L bioreactor with working volume of 7 L. After that, nutrients and *A. aceti* WK were added. Acetification was performed under 30±2°C with aeration. The result showed that the cells immobilized on luffa were more effective than free cells. In the case of acetification rate (ETA), the acetification by immobilization method had ETA at level of 1.37 g/L/d, which was higher than that of the free cell method which had ETA at level of 0.65 g/L/d. Additionally, dry cell weight obtained from the immobilization acetification was 191.18 mg/L which was higher than free-cell acetification (169.32 mg/L). Due to porous structure of luffa sponge, it is suitable for oxygen transfer. Therefore, acetification by cell immobilization resulted in high *A. aceti* WK content that produced high ETA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้ได้สำเร็จอย่างลุล่วง เพราะได้รับคำปรึกษา คำแนะนำ และแนวทางในการทำวิจัยที่ดีจากอาจารย์ที่ปรึกษา เมื่อเกิดข้อสงสัยหรือพบปัญหาข้อผิดพลาด อาจารย์จะช่วยแก้ไขข้อผิดพลาดต่างๆ ทำให้รายงานสำเร็จไปได้อย่างสมบูรณ์แบบ และรายงานฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีตามที่คาดหวังไว้

ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าข้อมูลการศึกษาวิจัยฉบับนี้จะเป็นแหล่งข้อมูลทางการศึกษาที่ดี และมีประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจและนำไปศึกษาต่อไป

พัทธมน สุพรรณวงศ์

มลทิรา อ่องคำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... II

กิตติกรรมประกาศ..... III

สารบัญ..... IV

สารบัญตาราง..... VI

สารบัญภาพ..... VII

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 3

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 น้ำส้มสายชู..... 4

2.2 ชนิดของน้ำส้มสายชู..... 4

2.3 กระบวนการหมักน้ำส้มสายชู..... 5

2.4 ประเภทกระบวนการหมักน้ำส้มสายชู..... 5

2.5 หลักการและประเภทการหมัก..... 6

2.6 การตรึงเซลล์..... 7

2.7 คุณสมบัติทางกายภาพของใยบวบ..... 9

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 9

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี..... 10

3.2 อุปกรณ์..... 11

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง..... 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์..... 19

4.1 การศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูโดยใช้เชื้อ *A.aceti WK* ด้วยวิธีการตรึงเซลล์โดยใยบวบ..... 19

4.2 ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกด้วยวิธีการตรึงเซลล์ *A.aceti WK* โดยวิธีการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบกับวิธีการไม่ตรึงเซลล์..... 21

4.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A.aceti WK* โดยวิธีการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบกับวิธีการไม่ตรึงเซลล์ 22

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ..... 24

บรรณานุกรม..... 25

ภาคผนวก..... 27

ภาคผนวก ก..... 28

ภาคผนวก ข..... 29

ภาคผนวก ค..... 30

ประวัติผู้เขียน..... 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ตารางแสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการหมักด้วยวิธีการตรึงเซลล์กับการหมักด้วยวิธีการไม่ตรึงเซลล์..... 21

4.2 ตารางแสดงค่าปริมาณเซลล์แห้งส่วนน้ำหมักและปริมาณเซลล์ในใยบวบ..... 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

3.1 Mold bran เทผสมข้าวเหนียวที่นึ่งสุก ปิดด้วยผ้าขาวบางนำไปบ่มเป็นเวลา 3 วัน..... 12

3.2 เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30.....
13

3.3 เทส่วนผสมที่ใช้ในการหมัก ทำการหมักไวน์ใส่ถังเป็นเวลา 4 วัน..... 13

3.4 (ก) ตัดใยบวบตามขนาดและรูปร่างข้างต้น..... 15

(ข) แช่ใยบวบที่ตัดเรียบร้อยใน 5% (v/v) กรดอะซิติกเป็นเวลา 1 คืน..... 15

3.5 กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์ข้าวด้วยวิธีการตรึงเซลล์บนใยบวบ..... 15

3.6 ลักษณะใยบวบที่ใช้ในการตรึงเซลล์ในการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวทรงตัดขวาง..... 16

4.1 การเปลี่ยนแปลงการผลิตกรดอะซิติกและเอทานอลระหว่างกระบวนการหมักน้ำส้มสาย
ชูจากไวน์ข้าวในระบบที่ไม่มีการตรึงเซลล์และระบบที่มีการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบ
และการเปลี่ยนแปลงของแอลกอฮอล์ในระหว่างกระบวนการหมัก (g/L)..... 20

ก.1 ลักษณะของถังหมักเป็นแบบให้อากาศ 30

ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งจากน้ำหมักของเชื้อ *A. aceti* WK..... 31

ค.1 วิเคราะห์ค่าอัตราการผลิตกรด (Acetification rate) โดยใช้วิธีหาค่าความแปรปรวน..... 32

ค.2 วิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนใยบวบและน้ำหมัก..... 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำส้มสายชูมาจากภาษาฝรั่งเศษเรียกว่า Vinaigre แปลว่า ไวน์ที่มีรสเปรี้ยวมาก (Vin=wine, aigre = รสเปรี้ยว) ดังนั้นน้ำส้มสายชูจึงมีความหมายว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำให้เกิดกรดน้ำส้ม (Acetification) ของวัตถุดิบประเภทน้ำตาลหรือแป้งที่ผ่านกระบวนการหมักแอลกอฮอล์มาแล้ว (นภษร, 2545) ทั้งนี้เนื่องจากประวัติการเกิดน้ำส้มสายชูนั้นเริ่มจากการหมักไวน์แต่บังเอิญไวน์ถังนั้นเกิดมีรสเปรี้ยวขึ้น เนื่องจากเชื้อน้ำส้มสายชูซึ่งปนมากับผลไม้เปลี่ยนเอทานอลเป็นกรดน้ำส้ม เมื่อได้ลองนำไวน์ที่มีรสเปรี้ยวนี้ไปปรุงอาหารพบว่าทำให้อาหารมีรสชาติดีขึ้น จึงเกิดความนิยมใช้กันเรื่อยมาจนมีการผลิตน้ำส้มสายชูเพิ่มมากขึ้น สำหรับคนไทยนั้นไม่ได้นิยมดื่มแอลกอฮอล์ที่มีวัตถุดิบเป็นผลไม้กันมาแต่เดิม แต่มีเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์พื้นบ้าน เช่น กระแช่ น้ำตาลเมา สาโท และ อุ เป็นต้น ซึ่งเครื่องดื่มเหล่านี้เมื่อตั้งทิ้งไว้นานๆ ในที่มีอากาศก็จะเปลี่ยนเป็นน้ำส้มสายชูได้เช่นกัน (นภา, 2518)

ชนิดของน้ำส้มสายชู

1. น้ำส้มสายชูหมัก (Fermented vinegar) หมายถึงน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมัก ธัญพืช ผลไม้ น้ำตาล หรือยีสต์ให้ได้แอลกอฮอล์ แล้วหมักต่อด้วยเชื้อน้ำส้มสายชู วัตถุดิบที่นิยมใช้นั้นขึ้นอยู่กับแหล่งที่ผลิต เช่น ในสหรัฐอเมริกา และประเทศต่างๆในยุโรป ซึ่งมีแอปเปิ้ลมากก็นิยมผลิตน้ำส้มสายชูจากแอปเปิ้ลเรียกว่า Cider vinegar ผลิตจากองุ่นเรียกว่า Wine vinegar เป็นต้น ในบ้านเราแต่เดิมนิยมผลิตน้ำส้มสายชูจากข้าวเหนียวและน้ำตาลเมา แต่ปัจจุบันได้มีการผลิตจากผลไม้ เช่น สับปะรด และได้มีผู้ทดลองผลิตจากน้ำมะพร้าว ลูกจาก ปรากฏว่าได้น้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพดีเช่นกัน (นภา, 2518)

2. น้ำส้มสายชูกลั่น (Distilled vinegar) ได้จากการหมักเชื้อน้ำส้มสายชูในสุราขาวเจือจางหรือเอทิลแอลกอฮอล์เจือจางโดยเติมเกลือแร่และอาหารเสริมซึ่งจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู น้ำส้มสายชูกลั่นจะมีลักษณะใสเหมือนน้ำและจะขาดกลิ่นรสบางอย่าง ซึ่งพบในน้ำส้มสายชูหมัก (นภา, 2518)

3. น้ำส้มสายชูเทียม เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการนำกรดน้ำส้ม (Acetic acid) หรือที่เรียกว่าหัวน้ำส้มมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามความต้องการ จัดว่าเป็นน้ำส้มสายชูที่ขาดกลิ่นรสที่ดีเมื่อนำมาปรุงอาหาร (นภา, 2518)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำส้มสายชูหมักจากไวน์ข้าวได้รับการพัฒนาคิดค้นโดยใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง ที่เรียกว่า (Semi-continuous fermentation) เพื่อให้ได้น้ำส้มสายชูหมักจากไวน์ข้าวที่มีค่าอัตราการผลิตกรดที่สูงขึ้น โดยใช้ระยะเวลาในการหมักที่สั้น ผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ได้ มีกลิ่น รสชาติที่ดี และมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง สามารถนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารและเครื่องดื่มได้เป็นอย่างดี (นภษร, 2545)

โดยอุณหภูมิและค่าอัตราการผลิตกรดนั้นจะมีผลต่อประสิทธิภาพของการหมักเพื่อผลิตกรดอะซิติก แต่เมื่ออุณหภูมิและการผลิตกรดเพิ่มสูงขึ้นประสิทธิภาพของการหมักจะลดลง (Krusong และคณะ, 2015) เนื่องจากในการผลิตน้ำส้มสายชูเมื่อความเข้มข้นของกรดเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาวะเครียดทำให้จุลินทรีย์ที่ผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวอ่อนแอลง

