



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดใน Quick acetification process ด้วยการ
ตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติกด้วยใยบัวใน Packed-bed bioreactor

Increment of acidification efficiency in Quick acetification process by
immobilized acetic acid bacteria with luffa sponge in
packed-bed bioreactor

นายวรารุณี ครูสง

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2560

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดใน Quick acetification process ด้วยการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติกด้วยใยบัวใน Packed-bed bioreactor

Increment of acidification efficiency in Quick acetification process by immobilized acetic acid bacteria with luffa sponge in packed-bed bioreactor

นายวรารุณี ครูสง

RCH

๖๒๘๖ ก

๒๕๖๐

เลขทะเบียน 149077

วันเดือนปี 4 ต.ค. 2561

12880735

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2560

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดใน Quick acetification process ด้วยการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติกด้วยใยบวบใน Packed-bed bioreactor

แหล่งเงิน

งบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ..... 2559..... จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน..... 394,000,-..... บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย..... 1..... ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2558 ถึง..... กันยายน 2559.....

หัวหน้าโครงการ

รศ.ดร.วราวุฒิ ครูสง

สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

กระบวนการ Quick acetification เพื่อผลิตน้ำส้มสายชู โดยใช้ packed-bed (PB) bioreactor ขนาด 10 ลิตร ที่เชื่อมต่อภายนอกกับถังเก็บน้ำหมักขนาด 10 ลิตร (ปริมาตรน้ำหมัก 5 ลิตร) ที่มีการให้อากาศตลอดเวลาได้พัฒนาขึ้นและเรียกระบบนี้ว่าระบบ packed bed-external aerated fermenting medium (PB-EAFM) ในเบื้องต้นได้ทำการหาค่า volumetric oxygen transfer coefficient (k_La) ของ EAFM จากอัตราการให้อากาศแก่ EAFM สูงสุดโดยพบว่า อัตราการให้อากาศในน้ำหมัก EAFM เท่ากับ 6 ลิตรต่อนาที ให้ค่า k_La เท่ากับ 0.092 h^{-1} ที่ไม่แตกต่างจากที่ 9 ลิตรต่อนาที ($p \geq 0.05$) และเมื่อศึกษาอัตราการหมุนวนของน้ำหมัก EAFM ในระบบ PB-EAFM พบว่า อัตราการหมุนวนที่ 0.09 ลิตรต่อนาที ให้ค่า k_La สูงสุดเท่ากับ 0.078 h^{-1} จากนั้นทำการศึกษาการผลิตกรดอะซิติกในระบบ PB-EAFM โดยพบว่า สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกจากเชื้อแบคทีเรียอะซิติก (acetic acid bacteria; AAB) สายพันธุ์ *Acetobacter aceti* WK ที่ตรึงบนใยบวบ (luffa sponge matrices; LSM) เกิดเป็นหัวเชื้อในลักษณะ LSM-AAB โดยใช้ LSM ในปริมาณ 3 ลิตร โดยปริมาตร ใน PB bioreactor ใช้การหมุนวนน้ำหมัก EAFM (ที่มีระดับความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วย ความเข้มข้นของกรดอะซิติกและความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำหมักเริ่มต้นเท่ากับ 45 และ 35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ของระบบ PB-EAFM ในอัตรา 0.03 ลิตรต่อนาที และมีการให้อากาศแก่น้ำหมัก EAFM ใน EAFM container ในระดับ 9 ลิตรต่อนาที ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *A. aceti* WK ในปริมาณที่สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทั้งเซลล์ที่ตรึงกับ LSM (0.00165 กรัมต่อลิตร) และเซลล์อิสระในน้ำหมัก (0.00091 กรัมต่อลิตร) ซึ่งช่วยให้เกิดอัตราการสร้างกรด (ETA) ที่สูงที่สุดเท่ากับ 7.67 ± 0.001 กรัมต่อลิตรต่อวัน จากนั้นทำการศึกษาความคงตัวของระบบ QAP ที่ใช้ LSM-AAB ของเชื้อ *A. aceti* WK ในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง จำนวน 9 รอบพบว่า มีค่า ETA เฉลี่ยเท่ากับ 8.94 ± 0.1 กรัมต่อลิตรต่อวัน และค่า Biotransformation yield ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพในการเปลี่ยนวัตถุดิบ (แอลกอฮอล์) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ (กรดอะซิติก) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 51.6% สามารถผลิตกรดอะซิติกได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาเพียง 2 วัน ต่อบรรยากาศการผลิต นอกจากนี้แล้วจากการติดตามลักษณะของการยึดเกาะของเชื้อ *A. aceti* WK บน LSM และในน้ำหมัก EAFM ด้วย Scanning electron microscopy พบว่า เชื้อ *A. aceti* WK สามารถเจริญได้ดีทั้งสภาพที่ตรึงบนเส้นใยของ LSM และสภาพเซลล์ที่เจริญในน้ำหมัก EAFM แสดงให้เห็นว่าระบบ PB-EAFM ที่ใช้ LAM-AAB นี้เป็นกระบวนการผลิตกรดอะซิติกแบบ QAP ที่มีประสิทธิภาพและมีต้นทุนไม่สูงเหมาะสมกับการผลิตในระดับที่อุตสาหกรรมได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ : การสร้างกรด Quick acetification process การตรึงเซลล์ ใยบวบ Packed-bed bioreactor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Increment of acidification efficiency in Quick acetification process by immobilized acetic acid bacteria with luffa sponge in packed-bed bioreactor

Researcher:.....Assoc.Prof.Dr. Warawut Krusong

Faculty:Agro-Industry..... **Division:** Industrial Fermentation Technology.....

ABSTRACT

Quick acetification process (QAP) using 10 l packed-bed (PB) bioreactor connected with 10 l external aerated fermenting medium (EAFM) container. 5 l EAFM was continuously aerated. This developed process was called as packed bed-external aerated fermenting medium (PB-EAFM) system. Preliminary study in determination of oxygen in the system, the volumetric oxygen transfer coefficient (k_La) of EAFM was measured within three levels of aeration. The aeration at 6 l min^{-1} provided k_La at 0.092 h^{-1} which was not significant different from at 9 l min^{-1} ($p \geq 0.05$). Then, recycling rate of EAFM in PB-EAFM system was determined and found that the highest k_La (0.078 h^{-1}) was obtained at 0.09 l min^{-1} . Furthermore, the acetification in PB-EAFM system using the adsorption of acetic acid bacteria (AAB), *Acetobacter aceti* WK, on the surface of luffa sponge matrices (LSM) as LSM-AAB was investigated. The optimum conditions were investigated consisting of (1) 3 l (by volume) LSM; (2) recycling rate of EAFM in the system at 0.03 l min^{-1} and (3) aeration rate of EAFM in the container at 9 l min^{-1} . The medium for acetification was constantly controlled at 80 g l^{-1} total concentration consisting of 45 g l^{-1} initial acetic acid concentration and 35 g l^{-1} initial ethanol concentration. Results showed the high cell in both LSM (0.00165 g l^{-1}) and plactonic cells (0.00091 g l^{-1}) causing in high acetification rate ($7.67 \pm 0.001 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$). To prove the efficiency of the system, nine cycles of semi-continuous acetification were conducted. The high average ETA ($8.94 \pm 0.1 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) and average biotransformation yield (51.5%) was found. Interestingly, the acid in each cycle was produced quickly within 2 d. Moreover, results of SEM images showed high amount of *A. aceti* WK cells in both LSM and EAFM. It indicated that the PB-EAFM system using LSM-AAB was an effective QAP with low investment. It was suitable for acetification in semi-industrial level.

Keywords: acetification, Quick acetification process, immobilization, luffa sponge, packed-bed bioreactor

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ นอกจากนี้ ขอขอบคุณ น.ส.จุฑาทิพ พวงมาลา น.ส.จุฑามาศ ผ่องอำไพวงศ์ น.ส.สิริรักษ์ อมรชินวิวัฒน์ และน.ส.รัตติพร โพธิมล ที่ช่วยเหลือในด้านปฏิบัติการเป็นอย่างดี

รศ.ดร.วราวุฒิ ครุสง
หัวหน้าโครงการ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	2
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	2
1.6 คำสำคัญของการวิจัย.....	3
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	12
3.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติกทนกรดสูง (High acid tolerant strain) <i>Acetobacter acetii</i> WK.....	12
3.2 การเตรียมส่วนประกอบของระบบการตรึงด้วยหัวเชื้อ <i>Acetobacter acetii</i> WK เพื่อใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูในถังหมัก Packed-bed bioreactor.....	12
3.3 การตรวจสอบปริมาณอากาศในระบบการหมัก.....	15
3.4 ผลของปริมาณไยบวบที่ตรึงเซลล์ <i>Acetobacter acetii</i> WK ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชู.....	15
3.5 ผลของอัตราการหมุนวนน้ำหมักที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชู.....	16
3.6 ผลของอัตราการให้อากาศใน Acetification medium ในขวดบรรจุที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชู.....	16
3.7 ความคงตัวของระบบ Quick acetification process ที่ใช้ไยบวบในการตรึงเซลล์ <i>A. acetii</i> WK.....	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.8 สรุปและรายงานผลการทดลอง.....	16
3.9 การวางแผนการทดลอง.....	16
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	17
4.1 ค่า Volumetric mass transfer coefficient ($k_L a$) ระบบ packed bed-external aerated fermenting medium (PB-EAFM)	17
4.2 ผลของปริมาณใยบวบที่ตรึงเซลล์ <i>Acetobacter aceti</i> WK ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชู.....	18
4.3 ผลของอัตราหมวนวนน้ำหมักที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูในระบบ packed bed-external aerated fermenting medium ที่ใช้ใยบวบที่ตรึงเซลล์ <i>Acetobacter aceti</i> WK ในปริมาณ 3 ลิตร (โดยปริมาตร).....	21
4.4 ผลของอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมใน external aerated fermenting medium (EAFM) ต่อประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูในระบบ packed bed-EAFM ที่ใช้ใยบวบที่ตรึงเซลล์ <i>Acetobacter aceti</i> WK ในปริมาณ 3 ลิตร (โดยปริมาตร) และใช้อัตราหมวนวนน้ำหมัก EAFM เท่ากับ 0.03 ลิตรต่อนาที.....	22
4.5 ความคงตัวของระบบ Quick acetification process ที่ใช้ใยบวบในการตรึงเซลล์ <i>A. aceti</i> WK.....	24
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	27
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	27
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	28
เอกสารอ้างอิง.....	29
ภาคผนวก.....	34
ภาคผนวก ลักษณะวัสดุที่ใช้ในการศึกษา.....	34
ภาคผนวก วิถีวิเคราะห์.....	35
ประวัตินักวิจัย.....	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 Influence of amount of loofa sponge matrices (LSM) as adsorption material for <i>A. acetii</i> WK 20 on acetification in a 10 l packed-bed (PB) bioreactor with 5 l of external aerated fermenting medium (EAFM). Aeration rate at EAFM container was 6 l min ⁻¹ while 0.06 l min ⁻¹ of EAFM recycling rate at PB bioreactor was controlled. Acetification was conducted at ambient temperature (30±2°C).	20
4.2 Influence of recycling rate of external aerated fermenting medium (EAFM) in a 10 l 21 packed-bed (PB) bioreactor with 5 l EAFM in 10 l EAFM container. Luffa sponge matrices (LSM; 3 l by volume) was used as adsorption material for <i>Acetobacter acetii</i> WK. Aeration rate at EAFM container was 6 l min ⁻¹ while acetification was conducted at ambient temperature (30±2°C).	21
4.3 Influence of aeration rate into 5 l external aerated fermenting medium (EAFM) in 10 l EAFM 23 container. The EAFM container was externally connected with 10 l packed-bed (PB) bioreactor for acetification by <i>Acetobacter acetii</i> WK adsorbed on luffa sponge matrices (LSM; 3 l by volume) as adsorption material. Recycling rate of EAFM was 0.03 l min ⁻¹ while acetification was conducted at ambient temperature (30±2°C).	23
4.4 Results of nine cycles of acetification by <i>Acetobacter acetii</i> WK in 10 l packed-bed (PB) 25 bioreactor connected with 10 l external aerated fermenting medium (EAFM) container containing 5l EAFM at 30±1°C. Luffa sponge matrices was used as adsorption material and packed in PB bioreactor. The charging medium of each cycle was constant at a target total concentration of 80 g l ⁻¹ (45 g l ⁻¹ acetic acid and 35 g l ⁻¹ ethanol).	25

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ลักษณะของ <i>Luffa cylindrical</i>	5
2.2 ลักษณะโครงสร้างของใยบวบ: (a) โครงสร้างโดยรวม; (b) ส่วนของ core part และ hoop wall;.....6 (c) ส่วนตามแนวยาว ;(d) ส่วน outer surface เส้นสีน้ำเงินแสดงความหยาบของเส้นใยในส่วน inner surface และ outer surface	6
2.3 ลักษณะเส้นใยเดี่ยวของใยบวบ : (a) เส้นใยของผิวด้านใน (Inner surface); (b) ตัวอย่างเส้นใย.....6 เดี่ยว ๆ ในรูป Dumbell shape	6
2.4 ลักษณะของเส้นใยที่เป็นรูพรุนของใยบวบ.....7	7
2.5 ลักษณะของถังหมักระบบ Submerged acetification ที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตน้ำส้มสายชู : (ก).....9 Frings acetator; (ข) ถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi injector bioreactor) ที่หัวหน้าผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้น; (ค) แผนภาพแสดงการทำงานและอุปกรณ์ของถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ	9
3.1 Diagram of reciprocating shaker system applied for preparation of adsorbed.....13 <i>Acetobacter aceti</i> on surfaces of luffa sponge matrices. The cultivation was conducted in 100 l plastic fermentation tank which shaken at 1 Hz for 14 d at room temperature.	13
3.2 Diagram of packed bed-external aerated fermenting medium (PB-EAFAM) system.....14 used for acetification by adsorbed <i>Acetobacter aceti</i> WK on luffa sponge matrices. The PB bioreactor was connected with external aerated-fermenting medium (EAFAM) container.	14
4.1 Changes of dissolved oxygen (■) and volumetric oxygen transfer coefficient (◆).....17 of packed bed-external aerated fermenting medium (PB-EAFM) system: (A) effect of aeration at 0 (control), 3, 6 and 9 l min ⁻¹ in external aerated fermenting medium (EAFM) and (B) effect of EAFM recycling rate at 0 (control), 0.03, 0.06 and 0.09 l min ⁻¹ into packed-bed bioreactor while optimum aeration rate of EAFM providing suitable volumetric oxygen transfer coefficient was used (6 l min ⁻¹). Values represent means ± standard deviation of triplicates.	17

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.2 Illustration images of packed-bed (PB) bioreactor for packed bed-external aerated.....19 fermenting medium (EAFM) system for vinegar production using luffa sponge matrices (LSM) as adsorption material. Stainless steel-screen cylinder and duran bottle (10 l) as EAFM container : (a) characteristic of PB bioreactor, LSM and stainless steel-screen cylinder for packing 2 l of LSM; (b) 1 l fermenting medium at the bottle of PB bioreactor; (c) PB bioreactor with stainless steel-screen cylinder for packing 2.5 l and 3 l of LSM. One sq. inch holes were made along the height of stainless steel- screen cylinder. EAFM container, aeration pump (for EAFM) for supplying air into EAFM container and peristaltic pump for recycling of EAFM into PB bioreactor. Abbreviation : PB = packed bed; LSM = luffa sponge matrices; EAFM = external aerated fermenting medium.	
4.3 Acetification by <i>Acetobacter aceti</i> WK in 10 l packed-bed (PB) bioreactor connected.....24 with 10 l external aerated fermenting medium (EAFM) container containing 5l EAFM at $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. Luffa sponge matrices was used as adsorption material and packed in PB bioreactor. Acid produced (\square) and ETA (\blacksquare) in nine acetification cycles (2 nd to 10 th cycle) after start-up (1 st cycle). The charging medium of each cycle was constant at a target total concentration of 80 g l^{-1} (45 g l^{-1} acetic acid and 35 g l^{-1} ethanol). Values represent the means \pm standard deviation of triplicates.	
4.4 SEM images of adsorbed <i>Acetobacter aceti</i> WK cells on loofa sponge matrice (LSM).....26 in 10 l packed-bed bioreactor connected with 10 l external aerated fermenting medium (EAFM) container after 3 rd cycle of semi-continuous acetification at $30\pm 1^{\circ}\text{C}$: (a) LSM samples obtained; (b) <i>A. aceti</i> WK cells adsorbed on surface of LSM at $\times 5000$ magnification, and (c) <i>A. aceti</i> WK cells in EAFM $\times 5000$ magnification.	

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 หัวหน้าผู้วิจัยได้ศึกษาการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากแบคทีเรียอะซิติก *Acetobacter aceti* โดยหัวเชื้อดังกล่าวได้คัดเลือกมาจากธรรมชาติและปรับปรุงอย่างต่อเนื่องที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (วราวุฒิ ครุสง, 2545, 2547, 2550ก, 2550, 2550ค, 2551ก, 2551ข, 2552, 2553ก, 2553ข, 2554ก, 2554ข, 2555; Krusong *et al.*, 2004, 2007, 2010, 2014a, 2014b, 2015a) ทั้งนี้หัวเชื้อนี้ได้พัฒนาให้เป็นหัวเชื้อที่มีความสามารถในการทนกรดได้สูง (high acid-tolerant strain) เพื่อรองรับกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูระบบสภาพความเป็นกรดเริ่มต้นสูง (high initial acid concentration process) ซึ่งพัฒนาโดยหัวหน้าผู้วิจัย (Krusong *et al.*, 2014a, 2014b, 2015a) นอกจากนี้แล้วหัวหน้าผู้วิจัยได้พัฒนาเกี่ยวกับกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูโดยใช้ถังหมักในลักษณะต่างๆ เช่น air-lift fermenter (Krusong *et al.*, 2004, 2007), stirred tank bioreactor (Krusong *et al.*, 2010), reciprocating shaker (Krusong *et al.*, 2014b) และ “ถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ” (Krusong, unpublished data; เป็นถังหมักที่ได้รับรางวัลเทคโนโลยีเครื่องจักรกลยอดเยี่ยมประจำปี 2554 สาขาเครื่องจักรกลการผลิต จากกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ) หรือเรียกว่า “internal Venturi injector bioreactor” (Krusong *et al.*, 2014a, 2015a) นอกจากนี้แล้วจากการศึกษาด้านการพัฒนากระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากเชื้อ *A. aceti* ของหัวหน้าผู้วิจัยก็พบองค์ความรู้ว่า “ไยบวบ (luffa sponge)” มีโครงสร้างที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ *A. aceti* เพื่อผลิตน้ำส้มสายชู เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นเส้นใยเซลลูโลสที่มีรูพรุนในโครงสร้างทำให้อากาศ (ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการผลิตน้ำส้มสายชู) สามารถกระจายผ่านได้ดี ผลการศึกษาดังกล่าวให้ผลเป็นที่น่าพอใจ และยังเป็นผลงานที่แสดงให้เห็นว่าเป็นที่ทีมงานแรกที่ใช้ไยบวบในการผลิตน้ำส้มสายชูได้สำเร็จนอกเหนือจากที่ทีมงานวิจัยอื่นๆทั่วโลกได้ประยุกต์ใช้ไยบวบในด้านอื่นๆ นอกจากนี้แล้วหัวหน้าผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการใช้ไยบวบในการหมักน้ำส้มสายชูในถังหมักลักษณะต่าง ๆ เพื่อใช้ในการผลิตในระดับเชิงการค้าที่มีปริมาณการผลิตสูง เช่น air-lift fermenter (Krusong *et al.*, 2004, 2007) และ stirred tank bioreactor (Krusong *et al.*, 2010) รวมถึงระบบหมักระบบ reciprocating shaker (Krusong *et al.*, 2014b) เพื่อผู้ผลิตในระดับผู้ประกอบการรายย่อย (small SMEs) ซึ่งมีปริมาณการผลิตไม่สูงและมีต้นทุนในการลงทุนไม่สูงนัก อนึ่งในการศึกษาการใช้ไยบวบที่ผ่านมาหัวหน้าผู้วิจัยได้มุ่งเน้นการใช้ไยบวบให้แขวนลอยอยู่ในน้ำหมัก (Suspended luffa sponge) จึงเกิดประเด็นปัญหาของการลอยตัวของไยบวบเหนือผิวหน้าหมักซึ่งไม่ก่อให้เกิดประโยชน์ในการหมัก ดังนั้นในการศึกษารั้งนี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนากระบวนการหมักน้ำส้มสายชูที่ใช้ไยบวบในการตรึงเซลล์ *A. aceti* ในแบบยัดนิ่ง (ไม่เคลื่อนไหว) ที่เรียกว่า “Quick acetification process (QAP)” ในถังหมักลักษณะ packed-bed bioreactor ที่จะถูกออกแบบเพื่อเป็นแนวทางเลือกใช้สำหรับการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในระดับ small Scale ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาสภาพที่เหมาะสมในการตรึงแบคทีเรียอะซิติกแบบยัดนิ่งบนใยบวบสำหรับการหมักแบบ Quick acetification process ในถังหมัก Packed-bed bioreactor
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการผลิตน้ำส้มสายชูจากแบคทีเรียอะซิติกที่ตรึงแบบยัดนิ่งบนใยบวบสำหรับการหมักแบบ Quick acetification process ในถังหมัก Packed-bed bioreactor
3. เพื่อศึกษาถึงความเสถียรของกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูจากแบคทีเรียอะซิติกที่ตรึงแบบยัดนิ่งบนใยบวบสำหรับการหมักแบบ Quick acetification process ในถังหมัก Packed-bed bioreactor ด้วยระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous acetification)
4. เพื่อเป็นต้นแบบสำหรับขยายขนาดของระบบการหมักน้ำส้มสายชูแบบ Quick acetification process

