สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

20369

# ใบรับรองปัญหาพิเศษ

T096955

## เรื่อง

การคงสภาพเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ในสภาพไม่สร้างเจลเพื่อการหมักน้ำส้มสายชู
และการติดตามการสร้างน้ำส้มสายชูโดยอาศัยการวัดค่า pH ด้วยเครื่อง

Stability of Acetobacter SP5 for Non-Gel Production during vinegar fermentation
and monitoring of vinegar by using pH meter

## จัดทำโดย

นางสาวพรรณธิดา สุนทรพนาเวศ รหัส 44040760
นางสาววนิดา ปานอุทัย รหัส 44040768

## ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 18 / เมย. / 48 อาจารย์ที่

ปรึกษาปัญหาพิเศษ

ปพ.
W262n
2548
หมู่.....
เลขทะเบียน 96955
วัน.เดือน.ปี - 5 JUN 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นางสาวพรรณธิดา สุนทรพนาเวศ และนางสาววนิดา ปานอุทัย.2547 : การคงสภาพเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ในสภาพไม่สร้างเจลเพื่อการหมักน้ำส้มสายชู และการติดตามการสร้างน้ำส้มสายชูโดยอาศัยการวัดค่า pH ด้วยเครื่อง (Stability of Acetobacter SP5 for Non-Gel Production during vinegar fermentation and monitoring of vinegar fermentation by using pH meter) สาขาเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

---

## บทคัดย่อ

จากการศึกษาการคงสภาพเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ในสภาพไม่สร้างเจลเพื่อการหมักน้ำส้มสายชู พบว่า มีเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 6 isolates ที่ผ่านการปรับสภาพในขั้นแรก หลังจากการถ่ายเชื้อทุก 5 วัน เป็นจำนวน 4 ครั้ง คือ สามารถทนสภาวะที่มีแอลกอฮอล์และกรดเริ่มต้น 8 เปอร์เซ็นต์และ 1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในสภาพที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาหมักสภาพนิ่งเพื่อติดตามการสร้างเจลในไวน์น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนไม่พบการสร้างเจลในระยะเวลา 68 วัน หลังจากนั้นนำเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ทั้ง 6 isolates มาผ่านการปรับสภาพครั้งที่ 2 พบว่าเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ทั้ง 6 isolates ผ่านการปรับสภาพครั้งที่ 2 คือ สามารถทนสภาวะที่มีแอลกอฮอล์และกรดเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในสภาพที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส

สำหรับการติดตามการสร้างน้ำส้มสายชูจากไวน์น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนในระบบกึ่งต่อเนื่องโดยตรึงเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 บนใยพลาสติกในถังสแตนเลสทรงสูงในสภาพที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง พบว่าปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในระดับทศนิยม 3 ตำแหน่งที่แน่นอน

| พรรณธิดา สุนทรพนาเวศ | | |
|---|---|---|
| วนิดา ปานอุทัย | | 18 เม.ย. 48 |
| ลายมือชื่อนักศึกษา | ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา | วัน/เดือน/ปี |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีต้องขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง อาจารย์ที่ปรึกษาเป็นอย่างสูง ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำในวิธีการดำเนินงาน การแก้ไขปัญหา ตลอดจนหาเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งการตรวจทานแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา ที่ได้ให้เกียรติเป็นคณะกรรมการในการสอบปัญหาพิเศษ

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่อบรมสั่งสอนและเลี้ยงดูมาตลอดจนถึงทุกวันนี้ และเป็นผู้ที่ช่วยออกกำลังทรัพย์ในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ โดยเฉพาะ นางสาวพิมพ์พร เบญจลักษณกุล และนางสาวอรสุธี แซ่โอว ที่ช่วยเหลือและคอยอยู่เป็นเพื่อนในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้โดยตลอด

สุดท้ายนี้หวังว่าความรู้และคุณค่าของปัญหาพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อทุกท่าน

พรรณธิดา สุนทรพนาเวศ
วนิดา ป่านอุทัย
11 เมษายน 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า