ทั้งนี้ในงานวิจัยมุ่งเน้นการเปรียบเทียบการผลิตกรดน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโดยวิธีการตรึงเซลล์ และไม่ตรึงเซลล์ เนื่องจากการตรึงเซลล์เป็นเทคนิคที่มุ่งเน้นปรับปรุงการอยู่รอดของจุลินทรีย์และกิจกรรมภายใต้สภาวะความเครียด โดยการศึกษานี้จะนำเซลล์ที่ตรึงแล้วกลับมาใช้ใหม่ โดยจะต้องมีวัสดุมาเสริมกระบวนการตรึงเซลล์ (Hutchinson และคณะ, 2020) ซึ่งใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์จะต้องใช้วัสดุจากธรรมชาติ ที่มีเส้นใยและมีลักษณะเป็นรูพรุน ดังนั้นจึงเลือกใช้ใยบวบ เนื่องจากใยบวบมีองค์ประกอบหลักทางด้านเคมีของเส้นใย เซลลูโลส Hemicellulose และ Lignin ซึ่งช่วยเสริมสร้างความแข็งแรง เนื่องจากใยบวบเป็นพืชที่เหมาะสมมีประสิทธิภาพที่ใช้ในการตรึงเซลล์และประสิทธิภาพในการผลิตกรด โดยใช้ใยบวบแบบผ่าตัดขวาง จึงมุ่งเน้นพัฒนาโดยใช้วิธีการตรึงเซลล์แบบการดูดซับเซลล์ (Absorption) (Sinnot and Bloch, 1943)

ข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงูเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองดั้งเดิมมีลักษณะเมล็ดเล็ก เรียวยาว สวยงาม เป็นข้าวเหนียวที่มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ในรูปของวิตามินอี เด่นเป็นพิเศษ โดยเฉพาะวิตามินอีในรูปแบบที่เรียกว่า (Mixed tocopherols) ซึ่ง tocopherol แต่ละชนิดจะช่วยกันกำจัดอนุมูลอิสระที่ต่างชนิดกันแต่เสริมการทำงานซึ่งกันและกัน ข้าวเหนียวเขี้ยวงูเป็นพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีคุณภาพดี อุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์หลายอย่าง เช่น มีสารต่อต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดคลอเลสเตอรอล เมื่อรับประทานเป็นประจำจึงช่วยป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ได้เป็นอย่างดี เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดอุดตัน โรคหัวใจ โรคปอด และยังช่วยป้องกันการเกิดอาการวัยทองได้อีกด้วย (พายัพภูเบศวร์, 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวด้วยวิธีการตรึงเซลล์โดยใช้ใยบวบเปรียบเทียบกับวิธีการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวด้วยวิธีการไม่ตรึงเซลล์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 สามารถนำกระบวนการที่ผลิตมาใช้ในอุตสาหกรรมได้จริง เพื่อช่วยลดต้นทุนและระยะเวลาในการผลิต

1.3.2 สามารถพัฒนาประสิทธิภาพของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวด้วยวิธีการตรึงเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัย

2.1 น้ำส้มสายชู

น้ำส้มสายชูเป็นเครื่องปรุงอาหาร (Seasoning) ที่เรารู้จักและใช้กันอย่างแพร่หลายในชีวิตประจำวัน Vinegar มาจากคำว่า vin aige เป็นภาษาฝรั่งเศส แปลว่า ไวน์เปรี้ยว เพราะน้ำส้มสายชูในสมัยเริ่มต้นได้จากการหมัก (Fermentation) เอทิลแอลกอฮอล์ในไวน์ด้วยแบคทีเรียกลุ่ม Acetobacter และ Gluconobacter ทำให้ได้กรดน้ำส้ม (Acetic acid) ซึ่งเป็นรสเปรี้ยว (จุฑาทิพ, 2559)

น้ำส้มสายชูเป็นเครื่องปรุงอาหารที่มีประจำทุกครัวเรือน เพื่อเพิ่มรสเปรี้ยวหรือแต่งกลิ่น มีกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง คือกรดน้ำส้ม (Acetic Acid) เป็นองค์ประกอบสำคัญ นอกจากนี้อาจมีกรดอินทรีย์และสารอื่นๆ ปนอยู่ด้วยเป็นส่วนน้อย เช่น กรดมาลิค (Malic Acid) กรดแลคติก (Lactic Acid) เอสเทอร์ (Ester) แอลกอฮอล์ (Alcohol) อัลดีไฮด์ (Aldehyde) ฯลฯ เกิดขึ้นจากการผลิตน้ำส้มด้วยกรรมวิธีการหมัก โดยปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ (จุฑาทิพ, 2559)

2.2 ชนิดของน้ำส้มสายชู

1. น้ำส้มสายชูหมัก (Fermented vinegar) หมายถึงน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมัก ธัญพืช ผลไม้ น้ำตาล หรือยีสต์ให้ได้แอลกอฮอล์ แล้วหมักต่อด้วยเชื้อน้ำส้มสายชู วัตถุดิบที่นิยมใช้นั้นขึ้นอยู่กับแหล่งที่ผลิต เช่น ในสหรัฐอเมริกา และประเทศต่างๆในยุโรป ซึ่งมีแอปเปิ้ลมากก็นิยมผลิตน้ำส้มสายชูจากแอปเปิ้ลเรียกว่า Cider vinegar ผลิตจากองุ่นเรียกว่า Wine vinegar เป็นต้น ในบ้านเราแต่เดิมนิยมผลิตน้ำส้มสายชูจากข้าวเหนียวและน้ำตาลเมา แต่ปัจจุบันได้มีการผลิตจากผลไม้ เช่น สับปะรด และได้มีผู้ทดลองผลิตจากน้ำมะพร้าว ลูกจาก ปรากฏว่าได้น้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพดีเช่นกัน (นภา, 2518)

2. น้ำส้มสายชูกลั่น (Distilled vinegar) ได้จากการหมักเชื้อน้ำส้มสายชูในสุราขาวเจือจางหรือเอทิลแอลกอฮอล์เจือจางโดยเติมเกลือแร่และอาหารเสริมซึ่งจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู น้ำส้มสายชูกลั่นจะมีลักษณะใสเหมือนน้ำและจะขาดกลิ่นรสบางอย่าง ซึ่งพบในน้ำส้มสายชูหมัก (นภา, 2518)

3. น้ำส้มสายชูเทียม เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการนำกรดน้ำส้ม (Acetic acid) หรือที่เรียกว่าหัวน้ำส้มมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามความต้องการ จัดว่าเป็นน้ำส้มสายชูที่ขาดกลิ่นรสที่ดีเมื่อนำมาปรุงอาหาร (นภา, 2518)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 กระบวนการหมักน้ำส้มสายชู

การหมักน้ำส้มสายชูมีกรรมวิธีการหมัก 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการหมักน้ำตาลให้กลายเป็นเอทิลแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยการทำงานของยีสต์ และขั้นตอนที่สอง คือการออกซิไดซ์พวกแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดน้ำส้ม โดยการทำงานของพวกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้ม (Solieri และ Giudici, 2009)

โดยจะหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง เนื่องจากการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเป็นการหมักที่มีการเติมอาหารหรือวัตถุดิบระหว่างกระบวนการหมัก เพื่อปรับความเข้มข้นของอาหารที่ใช้เลี้ยงให้คงที่และมีสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก และจะมีการเก็บตัวอย่างน้ำส้มสายชูเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ซึ่งการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเป็นการประยุกต์การหมักแบบครั้งเดียวกับการหมักแบบต่อเนื่องเข้าด้วยกัน โดยการหมักน้ำส้มสายชูจะต้องคำนึงถึงวัตถุดิบตั้งต้นที่ใช้ว่ามีความเข้มข้นของเอทานอลและความเข้มข้นของกรดอะซิติกเหมาะสมหรือไม่ ซึ่งโดยปกติแล้วความเข้มข้นของเอทานอลและกรดอะซิติกที่สูงจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (De Ory และคณะ, 2004)

2.4 ประเภทกระบวนการหมักน้ำส้มสายชู

2.4.1 กระบวนการหมักแบบเร็ว (Quick acetification process) เป็นวิธีที่ใช้การอย่างแพร่หลาย เนื่องจากทำให้น้ำส้มสายชูมีกลิ่นรสที่ดี วิธีนี้จะทำให้ปริมาณกรดสูงกว่ากระบวนการหมักแบบช้า เนื่องจากมีการปรับปรุงเชื้อที่ใช้ในการหมักให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยเพิ่มและลด Lag phase และเพิ่มออกซิเจนให้มากขึ้น โดยส่วนกลางของถังหมักจะใช้วัสดุที่เป็นรูพรุนเพื่อให้แบคทีเรียยึดเกาะวัสดุที่ใช้มักเป็นพวกเซลลูโลส เช่น เปลือกไม้ ซังข้าวโพด และหวาย ส่วนล่างของถังหมักจะเป็นส่วนที่ใช้เก็บน้ำส้มสายชู ในการหมักจะปล่อยให้แอลกอฮอล์ไหลลงผ่านส่วนที่เป็นรูพรุนที่มีแบคทีเรียเจริญเป็นเมือกเกาะอยู่ แบคทีเรียจะออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก โดยอากาศจะเข้าไปบริเวณส่วนกลางของถังหมักและในระหว่างการหมักจะต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้ไม่เกิน 29-30 องศาเซลเซียส (ดุษณี, 2537)

2.4.2 กระบวนการหมักแบบช้า เป็นกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นอย่างช้าๆ ได้ผลผลิตน้อยและคุณภาพของน้ำส้มสายชูที่ได้ค่อนข้างต่ำ มีการหมักแบบตั้งทิ้งไว้นิ่งๆ (Let alone acetification) มักเกิดภายหลังจากการหมักแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ จากนั้นเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่อยู่ในอากาศหรือสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกหรือน้ำส้มสายชู ลักษณะการหมักแบบเชื้อแบคทีเรียทำให้อะซิติกมีการเจริญแบบแผ่นฝ้าที่ผิวหน้าของของเหลวและมีการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก แผ่นฝ้าของแบคทีเรียนี้มักเรียกว่า “Mother of Vinegar” (Krusong และคณะ, 2016)