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

มุ่งเน้นการพัฒนากระบวนการหมักน้ำส้มสายชูที่ใช้ใยบวบ (ซึ่งเป็นวัสดุธรรมชาติ) ในการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติกสายพันธุ์ *Acetobacter aceti* WK (ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทนกรดสูงจากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) แบบยัดนิ่งสำหรับกระบวนการหมักแบบ Quick acetification process ในถังหมัก packed-bed bioreactor รวมถึงการศึกษาความเสถียรของกระบวนการหมักในระบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous acetification) และต้นแบบสำหรับขยายขนาดของระบบการหมักน้ำส้มสายชูแบบ Quick acetification process

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ทำการทดสอบระบบ Quick acetification process ในถังหมัก packed-bed bioreactor มีการให้อากาศที่เพียงพอต่อกระบวนการ acetification โดยศึกษาค่า volumetric oxygen transfer coefficient (K_La) และค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ (dissolved oxygen; DO) ของการให้อากาศที่ระดับ 0.03 0.06 และ 0.09 ลิตรต่อนาที จากนั้นจึงทำการศึกษาผลของการผลิตกรดอะซิติกในสภาพที่ให้อากาศทั้ง 3 ระดับ เพื่อทำการคัดเลือกระดับการให้อากาศที่เหมาะสมและศึกษาประสิทธิภาพการหมักโดยอาศัยการตรึงเซลล์ของแบคทีเรียอะซิติกที่ทนกรดสูง (high acid-tolerant *A. aceti*) บนผิวของใยบวบในระบบ Quick acetification process ในถังหมัก packed-bed bioreactor และหาความเสถียรของระบบการหมักใน semi-continuous process

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

จากองค์ความรู้เกี่ยวกับการนำใยบวบมาใช้ในการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติก โดยหัวหน้าวิจัยได้นำมาใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักได้สำเร็จทั้งในถังหมักแบบยกอากาศ (air-lift fermenter; Krusong et al., 2007) และในถังหมักแบบเขย่า (stirred tank bioreactor; Krusong et al., 2010) รวมถึงใน “ระบบแบบ reciprocating shaker” (Krusong et al., 2014b) โดยอาศัยหัวเขี่ยน้ำส้มสายชูที่ทนกรดสูง (high acid-tolerant strain) สายพันธุ์ *A. aceti* WK ซึ่งได้รับการพัฒนาตั้งแต่ปีพ.ศ. 2546 เป็นต้นมาในห้องปฏิบัติการ

เทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.) พบว่า ไยบวบให้ผลในการตรึงเซลล์ *A. acetii* WK ได้ดีในสภาพที่ไยบวบที่มีเซลล์ตรึงอยู่นั้นลอยอยู่ในน้ำหมัก (suspended luffa sponge) เนื่องจากน้ำหนักที่เบาของชิ้นไยบวบที่ใช้ จึงอาจจะก่อให้เกิดประเด็นของความสมดุลของปริมาณเชื้อ *A. acetii* WK ทั้งหมดในน้ำหมัก กล่าวคือ ในน้ำหมักที่มีไยบวบก็จะมีปริมาณหัวเชื้อที่มากกว่าในน้ำหมักที่ไม่มีไยบวบ ส่งผลต่อประสิทธิภาพการหมักเพื่อผลิตกรดโดยรวมของระบบ ดังนั้นหัวหน้าผู้วิจัยจึงได้พิจารณาถึงระบบการหมักแบบ Quick acetification process ที่ใช้ตัวกลางยึดแน่นอยู่กับที่และอาศัยการหมุนวนของน้ำหมักช่วยในการให้อากาศและเพิ่มประสิทธิภาพในการหมัก โดยยังคงเลือกใช้ไยบวบเป็นวัสดุช่วยตรึงเซลล์ เนื่องจากได้ผ่านการพิสูจน์แล้วว่าไยบวบมีโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ *A. acetii* WK สำหรับการหมักน้ำส้มสายชูหมัก อนึ่งจากแนวทางการศึกษาในการใช้งานไยบวบในกิจกรรมการตรึงเซลล์ *A. acetii* WK นี้ยังสามารถยืนยันได้ชัดเจนว่าหัวหน้าผู้วิจัยเป็นทีมงานแรกของกลุ่มที่ทำงานด้านแบคทีเรียอะซิติกในระดับสากลที่ใช้ไยบวบในการหมักน้ำส้มสายชูหมัก

นอกจากนี้แล้วจากประสบการณ์ด้านการพัฒนาองค์ความรู้ด้านการผลิตน้ำส้มสายชูด้วยระบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous acetification) จึงจะทำการศึกษาความเสถียรของระบบ Quick acetification process นี้ในถังหมัก packed-bed bioreactor อีกด้วย

1.6 คำสำคัญของการวิจัย

(ภาษาไทย) การสร้างกรด Quick acetification process การตรึงเซลล์ ไยบวบ packed-bed bioreactor

(ภาษาอังกฤษ) acetification, Quick acetification process, immobilization, luffa sponge, packed-bed bioreactor

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลที่คาดหวังจะได้รับ คือ แนวทางในการผลิตกรดอะซิติกโดยอาศัยการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติกบนไยบวบในถังหมักระบบ packed-bed bioreactor ที่สามารถผลิตน้ำส้มสายชูในลักษณะ semi-continuous acetification ได้ นอกจากนี้ยังสามารถเผยแพร่ผลงานในลักษณะบทความวิจัยอย่างน้อย 1 เรื่อง โดยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ที่ปรากฏในฐานข้อมูลการจัดอันดับวารสาร ISI ซึ่งแตกต่างจากที่ระบุไว้ในข้อเสนอโครงการที่จะนำเสนอผลงานในวารสาร SJR (SCImago Journal Rank) ในควอไทล์ที่ 3 หรือ 4 ส่วนหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ประกอบด้วย บริษัทที่ได้ดำเนินธุรกิจเกี่ยวกับการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในระดับผู้ประกอบการรายย่อย (small SMEs) รวมถึงสถาบันการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง (immobilized cells) หมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขตหรือสถานที่ทางฟิสิกส์ให้อยู่ในบริเวณซึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่งและสามารถนำมาใช้ได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์ระยะพัก เซลล์กำลังเจริญหรือเซลล์ที่ตายแล้ว (บุชบา ยงสมิทธิ์, 2540) ในการตรึงเซลล์นี้จัดเป็นเทคนิคในการยึดเซลล์จุลินทรีย์ไว้กับตัวกลาง (support หรือ matrix) การตรึงเซลล์นิยมใช้ในการปรับปรุงกระบวนการหมักได้ เนื่องจากช่วยในการเพิ่มชีวมวล (biomass) ความสามารถในการใช้ซ้ำ (reusability) รวมถึงการป้องกันเซลล์จากผลกระทบเชิงลบจากปัจจัยต่างๆซึ่งประกอบด้วยค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำ หรือ อุณหภูมิ หรือ สารยับยั้ง (inhibitors) (Brodelius and Vndamme, 1987) สำหรับตัวอย่างของตัวกลางที่ได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ที่ผ่านมา ประกอบด้วย 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 polyurethan foam (de Ory *et al.*, 2003) เป็นต้น ขณะเดียวกันได้มีความสนใจเกี่ยวกับตัวกลางที่เป็นสารธรรมชาติที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายภายหลังจากการใช้ (degradable materials) ซึ่งจัดเป็นวัสดุที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (environmental friendly materials) ตัวอย่างของตัวกลางในประเภทนี้ ได้แก่ เศษไม้ (de Ory *et al.*, 2003) ขานอ้อย (Kocher *et al.*, 2006) และใยบวบ (Ogbonna *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999; Akhtar *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Pekdemir *et al.*, 2003; Vignoli *et al.*, 2006; Ganguly *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2007; Krusong *et al.*, 2007, 2010, 2014b) เป็นต้น

บวบเป็นพืชตระกูลแตง จัดอยู่ใน Order: Cucurbitales, Family: Cucurbitaceae มีชื่อจีนว่า *Luffa* spp. สำหรับในประเทศไทยนั้นแต่เดิมส่วนใหญ่จะปล่อยให้บวบเลื้อยตามรั้วหรือปล่อยให้เลื้อยพันไปตามต้นไม้แล้วคอยเก็บผลอ่อนมารับประทานเป็นผัก ส่วนบวบที่ไม่ได้เก็บจะปล่อยให้แห้งเหี่ยวแต่เป็นเส้นใยที่เรียกว่า “รังบวบ” หรือ “ใยบวบ” บวบที่สามารถปลูกในประเทศไทยประกอบด้วย บวบเหลี่ยม บวบงู และบวบหอม ทั้งนี้บวบเหลี่ยม (*Luffa acutangula* Roxb.) มีชื่อสามัญว่า angel loofah เป็นไม้เถาอายุปีเดียว ผลของบวบมีรูปทรงกระบอกมีเหลี่ยมตามความยาวของผล ขณะที่บวบงู (*Trichosanthes anguina* Linn.) มีชื่อสามัญว่า snake gourd ผลลักษณะกลมยาวปลายผลแหลม ผิวเรียบ มีแถบสีขาวสลับเขียวทั้งผล เมื่อสุกมีสีส้มแดง ส่วนบวบหอม (*L. cylindrica* Roem.; ภาพที่ 2.1) มีชื่อสามัญว่า smooth loofah หรือ sponge gourd vegetable sponge ผลอ่อนสีเขียวมีลายเขียวเข้ม ผลแก่สีเขียวออกเหลืองจนถึงสีน้ำตาล มีเส้นใยเหนียวลักษณะเป็นร่างแห (สิริกุล วะสี, 2548) ในต่างประเทศอาจเรียกบวบในลักษณะต่างๆ เช่น dishcloth gourd, Chinese okra, “luffa sponge”, หรือ “loofa sponge”



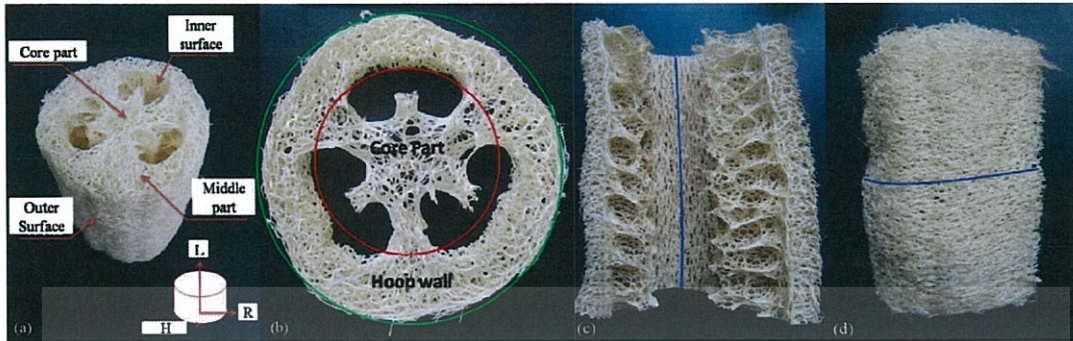
ภาพที่ 2.1 ลักษณะของ *Luffa cylindrical*
ที่มา: Terra Farmer (2011)

ใยบัวบนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ นับตั้งแต่การนำผลอ่อนมาประกอบอาหารโดยนิยมบริโภคในประเทศแถบเอเชียซึ่งรวมถึงประเทศไทย ขณะที่เส้นใยในผลแก่จะถูกนำมาใช้แทนฟองน้ำในการขัดตัวขณะอาบน้ำ หรือใช้เป็นอุปกรณ์ล้างจาน (Washing items) หรือ สบูใยบัวบ (Luffa soap) นอกจากนี้แล้วยังมีการทำใยบัวบให้เป็นผงและใช้เป็นยาจีน ([http:// www.luffa.info/](http://www.luffa.info/))

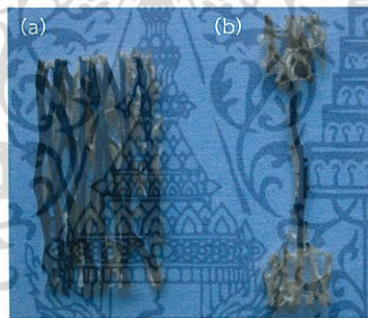
ลักษณะโครงสร้างของใยบัวบ สามารถแบ่งออกเป็น 4 ส่วนย่อย ๆ (Chen *et al.*, 2014) ได้แก่ (1) Outer surface (O) เป็นส่วนบาง ๆ อยู่ด้านนอกสุดรอบ ๆ ใยบัวบและเป็นตัวเชื่อมระหว่างฟองน้ำกับเปลือก; (2) Middle part (M) ประกอบด้วยเส้นใยโครงข่ายย่อย ๆ อย่างซับซ้อน; (3) Inner surface (I) แต่ละเส้นส่วนใหญ่จะวิ่งไปตามทางยาวเกือบจะขนานกับแกนตามยาวของใยบัวบและเป็นที่เก็บเมล็ดพันธุ์ของใยบัวบ; และ (4) Core part (C) เป็นส่วนที่เชื่อมต่ออย่างหลวม ๆ กับส่วนอื่น เป็นเส้นใยเดี่ยวหนา วิ่งตามเส้นกลางทั้งหมดของใยบัวบ ทั้งนี้ 3 ส่วนแรก (OMI) เป็นวงด้านผนัง (ส่วนที่อยู่ระหว่างวงกลมสีแดงกับเขียว) ความขรุขระจะ ค่อย ๆ ลดลงจากข้างนอกเข้าข้างในเป็นลำดับตามที่แสดงในภาพที่ 2.2

เส้นใยเดี่ยว (single fiber) ของใยบัวบ แยกตัวออกมาเดี่ยว ๆ จาก inner surface เนื่องจากมันมีความสัมพันธ์กัน ยาว 33 มม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3-0.5 มม. ดังแสดงในภาพที่ 2.3

คุณสมบัติทางกายภาพของใยบัวบ เนื่องจากใยบัวบเป็นวัสดุจากธรรมชาติที่มีเส้นใยเชื่อมต่อกันมีลักษณะเป็นรูพรุน ใยบัวบจากสายพันธุ์ *Luffa cylindrical* มีองค์ประกอบหลักทางด้านเคมี คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งช่วยเสริมสร้างความแข็งแรง ใยบัวบอาจมีโปรตีน กรดอะมิโน โพลีเปปไทด์ (Polypeptides) ไกลโคไซด์ (Glycosides) และอื่นๆ ที่เป็นสารประกอบอินทรีย์อยู่ในปริมาณเล็กน้อย ที่น่าสนใจคือ โครงสร้างเซลล์เริ่มต้นของใยบัวบในระหว่างเจริญจะเป็นเส้นใยเดี่ยว ๆ ที่ระยะแรกและสุดท้ายเส้น



ภาพที่ 2.2 ลักษณะโครงสร้างของไผ่บวบ: (a) โครงสร้างโดยรวม; (b) ส่วนของ core part และ hoop wall; (c) ส่วนตามแนวยาว ;(d) ส่วน outer surface เส้นสีน้ำเงินแสดงความหยابของเส้นใยในส่วน inner surface และ outer surface
ที่มา: Chen et al. (2014)

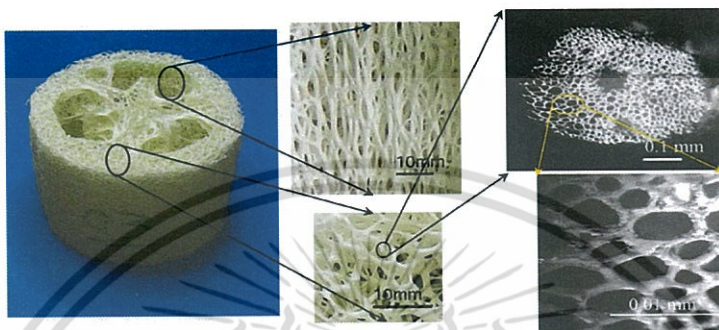


ภาพที่ 2.3 ลักษณะเส้นใยเดี่ยวของไผ่บวบ : (a) เส้นใยของผิวด้านใน (Inner surface); (b) ตัวอย่างเส้นใยเดี่ยว ๆ ในรูป Dumbell shape
ที่มา : Chen et al. (2014)

ไผ่จะแตกแขนงเป็นรูปร่าง ในระยะที่ยังอ่อนมาก ๆ (เส้นผ่าศูนย์กลางของผลบวบจะอยู่ราว ๆ 1 มม.) ยังไม่
เป็นเส้นตาข่าย แต่ต่อมากสามารถมองเห็นเส้นใยได้จากการสะสมของ protoplasm จนเป็นเซลล์เนื้อเยื่อ
ถาวรเชิงเดี่ยว (Parenchyma) เส้นใยที่สานต่อกันจะแยกจาก parenchyma cells จากนั้นจะแบ่งตัวยึด
ออกมาเป็นเส้นเล็ก ๆ โดยเส้นใยจะปรับตัวให้ขนานกัน กระบวนการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับ การแบ่งเซลล์
ในช่วง Half-grown ผลของไผ่บวบจะมีขนาดเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เซลล์มีการขยายทางยาวอย่างรวดเร็วใน
ระยะเวลาสั้น แต่ทางกว้างผลจะขยายช้าและใช้เวลานานและเซลล์หนึ่งชุดจะยาวเชื่อมต่อกันโดยเส้นใย
นอกจากนี้ยังเป็นเส้นใยที่มีลวดลายซับซ้อนเป็นร่างแห เนื่องจากการแตกแขนงของเส้นใย เมื่อไผ่ร่างแห
เติบโตเต็มที่ (เส้นผ่าศูนย์กลางของผลจะอยู่ราว ๆ 100 มม.) ก็จะเริ่มมี lignified ในขณะที่เนื้อเยื่ออ่อนและ
น้ำในผลไม้ค่อย ๆ หายไป และผลไม้กลายเป็นโครงสร้างแห้ง (Sinnot and Bloch, 1943, ภาพที่ 2.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใยบัวบได้ถูกเลือกให้เป็นตัวกลางเพื่อใช้ในการตรึงเซลล์ โดยจัดเป็น “Fibrous support” เนื่องจากโครงสร้างที่เป็นเส้นใย ใยบัวบที่นิยมใช้ในงานนี้ คือ ใยบัวบหอม (*L. cylindrica*) หรือนิยมเรียกชื่อสามัญว่า “Loofa sponge” หรือ “Luffa sponge” ทั้งนี้การประยุกต์ใช้ใยบัวบมีหลากหลาย เริ่มตั้งแต่การผลิตผลิตภัณฑ์และการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดยการตรึงเชื้อยีสต์



ภาพที่ 2.4 ลักษณะของเส้นใยที่เป็นรูพรุนของใยบัวบ
ที่มา: Shen et al. (2013)