**บทคัดย่อ** ..... ก
**กิตติกรรมประกาศ** ..... ข
**สารบัญ** ..... ค
**สารบัญตาราง** ..... จ
**สารบัญภาพ** ..... ฉ
**บทที่ 1 บทนำ** ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา ..... 1
1.2 ขอบเขตการวิจัย ..... 1
1.3 วัตถุประสงค์ ..... 2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ ..... 2

**บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** ..... 3
2.1 น้ำส้มสายชู ..... 3
2.2 ประเภทของน้ำส้มสายชู ..... 3
2.3 องค์ประกอบของน้ำส้มสายชู ..... 5
2.4 วิธีการผลิตน้ำส้มสายชู ..... 6
2.5 ประวัติการศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชู ..... 8
2.6 การพัฒนาการหมักน้ำส้มสายชู ..... 8
2.7 ขั้นตอนการหมักน้ำส้มสายชู ..... 10
2.8 แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอะซิติกจากเอทธานอล ..... 11
2.9 แหล่งที่พบและคุณสมบัติที่ใช้ในการแยกเชื้อ Acetobacter sp. ..... 11
2.10 คุณสมบัติทั่วไปของ Acetobacter sp. ..... 12
2.11 สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเจริญของ Acetobacter sp. ..... 13
2.12 การออกซิไดซ์เอทธานอลเป็นกรดอะซิติก ..... 14
2.13 การเปลี่ยนแปลงของเชื้อ Acetobacter ในระหว่างการหมักเพื่อผลิตน้ำส้มสายชู ..... 15
2.14 เครื่องวัด pH ..... 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

**บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ** ..... 20

3.1 วัตถุดิบ ..... 20

3.2 เชื้อจุลินทรีย์ ..... 20

3.3 สารเคมี ..... 20

3.4 สารอาหาร ..... 21

3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ ..... 21

3.6 เครื่องมือและอุปกรณ์ ..... 21

3.7 สถานที่ดำเนินงาน ..... 22

3.8 วิธีการดำเนินงาน ..... 22

**บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์** ..... 25

4.1 การคงสภาพเชื้อ Acetobacter sp. สป.5 ในสภาพไม่สร้างเจลเพื่อการหมักน้ำส้มสายชู ..... 25

4.2 ผลการติดตามการสร้างน้ำส้มสายชูโดยอาศัยการวัดค่า pH ด้วยเครื่อง ..... 27

**บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ** ..... 32

5.1 การคงสภาพเชื้อ Acetobacter sp. สป.5 ในสภาพไม่สร้างเจลเพื่อการหมักน้ำส้มสายชู ..... 32

5.2 ผลการติดตามการสร้างน้ำส้มสายชูโดยอาศัยการวัดค่า pH ด้วยเครื่อง ..... 32

**บรรณานุกรม** ..... 34

**ภาคผนวก ก** ..... 36

**ภาคผนวก ข** ..... 38

**ภาคผนวก ค** ..... 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดทุก 3 ชั่วโมง และติดตามค่า pH
ทุก 1 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมงในการหมักน้ำส้มสายชูระบบกึ่งต่อเนื่อง.....29

ภาคผนวก ค

1 ผ. ผลของปริมาณกรดที่เชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 6 isolates สร้างขึ้น
ในระหว่างการหมักสภาพนิ่งในไวน์น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อน ที่ปรับแอลกอฮอล์
และกรด 8 เปอร์เซ็นต์ และ 1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ.....40

2 ผ. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรด
กับค่า pH ในการหมักน้ำส้มสายชูของถังที่ 1.....41

3 ผ. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรด
กับค่า pH ในการหมักน้ำส้มสายชูของถังที่ 2.....42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

4.1 การคงสภาพเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE Broth ที่มีการปรับปริมาณแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ และปรับปริมาณกรดด้วยกรดอะซิติกให้มีปริมาณกรดเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง และควบคุมอุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส.....26

4.2 แสดงการหมักสภาพนิ่งเพื่อติดตามผลการสร้างเจล และปริมาณกรดที่เชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 สร้างขึ้น.....26

4.3 ผลการเปรียบเทียบปริมาณกรดที่เชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ทั้ง 6 isolates สามารถสร้างขึ้นได้ในระหว่างการหมักสภาพนิ่งในไวน์น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนที่ปรับปริมาณแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งปรับปริมาณกรดด้วยกรดอะซิติกให้มีปริมาณกรดเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์.....27