2.4.3 กระบวนการหมักแบบ Submerged acetification เป็นกระบวนการหมักแบบใหม่ที่มีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง นิยมใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมเป็นระบบ “Submerged process” นิยมทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักในถังทรงสูง “Cavitator” เชื้อแบคทีเรียอะซิติกจะกระจายในถังหมัก สามารถให้สารอาหารและแอลกอฮอล์กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในถังหมักโดยมีการผลิตกรดอะซิติกพร้อมกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอะซิติก (Krusong และคณะ, 2016)

ในกรณีการตรึงเซลล์ของแบคทีเรียอะซิติก *A. aceti* WK เพื่อหมักน้ำส้มสายชู ซึ่งเป็นกระบวนการหมักแบบเร็ว (Quick acetification process) ให้ไวน์ไหลอย่างช้าๆผ่านวัสดุตัวกลางที่มีเซลล์ของแบคทีเรียอะซิติกยึดติดหรือตรึงอยู่ซึ่งจะถูกเรียกว่า ฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) อากาศจะเคลื่อนที่ผ่านอย่างอิสระจากทางด้านนอกของแผ่นฟิล์มเพื่อเพิ่มอัตราการถ่ายออกซิเจน ทำให้แอลกอฮอล์ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอย่างรวดเร็ว ข้อดีของการใช้วิธีตรึงเซลล์คือ ปริมาณออกซิเจนที่สัมผัสกับไวน์ต่อเวลามากขึ้น คือมีอัตราการแลกเปลี่ยนออกซิเจนสูง นอกจากนี้แอลกอฮอล์สามารถสัมผัสกับแบคทีเรียได้เร็วขึ้นเนื่องจากมีการไหลไปตามวัสดุที่นำมาใช้ตรึงและมีเซลล์แบคทีเรียปริมาณมากขึ้นในการทำปฏิกิริยา สรุปคือน้ำหมักที่มีเซลล์แบคทีเรียที่ผลิตกรดจะไหลอย่างช้าๆ ลงมาสู่วัสดุที่ใช้ตรึง จากนั้นวัสดุจะดูดเข้าสู่ส่วนรูและใยของวัสดุเมื่อเซลล์แบคทีเรียถูกยึดติดกับเส้นใยแล้วจะเกิดการฟอร์มตัวเป็นแผ่นฟิล์มบางๆบริเวณผิวของวัสดุ (Krusong และคณะ, 2016)

2.5 หลักการและประเภทการหมัก

ระบบการหมักในอาหารเหลว (Submerge fermentation) เป็นการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่จะต้องมีการกวน และให้อากาศแก่จุลินทรีย์ โดยจะมีการเลี้ยงเชื้อแบบต่างๆ ดังนี้

2.5.1 การเลี้ยงเซลล์แบบคราวเดียว (Batch culture) เป็นการเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญในภาชนะซึ่งอาจจะเป็นหลอดแก้วหรือถังหมักโดยไม่มีการเปลี่ยนอาหาร จุลินทรีย์จะเจริญตามปกติในช่วงต่างๆ คือระยะพักตัว ระยะทวีคูณ ระยะคงที่ และระยะตาย การหมักแบบคราวเดียวจะมีปริมาณซับสเตทจำกัดเมื่อจุลินทรีย์ใช้ซับสเตทหมด ซึ่งยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์การหมักจะเข้าสู่ระยะคงที่ซึ่งไม่มีการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์อีก จากนั้นจะเข้าสู่ระยะตาย จำนวนจุลินทรีย์จะลดลงตามลำดับ จะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ สารอาหาร สารที่เกิดขึ้นจากเมแทบอลิซึมและสภาวะต่างๆในถังหมัก (พรพรรณ, 2546)

2.5.2 การเลี้ยงเซลล์แบบเติมอาหารเป็นระยะ (Fed-batch culture) จะมีการเติมอาหารลงไปทีละน้อย เพื่อรักษาระดับอาหารให้คงที่และมีความเข้มข้นต่ำที่ไม่ไปยับยั้งการเจริญของเซลล์จะทำให้เซลล์เจริญได้ตลอดเวลาในการหมักและสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตได้มากขึ้น (พรพรรณ, 2546)

2.5.3 การเลี้ยงเซลล์แบบต่อเนื่อง (Continuous culture) เป็นการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยให้เซลล์เจริญในระยะทวีคูณ โดยการเติมอาหารใหม่และดึงอาหารที่ผ่านการหมักแล้วออกติดต่อกัน จะทำให้เซลล์จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแอคทีฟและคงที่ มีอัตราการไหลเข้าออกของอาหารเท่ากับอัตราการไหลออกตลอดเวลา (พรพรรณ, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4 การเลี้ยงเซลล์แบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous culture) เป็นการเลี้ยงเซลล์แบบคราวเดียว เมื่อได้เซลล์ตามต้องการแล้วจะดูดออกให้เหลือเพียง ¼ แล้วเติมอาหารใหม่ลงไปให้เท่าเดิม ข้อดี คือสามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้อย่างต่อเนื่องและระบบไม่แพงเท่ากับการหมักแบบต่อเนื่องและสารอาหารที่ให้เข้าไปมีการนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพและข้อเสียคือ ต้องระวังการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ตัวอื่นๆที่ไม่ต้องการและต้องใช้แรงงานคนคอยดูแลและติดตามการให้อาหารของจุลินทรีย์อยู่ตลอดแล้วทำการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ไปพร้อมกับการให้อาหารชุดใหม่ทำให้ค่อนข้างยุ่งยากเพราะเป็นการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องไปตลอด (พรพรรณ, 2546)

2.6 การตรึงเซลล์ (Cell immobilization)

การตรึงเซลล์ (Immobilization) เป็นวิธีการกำจัดขอบเขตหรือสถานที่ทางกายภาพของจุลินทรีย์ให้อยู่ในบริเวณที่จำเพาะ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง (catalyst) เป็นเทคนิคทำได้ไม่ยาก และมีข้อได้เปรียบมากกว่าการผลิตโดยใช้เซลล์อิสระ (free cell) สามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง ใช้เวลาในกระบวนการผลิตสั้นกว่า และยังช่วยลดต้นทุน (Hutchinson และคณะ, 2020)

2.6.1 ข้อดีของการตรึงเซลล์ สามารถทนความเข้มข้นของกรดได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ตรึงเซลล์ ซึ่งสามารถป้องกันเซลล์จากการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิ ทั้งนี้ยังสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้และเก็บไว้ได้นาน ซึ่งช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อใหม่ (Nisha และคณะ, 2012)

2.6.2 ปัจจัยที่สำคัญในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ การคัดเลือกวัสดุตรึงเซลล์ ที่จะต้องมีความเป็นรูพรุนสูง มีพื้นที่ผิวมากใช้ในการเกาะติด ไม่ละลายน้ำ มีความแข็งแรงทนทานต่อสภาพแวดล้อมทางกายภาพ เคมี การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์และแรงกระทบกระเทือนเนื่องจากการตรึงเซลล์ต้องทำในสภาวะที่ปลอดเชื้อ จึงต้องทนต่อความร้อนและความดันได้สูง นอกจากนี้วัสดุที่ใช้ต้องไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อม ไม่ดูดซับสารพิษที่ปนเปื้อนและสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ วัสดุที่ใช้ต้องเตรียมง่าย ไม่ยุ่งยาก ประหยัดค่าใช้จ่าย และมีความคงทนต่อการนำไปใช้งาน

2.6.3 วิธีการตรึงเซลล์ ประเภทของการตรึงเซลล์จะจำแนกได้ทั้งหมด 5 ประเภทดังนี้

1) วิธีการดูดซับเซลล์ เป็นกลไกลการดูดซับบนพื้นผิว พื้นที่ผิวมีความสำคัญโดยตรงกับรูพรุน หากรูพรุนมีมากทำให้พื้นผิวดูดซับมาก ดังนั้นความสามารถในการดูดซับจะมากขึ้นการดูดซับจะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อโมเลกุลเล็กกว่ารูพรุนเล็กน้อย (Nisha และคณะ, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) วิธีการจับโควาเลนต์ เทคนิคนี้ขึ้นอยู่กับการก่อตัวของพันธะโควาเลนต์ระหว่างเอนไซม์และเมทริกซ์ ปฏิกิริยาการจับต้องดำเนินการภายใต้สภาวะที่ไม่ก่อให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ และหน้าที่ของเอนไซม์จะต้องไม่ได้รับผลกระทบจากรีเอเจนต์ที่ใช้ (Nisha และคณะ, 2012)

3) วิธีการจับข้าม การตรึงเอนไซม์ทำได้โดยการเชื่อมโยงข้ามระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับโมเลกุลโปรตีนอื่นหรือกลุ่มการทำงานบนเมทริกซ์ที่ไม่ละลายน้ำ การเชื่อมโยงข้ามเอ็นไซม์กับเอนไซม์นั้นราคาสูงและไม่เพียงพอ เนื่องจากวัสดุโปรตีนบางส่วนจะทำหน้าที่สนับสนุน ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างต่ำ โดยทั่วไปแล้วการจับข้ามจะใช้ร่วมกับวิธีอื่นได้ดีที่สุด มีการใช้กันอย่างแพร่หลายมากขึ้นในการทำให้เอนไซม์ที่ดูดซับมีความเสถียร (Nisha และคณะ, 2012)

4) วิธีการดักจับเซลล์ เป็นเทคนิคการกักขังเซลล์ดำเนินการโดยใช้วิธีดัดแปลงมาจาก Hutchinson และคณะ อธิบายการนำสารละลายอัลจิเนต YPD และ GM ที่ผสมกับเซลล์ถูกผสมเข้าด้วยกันเพื่อสร้างสารแขวนลอยที่เป็นเนื้อเดียวกัน โดยยีสต์และเซลล์ AAB ถูกดักจับอยู่ในเม็ดบีท Ca-alginate ที่แยกจากกันและมีเม็ดบีทจะเกิดการแข็งตัวขึ้น (Hutchinson และคณะ, 2023)