Candida brassicae (Ogbonna et al., 1997) การตรึงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อผลิตไวน์และเบียร์ที่ใส (WO/2002/068578) การตรึงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* RBU2-10 เพื่อผลิตกรดแลคติก (Ganguly et al., 2007) การตรึงเซลล์ยีสต์ *Zymomonas mobilis* เพื่อผลิตซอบิทอล (Vignoli et al., 2006) และการตรึงเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* WK เพื่อผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวโพด (Krusong et al. 2007, 2010) และเพื่อผลิตน้ำส้มสายชูสำหรับผู้ประกอบการรายย่อยด้วยระบบ reciprocating shaker (Krusong et al. 2014b) นอกจากนี้ยังมีการนำใยบัวบ (Loofa Sponge) ไปใช้ในทางการแพทย์ เช่น การเคลือบสารฆ่าเชื้อ (Germicide) บนใยบัวบ (WO/2000/006210) อุปกรณ์ในการรักษาความสะอาดในช่องปาก เพื่อช่วยลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เคลือบอยู่ที่ผิวฟันโดยใช้แทนแปรงสีฟัน (Schwartz et al., 2007) ใยบัวบยังมีการนำมาใช้ในงานที่เกี่ยวกับสิ่งแวดล้อมดังเช่น การเพิ่มประสิทธิภาพสารฆ่าสาหร่าย (Algicidal agent) ด้วยการตรึงแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* HYK0210-SK09 ที่มีฤทธิ์ในการสร้างสารฆ่าสาหร่าย *Stephanodiscus hantzschii* (Kang et al., 2007) การดั่งโลหะหนักเช่น แคดเมียม จากน้ำเสีย (Akhtar et al., 2003) และประจุเฟอร์รัส (Ferrous ion) (Pekdemir et al., 2003) รวมถึงใช้เป็นตัวกลางในระบบการหมักมีเทน (Yang et al., 2004) เป็นต้น

กระบวนการหมักน้ำส้มสายชู เป็นกระบวนการที่ต้องมีการให้อากาศอย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นกระบวนการหมักที่เหมาะสมจึงเป็นกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว (submerged acetification) การหมักในสภาพนี้จำเป็นจะต้องใช้ถังหมักที่จะได้รับการออกแบบที่เฉพาะ เพื่อให้การหมักเกิดขึ้นได้สมบูรณ์ที่สุด (วรารุฒิ ครุสง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2532) กระบวนการหมักน้ำส้มสายชูเริ่มจากการเตรียมน้ำหมัก (mashes) ที่ประกอบด้วยเอทานอล น้ำ และสารอาหารสำหรับแบคทีเรียอะซิติก โดยอาศัยการปรับความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดอะซิติกทำให้เกิดผลรวมของความเข้มข้นซึ่งเรียกว่า “Total concentration” กระบวนการหมักน้ำส้มสายชูมีหลายแบบ ประกอบด้วย

ก. กระบวนการหมักแบบเร็ว (ดุชนี ณะบริพัฒน์, 2537) เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากทำให้น้ำส้มสายชูมีกลิ่นรสที่ดี นิยมเรียกว่า “Quick acetification process” วิธีการหมักนี้จะให้ปริมาณกรดสูงกว่ากระบวนการหมักแบบช้า เนื่องจากมีการปรับปรุงเชื้อที่ใช้ในการหมักมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยการเพิ่มและลด Lag phase และเพิ่มออกซิเจนให้มากขึ้น โดยส่วนกลางของถังหมักจะใช้วัสดุที่เป็นรูพรุนเพื่อให้แบคทีเรียยึดเกาะวัสดุที่ใช้มักเป็นพวกเซลลูโลส เช่น เปลือกไม้ ชังข้าวโพด หวาย ถ่านไม้ กากผลไม้ ขาน อ้อย ก้านองุ่น และขี้เลื่อย ส่วนล่างสุดของถังหมักจะเป็นส่วนที่เก็บน้ำส้มสายชู ในการหมักจะปล่อยให้แอลกอฮอล์ไหลลงผ่านส่วนที่มีวัสดุลักษณะรูพรุนที่มีแบคทีเรียเจริญเป็นเมือกเกาะอยู่ แบคทีเรียจะออกซิไดส์แอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก โดยอากาศจะผ่านเข้าไปบริเวณส่วนกลางของถังหมักและในระหว่างการหมักจะต้องควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงเกิน 29-30 องศาเซลเซียส ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์รูปแบบนี้ได้มีการประยุกต์ใช้มานานโดยในปี ค.ศ.1823 Schuetzenbach ได้ทำการผลิตน้ำส้มสายชูแบบรวดเร็วนี้ด้วยฟิล์มเชื้อที่ติดบนเศษไม้เลื่อย

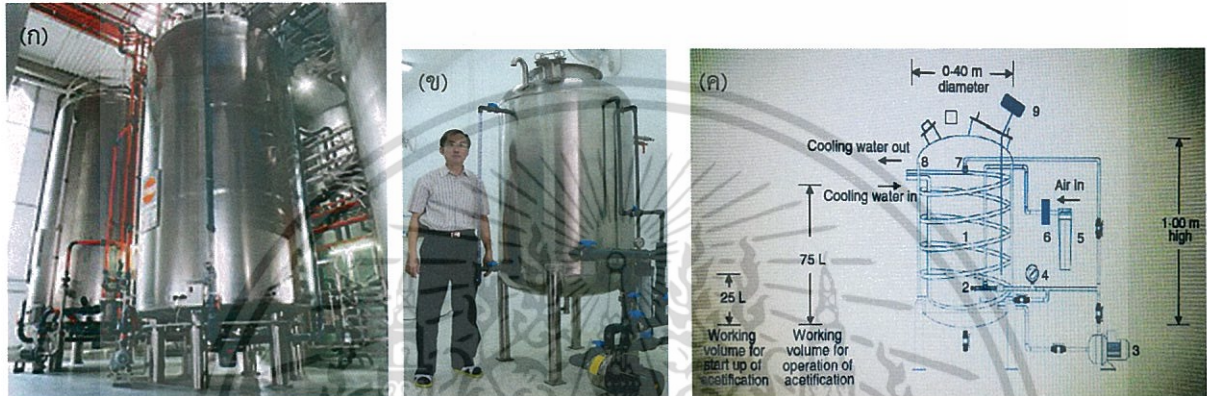
ข. กระบวนการหมักแบบช้า เป็นกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นช้า ๆ ได้ผลผลิตน้อยและคุณภาพของน้ำส้มสายชูที่ได้ค่อนข้างต่ำ มีลักษณะการหมักแบบตั้งไว้นิ่ง ๆ (let alone acetification) มักเกิดขึ้นภายหลังจากที่น้ำผลไม้ได้ผ่านการหมักเป็นแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์ธรรมชาติ จากนั้นจึงเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่อยู่ในอากาศหรือสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกหรือน้ำส้มสายชู ลักษณะการหมักแบบเชื้อแบคทีเรียอะซิติกมักจะเจริญเป็นแผ่นฝ้าที่ผิวหน้าของของเหลวและออกซิไดส์แอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก แผ่นฝ้าของแบคทีเรียนี้มักเรียกว่า “mother of vinegar”

ค. กระบวนการหมักแบบ submerged acetification เป็นกระบวนการผลิตที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรมเป็นระบบ “submerged process” ซึ่งนิยมทำการหมักในถังทรงสูงที่เรียกว่า “cavitator” เชื้อแบคทีเรียอะซิติกจะกระจายอยู่ในถังหมักโดยทั่วไป และสามารถให้สารอาหารและแอลกอฮอล์กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในถังหมักโดยมีการผลิตกรดอะซิติกพร้อมกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอะซิติก ถังหมักที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ “Fringes acetator” (ภาพที่ 2.5ก) ลักษณะของถังหมักทำขึ้นมาจากโลหะปลอดสนิม หรือไม้ส่วนอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการควบคุมทำขึ้นจากโลหะปลอดสนิมเช่นกัน มีเครื่องให้อากาศโดยการผ่านอากาศเข้าไปในน้ำหมักด้วยตัวเอง (วรารุณี ครุสง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2532) อย่างไรก็ตามถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้าอากาศหรือ Internal Venturi injector bioreactor ได้รับพัฒนาขึ้นใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มสายชูในประเทศไทย (ภาพที่ 2.5ข; วรารุณี ครุสง และคณะ, 2553) โดยมีลักษณะการทำงานและอุปกรณ์ดังแสดงในภาพที่ 5ค (Krusong *et al.*, 2015a)

ในกรณีของการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติก *A. aceti* เพื่อหมักน้ำส้มสายชู ซึ่งเป็นกระบวนการหมักแบบเร็ว (Quick acetification process) โดยให้ไวน์ไหลอย่างช้าๆ ลงผ่านวัสดุตัวกลางที่มีเซลล์ของแบคทีเรียอะซิติกยึดติดหรือตรึงอยู่ซึ่งจะถูกเรียกว่า ฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) อากาศก็เคลื่อนที่ผ่านอย่างอิสระจากทางด้านนอกของแผ่นฟิล์มที่มีเซลล์แบคทีเรียเกาะอยู่เพื่อเป็นการเพิ่มอัตราการถ่ายออกซิเจน ทำให้แอลกอฮอล์ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกได้อย่างรวดเร็ว ขณะที่ไวน์ซึ่งเป็นวัตถุดิบไหลลงมายังแผ่นฟิล์มที่มีแบคทีเรียเกาะอยู่อย่างช้าๆ ในช่วงดังกล่าวจะเกิดอุณหภูมิสะสมสูงขึ้นเนื่องจากการทำงานของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อดีของการใช้วิธีการตรึงเซลล์คือ ปริมาณออกซิเจนที่สัมผัสกับไวน์ต่อเวลามากขึ้น (อัตราการแลกเปลี่ยนออกซิเจนสูง) นอกจากนี้แล้วแอลกอฮอล์สามารถสัมผัสกับแบคทีเรียได้เร็วขึ้นอย่างต่อเนื่องจากการไหลไปตามวัสดุที่นำมาใช้ตรึงและมีเซลล์แบคทีเรียปริมาณมากขึ้นในการทำปฏิกิริยาด้วย สารคือ น้ำหมักที่มีเซลล์ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดจะไหลอย่างช้า ๆ ลงมาสู่แผ่นวัสดุที่ใช้ตรึง จากนั้นจะถูกดูดเข้าสู่ส่วนรูและใยของวัสดุ เมื่อเซลล์แบคทีเรียถูกยึดติดอยู่กับเส้นใยเหล่านั้นแล้ว เซลล์จะมีการเจริญและฟอร์มตัวเป็นแผ่นฟิล์มบางๆที่บริเวณผิวของวัสดุอย่างต่อเนื่อง



ภาพที่ 2.5 ลักษณะของถังหมักระบบ Submerged acetification ที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตน้ำส้มสายชู : (ก) Frings acetator; (ข) ถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi injector bioreactor) ที่หัวหน้าผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้น; (ค) แผนภาพแสดงการทำงานและอุปกรณ์ของถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ

ที่มา: (ก) http://www.frings-china.com/index1_2_en.html; (ข) วรารุณี ครุสง และคณะ, 2553;

(ค) Krusong *et al.* (2015a)

การหมักน้ำส้มสายชูในกระบวนการ Quick acetification นิยมดำเนินการใน Packed-bed bioreactor (Horiuchi *et al.*, 2000, 2001) โดยมีการเลือกใช้วัสดุตัวกลางที่แตกต่างกัน นับตั้งแต่ เซรามิก (Sueki *et al.*, 1991; Park and Stephanopoulos, 1993; Ghommidh *et al.*, 1982) Hollow fibers (Okuhara, 1985; Nanba *et al.*, 1985), *k*-carrageenan (Osuga *et al.*, 1984; Mori *et al.*, 1989), เม็ดแก้ว (de Backer and Baron, 1994) เม็ดถ่านจากอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด (Charcoal pellets derived from waste mushroom medium; Horiuchi *et al.*, 2000, 2001) รวมถึงเศษอริฐ เศษไม้ และโพลียูรีเทนโฟม (de Ory *et al.*, 2004)

งานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ใยบวบ (จากประสบการณ์ที่ผ่านมาของหัวหน้าผู้วิจัย; Krusong *et al.*, 2007, 2010, 2014b) เพื่อใช้เป็นวัสดุในการยึดติดเซลล์ของแบคทีเรีย *A. acetii* WK (สายพันธุ์ทนกรดที่ผ่านการปรับปรุงมาเป็นเวลามากกว่า 10 ปี และปัจจุบันได้ให้อยู่ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำส้มสายชูในประเทศไทยมากกว่า 3 แห่ง ที่ได้ขอใช้สิทธิประโยชน์ของงานวิจัยของหัวหน้าผู้วิจัยผ่านทางสำนักส่งเสริมและบริหารวิชาการพระจอมเกล้าลาดกระบัง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) ในลักษณะแบบยัดนิ่งในถัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมัก Packed-bed bioreactor ขนาด 8 ลิตร ที่ได้รับการออกแบบเพื่อเป็นต้นแบบสำหรับการศึกษาและนำไปสู่การเผยแพร่แก่ผู้ประกอบการรายย่อย (Small SMEs) เพื่อพิจารณาเป็นทางเลือกในทางธุรกิจ รวมถึงการนำเสนอผลงานในวารสารระดับนานาชาติต่อไป

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ghommidh *et al.* (1982) รายงานถึงการตรึงเซลล์ *Acetobacter* ด้วยดูดซับ (adsorption) บนผิวของเซรามิก (ceramic support) ใน pulsed flow reactor โดยสามารถให้การส่งถ่ายออกซิเจนสูงจนทำให้เชื้อแบคทีเรียอะซิติกสามารถผลิตกรดได้สูงถึง 10.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Okuhara (1985) รายงานการผลิตน้ำส้มสายชูจากเชื้อ *Acetobacter* ที่เจริญบน fibrous support ประเภท polypropylene fibres ซึ่งบรรจุใน packed-bed bioreactor

Nanba *et al.* (1985) ได้ทำการศึกษถึงการผลิตน้ำส้มสายชูจากข้าวด้วยการตรึงเชื้อ *A. rancens* บนผิวของ polypropylene hollow fibres ซึ่งมี ethanol medium ไหลผ่านด้านนอกของ fibres ทั้งนี้จากการศึกษา พบว่า เมื่อใช้หัวเชื้อน้ำส้มสายชู 1.9 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดได้ 30 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตที่ 0.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Sueki *et al.* (1991) รายงานถึงการพัฒนาระบบถังหมักสำหรับการหมักในสภาพที่ใช้อากาศโดยใช้ ceramic carrier “APHROCELL” ซึ่งมีรูปร่างที่เหมาะสมต่อการส่งผ่านของเหลวและก๊าซ เมื่อประยุกต์ระบบดังกล่าวในการผลิตน้ำส้มสายชูก็พบว่าสามารถที่จะได้อัตราการผลิตสูงถึง 17.25 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยได้กรดอะซิติกผลิตออกมาต่อเนื่อง 23 กรัมต่อลิตร

Horiuchi *et al.* (2000) ศึกษาถึงการผลิตกรดอะซิติกอย่างต่อเนื่องใน packed bed bioreactor ซึ่งใช้ charcoal pellets (จากวัตถุดิบเหลือทิ้งจากการผลิตหัตถ์) ทั้งนี้ pellets เหล่านี้มีลักษณะที่จำเพาะ คือ มี specific surface area มาก (200 ตารางเมตร/กรัม) และมีรูพรุนขนาดเล็กมากๆ (micropores; 2-10 ไมครอน) จำนวนมาก ทั้งนี้ในการหมักนั้นสามารถดำเนินการหมักได้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 180 วัน ภายใต้สภาพ retention times ต่างๆ โดยมีอัตราการผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 3.9 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้ระบบการให้อากาศแบบธรรมดา และ 6.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้ระบบการให้อากาศที่เติมออกซิเจน 40%

de Ory *et al.* (2003) ศึกษาถึงวัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติกประเภท solid carriers ประกอบด้วย Siran เศษชิ้นไม้ (wood chips) และ polyurethane foam ในถังหมักขนาด 450 มล. ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ ภายใต้สภาพการหมักแบบ semi-continuous acetification พบว่า Polyurethane foam ให้ผลผลิตสูงสุด เนื่องจากมีปริมาณเซลล์สูงสุด

Krusong *et al.* (2014b) รายงานว่า โยบวบที่ตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติกที่เรียกว่า “LSM-AAB” (LSM ย่อมาจาก luffa sponge matrices; AAB มาจาก acetic acid bacteria) ช่วยลดระยะเวลาในการปรับตัว (adaptation phase) และระยะผลิตรวด (operational phase) เนื่องจากมีปริมาณ total biomass สูงขึ้นอย่างสังเกตเห็นได้เมื่อเปรียบเทียบกับสภาพที่ไม่ใช่ LSM ดังนั้นจึงสรุปว่า “LSM-AAB” ก่อให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกในระบบ QAP (quick acetification process) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า “LSM-AAB” ยังสามารถใช้ในการผลิตกรดในระบบ semi-continuous acetification

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

process ในถังหมักแบบอื่นๆ ด้วย เช่น airlift fermenter (Krusong *et al.*, 2007) และ stirred-tank reactor (Krusong *et al.*, 2010)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติกทนกรดสูง (High acid tolerant strain) *Acetobacter aceti* WK

หัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติก *A. aceti* WK คัดเลือกจากผลไม้ในประเทศมานานกว่า 10 ปี หัวเชื้อนี้ได้รับการปรับสภาพให้ทนกรดสูงที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส ด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณกรดตามลำดับจาก 10 กรัมต่อลิตร (ในช่วงเริ่มต้น) เป็น 25±1, 45±1 หรือ 65±1 กรัมต่อลิตร (เมื่อสิ้นสุด) ในระยะเวลา 6 ปี ดังนั้นจึงสามารถมั่นใจได้ว่าหัวเชื้อ *A. aceti* WK เป็นสายพันธุ์ทนกรด (High acid-tolerance strain; *Krusong et al.*, 2014a).

ในการเตรียมหัวเชื้อ *A. aceti* WK เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium (Merck, Darmstadt, Germany) ประกอบด้วย (กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร) กลูโคส 50 ยีสต์สกัด 5 Mg₂SO₄·7H₂O 0.2 และ (NH₄)₂HPO₄ 0.5 ดังที่แสดงใน *Krusong et al.* (2007) ทำการให้อากาศในอัตรา 4.5 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะใช้เป็นหัวเชื้อในการศึกษาต่อไป

3.2 การเตรียมส่วนประกอบของระบบการตรึงด้วยหัวเชื้อ *Acetobacter aceti* WK เพื่อใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูในถังหมัก Packed-bed bioreactor

3.2.1 การเตรียมใยบวบที่ตรึงด้วยหัวเชื้อ *Acetobacter aceti* WK เพื่อใช้ในการหมักน้ำส้มสายชู

ใยบวบที่ใช้ต้องนำมาล้างเป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่นำไปต้มเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นตัดให้มีขนาด (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 1.5 ซม. x 1.5 ซม. x 1.5 ซม. เพื่อใช้ในการตรึงเซลล์ *A. aceti* WK ต่อไป

ในการเตรียมใยบวบที่ตรึงเซลล์ *A. aceti* WK อาศัยวิธีการที่ดัดแปลงจากรายงานของหัวหน้าผู้วิจัย (*Krusong et al.*, 2014b; ซึ่งเป็นวิธีในการทำการหมักน้ำส้มสายชูด้วยเชื้อ *A. aceti* WK ที่ตรึงอยู่บนใยบวบที่เลี้ยงในสภาพอาหารเหลวในลักษณะแขวนลอยที่เรียกว่า “suspended luffa sponge matrix” บน Reciprocating shaker) โดยทำการเตรียม Acetification medium ที่ปรับปริมาณความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร (ประกอบด้วยกรดอะซิติก 45 กรัมต่อลิตร และ แอลกอฮอล์ 35 กรัมต่อลิตร; *Krusong et al.*, 2014a, 2014b, 2015a) และเติมสารอาหารตามข้อ 3.1 ใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด (กว้างxยาวxสูง) เท่ากับ 30 ซม. X 40 ซม. X 30 ซม. โดยใช้ปริมาตรน้ำหมักเท่ากับ 40% (v/v) จากนั้นใส่ใยบวบที่ผ่านการเตรียมลงในน้ำหมักในปริมาตร 40% (w/v) แล้วจึงถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมจากหัวข้อ 3.1 ในปริมาตร 5% (v/v) วางบน reciprocating shaker ควบคุมอัตราการเขย่าที่ 1 Hz (*Krusong et al.*, 2014b) เป็นเวลา 14 วัน จึงใช้เป็นหัวเชื้อในถังหมัก packed-bed bioreactor ต่อไป สำหรับลักษณะของการเตรียมใยบวบที่ตรึงเซลล์ *A. aceti* WK นี้แสดงในภาพที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนึ่งในกรณีของการใช้ปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้น 45 กรัมต่อลิตรนี้เป็นระดับความเข้มข้นที่นิยมใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม (de Ory *et al.*, 2004) นอกจากนี้แล้วความเข้มข้นกรดอะซิติกที่สูงระดับนี้ทำให้มั่นใจเรื่องการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อปนเปื้อน (Contaminants) ได้เป็นอย่างดี เพราะกรดอะซิติกความเข้มข้น 20-30 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพดังรายงานที่เสนอโดยหัวหน้าผู้วิจัย (Krusong *et al.*, 2012, 2015b, 2015c)

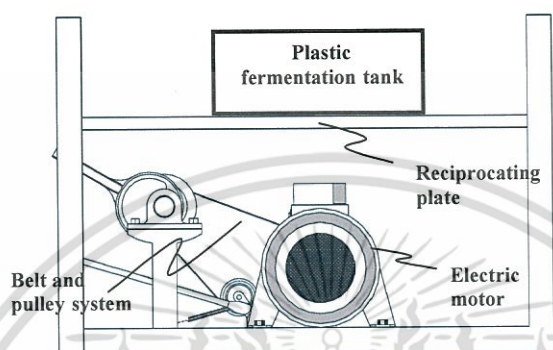


Fig. 3.1 Diagram of reciprocating shaker system applied for preparation of adsorbed *Acetobacter aceti* on surfaces of luffa sponge matrices. The cultivation was conducted in 100 l plastic fermentation tank which shaken at 1 Hz for 14 d at room temperature.