4.4 ถังหมักน้ำส้มสายชูสแตนเลสทรงสูงในสภาพแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi – continuous fermentation) ที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง.....28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

บริษัทผู้ผลิตข้าวโพดฝักอ่อนในน้ำส้มสายชูได้พัฒนาเครื่องผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องเพื่อผลิตน้ำส้มสายชูจากของเหลือทิ้งในกระบวนการผลิตที่จะช่วยลดต้นทุนค่าน้ำส้มหมักที่จะต้องซื้อได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากความต้องการของลูกค้าในยุโรปที่ไม่อยากได้น้ำส้มสายชูกลั่น จึงเปลี่ยนมาใช้น้ำส้มสายชูหมักโดยได้ทดลองใช้วัตถุดิบหลายอย่างตั้งแต่อ้อย ข้าว ข้าวฟ่าง และพบว่าน้ำส้มสายชูหมักที่มาจากน้ำมะพร้าวจะเหมาะกับข้าวโพดฝักอ่อนมากที่สุด แต่เนื่องจากน้ำส้มสายชูหมักที่มาจากน้ำมะพร้าวที่ต้องสั่งซื้อจากผู้ผลิตทั้งในและต่างประเทศในปริมาณมากทำให้เกิดปัญหาว่าบางครั้งผู้ค้าบางรายหาน้ำส้มให้ไม่ทัน จากปัญหาดังกล่าวทำให้เกิดแนวคิดที่จะผลิตน้ำส้มสายชูหมักขึ้นมาใช้เองโดยใช้วัตถุดิบจากกระบวนการผลิตซึ่งเป็นของเหลือทิ้งมาหมักเป็นน้ำส้มสายชูระบบต่อเนื่อง น้ำส้มสายชูระบบต่อเนื่องที่พัฒนาขึ้นมานั้นจะมีการถ่ายสลับการถ่ายออกน้ำส้มสายชูหมักที่ได้และถ่ายเข้าวัตถุดิบเข้าไปในถังหมักวันละถังหมุนเวียนกันไปทำให้ระบบนี้สามารถผลิตน้ำส้มสายชูหมักได้ทุกวัน (จุลเศรษฐกิจ (11-14 กรกฎาคม 2547) แต่เมื่อทำการทดลองเป็นระยะเวลาหนึ่งจะเกิดเจลขึ้นทำให้เกิดการอุดตันของสายยางซิลิโคลนและการให้อากาศภายในถังหมักไม่ทั่วถึงส่งผลให้อัตราการผลิตน้ำส้มสายชูคลาดเคลื่อนได้ เพื่อไม่ให้เกิดปัญหาดังกล่าวจึงทำการศึกษาการคงสภาพเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูเพื่อไม่ให้เกิดการสร้างเจลรวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH กับการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดที่สร้างขึ้นในระหว่างการผลิตน้ำส้มสายชู เพื่อลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบปริมาณกรดที่สร้างขึ้นในระหว่างการผลิตน้ำส้มสายชู

## 1.2 ขอบเขตการวิจัย

ปัญหาพิเศษนี้เป็นการคงสภาพเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ในสภาพไม่สร้างเจล เพื่อการหมักน้ำส้มสายชู รวมทั้งติดตามค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter ในระดับ 3 ตำแหน่ง และปริมาณกรดที่เชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 สร้างขึ้นในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูในถังสแตนเลสทรงสูงที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อคงสภาพเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ให้ไม่สร้างเจลในระหว่างการผลิตน้ำส้มสายชู
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของค่า pH กับปริมาณกรดที่สร้างขึ้นในระหว่างการผลิตน้ำส้มสายชู

## 1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. เชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ที่ไม่สร้างเจลในการผลิตน้ำส้มสายชู
2. เชื้อสามารถทนสภาพเครียดได้ กล่าวคือ สามารถทนสภาพที่มีปริมาณแอลกอฮอล์และกรดเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์และ 1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ
3. เพื่อทราบถึงความสัมพันธ์ของค่า pH กับค่าความเป็นกรดในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชู

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 น้ำส้มสายชู

น้ำส้มสายชู (vinegar) หรือกรดอะซิติก (acetic acid) เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่ผลิตขึ้นมาจากกระบวนการหมัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว น้ำส้มสายชูนี้รู้จักกันมาตั้งแต่สมัยโบราณเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ประเภทไวน์ ทั้งนี้เนื่องจากพบว่าน้ำส้มสายชูนี้เกิดขึ้นมาจากการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ไวน์นั่นเอง โดยเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในสกุล Acetobacter ซึ่งก่อให้เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงแอลกอฮอล์ที่มีอยู่ในไวน์ให้เป็นกรดอะซิติก ในสภาพที่มีออกซิเจนทำให้ไวน์นั้นมีรสเปรี้ยว ดังนั้นจึงทำให้เรียกผลิตภัณฑ์นี้ว่า "น้ำส้มสายชู" มาจากภาษาฝรั่งเศสว่า "vinaigre" ซึ่งหมายถึงไวน์เปรี้ยว (sour wine) นั่นเอง (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

คุณสมบัติของน้ำส้มสายชูที่เป็นเครื่องปรุงรสอาหารนี้ จะต้องเป็นของเหลวที่ใสปราศจากสีและสิ่งเจือปน ในกรณีที่มีสีจะต้องเป็นสีของวัตถุดิบที่ใช้เท่านั้น นอกจากนี้แล้วปริมาณของตัวทำละลาย (solutes) ต่าง ๆ ในน้ำส้มสายชูจะต้องขึ้นอยู่กับสารประกอบต่าง ๆ ที่มีอยู่ในวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก ส่วนคุณสมบัติของน้ำส้มสายชู อาทิเช่น ความหนาแน่น (density) จุดเดือด (boiling point) จุดเยือกแข็ง (freezing point) ความตึงผิว (surface tension) และความหนืด (viscosity) เป็นต้น อาจจะมีมากหรือน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับคุณสมบัติดังกล่าวของน้ำบริสุทธิ์ ขึ้นกับความเข้มข้นของกรดอะซิติก และชนิดของวัตถุดิบที่ใช้เป็นสำคัญ ค่าพีเอชของน้ำส้มสายชูควรอยู่ระหว่าง 2-3.5

## 2.2 ประเภทของน้ำส้มสายชู

น้ำส้มสายชูเป็นเครื่องปรุงรสอาหารมีทั้งเป็นผลิตผลที่ได้จากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ทางเคมี มีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ กรดน้ำส้ม (Acetic acid) มีคุณสมบัติที่ให้รสเปรี้ยว และเป็นกรดที่เหมาะสมในการรักษาคุณภาพอาหารยิ่งกว่ากรดชนิดใด ๆ เพราะไม่มีพิษต่อร่างกาย น้ำส้มสายชูจัดเป็นอาหารที่กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 204) พ.ศ.2543 เรื่อง น้ำส้มสายชู ประเภทของน้ำส้มสายชูนั้นแบ่งออกเป็น 3 ชนิด (http://www1.fda.moph.go.th) ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. น้ำส้มสายชูหมัก เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธัญพืช ผลไม้ หรือน้ำตาลมาหมักกับส่าเหล้าแล้วหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีธรรมชาติ การหมักจะเปลี่ยนน้ำตาลที่มีอยู่ในอาหารเหล่านี้ให้เป็นแอลกอฮอล์โดยอาศัยยีสต์ที่มีตามธรรมชาติ เพื่อให้น้ำส้มสายชูที่หมักมีกลิ่นหอมและรสชาติดี จากนั้นจะอาศัยแบคทีเรียตามธรรมชาติ หรือการเติมแบคทีเรีย เพื่อเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดน้ำส้ม น้ำส้มสายชูหมักจะมีสีเหลืองอ่อนตามธรรมชาติ มีรสหวานของน้ำตาลที่ตกค้างมีกลิ่นของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก ความแตกต่างในด้านกลิ่นรส และความเข้มข้นขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก น้ำส้มสายชูหมักจะใส ไม่มีตะกอน ยกเว้นตะกอนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ และมีปริมาณกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4%