5) การดักจับโดยไมโครเอนแคปซูเลชั่น คือ กระบวนการห่อหุ้มสารบางชนิดเพื่อประโยชน์ในการคงตัวของสารตลอดการใช้งาน การห่อหุ้มสารที่มีความไวต่อสิ่งแวดล้อม3, 4 เช่น ถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย ไวต่อแสง อุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง เป็นต้น จะทำให้สารดังกล่าวมีความคงตัวดีขึ้นและเก็บรักษาได้ยาวนาน กระบวนการดังกล่าวยังช่วยป้องกันสารที่ระเหยง่าย นอกจากนั้นการนำสารที่เป็นของเหลวมาอยู่ในไมโครแคปซูลอาจช่วยลดการทำปฏิกิริยาของสารผสม สะดวกต่อการนำไปใช้งาน รวมทั้งสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารไปสู่บริเวณที่ต้องการในเวลาที่เหมาะสมได้ จึงมีประโยชน์ช่วยลดความสิ้นเปลืองในการใช้สาร (Porzio, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 คุณสมบัติทางกายภาพของใยบวบ

ใยบวบเป็นวัสดุจากธรรมชาติมีลักษณะเป็นรูพรุน ลักษณะคล้ายฟองน้ำ เส้นใยเหนียว สีขาวหรือสีเหลือง มีน้ำหนักเบา ใยบวบประกอบด้วยเซลลูโลสสูงถึงประมาณร้อยละ 90 และ ลิกนินประมาณร้อยละ 10 ซึ่งช่วยเพิ่มความแข็งแรงและใยบวบมีคุณสมบัติเป็นตัวดูดซับที่ดี (Krusong และคณะ, 2016)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Krusong และคณะ (2016) ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตน้ำส้มสายชูสำหรับการหมักแบบ QAP (Quick acetification process) เพื่อพัฒนาสภาพที่เหมาะสมในการตรึงแบคทีเรียอะซิติก และศึกษาความเสถียรในการผลิตน้ำส้มสายชูจากแบคทีเรียโดยใช้วัสดุในการตรึงเซลล์คือใยบวบ เนื่องจากพบว่าใยบวบให้ผลในการตรึงเซลล์ *A. aceti* WK ได้ดี กล่าวคือในน้ำหมักที่มีใยบวบจะมีปริมาณหัวเชื้อที่มากกว่าในน้ำหมักที่ไม่มีใยบวบ ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการหมักเพื่อผลิตกรดโดยรวมในระบบ และเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง จะทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่งและสามารถนำมาใช้ได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอยู่ในสภาพ เซลล์ระยะพัก เซลล์กำลังเจริญ หรือเซลล์ที่ตายแล้ว ในการตรึงเซลล์นี้จัดเป็นเทคนิคในการยึดเซลล์จุลินทรีย์ไว้กับตัวกลางการดึงเซลล์นิยมใช้ในการปรับปรุงกระบวนการหมักได้เนื่องจากช่วยในการเพิ่มชีวมวล ความสามารถในการใช้ซ้ำรวมถึงการป้องกันเซลล์จากผลกระทบเชิงลบจากปัจจัยต่างๆซึ่งประกอบด้วยค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำ อุณหภูมิ และสารยับยั้ง

นภษร (2545) รายงานว่าในช่วงเริ่มต้นการหมักน้ำส้มสายชูจะทำการปรับความเข้มข้น ทั้งหมด (Total concentration; TC) เท่ากับ 8 ซึ่งประกอบด้วยกรดอะซิติก 4.5% และแอลกอฮอล์ 3.5% เมื่อทำการหมักไปจนถึงช่วงแอลกอฮอล์เหลือประมาณ 2% จึงทำการปรับแอลกอฮอล์ให้กลับมามีความเข้มข้นเท่ากับ 3.5% อีกครั้ง การศึกษาในลักษณะนี้จะทำให้ *A. aceti* WK สามารถใช้แอลกอฮอล์ (ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักสำหรับผลิตกรดอะซิติก) ที่มีความเข้มข้นที่สูงขึ้นได้ ซึ่งการใช้ปริมาณกรดอะซิติก 4.5% เป็นระดับที่นิยมใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ช่วยป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ (Contaminants) ได้เป็นอย่างดี

Hutchinson และคณะ (2020) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการตรึงเซลล์โดยใช้เม็ดแคลเซียมอัลจิเนตเซลล์ที่ดูดซับบนซังข้าวโพด (CC) และชิ้นไม้โอ๊ค (OWC) เพื่อผลิตน้ำส้มสายชูสไตล์บัลซามิก (BSV) พบว่าซังข้าวโพดและไม้โอ๊คมีความทนกรดสูง เนื่องจากซังข้าวโพดมีพื้นผิวขรุขระและมีรูพรุน เมื่อผ่านการหมักจะทำให้รูขุมขนมีขนาดใหญ่ขึ้นเกิดจากความเข้มข้นของกรดสูง ส่วนไม้โอ๊ค เมื่อผ่านการหมักรอบแรกจะพบว่ามียีสต์เกาะอยู่บนพื้นผิวของไม้โอ๊ค และมีอัตราการเกิด Acetification ไม่สูงมากและยังมีการสังเกตการดูดซับเซลล์เนื่องจากยีสต์อาจมีความสามารถในการดูดซับเซลล์บนพื้นผิวไม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

Acetobacter aceti WK, *Amylomyces* spp, *Saccharomyces cerevisiae* M30

จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมอาหาร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังกรุง เทพมหานคร

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

Agar, Difco, USA

Glucose, Ajax Finechem, New Zealand

Plate count agar (PCA), Himedia, India

Potato Dextose agar (PDA), Himedia, India

Yeast extract, Himedia, India

Alcohol 95%, Scidirect, Thailand

Acetic acid (Food grade) 99%, BP chemical, Malaysia

Magnesium sulfate, Ajax Finechem, New Zealand

Di-ammonium hydrogen phosphate, Himedia, India

Sodium citrate dihydrate, Emsure, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง (Balance), รุ่น MS105, MettlerToledo, Germany

ตู้อบลมร้อน (Hot air oven), รุ่น Heraeus Therm General, Heraeus, Germany

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 37°C, รุ่น B6200, Heraeus, Germany

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 30 °C, รุ่น B6200, Heraeus, Germany

ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow), รุ่น ABS 1200, BossTech, Thailand

ไมโครเวฟ (Microwave), รุ่น MR-30A, Electrolux, Japan

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave), รุ่น ES-315, Tommy, Japan

ไมโครปิเปต (Micropipette) 200 และ 1000 μL, Brand, Germany

เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer), Scientific Industrirs, USA

เครื่อง High speed Centrifuge, รุ่น 5804R, Eppendorf, Germany

เครื่อง Spectrophotometer, รุ่น UV1800, Thermofisher sciencetific, USA

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การทำไวน์ข้าว

เตรียมเชื้อรา *Amylomyces* spp. ในหลอดอาหารเอียง Potato dextrose agar (PDA slant) บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เส้นใยเชื้อราเจริญปกคลุมบนผิวหน้าอาหารเอียง

เตรียม mold bran ชั่งรำหยาบและรำละเอียดอย่างละ 10 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มล. เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.25% w/v ปริมาตร 5 มล. แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน แล้วฆ่าเชื้ออีกครั้งที่สภาวะเดียวกัน รอให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องถ่ายเชื้อรา *Amylomyces* spp. โดยดึงเส้นใยเชื้อราที่เจริญอยู่ในหลอดอาหารเอียงทั้งหมดลงไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในฟลาสก์แล้วเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไป 5 มล. คลุกให้เข้ากัน ใช้เชื้อรา 2 หลอด ต่อ 1ฟลาสก์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

ล้างและแช่ข้าวเหนียวเป็นเวลา 1 คืน นึ่งข้าวเหนียวให้สุกแล้วเทลงในกระบะ ซึ่งจะแบ่งใส่กระบะละ 1 กก. รอให้เย็นแล้วนำ Mold bran เทผสมคลุกให้เข้ากัน เติมน้ำให้พอท่วมข้าวเหนียวแล้วปิดด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน (จากภาพที่ 3.1)

ภาพที่ 3.1 Mold bran เทผสมข้าวเหนียวที่นึ่งสุก ปิดด้วยผ้าขาวบางนำไปบ่มเป็นเวลา 3 วัน

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30

โดยเขี่ยเชื้อยีสต์จากอาหารเอียง PDA slant 1 ลูป ลงใน Yeast malt (YM) broth ประกอบด้วย Yeast extract 3 กรัม/ลิตร Malt extract 3 กรัม/ลิตร Peptone 5 กรัม/ลิตร และ Glucose 10 กรัม/ลิตร ปริมาตร 250 มล. เขย่า และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 250 มล. เลี้ยงในอาหาร YM broth ปริมาตร 750 มล. ทำให้มีปริมาตรรวม 1 ลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง (จากภาพที่ 3.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 3.2 เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ Saccharomyces cerevisiae M30

เทข้าวเหนียวที่ผ่านการย่อย และน้ำเชื่อมปรับปริมาตรเป็น 45 ลิตร ด้วยน้ำดื่มสะอาด ให้บริกซ์เริ่มต้นเท่ากับ 18 องศาบริกซ์ แล้วเติมกล้าเชื้อยีสต์ปริมาตร 5 ลิตร ในถังหมักทำให้มีปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 50 ลิตร (จากภาพที่ 3.3) ทำการหมักไวน์ข้าวที่อุณหภูมิห้อง ตรวจปริมาณแอลกอฮอล์ในวันที่ 0 3 5 และ 7 จนไวน์มีแอลกอฮอล์ประมาณ 8-9% โดยปริมาตร แล้วทำการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปกรองใส่ถังเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก

ภาพที่ 3.3 การหมักไวน์ข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การหมักน้ำส้มสายชู