ที่มา : ดัดแปลงจาก Krusong *et al.* (2014b)

3.2.2 การจัดทำระบบการหมัก Packed-bed เชื่อมกับ external aerated-fermenting medium ที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูโดยใช้ยีสบวมเป็นวัสดุตั้งเซลล์ *Acetobacter aceti*

ถังหมัก packed-bed bioreactor ที่ใช้ในการศึกษาแสดงอยู่ในภาพที่ 3.2 โดยมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกมีขนาดสูง 50 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 14 ซม. มีความจุทั้งสิ้น 10 ลิตร ระบบหมุนวนน้ำหมักควบคุมด้วย peristaltic pump ที่สามารถควบคุมระดับการหมุนวนเท่ากับ 0.03 0.06 และ 0.09 ลิตรต่ออนาที น้ำหมักถูกปั๊มจากด้านล่างแล้วหมุนวนเข้า “aerated-fermenting medium (EAFM) container” ซึ่งเป็นขวดขนาด 10 ลิตร บรรจุน้ำหมักปริมาตร 5 ลิตร ที่มีการพ่นให้อากาศ (ระดับประกอบด้วย 3 6 และ 9 ลิตรต่ออนาที) น้ำหมักที่ผ่านการให้อากาศหรือ เรียกว่า “aerated-fermenting medium (EAFM)” ถูกปั๊มกลับไปพ่นลงด้านบนของถังหมัก packed-bed bioreactor ด้วย peristaltic pump ในอัตราการหมุนวนเดียวกับที่น้ำหมักออกจากด้านล่างของ packed-bed bioreactor อนึ่งระบบที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูนี้เรียกว่า “packed bed-external aerated fermenting medium system” หรือเรียกโดยย่อว่า “PB-EAFM system”

ภายในถังหมัก packed-bed bioreactor มีท่อทรงกระบอกที่ทำจากตะแกรงสแตนเลสที่มีรูพรุนขนาด 100 mesh โดยรอบมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 10 ซม. และมีความสูง 3 ระดับ คือ 27 ซม. 33 ซม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ 39 ซม. ทำให้มีปริมาตรของท่อทรงกระบอกที่จะบรรจุไยบวบได้ในปริมาตร 2 2.5 และ 3 ลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้ปลายด้านหนึ่งปิดด้วยตะแกรงสแตนเลส ส่วนอีกปลายจะเปิด ตะแกรงสแตนเลสนี้ใช้สำหรับบรรจุไยบวบที่จะใช้ในการตรึงหิวเชื้อ *A. aceti* WK (จากข้อ 3.2.1) เพื่อใช้ในการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการหมักน้ำส้มสายชูด้วยระบบ Quick acetification process ที่ใช้ไยบวบการตรึงเซลล์ *A. aceti* WK แบบยัดหนึ่ง ในระบบ PB-EAFM

อนึ่งระบบ PB-EAFM ที่ออกแบบนี้ได้ออกแบบให้แตกต่างจากระบบทั่วไป กล่าวคือ ได้มีการออกแบบให้มีช่องว่างด้านข้างของท่อทรงกระบอกที่ทำจากตะแกรงสแตนเลสตลอดความสูงของท่อนั้น เพื่อให้เป็นแหล่งของอากาศที่เข้าไประบบพร้อมกับอากาศที่ลงมากับน้ำหมักที่หมุนวนจากด้านบนของถังหมัก

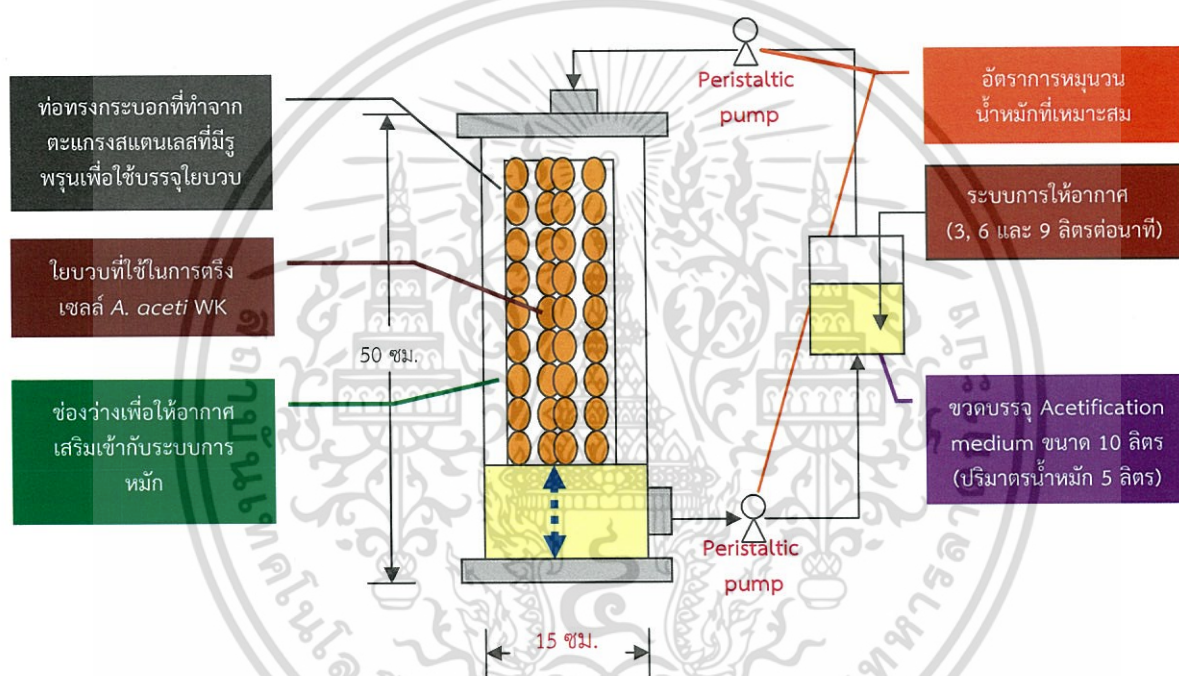


Fig. 3.2 Diagram of packed bed-external aerated fermenting medium (PB-EAFAM) system used for acetification by adsorbed *Acetobacter aceti* WK on luffa sponge matrices. The PB bioreactor was connected with external aerated-fermenting medium (EAFAM) container.

3.2.3 การเตรียมส่วนผสมของน้ำหมักสำหรับผลิตน้ำส้มสายชู (Acetification medium)

ไวน์ข้าวที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ 100 ± 0.5 กรัมต่อลิตร และปริมาณกรด 2.3 ± 0.5 กรัมต่อลิตร เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ตามที่ระบุในรายงานของ Krusong *et al.* (2014b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การตรวจสอบปริมาณอากาศในระบบการหมัก

3.3.1 อัตราการหมุนวนน้ำหมักต่อค่า Volumetric mass transfer coefficient (k_La) ระบบการให้อากาศที่จะใช้ในระบบการหมัก Quick acetification process ที่ตั้งโรงยอบว

เนื่องจากกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูเป็นกระบวนการที่ต้องการอากาศหรือออกซิเจน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาประสิทธิภาพในการส่งถ่ายออกซิเจนในน้ำหมักซึ่งเรียกว่า “Oxygen-transfer capacity” ของระบบการหมักที่ออกแบบซึ่งในการศึกษานี้คือ ระบบ “packed bed-external aerated fermenting medium (PB-EAFM) system” โดยได้ทำการศึกษาค่า volumetric oxygen transfer coefficient หรือเรียกโดยย่อว่า “ k_La ” หนึ่งเนื่องจากในระบบ PB-EAFM ที่ออกแบบนี้ (ข้อ 3.2.2) นี้ปริมาณออกซิเจนใน EAFM มีความสำคัญต่อปริมาณอากาศที่เข้าสู่ packed-bed bioreactor ดังนั้นจึงได้ทำการหาค่า k_La ใน EAFM container (ขนาด 10 ลิตร ปริมาตรน้ำหมัก 5 ลิตร) ที่ระดับการให้อากาศ 3 6 และ 9 ลิตรต่อ นาที จากนั้นจึงเลือกระดับการให้อากาศที่ให้ค่า k_La สูงสุดของ EAFM container เพื่อใช้ในการหาค่า k_La ของ packed-bed bioreactor ของระบบ PB-EAFM (หัวข้อ 3.2.2; ภาพที่ 3.2) ที่อาศัยการหมุนวนของน้ำหมักด้วยเครื่อง Peristaltic pump โดยควบคุมอัตราการหมุนวนน้ำหมักเท่ากับ 0.03 0.06 และ 0.09 ลิตรต่อ นาที การหาค่า k_La ที่กล่าวถึงนี้ใช้ Sodium sulfite oxidation method (Stenstrom, 2007) ทั้งนี้ในแต่ละอัตราการหมุนวนให้ตรวจวัดค่า k_La ในปริมาตรน้ำหมัก (ด้านล่างท่อทรงกระบอกที่บรรจุยอบว) ที่ปริมาตร 1 ลิตร

3.3.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่า Dissolved oxygen (DO)

เนื่องจากสารอาหารที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Acetification medium มีผลต่อค่า DO ดังนั้นจึงทำการติดตามค่า DO ของ external aerated fermenting acetification medium (EAFM) ในขวดบรรจุ (ขนาด 10 ลิตร ปริมาตรน้ำหมัก 5 ลิตร) ที่ระดับการให้อากาศ 3 6 และ 9 ลิตรต่อ นาที และใน packed-bed bioreactor ที่ใช้ EAFM ที่ให้อากาศในระดับที่ให้ค่า k_La สูงสุด (ข้อ 3.3.1) เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของระบบ PB-EAFM โดยวัดค่า DO ในปริมาตรน้ำหมัก (ด้านล่างท่อทรงกระบอกที่บรรจุยอบว ที่ปริมาตร 1 ลิตร) ในแต่ละอัตราการหมุนวนของ EAFM

3.4 ผลของปริมาณยอบวที่ตรึงเซลล์ *Acetobacter aceti* WK ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชู

ทำการศึกษาค่าผลปริมาณยอบวที่ผ่านการตรึงเซลล์ *A. aceti* WK ตามหัวข้อ 3.2.1 ที่บรรจุในท่อทรงกระบอกที่ทำจากตะแกรงสแตนเลส (ภาพที่ 3.2; หัวข้อ 3.2.2) ในระดับปริมาตร 2 2.5 และ 3 ลิตร (ตามขนาดของท่อทรงกระบอกที่ทำจากตะแกรงสแตนเลสที่จัดสร้างในหัวข้อ 3.2.2) ทำการหมักจำนวน 3 รอบต่อระดับปริมาตรของยอบวที่ตรึงเซลล์ ทั้งนี้กำหนดให้ใช้อัตราการหมุนวนน้ำหมักที่ 0.06 ลิตรต่อ นาที (ระดับกลางของระบบหมุนวนน้ำหมักของเครื่อง Peristaltic pump ที่กำหนดในศึกษา) และการให้อากาศใน Acetification medium ในขวดบรรจุที่อัตรา 6 ลิตรต่อ นาที (ซึ่งเป็นระดับกลางของระบบการให้อากาศที่กำหนดในศึกษา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดอะซิติกด้วยวิธี AOAC (1995) และปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Ebulliometer ทุก 3 วันของการหมัก

3.5 ผลของอัตราการหมวนนํ้าหมักที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการหมักนํ้าส้มสายชู

ทำการศึกษาผลของระดับการหมวนนํ้าหมักที่ระดับ 0.03 0.06 และ 0.09 ลิตรต่อนาที่ โดยกำหนดให้ใช้ปริมาณโยวบที่ตรึงเซลล์ *A. acetii* WK ที่เหมาะสมจากข้อ 3.4 และอัตราการให้อากาศใน Acetification medium ในขวดบรรจุที่อัตรา 6 ลิตรต่อนาที่ ทำการหมักจำนวน 3 รอบต่อระดับอัตราการหมวนนํ้าหมัก

ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดอะซิติกด้วยวิธี AOAC (1995) และปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Ebulliometer ทุก 3 วันของการหมัก

3.6 ผลของอัตราการให้อากาศใน Acetification medium ในขวดบรรจุที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการหมักนํ้าส้มสายชู

ทำการศึกษาผลอัตราการให้อากาศใน Acetification medium ในขวดบรรจุที่ระดับ 3 6 และ 9 ลิตรต่อนาที่ โดยกำหนดให้ใช้ปริมาณโยวบที่ตรึงเซลล์ *A. acetii* WK ที่เหมาะสมจากข้อ 3.4 และอัตราการหมวนนํ้าหมักที่เหมาะสมจากข้อ 3.5 ทำการหมักจำนวน 3 รอบต่อระดับอัตราการหมวนนํ้าหมัก

ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดอะซิติกด้วยวิธี AOAC (1995) และปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Ebulliometer ทุก 3 วันของการหมัก

3.7 ความคงตัวของระบบ Quick acetification process ที่ใช้โยวบในการตรึงเซลล์ *A. acetii* WK

ทำการศึกษาความคงตัวของระบบโดยทำการศึกษาจำนวน 9 รอบของการหมัก โดยใช้ปริมาณโยวบที่ตรึงเซลล์ *A. acetii* WK ที่เหมาะสมจากข้อ 3.4 อัตราการหมวนนํ้าหมักที่เหมาะสมจากข้อ 3.5 และอัตราการให้อากาศใน Acetification medium ในขวดบรรจุที่เหมาะสมจากข้อ 3.6

ทำการติดตามปริมาณกรดและค่า Acetification rate (อัตราการสร้างกรด) ซึ่งนิยมใช้ในการวัดประสิทธิภาพของการหมัก นอกจากนี้แล้วจะทำการดัดตัวอย่างโยวบที่รอบที่ 3 ของการหมักเพื่อติดตามลักษณะของการยึดเกาะของเชื้อ *A. acetii* WK บนโยวบด้วย Scanning electron microscopy

3.8 สรุปและรายงานผลการทดลอง

3.9 การวางแผนการทดลอง

ทำการวางแผนการทดลองในแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยใช้รอบของการหมักเป็นจำนวนซ้ำ ผลการทดลองจะนำมาวิเคราะห์หา ANOVA และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Tukey's Test ที่ระดับความน่าเชื่อถือ 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ค่า Volumetric mass transfer coefficient (k_La) ระบบ packed bed-external aerated fermenting medium (PB-EAFM)

Quick acetification process (QAP) ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้ออกแบบให้ใช้ใยบัว (luffa sponge) เป็นวัสดุตรึงเซลล์ *A. aceti* WK ใน packed-bed (PB) bioreactor อย่างไรก็ตามระบบการหมักที่ออกแบบคือ ระบบ packed bed-external aerated fermenting medium (PB-EAFM) (ดังแสดงในภาพที่ 3.2) โดยจำเป็นต้องพิจารณาถึงปริมาณอากาศในน้ำหมักซึ่งในที่นี้คือ external aerated fermenting medium (EAFM) ที่บรรจุอยู่ใน EAFM container หรือ ขวดขนาด 10 ลิตร (ปริมาตรที่ใช้งานคือ 5 ลิตร) ก่อนเพื่อให้ได้ปริมาณอากาศที่เหมาะสมก่อนที่ป้อนเข้าสู่ PB bioreactor ดังนั้นจึงทำการหาค่า volumetric oxygen transfer coefficient (k_La) ของ EAFM ในสภาพที่มีการให้อากาศ 3 ระดับ (3 6 และ 9 ลิตรต่อ นาที) โดยที่ 0 ลิตรต่อ นาที ใช้เป็นข้อมูลควบคุม ทั้งนี้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.1

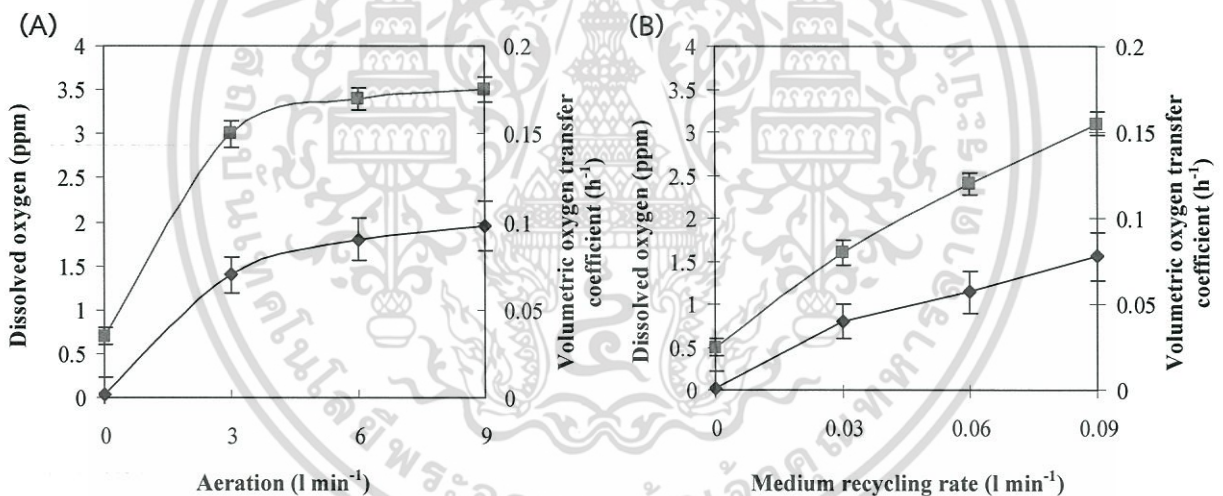


Fig. 4.1 Changes of dissolved oxygen (■) and volumetric oxygen transfer coefficient (◆) of packed bed-external aerated fermenting medium (PB-EAFM) system: (A) effect of aeration at 0 (control), 3, 6 and 9 l min⁻¹ in external aerated fermenting medium (EAFM) and (B) effect of EAFM recycling rate at 0 (control), 0.03, 0.06 and 0.09 l min⁻¹ into packed-bed bioreactor while optimum aeration rate of EAFM providing suitable volumetric oxygen transfer coefficient was used (6 l min⁻¹). Values represent means ± standard deviation of triplicates.