2. น้ำส้มสายชูกลั่น เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำแอลกอฮอล์กลั่นเจือจาง (Dilute Distilled Alcohol) มาหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชู หรือเมื่อหมักแล้วนำไปกลั่นอีก หรือได้จากการนำน้ำส้มสายชูหมักมากลั่น น้ำส้มสายชูกลั่นจะต้องมีลักษณะใส ไม่มีตะกอนและมีปริมาณกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์

3. น้ำส้มสายชูเทียม เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเอากรดน้ำส้ม (Acetic acid) ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นทางเคมี เป็นกรดอินทรีย์มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนมีความเข้มข้นประมาณ 95 % มาเจือจางจนได้ปริมาณกรด 4 - 7% ลักษณะใส ไม่มีสี กรดน้ำส้มที่นำมาเจือจางจะต้องมีความบริสุทธิ์สูงเหมาะสมที่จะนำมาเป็นอาหารได้และน้ำที่ใช้เจือจางต้องเหมาะสมที่จะใช้ดื่มได้

**2.2.1 การควบคุมคุณภาพหรือมาตรฐานน้ำส้มสายชู**

น้ำส้มสายชูหมักหรือน้ำส้มสายชูกลั่น ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

1. มีกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 27 องศาเซลเซียส
2. ตรวจพบสารปนเปื้อนได้ไม่เกินปริมาณกำหนด ดังต่อไปนี้
   - สารหนู ไม่เกิน 1 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
   - ตะกั่ว ไม่เกิน 1 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
   - ทองแดงและสังกะสี ไม่เกิน 10 มิลลิกรัม ต่อ น้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
   - เหล็ก ไม่เกิน 10 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
3. ไม่มีกรดน้ำส้มที่ไม่ได้มาจากผลิตน้ำส้มสายชูหมักหรือน้ำส้มสายชูกลั่น
4. ไม่มีกรดกำมะถัน (Sulfuric acid) หรือ กรดแร่อิสระอย่างอื่น
5. ใสไม่มีตะกอน เว้นแต่น้ำส้มสายชูหมักตามธรรมชาติ
6. ไม่มีหนอนน้ำส้ม (Vinegar eel)
7. ใช้น้ำสะอาดเป็นส่วนผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. ให้ใช้วัตถุเจือปนอาหาร (Food Additives) ได้ ดังต่อไปนี้
   - ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไม่เกิน 70 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
   - กรดแอล-แอสคอร์บิก ไม่เกิน 400 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
9. มีแอลกอฮอล์ตกค้าง (Residual alcohol) ไม่เกิน 0.5%
10. การแต่งสี ให้ใช้น้ำตาลเคี่ยวไหม้หรือสีคาราเมล

น้ำส้มสายชูเทียม ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

1. มีกรดน้ำส้มสายชูไม่น้อยกว่า 4 กรัม และไม่เกิน 7 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 27 องศาเซลเซียส
2. ตรวจพบสารปนเปื้อนได้ไม่เกินปริมาณที่กำหนด ดังต่อไปนี้
   - สารหนู ไม่เกิน 1 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
   - ตะกั่ว ไม่เกิน 1 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
   - ทองแดงและสังกะสี ไม่เกิน 10 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
   - เหล็ก ไม่เกิน 10 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม
3. ใสไม่มีตะกอน
4. ไม่มีกรดกำมะถันหรือกรดแร่อิสระอย่างอื่น
5. ไม่ใช้สี
6. ไม่มีการแต่งกลิ่นหรือรส
7. ใช้น้ำสะอาดเป็นส่วนผสม