เตรียมกรดอะซิติกเข้มข้น 98% โดยปริมาตรมาทำการเจือจางด้วยน้ำผสมกับไวน์ข้าว ปรับความเข้มข้น ของกรดอะซิติกเริ่มต้นให้เท่ากับ 4.5 กรัม/ลิตร ความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้นเท่ากับ 3.5 กรัม/ลิตร ทำให้มีความเข้มข้นรวมเริ่มต้น (Total concentration :TC) เท่ากับ 8 กรัม/ลิตร (TC8) ลงในถังหมัก 10 ลิตร โดยมีปริมาตรการหมัก (Working volume) 7 ลิตร จากนั้นเติมสารอาหาร ประกอบด้วย Glucose 1 กรัม/ลิตร Yeast extract 0.5 กรัม/ลิตร Diammonium phosphate (DAP) 0.5 กรัม/ลิตร และ MgSO4 0.2 กรัม/ลิตร ลงไปแล้วเติมหัวเชื้อ *A. aceti* WK 5% ของปริมาตรการหมัก ต่อสายให้อากาศที่มีตัวกรองเข้ากับปั๊ม โดยทำการตรวจปริมาณกรดและแอลกอฮอล์ในแต่ละวัน จนกระทั่งปริมาณแอลกอฮอล์ลดลงเหลือ 0.5 % หรือ 5 กรัม/ลิตร แสดงว่าสิ้นสุดการหมัก 1 รอบ ทำการเก็บตัวอย่าง และเติมวัตถุดิบใหม่เพื่อหมักในรอบต่อไป (จากภาพที่ 3.5)

3.3.3 การเตรียมใยบวบ

การเตรียมใยบวบ ตัดใยบวบให้เป็นรูปทรงตัดขวางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 cm. หนา 2 cm. แช่ในกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 5% โดยปริมาตร 1 คืน จากนั้นนำมาฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เวลา 20 นาที นำใยบวบที่ได้ไปอบด้วยเครื่องลมร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 32-48 ชั่วโมง คัดเลือกใยบวบแต่ละรูปทรงด้วยน้ำหนักที่ใกล้เคียงกัน (จากภาพที่ 3.4) (วราวุฒิ และคณะ, 2007)

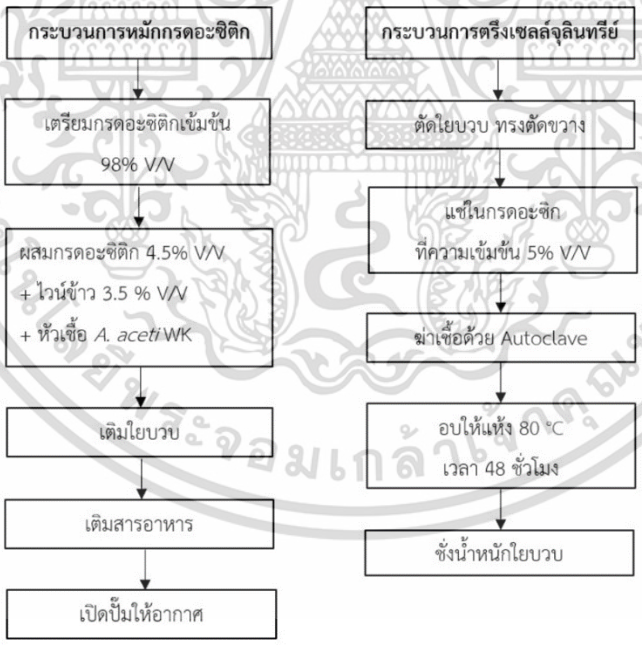
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก ข

ภาพที่ 3.4 การเตรียมใยบวบ

(ก) ตัดใยบวบแนวขวาง

(ข) แช่ใยบวบที่ตัดเรียบร้อยใน 5% (v/v) ในกรดอะซิติกเป็นเวลา 1 คืน



ภาพที่ 3.5 กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์ข้าวด้วยวิธีการตรึงเซลล์บนใยบวบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3.1 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์

การหมักน้ำส้มสายชูในถังหมักแบบให้อากาศ ขนาด 10 ลิตร โดยมีปริมาตรการหมัก 7 ลิตร

ภาพที่ 3.6 ลักษณะใยบวบที่ใช้ในการตรึงเซลล์ในการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวทรงตัดขวาง

3.3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.3.4.1 วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ (AOAC, 2000)

นำตัวอย่างไวน์ข้าวมาปริมาตร 50 มล. นำมาวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในตัวอย่างด้วยเครื่องอีบูลิโอมิเตอร์ แล้วอ่านค่าอุณหภูมิของตัวอย่างไปเตรียมกับแผ่นอ่านปริมาณแอลกอฮอล์ % โดยปริมาตร

3.3.4.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดที่ผลิตได้ (AOAC, 2000)

นำตัวอย่างน้ำส้มสายชูปริมาตร 5 มล. เติมน้ำกลั่น 75 มล. ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล. หยดฟีนอล์ฟทาลีน 1-2 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ ไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 1 N NaOH สังเกตจุดยุติของตัวอย่างจะเกิดเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต ทำการทดลอง ซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณกรดอะซิติกตามสมการที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\%\text{ความเป็นกรด (w/v)} = \frac{(mL \text{ ของ } NaOH) \times (Normality \text{ของ} NaOH) \times (\text{น้ำหนักกรัมสมมูลของกรดอะซิติก}) \times 100}{mL \text{ของตัวอย่าง} \times 1000} \quad \text{3.1}$$

โดย mL ของ NaOH คือ ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เป็นหน่วย (มล.)

Normality ของ NaOH คือ ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์หน่วยนอร์มอล (N)

mL ของตัวอย่าง คือ ปริมาตรของตัวอย่าง (มล.)

สูตรคำนวณหาอัตราการผลิตกรด (Acetification rate)

$$\text{ETA} = \frac{\boldsymbol{Acid\ Production}(\frac{g}{L})}{\boldsymbol{Acetification\ period\ in\ days}\ (d)} \quad \text{——— 3.2}$$

3.3.4.2 วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ทั้งหมดด้วยวิธีน้ำหนักแห้ง (Cell dry weight)

1. วิเคราะห์ปริมาณเซลล์จากน้ำหมัก

นำน้ำส้มสายชูที่มีเซลล์ *A. aceti WK* ปริมาณ 50 มล. มาใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยงแล้วทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จะเกิดการแยกตะกอนกับส่วนใสขึ้น เทส่วนใสออกแล้วทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นใน หลอดทดลอง อัตราส่วนเจือจาง 100:0 80:20 60:40 40:60 และ 20:80 นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาเฉพาะเซลล์มาทำการทดลองปริมาตร 2 มล. นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักส่วนที่เหลือนำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 580 nm นำทั้งสองค่ามาหาความสัมพันธ์ โดยทำการพลอตกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่นที่อ่านได้กับน้ำหนักแห้งของเซลล์ จะได้สมการเส้นตรงเพื่อใช้ในการคำนวณค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามสมการที่ 3.3 (Krusong และ Vichitraka, 2011)

สูตรคำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์

$$\text{น้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(B-A)\times 1000}{\text{ปริมาตรที่ใช้}} \quad \text{——— 3.3}$$

โดย A คือ น้ำหนักกระป๋องอะลูมิเนียมที่ผ่านการอบ (กรัม)

B คือ น้ำหนักตัวอย่างที่อยู่ในอะลูมิเนียมแคนที่ผ่านการอบ (กรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่เกาะบนใยบวบ

นำใยบวบที่มีเซลล์ *A. aceti* WK เกาะอยู่ใส่ในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เติมสารละลายโซเดียมซิเตรตความเข้มข้น 0.05 M ปริมาณ 300 มล. นำไปเขย่าด้วยเครื่องแบบขนาน ที่ความเร็วรอบ 175 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเทตัวอย่างลงในถุงตีปั่นแล้วนำไปตีปั่นเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทำการ วิเคราะห์เหมือนกับการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์แห้งจากน้ำหมักที่ได้กล่าวมาข้างต้น (Krusong และ Vichitraka, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

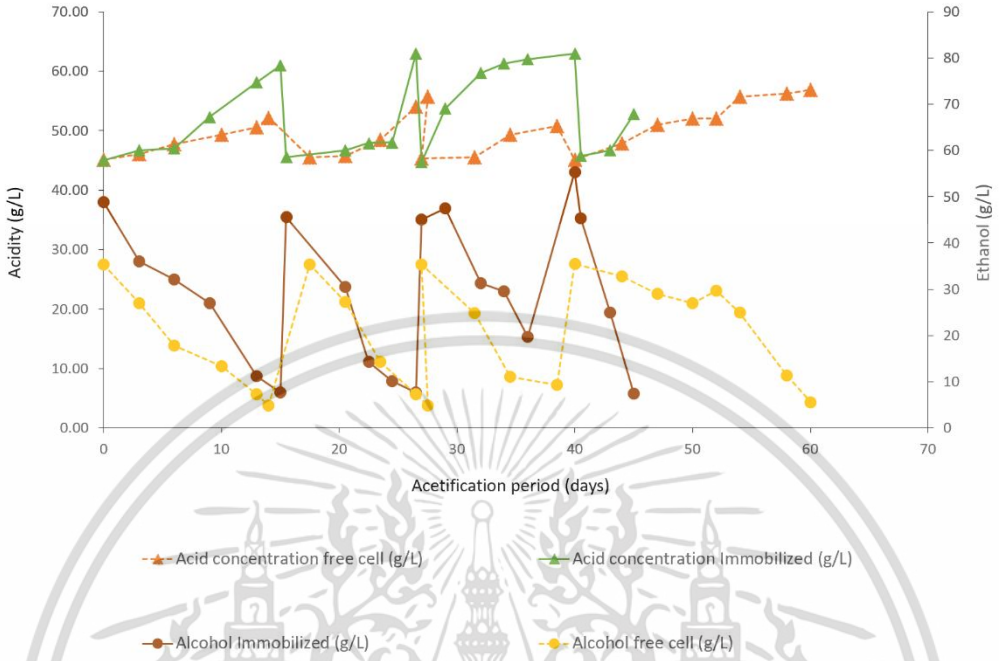
ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู โดยกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจะเริ่มจากการเตรียมน้ำหมักก่อนซึ่งจะประกอบไปด้วย เอทานอล น้ำ และสารอาหารสำหรับแบคทีเรียอะซิติก โดยใช้หลักการ Total concentration คือผลรวมความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดอะซิติก รวมเท่ากับ 8 (TC8) โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติก 4.5% และความเข้มข้นของเอทานอล 3.5% จากนั้นทำการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous fermentation) ทั้งหมด 3 รอบ ทั้งของการตรึงเซลล์และแบบไม่ตรึงเซลล์ จากนั้นจะเก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์เอทานอลเมื่อเอทานอลต่ำกว่าหรือเท่ากับ 0.5% ถือว่าสิ้นสุด 1 รอบของการหมัก อีกทั้งวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกและปริมาณเซลล์แห้ง