จากภาพที่ 4.1A พบว่า ที่ระดับการให้อากาศ 9 ลิตรต่อ นาที ให้ค่า k_La สูงสุดเท่ากับ 0.096 h⁻¹ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่า k_La ที่ระดับการให้อากาศ 6 ลิตรต่อ นาที ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.092 h⁻¹ ($p \geq 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราการให้อากาศสำหรับ EAFM เท่ากับ 6 ลิตรต่อ นาที สำหรับค่า DO ใน EAFM พบว่า

ค่า DO ที่พบใน EAFM ที่ให้อากาศในอัตรา 6 ลิตรต่อนาที ($DO = 3.4$) มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ให้อากาศในอัตรา 9 ลิตรต่อนาที ($DO = 3.5$) ($p \geq 0.05$) อนึ่งผลของค่า k_{La} ที่ได้นี้มีค่าสูงกว่าเล็กน้อยจากที่เคยรายงานใน Krusong *et al.* (2016) ที่ทำการศึกษาการให้อากาศในขนาด 2 ลิตร และใช้น้ำหมักปริมาตร 1 ลิตร ในระดับการให้อากาศทั้ง 3 ระดับเช่นกัน

หลังจากเลือกอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม (อัตรา 6 ลิตรต่อนาที) สำหรับ EAFM ที่จะป้อนเข้า PB bioreactor จึงได้ทำการศึกษาค่า k_{La} ที่ระดับการหมุนวนน้ำหมัก (ในที่นี้คือ EAFM) 3 ระดับ ประกอบด้วย 0.03 0.06 และ 0.09 ลิตรต่อนาที ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 4.1B ซึ่งพบว่า ค่า k_{La} อยู่ในระดับที่ไม่สูงนักโดยมีค่า k_{La} เท่ากับ 0.04 0.057 และ 0.078 h^{-1} ตามลำดับ อนึ่งสังเกตจากผลที่ได้นี้พบว่า ถ้าสามารถเพิ่มอัตราการหมุนวนน้ำหมัก EAFM ให้สูงขึ้นน่าจะเกิดผลดีต่อการเพิ่มค่า k_{La} ได้ อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของ peristaltic pump ที่ใช้สามารถปรับระดับการหมุนวนได้เพียง 3 ระดับเท่านั้น อย่างไรก็ตามการหมุนวนน้ำหมักก่อให้เกิดผลดีในการเพิ่มปริมาณอากาศในน้ำหมักได้เนื่องจากค่า k_{La} ในสภาพที่ไม่มีการหมุนวนน้ำหมักมีค่าเท่ากับ 0.0012 h^{-1} ซึ่งมีความแตกต่างจากน้ำหมักที่ผ่านการหมุนวนอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) สำหรับการตรวจวัดค่า DO ในน้ำด้านล่าง PB bioreactor (ปริมาตร 1 ลิตร) พบว่ามีค่าสูงสุดเท่ากับ 3.1 ppm ที่ระดับการหมุนวนที่ 0.09 ลิตรต่อนาที

4.2 ผลของปริมาณใยบวบที่ตรึงเซลล์ *Acetobacter aceti* WK ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชู

จากข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาของผู้วิจัยซึ่งพบว่า ใยบวบ (luffa sponge) ในลักษณะของ matrices ซึ่งเรียกโดยรวมว่า luffa sponge matrices ซึ่งต่อไปในรายงานจะเรียกว่า “LSM” เป็นวัสดุธรรมชาติที่มีโครงสร้างเส้นใยที่มีช่องว่างระหว่างเส้นใยมากจึงเหมาะต่อการตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ เช่น แบคทีเรียอะซิติกที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู (Krusong *et al.*, 2007; 2010; 2014b; 2016) ในการศึกษาการหมักน้ำส้มสายชูด้วย QAP นี้จึงเลือกใช้ใยบวบมาตรึงเซลล์แบคทีเรีย *A. aceti* WK เพื่อใช้ในระบบ PB-EAFM

นอกจากนี้แล้วยังได้ออกแบบวัสดุที่ใช้ในการบรรจุใยบวบเพื่อตรึงใยบวบให้อยู่กับที่ เนื่องจากธรรมชาติของ LSM จะลอยน้ำ โดยออกแบบเป็นท่อทรงกระบอกที่ทำจากตะแกรงสแตนเลสที่มีรูพรุนขนาด 100 mesh โดยรอบ ท่อทรงกระบอกนี้มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 10 ซม. ปลายด้านหนึ่งปิดด้วยตะแกรงสแตนเลส ส่วนอีกปลายจะเปิด (ภาพที่ 3.2; หัวข้อ 3.2.2) อนึ่งในการออกแบบนี้คำนึงถึงอากาศที่จะเข้าสู่ใยบวบที่ตรึงเซลล์จึงเว้นช่องว่างด้านข้างของตะแกรงกับผนังของ PB reactor ตลอดความสูงของทรงกระบอก รวมทั้งยังทำการตัดตะแกรงเป็นช่องอากาศที่ตะแกรงขนาด 1 ตารางนิ้ว ห่างกันทุก 2 นิ้ววัดจากด้านล่างของตะแกรง ทั้งนี้ระบบที่ใช้ในการหมักแสดงในภาพที่ 4.2

ในการศึกษาปริมาณของ LSM ที่เหมาะสมในปริมาตร 2 2.5 และ 3 ลิตร (ตามขนาดของท่อทรงกระบอกที่ทำจากตะแกรงสแตนเลสที่จัดสร้างในหัวข้อ 3.2.2) นี้เลือกใช้อัตราการหมุนวนน้ำหมักที่ 0.06 ลิตรต่อนาที (ระดับกลางของระบบหมุนวนน้ำหมักของเครื่อง Peristaltic pump ที่กำหนดในศึกษา) และการให้อากาศใน EAFM ในขนาดบรรจุที่อัตรา 6 ลิตรต่อนาที (ซึ่งเป็นระดับกลางของระบบการให้อากาศที่กำหนด

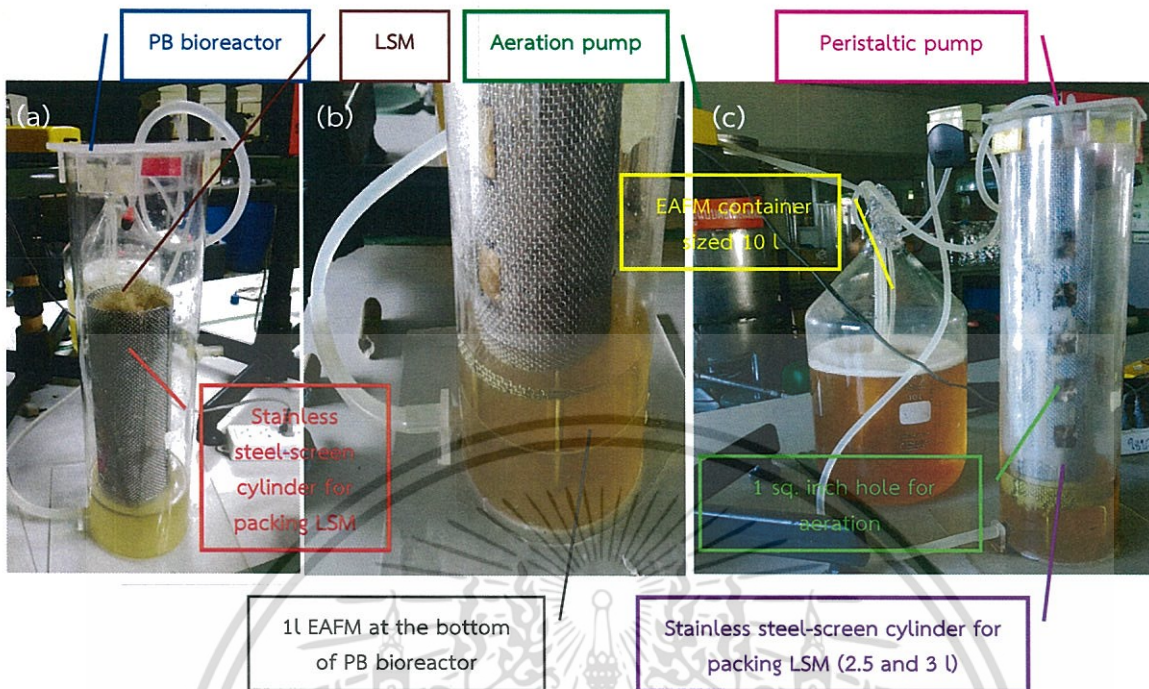


Fig 4.2 Illustration images of packed-bed (PB) bioreactor for packed bed-external aerated fermenting medium (EAFM) system for vinegar production using luffa sponge matrices (LSM) as adsorption material. Stainless steel-screen cylinder and duran bottle (10 l) as EAFM container : (a) characteristic of PB bioreactor, LSM and stainless steel-screen cylinder for packing 2 l of LSM; (b) 1 l fermenting medium at the bottle of PB bioreactor; (c) PB bioreactor with stainless steel-screen cylinder for packing 2.5 l and 3 l of LSM. One sq. inch holes were made along the height of stainless steel-screen cylinder. EAFM container, aeration pump (for EAFM) for supplying air into EAFM container and peristaltic pump for recycling of EAFM into PB bioreactor. Abbreviation : PB = packed bed; LSM = luffa sponge matrices; EAFM = external aerated fermenting medium

ในศึกษา) ผลจากการหมักแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า ในระบบ PB-EAFM ที่ออกแบบเพื่อใช้ในการผลิตกรดอะซิติกด้วยกระบวนการ QAP นี้สามารถผลิตกรดในอัตราที่สูงเมื่อพิจารณาจากค่า Acetification rate (ETA) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณของไยบวบที่ใช้มีผลต่อการผลิตกรดอย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณไยบวบที่ 3 ลิตร (โดยปริมาตร) ให้ ETA สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญที่ 4.50 ± 0.001 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ใช้ไยบวบ 2.5 ลิตร ($ETA\ 3.40 \pm 0.001$ กรัมต่อลิตรต่อวัน) และ 2 ลิตร ($ETA\ 2.33 \pm 0.001$ กรัมต่อลิตรต่อวัน) ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณของเซลล์ *A. aceti* WK ที่จับที่ไยบวบหรือที่เรียกว่า “LSM-AAB” เป็นสำคัญ ในขณะที่ปริมาณเซลล์ในน้ำหมัก (planktonic cells) มีปริมาณใกล้เคียงกัน ($0.00054 - 0.00055$ กรัมต่อลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 4.1 Influence of amount of loofa sponge matrices (LSM) as adsorption material for *A. aceti* WK on acetification in a 10 l packed-bed (PB) bioreactor with 5 l of external aerated fermenting medium (EAFM). Aeration rate at EAFM container was 6 l min⁻¹ while 0.06 l min⁻¹ of EAFM recycling rate at PB bioreactor was controlled. Acetification was conducted at ambient temperature (30±2°C).

	Amount of loofa sponge matrices*		
	2 l	2.5 l	3 l
Adaptation during start up phase (d)	7	5	5
Final acidity** (g l ⁻¹)	59 ^b ±1	62 ^a ±1	63 ^a ±1
Acid produced (g l ⁻¹)	14±1	17±1	18±1
Acetification period (d)	6	5	4
Acetification rate*** (g l ⁻¹ d ⁻¹)	2.33 ^c ±0.001	3.40 ^b ±0.001	4.50 ^a ±0.001
Average cell dry weight (g l ⁻¹):			
-Planktonic cells in EAFM ^{ns}	0.00054	0.00055	0.00055
-Adsorbed cells on LSM ^{ns}	0.00148	0.00149	0.00152
Average dissolved oxygen (ppm)	3.10 ^a ±0.3	3.15 ^a ±0.3	3.18 ^b ±0.2

Initial acidity was adjusted to 45±1 g l⁻¹. Calculation of average acetification rate is based on three acetification cycles. *Mean ± one standard deviation. ** Means with different letters within the same row are significantly different ($p \leq 0.05$) according to Tukey's test. Means in a row followed by ^{ns} are not significantly different ($p \geq 0.05$).

นอกจากนี้แล้วยังพบว่า ระบบ PB-EAFM นี้สามารถเริ่มการผลิตกรดได้เร็ว เนื่องจากหัวเชื้อ *A. aceti* WK สามารถปรับตัวได้เร็ว ตามปกติแล้วการผลิตกรดอะซิติกจะมี 2 ช่วง กล่าวคือ ช่วงแรก เป็นช่วงแรก ภายหลังจากมีการถ่ายเชื้อ *A. aceti* WK ลงในน้ำหมัก ช่วงนี้เรียกว่า “adaptation phase” หรือในบางครั้ง เรียกว่า “start up phase” เป็นช่วงเวลาที่เชื้อใช้ในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ และช่วงที่สอง เป็นระยะในการสร้างกรดซึ่งเรียกว่า “operational phase” (de Ory *et al.*, 2003) สำหรับผลการศึกษาที่ได้ (ตารางที่ 4.1) พบว่า หัวเชื้อ *A. aceti* WK สามารถปรับตัวเข้ากับระบบ PB-EAFM ได้อย่างรวดเร็วโดยใช้ เวลา 7 5 และ 5 วัน ในสภาพที่ใช้ปริมาณ LSM เท่ากับ 2 2.5 และ 3 ลิตร (โดยปริมาตร) ตามลำดับ อนึ่ง โดยปกติแล้วเชื้อจะใช้เวลาประมาณ 7-15 วัน ทั้งนี้เนื่องจากระบบ PB-EAFM นี้ได้ใช้หัวเชื้อในลักษณะ LSM-AAB กล่าวคือ หัวเชื้อ *A. aceti* WK ที่ตรึงบนใยบวบ (LSM) ที่เตรียมตามวิธีการที่ระบุใน Krusong *et al.* (2014b) ทำให้มีปริมาณเชื้อ *A. aceti* WK สูงตั้งแต่เริ่มต้นซึ่งส่งผลให้สามารถปรับตัวเข้ากับระบบ PB-EAFM อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้แล้วยังเกิดจากผลของการให้อากาศใน EAFM ทำให้มีปริมาณอากาศที่หัวเชื้อ LSM-AAB สามารถใช้ในการออกซิโดซ์แอลกอฮอล์ได้ดีจึงส่งผลให้ค่า ETA ของระบบมีค่าที่สูง จากผลที่ได้จากการศึกษานี้ช่วยยืนยันแนวความคิดในการใช้ EAFM เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการทำงานใน PB bioreactor ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาในหัวข้อนี้สามารถสรุปว่า ปริมาณไยบวบที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกในระบบ PB-EAFM เท่ากับ 3 ลิตร (โดยปริมาตร) ในสภาพที่ใช้อัตราการหมุนวน EAFM เท่ากับ 0.06 ลิตรต่อนาที และอัตราการให้อากาศใน EAFM เท่ากับ 6 ลิตรต่อนาที

4.3 ผลของอัตราหมุนวนน้ำหมักที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูในระบบ packed bed-external aerated fermenting medium ที่ใช้ไยบวบที่ตรึงเซลล์ *Acetobacter aceti* WK ใน ปริมาณ 3 ลิตร (โดยปริมาตร)

จากการศึกษาผลของระดับการหมุนวนน้ำหมักที่ระดับ 0.03 0.06 และ 0.09 ลิตรต่อนาที ในระบบ PB-EAFM โดยกำหนดให้ใช้ปริมาณไยบวบที่ตรึงเซลล์ *A. aceti* WK ที่เหมาะสมเท่ากับ 3 ลิตร (โดยปริมาตร) และอัตราการให้อากาศใน EAFM ใน EAFM container เท่ากับ 6 ลิตรต่อนาที แสดงอยู่ในตารางที่ 4.2

Table 4.2 Influence of recycling rate of external aerated fermenting medium (EAFM) in a 10 l packed-bed (PB) bioreactor with 5 l EAFM in 10 l EAFM container. Luffa sponge matrices (LSM; 3 l by volume) was used as adsorption material for *Acetobacter aceti* WK. Aeration rate at EAFM container was 6 l min⁻¹ while acetification was conducted at ambient temperature (30±2°C).

	Recycling rate of EAFM* (l min ⁻¹)		
	0.03	0.06	0.09
Adaptation during start up phase (d)	4	5	7
Final acidity** (g l ⁻¹)	65 ^a ±2	64 ^a ±2	61 ^b ±3
Acid produced (g l ⁻¹)	20±2	19±2	16±1
Acetification period (d)	4	4	5
Acetification rate** (g l ⁻¹ d ⁻¹)	5.00 ^a ±0.001	4.75 ^b ±0.001	3.20 ^c ±0.001
Average cell dry weight (g l ⁻¹):			
-Planktonic cells in EAFM **	0.00072 ^a	0.00058 ^b	0.00057 ^b
-Adsorbed cells on LSM ^{ns}	0.00155	0.00154	0.00154
Average dissolved oxygen (ppm)	3.18 ^a ±0.3	3.10 ^a ±0.3	3.04 ^b ±0.3

Initial acidity was adjusted to 45±1 g l⁻¹. Calculation of average acetification rate is based on three acetification cycles. *Mean ± one standard deviation. ** Means with different letters within the same row are significantly different ($p \leq 0.05$) according to Tukey's test. Means in a row followed by ^{ns} are not significantly different ($p \geq 0.05$).

จากผลการหมักที่ได้จากตารางที่ 4.2 พบว่า ผลการหมักที่ได้จากสภาพที่ให้อากาศใน EAFM คงที่ เท่ากับ 6 ลิตรต่อนาที และปริมาณไยบวบคงที่ที่ 3 ลิตร (โดยปริมาตร) นี้ ในกรณีที่ใช้อัตราการหมุนวน EAFM เท่ากับ 0.06 ลิตรต่อนาที ให้ผลที่ใกล้เคียงที่ได้รับจากการศึกษาในตารางที่ 4.1 ซึ่งถือเป็นการยืนยันผล

การศึกษา อย่างไรก็ตามค่า ETA ของสภาพดังกล่าว (4.75 ± 0.001 กรัมต่อลิตรต่อวัน) กลับต่ำกว่าในสภาพที่ใช้ อัตราการหมยวน EAFM เท่ากับ 0.03 ลิตรต่อนาที่ (5.00 ± 0.001 กรัมต่อลิตรต่อวัน) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ก็มากกว่าในสภาพที่ใช้อัตราการหมยวน EAFM เท่ากับ 0.09 ลิตรต่อนาที่ (3.20 ± 0.001 กรัมต่อลิตรต่อวัน) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เช่นกัน

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณเซลล์ทั้งใน LSM และในน้ำหมัก EAFM พบว่า ที่อัตราการหมยวน EAFM เท่ากับ 0.03 ลิตรต่อนาที่ มีปริมาณเชื้อ *A. acetii* WK ใน EAFM สูงที่สุดซึ่งทำให้อัตราการสร้างกรด (ETA) ในสภาพดังกล่าวจึงมีค่าสูงที่สุด (0.00072 กรัมต่อลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ขณะที่ปริมาณเซลล์ LSM-AAB ไม่แตกต่างจากที่อัตราการหมยวน 0.06 และ 0.09 ลิตรต่อนาที่ ($p \geq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากอัตราการหมยวนที่ 0.03 ลิตรต่อนาที่ สามารถทำให้น้ำหมัก EAFM สามารถที่จะสัมผัสกับ LSM ได้อย่างทั่วถึงประกอบกับ ปริมาณอากาศ (ในรูปของค่า DO) ในน้ำหมัก EAFM ก็เพียงพอจนสามารถสนับสนุนการเกิดออกซิเดชันของ แอลกอฮอล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นในการศึกษาถัดไปจึงเลือกใช้อัตราการหมยวน EAFM เท่ากับ 0.03 ลิตรต่อนาที่ ในระบบ PB-EAFM ที่ใช้ไยบวบในปริมาณ 3 ลิตร (โดยปริมาตร)

4.4 ผลของอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมใน external aerated fermenting medium (EAFM) ต่อ ประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูในระบบ packed bed-EAFM ที่ใช้ไยบวบที่ตรึงเซลล์ *Acetobacter acetii* WK ในปริมาณ 3 ลิตร (โดยปริมาตร) และใช้อัตราหมยวนน้ำหมัก EAFM เท่ากับ 0.03 ลิตรต่อนาที่

จากการศึกษาผลของการให้อากาศที่ระดับ 3 6 และ 9 ลิตรต่อนาที่ ในน้ำหมัก EAFM ปริมาตร 5 ลิตร ที่บรรจุใน EAFM container ขนาด 10 ลิตร ซึ่งต่ออยู่ภายนอกกับ packed-bed (PB) bioreactor ที่ใช้ไยบวบ (LSM) ในปริมาณ 3 ลิตร (โดยปริมาตร) เป็นวัสดุตรึงเซลล์เชื้อ *A. acetii* WK โดยมีการหมยวนน้ำหมัก EAFM ระหว่าง PB bioreactor และ EAFM container ในอัตรา 0.03 ลิตรต่อนาที่ แสดงอยู่ในตารางที่ 4.3 พบว่า ในสภาพที่มีการให้อากาศใน EAFM สูงสุดที่ 9 ลิตรต่อนาที่ ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *A. acetii* WK ในปริมาณที่สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทั้งเซลล์ที่ตรึงกับ LSM (0.00165 กรัมต่อลิตร) และเซลล์อิสระในน้ำหมัก (0.00091 กรัมต่อลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับสภาพที่มีการให้อากาศที่ระดับ 3 และ 6 ลิตรต่อนาที่ ($p \leq 0.05$) ขณะเดียวกันสภาพที่ให้อากาศที่ระดับ 6 ลิตรต่อนาที่ ทำให้มีปริมาณเซลล์ที่ LSM (0.00158 กรัมต่อลิตร) และ น้ำหมัก EAFM (0.00082 กรัมต่อลิตร) ที่มากกว่าที่ระดับ 3 ลิตรต่อนาที่ (เซลล์อิสระ 0.00074 กรัมต่อลิตร และเซลล์ที่ LAM 0.00156 กรัมต่อลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) อนึ่งทั้ง 3 ระดับของการให้อากาศก่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทั้งในน้ำหมัก EAFM และใน LSM เมื่อเปรียบเทียบกับสภาพที่ไม่มีการให้อากาศในน้ำหมัก EAFM ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ระบบการให้อากาศในน้ำหมักที่ติดตั้งภายนอกเชื่อมต่อกับ PB bioreactor ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกของระบบ QAP ที่ใช้ LSM-AAB ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในสภาพการให้อากาศในน้ำหมัก EAFM นี้ช่วยทำให้เชื้อ *A. acetii* WK เข้าสู่สภาพการปรับตัวเพื่อผลิตกรดได้อย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับสภาพที่ไม่มีการให้อากาศ โดยที่อัตราการให้อากาศที่ 9 ลิตรต่อนาที่

เชื้อ *A. aceti* WK ใช้เวลาสั้นที่สุด (เท่ากับ 3 วัน) ซึ่งเร็วกว่าสภาพที่มีการให้อากาศที่ 6 และ 3 ลิตรต่อนาที ซึ่งใช้เวลา 4 วัน ส่วนสภาพที่ไม่ให้อากาศจะใช้เวลาถึง 9 วัน

Table 4.3 Influence of aeration rate into 5 l external aerated fermenting medium (EAFM) in 10 l EAFM container. The EAFM container was externally connected with 10 l packed-bed (PB) bioreactor for acetification by *Acetobacter aceti* WK adsorbed on luffa sponge matrices (LSM; 3 l by volume) as adsorption material. Recycling rate of EAFM was 0.03 l min⁻¹ while acetification was conducted at ambient temperature (30±2°C).