4.1 การศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูโดยเชื้อ *A. aceti* WK โดยใช้วิธีการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบ

ผลการศึกษาการผลิตกรดอะซิติกในการหมักน้ำส้มสายชู ในถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง ขนาด 10 ลิตร และใช้ปริมาตรในการหมัก 7 ลิตร ด้วยเชื้อ *“A. aceti* WK“ ที่ตรึงเซลล์ด้วยใยบวบในถังหมักและเปรียบเทียบกับระบบที่ไม่มีการตรึงเซลล์ จากภาพที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงการผลิตกรดอะซิติกและเอทานอลระหว่างกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวในระบบที่ไม่มีการตรึงเซลล์และระบบที่มีการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบและการเปลี่ยนแปลงของแอลกอฮอล์ในระหว่างกระบวนการหมัก (g/L)

ภาพที่ 4.1 จะพบว่าการตรึงเซลล์สามารถช่วยลดระยะเวลาในการปรับตัว (Adaptation phase) ทำให้สามารถผลิตกรดได้สูงขึ้นและใช้ระยะเวลาการหมักที่สั้น เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักน้ำส้มสายชูแบบไม่ตรึงเซลล์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการหมักน้ำส้มสายชูด้วยวิธีการตรึงเซลล์มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกว่าโดยใช้ระบบ QAP (Quick acetification process) จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าการหมักแบบตรึงเซลล์จะได้ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่เข้มข้นโดยเฉลี่ย 14.11 ± 5.33 กรัม/ลิตร เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับระบบที่หมักแบบไม่ตรึงเซลล์ ได้ความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่เข้มข้นโดยเฉลี่ย 9.15 ± 3.50 กรัม/ลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ (วราวุฒิ และคณะ, 2553) รายงานว่า ใยบวบมีโครงสร้างเหมาะสมในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย *A. aceti* WK เพื่อผลิตน้ำส้มสายชู เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นเส้นใยเซลลูโลสที่มีรูพรุนในโครงสร้าง ทำให้อากาศสามารถกระจายผ่านได้ดี นอกจากนี้รายงาน (วราวุฒิ และคณะ, 2557) การตรึงเซลล์ด้วยใยบวบจะก่อให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกในระบบ QAP (Quick acetification process)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกด้วยวิธีการตรึงเซลล์ *Acetobacter aceti* WK โดยวิธีตรึงเซลล์ด้วยใยบวบกับวิธีการไม่ตรึงเซลล์

ในการศึกษาประสิทธิภาพผลการผลิตกรดอะซิติก โดยการหมักน้ำส้มสายชูโดยใช้ระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องด้วยการใช้หัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ตรึงเซลล์ด้วยใยบวบในถังหมักเปรียบเทียบกับระบบที่ไม่มีการตรึงเซลล์ ได้ผลดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวด้วยเชื้อ *A. aceti* WK ด้วยวิธีการตรึงเซลล์กับการหมักด้วยวิธีการไม่ตรึงเซลล์

Initial acetic acid (g/L)	Free cell	Immobilized cells
1 cycle	45.50 ± 0.57	45.50 ± 1.46
2 cycle	45.30 ± 0.47	44.70 ± 3.07
3 cycle	45.10 ± 0.00	45.70 ± 0.47
average (g/L)	45.30 ± 0.37	45.30 ± 1.66
Final acetic production (g/L)		
1 cycle	55.70 ± 1.13	63.00 ± 1.50
2 cycle	50.80 ± 2.04	63.00 ± 0.57
3 cycle	56.90 ± 4.91	52.80 ± 0.86
average (g/L)	54.46 ± 2.69	59.6 ± 0.97
Acetic acid production (g/L)		
1 cycle	10.20 ± 4.23	17.46 ± 6.45
2 cycle	5.50 ± 2.39	17.73 ± 6.42
3 cycle	11.80 ± 3.90	7.13 ± 3.13
average (g/L)	9.15 ± 3.50	14.11 ± 5.33
Acetification period (D)		
1 cycle	10	11
2 cycle	11	14
3 cycle	21	6
average (g/L)	14	10.33
Acetification rate (g/L/D)		
1 cycle	1.02 ± 0.26	1.59 ± 0.10
2 cycle	0.48 ± 0.26	1.36 ± 0.10
3 cycle	1.02 ± 0.26	1.59 ± 0.10
average (g/L)	0.84 ± 0.26^{S}	1.59 ± 0.1^{S}

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการหมักแบบตรึงเซลล์กับแบบไม่ตรึงเซลล์, s= significant ที่อยู่ในแนวของค่า Acetification rate (g/L/D) ของตัวอย่าง Cycle ที่ 1,2 และ 3 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) Acetification rate; ETA) (g/L/D) คำนวนได้จากปริมาณที่สร้างขึ้นในรอบการหมักหารด้วยระยะเวลาที่ใช้ในการสร้างกรดของแต่ละรอบการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลดังตารางที่ 4.1 พบว่าผลของการผลิตกรดและระยะเวลาในการผลิตกรดของเชื้อ *A. aceti* WK จากผลการศึกษาการหมักด้วยวิธีการตรึงเซลล์ทำให้ประสิทธิภาพของการผลิตกรดสูงขึ้น โดยสามารถผลิตกรดเฉลี่ยได้ถึง 14.11 ± 5.33 (กรัม/ลิตร) ใช้ระยะเวลาโดยเฉลี่ย 10.33 วัน ซึ่งเร็วกว่าวิธีการไม่ตรึงเซลล์ที่สามารถผลิตกรดโดยเฉลี่ยได้ 9.15 ± 3.50 (กรัม/ลิตร) ใช้ระยะเวลาโดยเฉลี่ยมากกว่า 14 วัน ดังนั้นการตรึงเซลล์ส่งผลให้การผลิตกรดและอัตราการผลิตกรดเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับแบบไม่ตรึงเซลล์ จากผลที่กล่าวมาทำให้ทราบว่าการหมักด้วยวิธีการตรึงเซลล์มีประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกได้มากกว่าการหมักด้วยวิธีการไม่ตรึงเซลล์ โดยจะส่งผลกระทบต่อการผลิตกรดอะซิติก และพบว่าการหมักแบบไม่ตรึงเซลล์ Cycle ที่ 2 มีค่าการผลิตกรดอะซิติกเท่ากับ 5.46 ± 2.39 (กรัม/ลิตร) ซึ่งมีค่าน้อยกว่า Cycle ที่ 1 และ Cycle ที่ 3 ที่เป็นเช่นนี้เพราะค่าการผลิตกรดอะซิติกของ Cycle ที่ 2 ลดลงเป็นช่วงเวลาที่หัวเชื้อ *A. aceti* WK มีการลดจำนวนลงและภายหลังเชื้อเพิ่มจำนวนขึ้น อาจเนื่องมาจากการเพิ่มความเป็นพิษของกรดอะซิติก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายต่อการเพิ่มจำนวนของหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติก (วราวุฒิ, 2560) ดังนั้นการตรึงเซลล์จึงเป็นการช่วยลดการเกิดสภาวะเครียดจากปัจจัยต่างๆได้เนื่องจากใยบวบที่นำมาตรึงเซลล์มีโครงสร้างเป็นเส้นใยที่มีลักษณะเป็นรูพรุนที่สามารถช่วยให้เซลล์ยึดเกาะบนวัสดุเสริมได้ดี อีกทั้ง (วราวุฒิ และคณะ, 2557) พบว่าการตรึงเซลล์เป็นกระบวนการหมักแบบเร็ว (Quick acetification process) โดยเป็นการปล่อยให้แอลกอฮอล์ได้ไหลผ่านวัสดุตัวกลางที่มีเซลล์แบคทีเรียอะซิติกถูกตรึงอยู่อย่างช้าๆ เพื่อเป็นการเพิ่มอัตราการถ่ายโอนออกซิเจนได้อย่างทั่วถึงและเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างแอลกอฮอล์ในไวน์กับแบคทีเรียอะซิติก ทำให้ได้แบคทีเรียอะซิติกเพิ่มมากขึ้นและจะไปสร้างกรดให้ได้เพิ่มมากขึ้น ใช้ระยะเวลาสั้นลง ดังนั้นจึงส่งผลให้อัตราการผลิตกรดโดยวิธีการตรึงเซลล์จึงสูงกว่าการหมักด้วยวิธีการไม่ตรึงเซลล์

4.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. aceti* WK ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบกับวิธีการไม่ตรึงเซลล์

การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. aceti* WK ในการหมักน้ำส้มสายชูในระบบที่ไม่มีการตรึงเซลล์และระบบที่มีการตรึงเซลล์ด้วยใยบวบ ได้ผลดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าปริมาณเซลล์แห้งของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวด้วยเชื้อ *A. aceti* WK ด้วยวิธีการตรึงเซลล์กับการหมักด้วยวิธีการไม่ตรึงเซลล์

cycle	เซลล์อิสระ		ตรึงเซลล์		
	เซลล์ที่เกาะอยู่บนใยบวบ (mg/L)	เซลล์ที่อยู่ในน้ำหมัก (mg/L)	เซลล์ที่เกาะอยู่บนใยบวบ (mg/L)	เซลล์ที่อยู่ในน้ำหมัก (mg/L)	ปริมาณเซลล์รวม (mg/L)
1	-	160.72	17.74	178.46	196.2
2	-	168.25	23.11	162.87	185.99
3	-	179	26.34	165.02	191.36
ค่าเฉลี่ย	-	169.32^{S}	22.40	168.78	191.18^{S}

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการหมักแบบตรึงเซลล์และไม่ตรึงเซลล์, s= significant ที่อยู่ในแนวของค่าเฉลี่ย ของตัวอย่าง Cycle ที่ 1,2 และ 3 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลในตารางที่ 4.2 จะพบว่าใน 3 รอบ ระบบการหมักแบบตรึงเซลล์จะได้ปริมาณเซลล์แห้งเฉลี่ยอยู่ที่ 191.18 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมีปริมาณมากกว่าปริมาณเซลล์แห้งของระบบการหมักแบบไม่ตรึงเซลล์เฉลี่ยคือ 169.32 มิลลิกรัม/ลิตร จากผลการทดลองนี้สามารถยืนยันข้อดีของการตรึงเซลล์ที่ใช้เชื้อ *A. aceti* WK ที่ตรึงอยู่บนใยบวบ สามารถป้องกันเซลล์จากผลกระทบเชิงลบได้ และสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการหมักให้สูงขึ้น เนื่องจากใยบวบที่ใช้ในการตรึงเซลล์มีโครงสร้างเหมาะสมต่อการใช้เป็นวัสดุตรึงที่ดีกับเชื้อ *A. aceti* WK เนื่องจากใยบวบมีลักษณะเป็นเส้นใยที่เหมาะสมต่อการยึดจับของเชื้อได้ดี เป็นรูพรุนทำให้อากาศสามารถกระจายผ่านได้ดี ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการผลิตน้ำส้มสายชู (วราวุฒิ, 2560) ซึ่งแบคทีเรียอะซิติกนั้นจำเป็นที่ต้องใช้อากาศในการเจริญ ดังนั้นเมื่อทำการหมักด้วยวิธีการตรึงเซลล์จะทำให้มีเชื้อ *A. aceti* WK มากขึ้น จึงมีปริมาณเซลล์แห้งโดยเฉลี่ยที่สูงกว่า นอกจากนี้งานวิจัยของ (Krusong, 2015) พบว่าใยบวบให้ผลในการตรึงเซลล์ *A. aceti* WK ได้ดีในสภาพที่ใยบวบนั้นลอยอยู่ในน้ำหมัก เนื่องจากน้ำหนักที่เบาของใยบวบอาจจะก่อให้เกิดความสมดุลของปริมาณเชื้อ *A. aceti* WK ทั้งหมดในน้ำหมัก กล่าวคือในน้ำหมักที่มีใยบวบจะมีปริมาณหัวเชื้อที่มากกว่าในน้ำหมักที่ไม่มีใยบวบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากการศึกษาประสิทธิภาพของการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวด้วยวิธีการตรึงเซลล์โดยใช้ใยบวบกับวิธีการไม่ตรึงเซลล์ พบว่า อัตราการผลิตกรดด้วยวิธีการตรึงเซลล์จะสูงกว่าวิธีการแบบไม่ตรึงเซลล์ ซึ่งจากอัตราการผลิตกรดโดยเฉลี่ยทำให้ทราบว่า วิธีการตรึงเซลล์มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการไม่ตรึงเซลล์ โดยการหมักด้วยวิธีการตรึงเซลล์จะไปช่วยให้เอทานอลในไวน์ข้าวไหลผ่านใยบวบที่มีการตรึงเซลล์ *A. aceti* WK อย่างช้าๆ เพื่อจะไปเพิ่มอัตราการถ่ายโอนออกซิเจน และเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสได้อย่างทั่วถึง เนื่องจากใยบวบมีโครงสร้างเป็นรูพรุน เป็นคุณสมบัติที่ดีในการยึดตรึงเซลล์ ทำให้แบคทีเรียอะซิติกสามารถใช้อากาศในการเจริญได้ดี จึงทำให้เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยใยบวบมีปริมาณเซล์รวมที่สูงกว่าวิธีการไม่ตรึงเซลล์ ดังนั้นการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวด้วยวิธีการตรึงเซลล์สามารถช่วยลดระยะเวลาในการปรับตัว ทำให้ระยะการหมักสั้นลงและมีการผลิตกรดเพิ่มมากขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 สามารถใช้วัสดุอื่นในธรรมชาติใช้ในการตรึงเซลล์ได้ เช่น ซังข้าวโพด เปลือกไม้ เศษไม้โอ๊ค และชานอ้อย เป็นพืชทางการเกษตร

5.2.2 การเคลือบ Carrageenan สามารถทำให้วัสดุในการตรึงเซลล์มีความแข็งแรงขึ้น เพราะจะทำให้เซลล์เกาะติดได้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จุฑาทิพ พวงมาลา. 2559. การหมักน้ำส้มสายชูในถังหมัก Packed-bed bioreactor โดยอาศัยการตรึงหัวเชื้อ *Acetobacter aceti* WK ด้วยใยบวบ. **วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม.** คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นภา โล่ห์ทอง. 2520. น้ำส้มสายชู. ข่าวสารเกษตรศาสตร์. 22(4): 70-75.

นภษร บุญเพ็ชรแก้ว. 2545. การผลิตน้ำส้มสายชูโดยการตรึงเซลล์ในถังหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่อง. **วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม.** คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นพวรรณ เดชรักษา. 2558. การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำเชื่อมข้าวเหนียว Production of fermented vinegar from glutinous rice syrup. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์. 2546. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

พายัพภูเบศวร์ มากกูล. 2559. การพัฒนาพันธุ์ข้าวเหนียวเขี้ยวงูจากธนาคารเชื้อพันธุ์สู่นาเกษตรกร. วารสารวิชาการข้าว. 7(1): 46-47.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2553. การเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกของ *Acetobacter aceti* WK ที่ตรึงเซลล์ด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศ. **วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม.** คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วราวุฒิ ครูส่ง. 2560. การเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดใน Quick acetification process ด้วยการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติกด้วยใยบวบใน Packed-bed bioreactor. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2537. จุลชีวอุตสาหกรรม. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

AOAC. 2000. Official method of analysis of AOAC international in the Association of OfficialAnalytical Chemists book. Washington D.C. 17th Street Northwest.

Bekatorou, A. Plessas, S. and Mallouchos, A. 2019 Cell Immobilization Technologies for Applications in Alcoholic Beverages. In Applications of Encapsulation and Controlled Release. Florida: Boca Raton.

De Ory, I., Romero, L.E., and Cantero, D. 2004. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter aceti*. Process Biochemistry. 39(5): 547-555.

Hutchinson, U.F., Ntwampe, S.K., Chidi, B.S., Mewa-Ngongang, M., du Plessis, H.W., Booyse, M. and Jolly, N.P. 2020. Reusability of immobilized cells for subsequent balsamic-styled vinegar fermentations. 6(4): 103.

Kocher, G., Kalra, K. and Phutela, R. 2006. Comparative Production of Sugarcane Vinegar by Different Immobilization Techniques. In Journal of the Institute of Brewing. London: SE1 2ND, UK.

Krusong, W., Vichitraka, A. and Pornpakdeewattana, S. 2007. Luffa sponge as supporting material of *Acetobacter aceti* WK for corn vinegar production in semi-continuous process. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Science. 7: 63-68.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 in agriculture and Natural Resources. 44(3): 454-461.

Krusong, W. and Vichitraka, A. 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 in 2nd International conference on biotechnology and food science IPCBEE. 7: 86-90.

Krusong, W., Teerarak, M. and Laosinwattana, C. 2015. Liquid and vapor-phase vinegar reduces 26 Klebsiella pneumoniae on fresh coriander. Food Control. 50: 502-508.

Krusong, W., Jindaprasert, A. Laosinwattana, C. and Teerarak, M. 2015. Baby corn fermented vinegar and its vapour control postharvest decay in strawberries in New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 43(3): 193-203.

Krusong, W., Kerdpiboon, S., Jindaprasert, A., Yaiyen, S., Pornpukdeewatana, S. and Tantratian, S. 2015. Influence of calcium chloride in the high temperature acetification by strain *Acetobacter aceti* WK for vinegar in Journal of applied microbiology. 119(5): 1291-1300.

Krusong, W., Kerdpiboon, S., Pornpukdeewattana, S. and Jindaprasert, A. 2016. Luffa sponge offsets the negative effects of aeration on bacterial cellulose production in Journal of applied microbiology. 121(6): 1665-1672.

Kocher, G.S. and Dhillon, H.K. 2012. Fermentative production of sugarcane vinegar by immobilized cells of *Acetobacter aceti* under packed bed conditions. London: Sugar Tech.

Kandylis, P. 2020. Innovative vinegar products. In Advances in Vinegar Production. Florida: Boca Raton.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lisa, S. and Paolo, G. 2009. Vinegars of the world. New York. Springer Milan Berlin Heidelberg.

Nisha, S., Arun Karthick, S. and Gobi N. 2012. A Review on Methods Application and Properties of Immobilized Enzyme. 148-152.

Porzio 2004. Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. New York. Springer Milan Berlin Heidelberg.