	Aeration rate of EAFM in EAFM container* (l min ⁻¹)			
	0	3	6	9
Adaptation during start up phase (d)	9	4	4	3
Final acidity** (g l ⁻¹)	56 ^a ±2	66 ^a ±2	66 ^b ±2	68 ^a ±3
Acid produced (g l ⁻¹)	11±2	21±2	21±2	23±1
Acetification period (d)	8	4	3	3
Acetification rate** (g l ⁻¹ d ⁻¹)	1.38 ^d ±0.001	5.25 ^c ±0.001	7.00 ^b ±0.001	7.67 ^a ±0.001
Average cell dry weight (g l ⁻¹):				
-Planktonic cells in EAFM **	0.00016 ^d	0.00074 ^c	0.00082 ^b	0.00091 ^a
-Adsorbed cells on LSM **	0.00134 ^c	0.00156 ^b	0.00158 ^b	0.00165 ^a
Average dissolved oxygen (ppm)	1.38 ^c ±0.2	3.20 ^b ±0.2	3.22 ^b ±0.2	3.25 ^a ±0.2

Initial acidity was adjusted to 45±1 g l⁻¹. No aeration rate of EAFM as control was conducted. Calculation of average acetification rate is based on three acetification cycles. *Mean ± one standard deviation. ** Means with different letters within the same row are significantly different ($p \leq 0.05$) according to Tukey's test.

นอกจากนี้แล้วสภาพการให้อากาศที่ระดับ 9 ลิตรต่อนาที ยังช่วยให้เกิดอัตราการสร้างกรด (ETA) ที่สูงที่สุดเท่ากับ 7.67±0.001 กรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งสูงกว่าที่การให้อากาศที่ระดับ 6 ลิตรต่อนาที (7.00±0.001 กรัมต่อลิตรต่อวัน) และ 3 ลิตรต่อนาที (5.25±0.001 กรัมต่อลิตรต่อวัน) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่สภาพที่ไม่มีการให้อากาศจะมีอัตราการสร้างกรดที่ต่ำที่สุด (1.38±0.001 กรัมต่อลิตรต่อวัน) ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณอากาศ (ในค่าของ DO) ที่มีปริมาณต่ำมากรวมถึงปริมาณเชื้อ *A. aceti* WK ที่ต่ำมากด้วย

จากผลการศึกษาก็สามารถสรุปว่าสภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกในกระบวนการ QAP ซึ่งใช้การตรึงเชื้อ *A. aceti* WK ด้วย LSM (เกิดเป็นหัวเชื้อในลักษณะ LSM-AAB โดยใช้ LSM ในปริมาณ 3 ลิตร โดยปริมาตร) ใน PB bioreactor ขนาด 10 ลิตร ที่เชื่อมต่อกับ EAFM container ขนาด 10 ลิตร (บรรจุน้ำหมัก EAFM ปริมาตร 5 ลิตร) ซึ่งใช้การหมุนวนน้ำหมักของระบบ PB-EAFM ในอัตรา 0.03 ลิตรต่อนาที และมีการให้อากาศแก่น้ำหมัก EAFM ใน EAFM container ในระดับ 9 ลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ความคงตัวของระบบ Quick acetification process ที่ใช้โยบวบในการตรึงเซลล์ *A. aceti* WK

จากข้อสรุปของสภาพการหมักของกระบวนการ QAP ที่ใช้โยบวบ (LSM) ในการตรึงเซลล์ *A. aceti* WK (เกิดเป็นหัวเชื้อในลักษณะ LSM-AAB โดยใช้ LSM ในปริมาณ 3 ลิตร โดยปริมาตร) ใน PB bioreactor ขนาด 10 ลิตร ที่เชื่อมต่อกับ EAFM container ขนาด 10 ลิตร (บรรจุน้ำหมัก EAFM ปริมาตร 5 ลิตร) ซึ่งใช้การหมุนวนน้ำหมักของระบบ PB-EAFM ในอัตรา 0.03 ลิตรต่อนาที และมีการให้อากาศแก่น้ำหมัก EAFM ใน EAFM container ในระดับ 9 ลิตรต่อนาที เพื่อให้เกิดความมั่นใจในระบบจึงทำการศึกษาถึงเสถียรภาพของระบบ PB-EAFM โดยทำการหมักจำนวน 9 รอบ ทั้งนี้ไม่นับรวมรอบที่เป็นการปรับตัวหรือที่เรียกว่า “start up phase” ทั้งนี้ผลของการศึกษาแสดงในภาพที่ 4.3

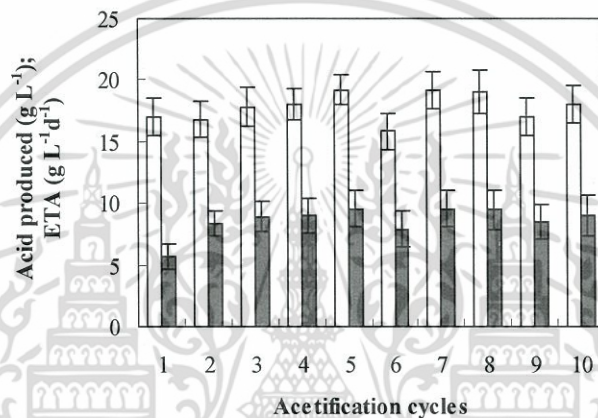


Fig 4.3 Acetification by *Acetobacter aceti* WK in 10 l packed-bed (PB) bioreactor connected with 10 l external aerated fermenting medium (EAFM) container containing 5l EAFM at $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Luffa sponge matrices was used as adsorption material and packed in PB bioreactor. Acid produced (\square) and ETA (\blacksquare) in nine acetification cycles (2^{nd} to 10^{th} cycle) after start-up (1^{st} cycle). The charging medium of each cycle was constant at a target total concentration of 80 g l^{-1} (45 g l^{-1} acetic acid and 35 g l^{-1} ethanol). Values represent the means \pm standard deviation of triplicates.

จากภาพที่ 4.3 พบว่า ค่า Acetification rate (ETA; อัตราการสร้างกรด) ซึ่งนิยมใช้ในการวัดประสิทธิภาพของการหมักในระบบ PB-EAFM นั้น มีค่าที่สูงมาก โดยมีค่า ETA ระหว่าง 8.42 ± 0.1 ถึง 9.58 ± 0.1 กรัมต่อลิตรต่อวัน มีค่า ETA เฉลี่ยเท่ากับ 8.94 ± 0.1 กรัมต่อลิตรต่อวัน ค่า ETA ที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าระบบ PB-EAFM ที่ใช้ LSM-ABB เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดด้วยกระบวนการ QAP อนึ่งจะสังเกตเห็นว่า ETA จะเพิ่มขึ้นจากรอบที่ 2 ถึง 5 ก่อนที่จะลดลงที่รอบที่ 6 แล้วกลับเพิ่มขึ้นในรอบที่ 7-8 และลดลงแล้วเพิ่มขึ้นในรอบที่ 9 ถึง 10 ที่เป็นเช่นนี้โดยเฉพาะในช่วงที่ ETA ลดลงจะเป็นช่วงเวลา หัวเชื้อ *A. aceti* WK มีการลดจำนวนลงและภายหลังเมื่อเชื้อเพิ่มจำนวนขึ้นอัตรา ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซิติกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายต่อการเพิ่มจำนวนของหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติก (de Ory *et al.* 2004; Matsushita *et al.* 2005; Maestre *et al.* 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากค่า Biotransformation yield ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพในการเปลี่ยนวัตถุดิบ (แอลกอฮอล์) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ (กรดอะซิติก) พบว่า ระบบ PB-EAFM ที่ใช้ LSM-AAB นี้มีค่า 48.2-56.0% โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 51.6% ดังแสดงในตารางที่ 4.4

Table 4.4 Results of nine cycles of acetification by *Acetobacter aceti* WK in 10 l packed-bed (PB) bioreactor connected with 10 l external aerated fermenting medium (EAFM) container containing 5l EAFM at $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. Luffa sponge matrices was used as adsorption material and packed in PB bioreactor. The charging medium of each cycle was constant at a target total concentration of 80 g l^{-1} (45 g l^{-1} acetic acid and 35 g l^{-1} ethanol).

Experiment	Time (d)	Total acidity		Acid production* (g l^{-1})	Ethanol		Ethanol oxidized* (g l^{-1})	Biotransformation Yield (%)
		Initial (g l^{-1})	Final (g l^{-1})		Initial (g l^{-1})	Final (g l^{-1})		
Start up	3	45.0±0.2	62.0±0.1	17.0±0.1	34.5±0.1	0.5±0.2	34.0±0.1	50.0
Cycle 1	2	45.5±0.2	62.3±0.3	16.8±0.1	34.4±0.2	0.4±0.1	34.0±0.2	49.4
Cycle 2	2	46.0±0.1	63.8±0.3	17.8±0.2	35.7±0.2	0.4±0.1	35.3±0.2	50.4
Cycle 3	2	46.0±0.2	64.0±0.0	18.0±0.2	34.0±0.2	0.3±0.2	33.7±0.2	53.4
Cycle 4	2	45.0±0.1	64.2±0.2	19.2±0.2	34.8±0.0	0.5±0.1	34.3±0.2	56.0
Cycle 5	2	46.2±0.3	62.0±0.2	15.8±0.1	34.7±0.3	0.4±0.1	34.3±0.2	46.1
Cycle 6	2	45.0±0.1	64.2±0.3	19.2±0.3	35.1±0.1	0.3±0.2	34.8±0.2	55.2
Cycle 7	2	44.8±0.2	63.8±0.2	19.0±0.3	35.4±0.2	0.4±0.1	35.0±0.1	54.3
Cycle 8	2	45.3±0.2	62.3±0.3	17.0±0.3	35.8±0.4	0.5±0.2	35.3±0.1	48.2
Cycle 9	2	45.4±0.2	63.4±0.2	18.0±0.2	35.5±0.2	0.5±0.2	35.0±0.1	51.4
Average								51.6

* Values represent the mean \pm standard deviation of triplicate. Average biotransformation yield was calculated among nine semi-continuous cycles, not including start-up phase.

เมื่อพิจารณาจาก Biotransformation yield พบว่า ระบบ PB-EAFM นี้มีประสิทธิภาพในระดับหนึ่ง ทั้งนี้เนื่องจากประสิทธิภาพของการให้อากาศยังไม่สามารถทัดเทียมระบบที่มีการให้อากาศแบบ submerged acetification ที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมรวมถึงในถังหมัก internal Venturi injector bioreactor ดังรายงานของผู้วิจัย (Krusong *et al.*, 2014a; 2015a) แต่ดีกว่าระบบ reciprocal shaking ที่ใช้โบบบในลักษณะของ LSM-AAB (Krusong *et al.*, 2014b) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงต้นทุนในการผลิตก็พบว่าระบบ PB-EAFM เป็นระบบที่มีต้นทุนต่ำและให้ประสิทธิภาพการผลิตที่สูง รวมถึงระยะเวลาในการหมักที่สั้นทำให้ได้ผลผลิตในปริมาณกรดที่สูงในเกณฑ์ที่รับได้ (60-70 กรัมต่อลิตร) อย่างรวดเร็วจึงจัดว่าระบบ PB-EAFM นี้เป็นกระบวนการผลิตกรดอะซิติกแบบ Quick acetification process ที่ดีระบบหนึ่ง อนึ่งเมื่อพิจารณาจากค่า ETA (ภาพที่ 4.3) ที่ได้นั้นจัดได้ว่าระบบ PB-EAFM อยู่ในเกณฑ์ที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการ QAP อื่นๆ ที่ใช้ inert material เป็นวัสดุตรึงเซลล์แบบที่เรียกว่าอะซิติกดั่งเช่น วัสดุ cotton cloth ใน rotating-disc reactor (ETA เท่ากับ 5.5 กรัมต่อลิตรต่อวัน) (Lotong *et al.* 1989) วัสดุ charcoal pellets ใน laboratory packed-bed bioreactor (ETA เท่ากับ 3.9 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) (Horiuchi *et al.* 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัสดุ polyurethane ใน 500 ml laboratory air-lift glass bioreactor (ETA เท่ากับ 4.74 กรัมต่อลิตรต่อวัน) (de Ory *et al.* 2004) และ wood shaving ใน packed-bed, polyvinyl bioreactor (ETA ระหว่าง 5.8 ถึง 22.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน ในการผลิตแบบ semi-continuous acetification จำนวน 25 รอบ) (Kocher and Dhillon 2013)

นอกจากนี้แล้วเมื่อทำการหมักในรอบที่สาม ได้ตั้งตัวอย่างโอบบและน้ำหมักเพื่อติดตามลักษณะของการยึดเกาะของเชื้อ *A. aceti* WK บนโอบบและในน้ำหมัก EAFM ด้วย Scanning electron microscopy ดังผลแสดงในภาพที่ 4.4 ซึ่งเห็นได้ว่า เชื้อ *A. aceti* WK สามารถเจริญได้ดีทั้งสองสภาพ คือ สภาพที่ตรึงบนเส้นใยของ LSM ก่อให้เกิดลักษณะของ LSM-AAB ขึ้นใน PB bioreactor และในลักษณะเซลล์ที่เจริญในน้ำหมัก EAFM ซึ่งหมუნวนในระบบระหว่าง PB bioreactor-EAFM container ในระบบ PB-EAFM ซึ่งทำให้สามารถผลิตกรดอะซิติกได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาเพียง 2 วัน ต่อรอบการผลิต



Fig. 4.4 SEM images of adsorbed *Acetobacter aceti* WK cells on loofa sponge matrice (LSM) in 10 l packed-bed bioreactor connected with 10 l external aerated fermenting medium (EAFM) container after 3rd cycle of semi-continuous acetification at $30\pm 1^{\circ}\text{C}$: (a) LSM samples obtained; (b) *A. aceti* WK cells adsorbed on surface of LSM at $\times 5000$ magnification, and (c) *A. aceti* WK cells in EAFM $\times 5000$ magnification.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การพัฒนากระบวนการผลิตแบบ Quick acetification process มีหลากหลายวิธี ส่วนใหญ่แล้วจะต้องพิจารณาถึงลักษณะและสมบัติของวัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติก (acetic acid bacteria; AAB) โดยปกติจะเลือกใช้วัสดุในกลุ่ม inert material แต่ในการศึกษานี้มีเป้าหมายถึงการใช่วัสดุที่นอกจากจะสามารถตรึงเซลล์ได้แล้วยังต้องไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงเลือกใช้วัสดุธรรมชาติที่มีลักษณะเป็นเส้นใยซึ่งคือ โยบวบ (luffa sponge) โดยตัดเป็นชิ้นขนาด (ก x ย x ส) เท่ากับ 1.5 ซม. x 1.5 ซม. x 1.5 ซม. เรียกว่า Luffa sponge matrices (LSM) ทั้งนี้อาศัยการศึกษาในอดีตของผู้วิจัยยืนยันว่า LSM มีความเหมาะสมในการตรึงแบคทีเรีย AAB เกิดเป็นแหล่งของเชื้อแบคทีเรียอะซิติกที่เรียกว่า LSM-AAB (Krusong *et al.*, 2007; 2010; 2014b) ซึ่งทำให้เกิดการหมักเพื่อผลิตกรดอะซิติกได้

อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของการผลิตกรดอะซิติกนอกจากขึ้นกับหัวเชื้อ (ในที่นี้ คือ LSM-AAB และ เซลล์อิสระ AAB) แล้วยังต้องขึ้นกับความสามารถในการให้อากาศแก่ระบบ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ออกแบบให้มีการให้อากาศแก่น้ำหมักด้วย ตามปกติแล้วระบบ QAP ในถังหมักแบบ packed-bed จะใช้การหมุนวนน้ำหมักเพียงอย่างเดียว แต่ในการศึกษานี้เล็งเห็นว่าการให้อากาศในน้ำหมักจะช่วยทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen; DO) อยู่ในระดับที่ทำให้การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอทานอลได้อย่างดีซึ่งจะทำให้เกิดกรดอะซิติกในระดับความเข้มข้นที่สูงและรวดเร็ว ทั้งนี้ระบบที่ออกแบบเพื่อใช้ในการศึกษานี้จึงเรียกว่า “ระบบ packed bed-external aerated fermenting medium (PB-EAFM)”

สำหรับผลการศึกษาสามารถสรุปได้ดังนี้

5.1.1 ค่า Volumetric mass transfer coefficient (k_La) ระบบ PB-EAFM พบว่า ในสภาพที่ไม่มี การหมักอัตราการให้อากาศสำหรับ EAFM เท่ากับ 6 ลิตรต่อนาที ให้ค่า k_La ในระบบ EAFM สูงสุด ในขณะที่อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมระดับการหมุนวนของระบบ PB-EAFM ที่ 0.09 ลิตรต่อนาที ให้ค่า k_La ในระบบ EAFM สูงสุด

5.1.2 ผลของปริมาณโยบวบที่ตรึงเซลล์ *Acetobacter aceti* WK ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูในสภาพที่ใช้อัตราการหมุนวนน้ำหมักที่ 0.06 ลิตรต่อนาที และการให้อากาศใน EAFM ในอัตรา 6 ลิตรต่อนาที ปริมาณโยบวบที่ 3 ลิตร (โดยปริมาตร) ให้ ETA สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ

5.1.3 ผลของอัตราหมุนวนน้ำหมักที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูในระบบ PB-EAFM ที่ใช้โยบวบที่ตรึงเซลล์ *A. aceti* WK ในปริมาณ 3 ลิตร (โดยปริมาตร) และใช้อัตราการให้อากาศใน EAFM ใน EAFM container เท่ากับ 6 ลิตรต่อนาที อัตราการหมุนวน EAFM เท่ากับ 0.03 ลิตรต่อนาที ให้ประสิทธิภาพในสร้างกรดอะซิติกได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.4 ผลของอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมใน EAFM ต่อประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูในระบบ PB-EAFM ที่ใช้ไบโอบิวที่ตรึงเซลล์ *A. aceti* WK ในปริมาณ 3 ลิตร (โดยปริมาตร) และใช้อัตราหมุนวนน้ำหมัก EAFM เท่ากับ 0.03 ลิตรต่อนาที ในสภาพการให้อากาศในน้ำหมัก EAFM ช่วยทำให้เชื้อ *A. aceti* WK เข้าสู่สภาพการปรับตัวเพื่อผลิตกรดได้อย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับสภาพที่ไม่มีกรให้อากาศ โดยที่อัตราการให้อากาศที่ 9 ลิตรต่อนาทีเชื้อ *A. aceti* WK ใช้เวลาสั้นที่สุด (เท่ากับ 3 วัน)

5.1.5 ความคงตัวของระบบ Quick acetification process ที่ใช้ไบโอบิวในการตรึงเซลล์ *A. aceti* WK ระบบ PB-EAFM ที่ใช้ LSM-AAB นี้มีค่า ETA 48.2-56.0% โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 51.6%

5.1.6 ผลของ SEM images แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *A. aceti* WK สามารถเจริญได้ดีทั้งสภาพที่ตรึงบนเส้นใยของ LSM ก่อให้เกิดลักษณะของ LSM-AAB ขึ้นใน PB bioreactor และในลักษณะเซลล์ที่เจริญในน้ำหมัก EAFM ซึ่งหมุนวนในระบบระหว่าง PB-EAFM container ในระบบ PB-EAFM ซึ่งทำให้สามารถผลิตกรดอะซิติกได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาเพียง 2 วัน ต่รอบการผลิต

5.2 ข้อเสนอแนะ

การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหรือกรดอะซิติกโดยการใช้วัสดุเฉื่อย (inert material) สามารถเลือกใช้วัสดุได้หลากหลายประเภท แต่วัสดุที่เลือกใช้ในการศึกษามุ่งเน้นว่าภายหลังการใช้งานแล้วไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมเป็นหลัก ไบโอบิวเป็นวัสดุธรรมชาติจึงตอบโจทย์เรื่องสิ่งแวดล้อมได้อย่างดี อย่างไรก็ตามยังคงมีวัสดุธรรมชาติอีกหลายอย่างที่น่าสนใจ อาทิเช่น ชานอ้อย ชังข้าวโพด และวัสดุทางการเกษตรที่มีโครงสร้างเป็นเส้นใยที่มีรูพรุน เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- คุชณี ธนะบริพัฒน์. 2537. จุลชีวอุตสาหกรรม. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- บุษบา ยงสมิทธิ. 2540. จุลชีววิทยาการหมัก: วิตามินและสารสี. เท็กซ์ แอนด์พับลิเคชัน. กรุงเทพฯ.
- วรารุณี ครุสง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
- วรารุณี ครุสง. 2553ก. การพัฒนาหัวเชื้อ *Acetobacter aceti* สป5 ให้มีประสิทธิภาพการสร้างกรด 10-12% ในถังหมักน้ำส้มสายชู High Speed Agitation ขนาด 600 ลิตร. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. ทุนวิจัยโครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ปี พ.ศ. 2552-53. 15 หน้า.
- วรารุณี ครุสง. 2553ข. การเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกของ *Acetobacter aceti* WK ที่ตรึงเซลล์ด้วยใยบัวในถังหมักแบบยกอากาศ. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. ทุนอดหนุนการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ. 27 หน้า.
- วรารุณี ครุสง. 2553ค. พินิต เพ็ชรนวม และ ประภาส ปิ่นวิเศษ. 2553. เส้นทางวิจัยกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก: การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อทดแทนการนำเข้า...สู่การยอมรับของภาคเอกชนไทย. วารสารวิจัยและนวัตกรรมเพื่ออุตสาหกรรมไทย. 1: 13-20.
- วรารุณี ครุสง. 2554ก. การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ให้ทนความเข้มข้นกรดสูงด้วยเทคนิค repeated fed batch. ทุนอดหนุนการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ. 34 หน้า.
- วรารุณี ครุสง. 2554ข. การคงเสถียรภาพของหัวเชื้อ *Acetobacter aceti* สป5 เพื่อผลิตกรดและทนกรด 10-12% และการใช้น้ำแครอทเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชู. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. ทุนวิจัยโครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ปี พ.ศ. 2553-54. 23 หน้า.
- วรารุณี ครุสง. 2555. การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากสับปะรดนางแล-ภูแลในระบบกึ่งต่อเนื่อง. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. ทุนวิจัยโครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ปี พ.ศ. 2554-55. 16 หน้า.
- สิริกุล วะสี. 2548. สารพัดบวบ. นิทรรศการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ “เกษตรนำชาติศาสตร์ที่ยั่งยืนคืนทรัพยากรสู่ชุมชน” 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.
- Akhtar, N., Saeed, A., and Iqbal, M. 2003. *Chlorella sorokiniana* immobilized on the biomatrix of vegetable sponge of *Luffa cylindrica*: a new system to remove cadmium from contaminated aqueous medium. *Bioresource Technology*. 88: 163-165.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Brodelius, P., and Vndamme, E.J. 1987. Immobilized Cell Systems. In: H.J. Rehm and G. Reed (Eds.). *Biotechnology*. Vol.7A. (pp. 405 – 464). Verlag Chemie: Germany.
- Chen, J.P., Yu,, S.C., Hsu, B.R.S., Fu, S.H., and Liu, H.S. 2003. Loofa sponge as a scaffold for the culture of human hepatocyte cell line. *Biotechnology Progress*.19: 522-527.
- Chen, Q., Shi, Q., Gorb, S.N., and Li, Z. 2014. A multiscale study on the structural and mechanical properties of the Luffa sponge from *Luffa cylindrica* plant. *Journal of Biomechanics*. 47: 1332-1339.
- de Backer, L. and Baron, G. 1994. Residence time distribution in a packed bed bioreactor containing porous glass particles: influence of the presence of immobilized cells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 59: 297-302.
- de Ory, I., Romero, L.E., and Cantero, D. 2003. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood Chips and polyurethan foam as Carriers for *Acetobacter aceti*. *Process Biochemistry*. 39: 547-555.
- de Ory, I., Romeo, 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: 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 September 2012.
- Ganguly, R., Dwivedi, P., and Singh, R.P. 2007. Production of lactic acid with loofa sponge immobilized *Rhizopus oryzae* RBU2-10. *Bioresource Technology*. 98:1246-51.
- Ghommidh, C., Navarro, J.M., and Durand, G. 1982. A study of acetic acid production by immobilized *Acetobacter* cells: oxygen transfer. *Biotechnology and Bioengineering*. 24: 605-617.
- Horiuchi, J.I., Tabata, K., Kanno, T., and Kobayashi, M. 2000. Continuous acetic acid production by a packed bed bioreactor employing charcoal pellets derived from waste mushroom medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 89: 126-130.
- Horiuchi, J.I., Ando, K., Watanabe, S., Tada, K., Kobayashi, M., and Kanno, T. 2001. Performance of a partial packed charcoal pellet bioreactor for acetic acid fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92: 478-480.
- http://www.frings-china.com/index1.2_en.html. Accessed Date 1 June 2015.
- <http://www.luffa.info/>. Luffa info. Accessed Date 18 January 2008.
- Kang, Y.H., Kim, B.R., Choi, H.J., Seo, J.G., Kim, B.H., and Han, M.S. 2007. Enhancement of algicidal activity by immobilization of algicidal bacteria antagonistic to *Stephanodiscus hantzschii* (Bacillariophyceae). *Journal of Applied Microbiology*. 103: 1983-1994.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kocher, G.S., Kalra, K.L. and Phutela, R.P. 2006. Comparative production of sugarcane vinegar by different immobilization techniques. *Journal of the Institute of Brewing*. 112: 264-266.
- Kocher, G.S. and Dhillon, H.K. 2013. Fermentative production of sugarcane vinegar by immobilized cells of *Acetobacter aceti* under packed bed conditions. *Sugar Technology* 15: 71-76.
- Krishnan, S., Gowthaman, M.K., Misra, M.C., and Karanth, N.G. 2001. Chitosan-treated polypropylene matrix as immobilization support for lactic acid production using *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 76: 461-468.
- Krusong, W., Klomklieng, W., and Pinvisetse, P. 2004. Fermented vinegar production process for replacement of imported technology. Proceeding of the 1st KMITL International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development. Vol.2. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang. 25-26 August 2004. pp.174-177.
- 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. *KMITL Science Journal*. 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 loffa sponge. *Kasetsart Journal (Natural Science)*. 44: 201-207.
- Krusong, W., P. Dansai and A. Itharat. 2012. Combination impact of turmeric extract and fermented vinegar on reduction of inoculated *Salmonella* Typhimurium on fresh lettuce. *KMITL Science and Technology Journal*. 12: 77-84.
- Krusong, W., Pornpukdeewatana, S., Kerdpiboon, S., and Tantratian, S. 2014a. Prediction of influence of stepwise increment of initial acetic acid concentration in charging medium on acetification rate of semi-continuous process by artificial neural network. *LWT - Food Science and Technology*. 56: 383-389.
- Krusong, W., and Tantratian, S. 2014b. Acetification of rice wine by *Acetobacter aceti* using loofa sponge in a low-cost reciprocating shaker. *Journal of Applied Microbiology*. 117: 1348-1357.
- Krusong, W., Yaiyen, S., and Pornpukdeewatana, S. 2015a. Impact of high initial concentrations of acetic acid and ethanol on acetification rate in an internal Venturi injector bioreactor. *Journal of Applied Microbiology*. 118: 629-640.
- Krusong, W., Teerarak, M., and Laosinwattana, C. 2015b. Liquid and vapor-phase vinegar reduces *Klebsiella pneumoniae* on fresh coriander. *Food Control*. 50: 502-508.

- Krusong, W., Jindaprasert, A., Laosinwattana, C, and Teerarak, M. 2015c. Baby-corn fermented vinegar and its vapour, control postharvest decay in strawberries. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 43: 193–203.
- Krusong, W., Kerdpi boon, S., Pornpukdeewatana, P., and Jindaprasert, A. 2016. Luffa sponge offsets the negative effects of aeration on bacterial cellulose production. *Journal of Applied Microbiology*. 121: 1665-1672.
- Liu, K., Seki, M., and Furusaki, S. 1999. Plant cell immobilization in loofa sponge using two-way bubble circular system. *Journal of Chemical Engineering*. 32: 8-14.
- Lotong, N., Malaphan, W., Boongorsrang, A., and Yongmanitchai, W. 1989. Production of vinegar by *Acetobacter* cells fixed on a rotating disc reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*. 32: 27-31.
- Maestre, O., Santos-Dueñas, I.M., Peinado, R., Jiménez-Ot, C., García-García, I., and Mauricio, J.C. 2008. Changes in amino acid composition during wine vinegar production in a fully automatic pilot acetator. *Process Biochemistry*. 43: 803-807.
- Matsushita, K., Inoue, T., Theeragool, G., Trcek, J., Toyama, H., and Adachi, O. 2005. Acetic acid production in acetic acid bacteria leading to their death and survival. In *Survival and Death in Bacteria*. ed. Yamada, M. pp.168-181. Karala: Research Signpost.
- Mori, A., Matsumoto, N., and Imai, C. 1989. Growth behavior of immobilized acetic acid bacteria. *Biotechnology Letters*. 11: 183-188.
- Nanba, A., Kimura, K., and Nagai, S. 1985. Vinegar production by *Acetobacter rancens* cells fixed on a hollow fiber module. *Journal of Fermentation Technology*. 63: 175-179.
- Ogbonna, J.C., Tomiyama, S., Liu, Y., and Tanaka, H. 1997. Efficient production of ethanol by cells immobilized in Loofa (*Luffa cylindrical*) Sponge. *Journal of Fermentation and Biotechnology*. 84: 271-274.
- Okuhara, A. 1985. Vinegar production with *Acetobacter* grown on a fibrous support. *Journal of Fermentation Technology*. 62: 57-60.
- Osuga, J., Mori, A., and Kato, J. 1984. Acetic acid production by immobilized *Acetobacter aceti* cells entrapped in a k-carrageenan gel. *Journal of Fermentation Technology*. 62: 139-149.
- Park, S. and Stephanopoulos, G. 1993. Packed bed bioreactor with porous ceramic beads for animal cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 41: 25-34.
- Pekdemir, T., B. Keskinler, E. Yildiz, and G. Akay. 2003. Process intensification in wastewater treatment: ferrous iron removal by a sustainable membrane bioreactor system. *Chemical Engineering*. 78: 773-780.

- Sakurai, A., Nishida, Y., Saito, H., and Sakakibara, M. 2000. Ethanol production by repeated batch culture using yeast cells immobilized within porous cellulose carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 90: 526-529.
- Schwartz, J.P., Souza Jr., J.A.D., Santos, E.B.D., and Kozłowski Jr., V.A. 2007. Biofilm control in total dentures with vegetable sponge. Available at http://iadr.confex.com/iadr/2007_orleans/techprogram/abstract_90078.htm. Accessed Date 14 August 2008.
- Shen, J., Xie, Y.M., Huang, X., Zhou, P., and Ruan, D. 2013. Behaviour of luffa sponge material under dynamic loading. *International Journal of Impact Engineering*. 57:17-26.
- Sinnot, E.W., and Bloch, R. 1943. Development of the fibrous net in the fruit of various races of *Luffa cylindrica*. *Botanical Gazette*. 105, 90-100.
- Stenstrom, M. 2007. Measurement of Oxygen Transfer in Clean Water. Standards ASCE/EWRI 2-06. 42pp. American Society of Civil Engineers, USA.
- Sueki, M., Kobayashi, N., and Suzuki, A. 1991. Continuous acetic acid production by the bioreactor system loading a new ceramic carrier for microbial attachment. *Biotechnology Letters*. 13: 185-190.
- Terra Farmer. 2011. Gourd-zilla.[Online]. Available: <http://kanak7.wordpress.com/2011/10/20/gourd-zilla/>. 20 October 2011.
- Vignoli, J.A., Celligoi, M.A.P.C., and Silva, R.S.F. 2006. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrica*. *Process Biochemistry*. 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 21 April 2012.
- Yang, Y., Tada, C., Miah, M.S., Tsukahara, K., Yagishita, T., and Sawayama, S. 2004. Influence of bed materials on methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester. *Materials Science and Engineering*. 24: 413-419.

ภาคผนวก

ลักษณะวัสดุที่ใช้ในการศึกษา

1. ไยบวบ

ไยบวบจะต้องตัดแต่งให้มีลักษณะเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด (ก x ย x ส) เท่ากับ 1.5 ซม. x 1.5 ซม. x 1.5 ซม. โดยเรียกว่า “Luffa sponge matrices (LSM)” ดังแสดงในภาพผนวกที่ 1(a)

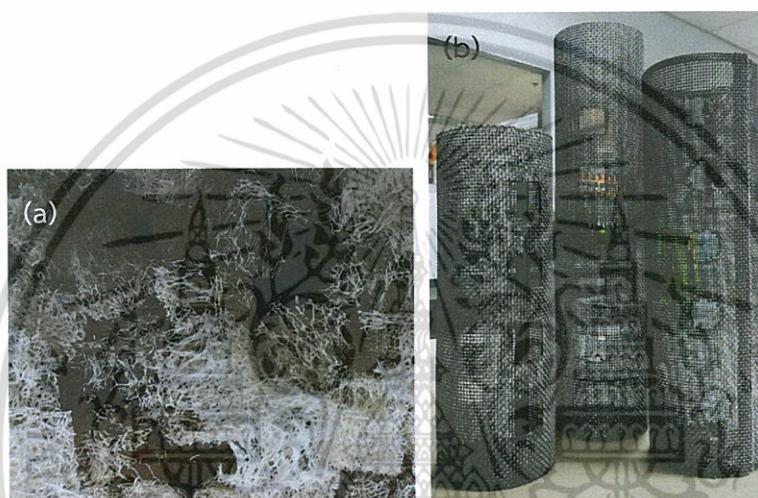


Fig. supplementary1. Characteristic of luffa sponge matrices and stainless steel screen cylinder used for adsorption of *Acetobacter aceti* WK in packed bed-external aerated fermenting medium system: (a) luffa sponge matrices; (b) three types of stainless steel screen cylinder

2. ตะแกรงเสตเลสสำหรับบรรจุ LSM

ลักษณะของตะแกรงเสตเลสเป็นรูปทรงกระบอกมี 3 ขนาด เพื่อบรรจุ LSM ในระดับปริมาตร 2, 2.5 และ 3 ลิตร (โดยปริมาตร) ดังแสดงในภาพผนวกที่ 1(b)

วิธีวิเคราะห์

1. ค่าปริมาณออกซิเจนในน้ำ (Dissolved Oxygen, DO)

ค่า DO (ppm) วัดด้วยเครื่อง HI9146 Microprocessor Dissolved Oxygen Meter (HANNA Instruments Inc., Cluj Napoca, Romania)

วิธีการใช้งาน DO Meter มีดังนี้

1. คลายเกลียวเมมเบรน เติมน้ำยาอิเล็กโทรไลต์ในเมมเบรน แล้วปิดให้สนิท เปิดเครื่องวัด DO วางทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เครื่องจะปิดเอง (สำหรับการใช้งานครั้งแรก)
2. เปิดเครื่อง กดปุ่ม “CAL” หลังจากนั้นค่าที่โชว์อุณหภูมิจะขึ้น “100” และกระพริบ วางเครื่องไว้หนึ่งๆ ห้ามเขย่า รอประมาณ 3-5 นาที ค่าจะนิ่ง แล้วกดปุ่ม “YES” เพื่อยืนยัน (*การเติมน้ำยาในเมมเบรนไม่ควรทำในที่มืด)
3. จุ่มหัววัดลงไปใต้น้ำหมัก (ควรใช้หัววัดกวนน้ำหมักเล็กน้อย) รอค่าให้นิ่ง อ่านค่าและจดบันทึก
4. ในกรณีที่ไม่ได้ใช้เป็นเวลานาน ก่อนนำมาใช้ควรล้างหัววัดและเมมเบรนด้วยน้ำกลั่น ซับด้วยกระดาษทิชชูให้แห้ง(*ในกรณีที่ไม่ได้ใช้เป็นเวลานานควรถอดแบตเตอรี่ออก)

2. การหาค่า k_La ด้วย Sodium sulfite oxidation method (Stenstrom, 2007)

การหาค่า k_La อาศัยหลักการการกำจัดค่า DO โดยอาศัยปฏิกิริยาของ sodium sulfite (Na_2SO_3) ซึ่งเป็น reducing agent เพื่อเปลี่ยนเป็น sulfate ในสภาพที่มี divalent cation ของ Co^{++} ในลักษณะของ cobalt chloride (CoCl_2) ที่ใช้เป็น catalyst

ขั้นตอนการหาค่า k_La ในถังหมัก packed-bed bioreactor ที่ใช้อัตราการหมุนวนน้ำหมัก 3 ระดับ (0.03 0.06 และ 0.09 ลิตรต่อนาที) เริ่มจากเติมน้ำ 1000 มล. ลงใน pack-bed bioreactor (ขนาด 8000 มล.) จากนั้นเติม CoCl_2 3 มก.ต่อลิตร ก่อนให้อากาศในอัตราการหมุนวนที่ใช้ในการศึกษาเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงเติม Na_2SO_3 ปริมาณ 200 มก.ต่อลิตร ก่อนสิ้นสุดการหมุนวน ทำการวัดค่า DO ในทุกๆ 2 นาที เป็นเวลา 30 นาที และนำค่าที่วัดได้ไปพล็อต semi-logarithmic scale โดยค่า slope ของกราฟที่ได้เป็นค่า k_La ที่ต้องการวัด

สำหรับการวัดค่า k_La ในขวดขนาด 10 ลิตร ที่บรรจุน้ำหมักปริมาตร 5 ลิตร ที่มีการพ่นให้อากาศ (3ระดับ ประกอบด้วย 3 6 และ 9 ลิตรต่อนาที) หรือ เรียกว่า “aerated-fermenting medium” นั้น ดำเนินการเช่นเดียวกัน แต่ใช้น้ำ 5000 มล. ส่วนสารเคมีอาศัยการคำนวณที่เพิ่มขึ้น 5 เท่า จากกรณีของการหาค่า k_La ในถังหมัก packed-bed bioreactor ข้างต้น

3.3.2.1 การตรวจวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์กรด (AOAC, 2000)

นำตัวอย่างน้ำส้มสายชูมาทำการไตเตรทด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 N. จนเกิดจุดยุติ คือ เปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน (ปฏิบัติตามขั้นตอนของ AOAC, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.2 วิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์

นำตัวอย่างน้ำส้มสายชู 50 มิลลิลิตร ทำการต้มด้วยอู่บลูโอมิเตอร์

3.3.2.5 ผลของปริมาณเชื้อที่หมักน้ำส้มสายชู

โดยหาค่ากราฟมาตรฐานของปริมาณเชื้อจากความสัมพันธ์ของค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell Weight) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm การทำกราฟมาตรฐานแสดงปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *Acetobacter aceti* โดยวิธีการนำเอาน้ำหมักที่มีเซลล์แบคทีเรียอยู่มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm และนำมาเหวี่ยงด้วยเครื่อง Hi speed Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 8500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง นำค่าที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้เป็นกราฟในการหาปริมาณเชื้อที่หมักน้ำส้มสายชู

1. วิเคราะห์ Cell Dry Weight (น้ำหนักเซลล์แห้ง) จากน้ำหมัก

นำตัวอย่างน้ำส้มสายชูที่มีแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* เจริญอยู่ในช่วง log phase ปริมาตร 250 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด centrifuge 5 หลอด หลอดละ 50 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง Hi speed Centrifuge ด้วยอัตราเร็ว 8500 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เมื่อปั่นเหวี่ยงเสร็จจะเกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำกับตะกอนเซลล์แบคทีเรีย เทส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาทำการล้างด้วยน้ำเสตอไรซ์ 2 ครั้ง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นใส่หลอดทดลอง ที่อัตราการเจือจาง 100:0 80:20 60:40 40:60 20:80 นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge และดูดใส่ฟอยล์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ส่วนที่เหลือนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 nm แล้วนำค่าทั้งสองมาหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นกับน้ำหนักแห้งของเซลล์แบคทีเรีย *Acetobacter aceti* สมการที่ใช้ในการคำนวณค่าน้ำหนักแห้ง คือ

$$\text{น้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(B-A) \times 1000}{(\text{ปริมาตรที่ใช้ในการเหวี่ยง})}$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักของฟอยล์

B คือ น้ำหนักของฟอยล์ หลังอบ

2. วิเคราะห์ Cell Dry Weight (น้ำหนักเซลล์แห้ง) จากโยบวบ

นำโยบวบมาใส่น้ำกลั่นเสตอไรซ์ปริมาตร 1:100 มิลลิลิตร จำนวน 5 flask และนำเข้าเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนทำการวิเคราะห์ตามข้อ 3.3.2.5.1

3. การวิเคราะห์ Optical Density (ความขุ่น)

เก็บตัวอย่างน้ำส้มสายชูหมักในแต่ละวันมาวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 nm แล้วนำไปแทนค่าในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นกับน้ำหนักแห้งของเซลล์แบคทีเรีย

Acetobacter aceti เพื่อหาค่าปริมาณของเซลล์ *Acetobacter aceti* ในแต่ละ cycle ของการหมัก สามารถหาได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณเซลล์ของแต่ละ cycle} = \left| \frac{(\text{ปริมาณเซลล์แห้งวันที่สุดท้ายของ cycle} - \text{ปริมาณเซลล์แห้งวันที่เริ่มต้นของ cycle})}{(24 \times \text{จำนวนวันทั้งหมดที่ใช้ในการหมัก})} \right|$$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล ดร.วรารุณี ครูส่ง.....
ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
(กำลังอยู่ในขั้นตอนรอโปรดเกล้าฯ เพื่อดำรงตำแหน่งศาสตราจารย์)

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
Ph.D	Food Science	University of the Philippines at Los Banos	2533
วท.ม	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2528
วท.บ	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2525

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา).....