Sinnot, E.W. and Bloch. 1943. Development of the Fibrous Net in the Fruit of Various Races of Luffa cylindrica. Botanical Gazette. 105: 90-100.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

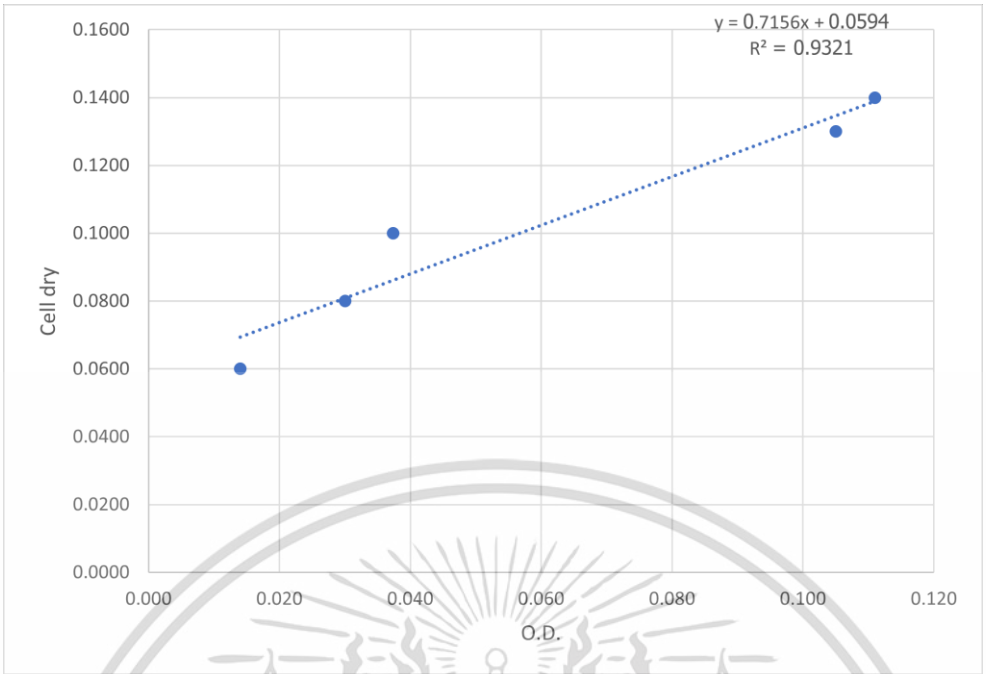
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

รูปภาพ

ภาพที่ ก.1 ลักษณะของถังหมักเป็นแบบให้อากาศ ถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่มีปริมาตรการหมัก 7 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งจากน้ำหมักของเชื้อ *A. aceti* WK

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ค.1 วิเคราะห์ค่าอัตราการผลิตกรด (Acetification rate) โดยใช้วิธีหาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA)

Descriptives

Acetificationrate

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Free cell	3	.695133	.2871185	.1657680	-.018109	1.408375	.4754	1.0200
Immobilized cells	3	1.512389	.1284267	.0741472	1.193359	1.831419	1.3641	1.5879
Total	6	1.103761	.4898410	.1999767	.589705	1.617818	.4754	1.5879

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Acetificationrate	Based on Mean	2.988	1	4	.159
	Based on Median	.522	1	4	.510
	Based on Median and with adjusted df	.522	1	3.175	.519
	Based on trimmed mean	2.630	1	4	.180

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

Acetificationrate

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.002	1	1.002	20.254	.011
Within Groups	.198	4	.049		
Total	1.200	5			

Descriptives

Acetificationrate

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 Cycle	2	1.305000	.4030509	.2850000	-2.316268	4.926268	1.0200	1.5900
2 Cycle	2	.920000	.6222540	.4400000	-4.670730	6.510730	.4800	1.3600
3 Cycle	2	1.090000	.7071068	.5000000	-5.263102	7.443102	.5900	1.5900
Total	6	1.105000	.4896019	.1998791	.591194	1.618806	.4800	1.5900

Tests of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Acetificationrate	Based on Mean	1.997E+30	2	3	<.001
	Based on Median	1.997E+30	2	3	<.001
	Based on Median and with adjusted df	1.997E+30	2	1.800	<.001
	Based on trimmed mean	6.657E+29	2	3	<.001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

Acetificationrate

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.149	2	.074	.213	.820
Within Groups	1.050	3	.350		
Total	1.199	5			

Multiple Comparisons

Dependent Variable		(I) trt	(J) trt	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
Acetificationrate	Scheffe	1 cycle	2 cycle	.385000	.4872029	.753	-1.744483	2.514483
			3 cycle	.000000	.4872029	1.000	-2.129483	2.129483
		2 cycle	1 cycle	-.385000	.4872029	.753	-2.514483	1.744483
			3 cycle	-.385000	.4872029	.753	-2.514483	1.744483
		3 cycle	1 cycle	.000000	.4872029	1.000	-2.129483	2.129483
			2 cycle	.385000	.4872029	.753	-1.744483	2.514483
	LSD	1 cycle	2 cycle	.385000	.4872029	.487	-1.165497	1.935497
			3 cycle	.000000	.4872029	1.000	-1.550497	1.550497
		2 cycle	1 cycle	-.385000	.4872029	.487	-1.935497	1.165497
			3 cycle	-.385000	.4872029	.487	-1.935497	1.165497
		3 cycle	1 cycle	.000000	.4872029	1.000	-1.550497	1.550497
			2 cycle	.385000	.4872029	.487	-1.165497	1.935497
Biock	Scheffe	1 cycle	2 cycle	.0000	.70711	1.000	-3.0906	3.0906
			3 cycle	.0000	.70711	1.000	-3.0906	3.0906
		2 cycle	1 cycle	.0000	.70711	1.000	-3.0906	3.0906
			3 cycle	.0000	.70711	1.000	-3.0906	3.0906
		3 cycle	1 cycle	.0000	.70711	1.000	-3.0906	3.0906
			2 cycle	.0000	.70711	1.000	-3.0906	3.0906
	LSD	1 cycle	2 cycle	.0000	.70711	1.000	-2.2503	2.2503
			3 cycle	.0000	.70711	1.000	-2.2503	2.2503
		2 cycle	1 cycle	.0000	.70711	1.000	-2.2503	2.2503
			3 cycle	.0000	.70711	1.000	-2.2503	2.2503
		3 cycle	1 cycle	.0000	.70711	1.000	-2.2503	2.2503
			2 cycle	.0000	.70711	1.000	-2.2503	2.2503

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acetificationsrate

	trt	N	Subset 1
Scheffe[a,b]	2 cycle	2	.920000
	1 cycle	2	1.305000
	3 cycle	2	1.305000
	Sig.		.753

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .237.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

ค.2 วิเคราะห์ค่าความต่างของปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะอยู่บนใยบวบและน้ำหมัก

Cellsvolume * trt

Cellsvolume

Trt	Mean	N	Std. Deviation	Sum	Minimum	Maximum	Harmonic Mean
1	178.460000	2	25.0881486	356.9200	160.7200	196.2000	176.696537
2	177.120000	2	12.5440743	354.2400	168.2500	185.9900	176.675799
3	185.180000	2	8.7398398	370.3600	179.0000	191.3600	184.973755
Total	180.253333	6	13.6950030	1081.5200	160.7200	196.2000	179.364930

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cellsvolume * block

Descriptives

Cellsvolume

Harmonic

Cellsvolume

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	2	158.990000	17.7342381	12.5400000	-.345807	318.325807	146.4500	171.5300
2	2	123.565000	96.1453090	67.9850000	-740.266329	987.396329	55.5800	191.5500
3	2	146.320000	129.1601247	91.3300000	-1014.137679	1306.777679	54.9900	237.6500
Total	6	142.958333	74.2018793	30.2927904	65.088237	220.828430	54.9900	237.6500

Tests of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Cellsvolume	Based on Mean	9.732E+30	2	3	<.001
	Based on Median	9.732E+30	2	3	<.001
	Based on Median and with adjusted df	9.732E+30	2	2.778	<.001
	Based on trimmed mean	5.407E+30	2	3	<.001

ANOVA

Cellsvolume

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1288.833	2	644.417	.074	.931
Within Groups	26240.761	3	8746.920		
Total	27529.594	5			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Cellsvolume

	(I) Trt	(J) Trt	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
Scheffe	1	2	35.4250000	93.5249725	.932	-373.357120	444.207120
		3	12.6700000	93.5249725	.991	-396.112120	421.452120
	2	1	-35.4250000	93.5249725	.932	-444.207120	373.357120
		3	-22.7550000	93.5249725	.971	-431.537120	386.027120
	3	1	-12.6700000	93.5249725	.991	-421.452120	396.112120
		2	22.7550000	93.5249725	.971	-386.027120	431.537120
LSD	1	2	35.4250000	93.5249725	.730	-262.213203	333.063203
		3	12.6700000	93.5249725	.901	-284.968203	310.308203
	2	1	-35.4250000	93.5249725	.730	-333.063203	262.213203
		3	-22.7550000	93.5249725	.823	-320.393203	274.883203
	3	1	-12.6700000	93.5249725	.901	-310.308203	284.968203
		2	22.7550000	93.5249725	.823	-274.883203	320.393203

Cellsvolume

	Trt	N	Subset for alpha = 0.05: 1
Scheffe[a]	2	2	123.565000
	3	2	146.320000
	1	2	158.990000
	Sig.		.932

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - นามสกุล	พัทธมน สุพรรณวงศ์
วัน เดือน ปีเกิด	1 มิถุนายน 2544
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนมกุฎเมืองราชวิทยาลัย
	ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมอาหาร หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
	สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมอาหาร
ประสบการณ์ทำงาน	บริษัท ไทยอินสแตนท์ โพรดักส์
ผลงานวิจัย	การหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวด้วยวิธีการตรึงเซลล์
	(Vinegar fermentation from rice wine by using cell
	Immobilization method)
ชื่อ – นามสกุล	มลทิรา อ่องคำ
วัน เดือน ปีเกิด	18 มกราคม 2544
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนท่าวังผาพิทยาคม
	ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมอาหาร หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
	สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมอาหาร
ประสบการณ์การทำงาน	ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ปศุสัตว์เชียงใหม่
ผลงานวิจัย	การหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวด้วยวิธีการตรึงเซลล์
	(Vinegar fermentation from rice wine by using cell
	Immobilization method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้