- (1) การพัฒนากระบวนการหมักน้ำส้มสายชู
- (2) จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร
- (3) การยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้
2558	รางวัลเชิดชูเกียรติผู้มีผลงานดีมีพระศับนานาชาติ สูงสุด ประจำปี 2558	คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
2557	รางวัลเชิดชูเกียรตินักวิจัยที่ได้รับเงินทุนวิจัยสนับสนุน จากแหล่งทุนภายนอกสูงสุด (พ.ศ. 2553-2555)	คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
2556	รางวัลนักวิจัยที่สร้างชื่อเสียงให้คณะ	คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
2556	รางวัลครุฑดีเด่น	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
2555	รางวัลบุคคลที่ทำคุณประโยชน์และชื่อเสียงให้แก่สถาบัน	สภาคณาจารย์และพนักงาน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
2555	รางวัลอาจารย์ดีเด่นประจำปี 2555	คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
2555	รางวัลเทคโนโลยีเครื่องจักรกลยอดเยี่ยม	กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	รางวัลที่ 1 สาขาเครื่องจักรกลการผลิต ในการประกวดรางวัลเทคโนโลยีเครื่องจักรกล ยอดเยี่ยม ประจำปี 2554	
2551	Professional Award ชนะเลิศอันดับสาม โครงการ IRPUS ประจำปี 2551	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
2550	Best iTAP Partnership Award	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของ อุตสาหกรรมไทย (iTAP) ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี (TMC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งชาติ (สวทช.)

ทุนวิจัยที่กำลังได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2560	การใช้ประโยชน์จากเส้นใยจากถั่วเหลืองจากกระบวนการ ผลิตน้ำมันถั่วเหลืองด้วย เชื้อรา <i>Rhizopus oligosporus</i> เพื่อเป็นอาหารสุภาพ	บริษัท พี ที เอ็ม การเกษตร จำกัด (ผ่านทางสำนักบริหารวิชาการและนวัตกรรมพระจ เกล้าลาดกระบัง)
2560-61	การพัฒนาเครื่องต้มเปียร์สุภาพที่มีปริมาณแอลกอฮอล์- คาร์โบไฮเดรตต่ำและเสริมเยื่อใยพรีไบโอติก	โครงการ Talent Mobility สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (ร่วมกับบริษัท ไทยสฟิร อินดัสทรี จำกัด)

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2556-60	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูจากข้าวไร้และ การใช้ประโยชน์	กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2556-57	การเพิ่มประสิทธิภาพการทนความร้อนของหัวเชื้อ น้ำส้มสายชู <i>Acetobacter aceti</i> WK ด้วยประจุ แคลเซียม	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2556	การพัฒนาและการให้คำปรึกษากระบวนการผลิตวัน เซลล์ูโลสจากน้ำสับปะรดที่เป็นผลพลอยได้	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของ อุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งชาติ
2555-56	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากมะม่วง	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของ อุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งชาติ
2555-56	การเลี้ยงเส้นใยเห็ดขอนขาว <i>Lentinus squarrosulus</i> Mont ในสภาพอาหารเหลวด้วยถังหมักระบบผสมน้ำ	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หมักเข้ากับอากาศเพื่อเป็นแหล่งเอนไซม์ย่อยสลายเปลือกข้าวโพดฝักอ่อน	
2555	การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักจากน้ำฝักภาคเขียวปัสที่เหลือใช้	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2554-55	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากสับปะรดนางแล-ภูแลในระบบกึ่งต่อเนื่อง	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2554-55	การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู <i>Acetobacter aceti</i> สป5 เพื่อผลิตกรดได้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2553-54	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำต้มเหี่ยวที่เป็นผลพลอยได้	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2553-54	การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู <i>Acetobacter aceti</i> WK ให้ทนความเข้มข้นกรดสูงด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2553-54	การคงเสถียรภาพของหัวเชื้อ <i>Acetobacter aceti</i> สป5 ผลิตกรดและทนกรด 10-12% และการใช้น้ำแครอทเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชู	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2552-53	การเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกของ <i>Acetobacter aceti</i> WK ที่ตรึงเซลล์ด้วยใยบัวในถังหมักแบบยกอากาศ	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2552-53	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเศษเหลือใช้จากกระบวนการผลิตมะเขือเทศเข้มข้น	บริษัท โรซ่าเกษตรอุตสาหกรรม จำกัด
2552-53	การพัฒนาหัวเชื้อ <i>Acetobacter aceti</i> สป5 ให้มีประสิทธิภาพการสร้างกรด 10-12% ในถังหมักน้ำส้มสายชู High Speed Agitation ขนาด 600 ลิตร	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2551-52	การเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยข้าวด้วยโคจิวข้าวของเชื้อรา <i>Amylomyces</i> spp. DK	โครงการงาน IRPUS สกว.
2551-52	การผลิตวันเซลล์โลสสีแดงโดยอาศัยการหมักด้วยเชื้อรา <i>Monascus purpureus</i> ในน้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อน	โครงการงาน IRPUS สกว.
2551-52	น้ำส้มสายชูหมักจากผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตน้ำฝักและผลไม้: กากแครอท	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2551-52	การเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในถังหมักขนาด 600 ลิตร	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

		สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2551-52	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Botrytis cinerea</i> บนผิวของสตอเบอร์รี่สดด้วยน้ำส้มสายชูหมัก	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2551	การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อรา <i>Rhizopus oligosporus</i> เพื่อใช้ในการผลิตเทมเป้จากถั่วเหลืองอินทรีย์สำหรับเป็นวัตถุดิบอาหารสุขภาพ	โครงการ IRPUS สกว.
2551	ผลของออกซิเจนต่อการเพิ่มอัตราการสร้างกรดอะซิติกจากแบคทีเรีย <i>Acetobacter aceti</i> WK ในระบบหมวนวนน้ำหมัก	โครงการ IRPUS สกว.
2550-51	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเกษตรอินทรีย์	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2550-51	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในถังหมัก High Speed Agitation ขนาด 600 ลิตร	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2550-51	การสร้างฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรียอะซิติกบนซึ่งข้าวโพดในระดับห้องปฏิบัติการ	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2550	การหมักไซเลทจากเศษข้าวโพดฝักอ่อน เศษข้าวโพดหวานผสมกับยีสต์ที่เหลือจากการผลิตไวน์	โครงการ IRPUS สกว.
2550	การใช้ประโยชน์จากยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์เพื่อทดแทนยีสต์สกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักไวน์และน้ำส้มสายชูจากน้ำตาลข้าวโพดฝักอ่อน	โครงการ IRPUS สกว.
2549-50	การลดจำนวนเชื้อ <i>Salmonella Anatum</i> บนเนื้อสุกสดด้วยกรดอะซิติก	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2549-50	น้ำส้มสายชูจากเปลือกและเนื้อมะม่วงเพื่อเอกลักษณ์ไทย	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2550	การปรับปรุงหัวเชื้อสำหรับหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว	งบประมาณเงินรายได้ โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2548-50	การพัฒนาหัวเชื้อน้ำส้มสายชูหมักเพื่อรองรับเทคโนโลยีผลิตน้ำส้มสายชูจากต่างชาติ	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2548-49	ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูระบบ Single Stage	งบประมาณเงินรายได้ โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2547-48	การปรับสภาพเชื้อ <i>Acetobacter sp.</i> สป5 ให้ปราศจากเจลสำหรับกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำตาลข้าวโพดฝักอ่อน	บริษัท แอ็กโกร - ออน (ประเทศไทย) จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2547-48	การออกแบบและสร้างเตาอบปลาด้วยอินฟราเรดแบบสายการผลิตต่อเนื่อง (ผู้ร่วมวิจัย)	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2547-48	การออกแบบและสร้างสายการผลิตแบบต่อเนื่องในภาคอุตสาหกรรม (ผู้ร่วมวิจัย)	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2547-48	การยืดอายุการเก็บรักษาสลัดผักชนิดไทย	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2547	การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกจากกากถั่วเหลืองที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองและสถานะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในการหมักกากถั่วเหลืองเพื่อเป็นอาหารสัตว์	โครงการ IRPUS สกว.
2547	โยเกิร์ตน้ำมันถั่วเหลืองจากเมล็ดถั่วเหลืองสกัดไขมัน	โครงการ IRPUS สกว.
2546	การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาข้างเหลืองกึ่งแห้งที่ใช้ น้ำส้มสายชูในการยืดอายุการเก็บรักษา	โครงการ IRPUS สกว.
2546	การผลิตจุลินทรีย์โปรตีนจากน้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนโดย <i>Saccharomyces cerevisiae</i> M30	โครงการ IRPUS สกว.
2546	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อน	บริษัท แอ็กโกร – ออน (ประเทศไทย) จำกัด
2546	การพัฒนาผลิตภัณฑ์ประเภทสุราแช่ชนิดสุราผลไม้	บริษัท ไทยสพิริทอินดัสตรี จำกัด
2544-45	การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำอ้อย	สกว.
2543-45	การพัฒนากระบวนการผลิตเซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย <i>Acetobacter xylinum</i>	สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ โครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ (ไทย-ญี่ปุ่น)
2539-42	Experimental and Threoretical Investigation of Packed Bed Solid-State Fermentation (ผู้ร่วมวิจัย)	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
2539-42	High Vitamin B12 Vegetarian Diets by Mixed Fermentation (ผู้ร่วมวิจัย)	CDR USAID – ISRAEL Project
2541	การผลิตนมเปรี้ยวเสริมสุขภาพจากถั่วเหลืองในระดับกึ่งโรงงาน	สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ประเภทพัฒนาสังคม
2540	การศึกษาสมบัติทางกายภาพของวุ้นเซลล์ูโลสของแบคทีเรีย <i>Acetobacter xylinum</i>	งบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.
2539-40	การผลิตคาร์บอกซีเมทิลเซลล์ูโลสจากวุ้นเซลล์ูโลสที่ได้จาก <i>Acetobacter xylinum</i>	สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
2538	การผลิตเซลล์ูโลสเสริมสุขภาพจากน้ำกากสำ	งบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.
2537	Lactic Drink from High Vitamin B12 –	UNU (United Nation University)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	Tempeh	
2536	เซลล์โลสเสริมสุขภาพจากน้ำหางนม	งบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.
2535	การผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าว	งบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.
2530	ผลของการสารสกัดไม้เคี่ยมต่อการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล	งบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.
2529	Fermented Mungbean Residues by Laru, Traditional Inoculum	UNU (United Nation University)
2543	Research Activity at International Center for Biotechnology (ICBiotech), Osaka University, Osaka, Japan.	Japan under the JSPS-NRCT/DOST/LIPI/VCC Large Scale Cooperative Program in the Field of Biotechnology. Subgroup 4 : Process Development for the Production of Organic Acids and Biopolymers.
2542	Research Visit.	International Center for Biotechnology, Osaka University, Japan, under the RIKEN Project, Japan.
2541	Research Visit at Cornell University, United State.	USAID-Israel CDR Project.
2540	Research Activity at International Center for Biotechnology(ICBiotech), Osaka University, Osaka, Japan.	Japan under the JSPS-NRCT/DOST/LIPI/VCC Large Scale Cooperative Program in the Field of Biotechnology. Subgroup 3 : Development of Manufacturing Bioprocess Technology in Tropics.
2538	Research Activity at International Center for Cooperative Research in Biotechnology(ICBiotech), Osaka University, Osaka, Japan.	JSPS-NRCT Core University Cooperative Program.
2538	Training in Soy Yogurt (Yogurt from soybean) at Department of Food Science and Technology, University of Reading, Reading, UK.	ทบวงมหาวิทยาลัยของรัฐ
2536	Training on Advances in Microbial Process for the Utilization of Tropical Raw Materials in the Production of Food Products at the University of the Philippines at Los Banos, Philippines.	UNESCO
2536	Research Activity at Kyoto University, Kyoto, Japan	JSPS-NRCT Core University Cooperative Program.
2531	SEARCA Scholarship (ปริญญาเอก)	SEAMEO Regional Centre for Graduate Study and Research in Agriculture
2531	Training on Bioenergy at Asian Institute of	UNESCO

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	Technology at Asian Institute of Technology	
2529	Training on Food Fermentation : Tempe at Nutrition Research and Development Center, Bogor, Indonesia.	United Nation University, Tokyo

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

การขอใช้สิทธิในเทคโนโลยี (Licensing Agreement) สิ่งประดิษฐ์ เรื่อง “กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi Ejector System)”

เลขที่ LA 53/01 ลงวันที่ 4 มกราคม พ.ศ. 2553

ระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ บริษัท ไฮคิวผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด

การขอใช้สิทธิในเทคโนโลยี (Licensing Agreement) สิ่งประดิษฐ์ เรื่อง “กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi Ejector System)”

เลขที่ LA 54/01 ลงวันที่ 23 กันยายน พ.ศ. 2554

ระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ บริษัท วินีโก้ไทย จำกัด

การขอใช้สิทธิในเทคโนโลยี (Licensing Agreement) สิ่งประดิษฐ์ เรื่อง “กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi Ejector System)”

เลขที่ LA 55/01 ลงวันที่ 21 สิงหาคม พ.ศ. 2555

ระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ บริษัท ปริ้นเชส ฟู้ดส์ จำกัด

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Krusong, W., Dansai, P. and Itharat, A. 2012. Combination impact of turmeric extract and fermented vinegar on reduction of inoculated *Salmonella* Typhimurium on fresh lettuce. KMITL Sci. Tech. J. 12: 77-84.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Pornpukdeewattana, S., Kerdpi boon, S., Jindaprasert, A., Pandee, P., Teerarak, M. and Krusong, W. 2017. Upland rice vinegar vapor inhibits spore germination, hyphal growth and aflatoxin formation in *Aspergillus flavus* on maize grains. Food Control. 71, 88-93.

Krusong, W., Kerdpi boon, S., Pornpukdeewatana, P. and Jindaprasert, A. 2016. Luffa sponge offsets the negative effects of aeration on bacterial cellulose production. Journal of Applied Microbiology. 121, 1665-1672.

Krusong, W., Pornpukdeewatana, S. and Teerarak, M. 2016. Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* on coriander leaves to liquid- and vapor-phase ethanol. FEMS Microbiology Letters. 363. doi: 10.1093/femsle/fnw072.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Krusong, W., Kerdpi boon, 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. *Journal of Applied Microbiology*. 119, 1291-1300.
- Krusong, W., Jindaprasert, A., Laosinwattana, C, and Teerarak, M. 2015. Baby-corn fermented vinegar and its vapour, control postharvest decay in strawberries. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 43, 193-203.
- Krusong, W., Teerarak, M., and Laosinwattana, C. 2015. Liquid and vapor-phase vinegar reduces *Klebsiella pneumoniae* on fresh coriander. *Food Control* 50, 502-508.
- Krusong, W., Yaiyen, S., and Pornpukdeewatana, S. 2015. Impact of high initial concentrations of acetic acid and ethanol on acetification rate in an internal Venturi injector bioreactor. *Journal of Applied Microbiology* 118, 629-640.
- Krusong, W. and Tantratian, S. 2014. Acetification of rice wine by *Acetobacter aceti* using loofa sponge in a low-cost reciprocating shaker. *Journal of Applied Microbiology* 117, 1348-1357.
- Krusong, W., Pornpukdeewatana, S., Kerdpi boon, S., and Tantratian, S. 2014. Prediction of influence of stepwise increment of initial acetic acid concentration in charging medium on acetification rate of semicontinuous process by artificial neural network. *LWT - Food Science and Technology* 56, 383-389.

ผลงานวิชาการนำเสนอในที่ประชุมระดับชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Changsa wake, K., Krusong, W., Laosinwattana, J. and Teerarak, M. 2014. Antioxidant properties and DNA damage protective potential of RD6 glutinous rice. The 12th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. King Mongkut's Institute of Technpology Ladkrabang, Prince of Chumphon Campus, Chumphon, Thailand. 11-13 December 2014.

ผลงานวิชาการนำเสนอในที่ประชุมระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

- Krusong, W., Jindaprasert, A., Yaiyen, S. and Pornpukdeewatana, S. 2016. Changes in lipid, membrane-bound enzyme of acetic-acid bacteria under high initial acetic acid acetification process. International Conference on Beneficial Microbes 2016, Microbes for the Benefits of Mankind, 31st May-2nd June, 2016. Duangitt Resort & Spa, Phuket, Thailand. (oral presentation)
- Jindaprasert, A., Pornpukdeewatana, S. Kerdpi boon, S. and Krusong, W. 2016. Improvement of α -amylase and glucoamylase production from *Amylomyces* spp. using metal ions in wheat bran. International Conference on Beneficial Microbes 2016, Microbes for the Benefits of Mankind, 31st May-2nd June, 2016. Duangitt Resort & Spa, Phuket, Thailand. (poster presentation)
- Changsa wake, K., Krusong, W., Laosinwattana, J. and Teerarak, M. 2015. Use of ambient upland rice fermented vinegar vapor to extend shelf life of sweet basil (*Ocimum basilicum* Linn.). The 4th ICIST, November 27-28, 2015, CWD Hotel, Hanot, Vietnam.
- Changsa wake, K., Krusong, W., Laosinwattana, C. and Teerarak, M. 2015. Evaluation of hydroxyl radical scavenging, anti-lipid peroxidation abilities and total phenolic content of RD6 glutinous rice grain. International Symposium on Engineering and Natural Sciences. Beijing, China. 12-14 August 2015.

ผลงานสิทธิบัตร/สิ่งประดิษฐ์/งานสร้างสรรค์ (ศิลปะ หรือ อื่นๆ)

กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi Ejector System)

คำขอรับอนุสิทธิบัตรเลขที่ 1403002218 ยื่นเมื่อวันที่ 18 กันยายน 2557

กรรมวิธีการทำให้วุ้นเซลลูโลสใส

คำขอรับสิทธิบัตรเลขที่ 0901005777 ยื่นเมื่อวันที่ 22 ธันวาคม 2552

วุ้นเซลลูโลสเสริมกลิ่น-รสชาติและกรรมวิธีการผลิต

ได้ยื่นความจำนงการขอรับอนุสิทธิบัตรที่ฝ่ายจัดการทรัพย์สินทางปัญญา สำนักบริหารงานวิจัยและนวัตกรรมพระจอมเกล้าลาดกระบัง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อวันที่ 26 มกราคม 2560



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้