## 2.3 องค์ประกอบของน้ำส้มสายชู

องค์ประกอบของน้ำส้มสายชูที่ได้จากกระบวนการหมัก ได้แก่ น้ำ กรดอะซิติกและสารอื่น ๆ อีกเล็กน้อย ซึ่งกรดที่ได้จะทำให้น้ำส้มสายชูมีรสเปรี้ยว จึงมีคุณสมบัติในการป้องกันการ เน่าเสียของอาหารและเป็นตัวทำละลายที่ดี พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารกำหนดว่าน้ำส้มสายชูหมักและน้ำส้มสายชูกลั่นต้องมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกไม่น้อยกว่า 4 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ส่วนสารอื่น ๆ ที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยนั้นจะมีความสำคัญในด้านกลิ่นรส ทำให้น้ำส้มสายชูหมักและน้ำส้มสายชูกลั่นมีกลิ่นรสที่ดีกว่าน้ำส้มสายชูเทียม ซึ่งจะขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชู หรืออาจเป็นสารที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูหรือเป็นสารที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากันของวัตถุดิบตั้งต้นกับสารที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก เช่น การทำปฏิกิริยาระหว่างเอทธานอลกับกรดอะซิติกเกิดเป็นเอธิทอะซิเตท ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นรสชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนึ่งในการหมักน้ำส้มสายชู ในกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูโดยวิธีการหมักตามธรรมชาติจะพบสารระเหย 4 ชนิด คือ อะซิตัลดีไฮด์ อะซิตัล เอธิลอะซิเตทและเอทธานอล ส่วนในน้ำส้มสายชูกลั่นจะพบสารระเหยอีก 7 ชนิด สารที่ทำให้น้ำส้มสายชูเกิดกลิ่นรสที่ดี ได้แก่ คาร์บอนิล (carbonyl) แอลกอฮอล์ และเอสเทอร์ (ester)

นอกจากนั้น Yanazida และคณะ (1974) พบว่าในน้ำส้มสายชูยังมีกรดอะมิโนหลายชนิด ได้แก่ อะลานีน กรดแอสปาร์ติก โปรตีน และกรดกลูตามิก รวมทั้ง พบฮีสติดีน (Histidine) อาร์จีนีน (Arginine) และเมทไธโอนีน (Methionine) ในปริมาณเล็กน้อย และความเข้มข้นของกรดอะมิโนจะลดลงเรื่อย ๆ ในระหว่างการหมักเนื่องจากถูกแบคทีเรียนำมาใช้ ดังนั้น Seppi และ Sperando (1980) จึงได้ใช้ประโยชน์จากปริมาณของกรดอะมิโนในน้ำส้มสายชูเป็นดัชนีที่แสดงถึงการปลอมปนน้ำส้มสายชู โดยพบว่าน้ำส้มสายชูที่มีปริมาณกรดอะมิโนต่ำกว่าปกติอาจเกิดจากการเติมกรดน้ำส้มเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของกรดตามมาตรฐานที่กำหนดไว้

## 2.4 วิธีการผลิตน้ำส้มสายชู

### 2.4.1 การผลิตน้ำส้มสายชูแบบช้า (Slow process หรือ surface culture)

ในระบบเปิดทั่ว ๆ ไป จะพบเชื้อน้ำส้มสายชูเจริญเป็นแผ่นฝ้า (film) อยู่บนผิวหน้าของสารละลายแอลกอฮอล์หรือไวน์เพื่อเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก ในสมัยโบราณมีวิธีการผลิตน้ำส้มสายชูโดยเติมไวน์ลงในถังหมัก แล้วให้เกิดการสร้างกรดเองตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นการผลิตแบบรุ่น จึงต้องมีการสร้างแผ่นฝ้าขึ้นใหม่ทุกครั้งทำให้สูญเสียสับเตรทไปโดยไม่มีการสร้างกรดอะซิติก รวมทั้งกระบวนการยังเกิดช้าและมีประสิทธิภาพต่ำ จึงได้มีการปรับปรุงโดยใช้เชื้อน้ำส้มสายชูที่มีประสิทธิภาพดีเป็นกล้าเชื้อ (Inoculum) โดยใช้เชื้อน้ำส้มสายชูที่เกาะกับข้างถังและลอยอยู่ในน้ำส้มสายชูที่เหลืออยู่จากการหมักครั้งก่อนเป็นกล้าเชื้อในการหมักครั้งต่อไป แต่พบว่าวิธีนี้มีเอทธานอลเหลืออยู่ในน้ำส้มสายชูที่ได้เนื่องจากการหมักเกิดไม่สมบูรณ์ ในประเทศไทยส่วนมากผลิตน้ำส้มสายชูวิธีนี้แต่ใช้กล้าเชื้อในรูปของลูกแป้งของเชื้อน้ำส้มสายชูที่เก็บไว้ในรูปแห้ง

ต่อมาจึงมีการปรับปรุงกระบวนการผลิตใหม่ เป็นวิธีการผลิตแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous) เรียกว่า Orleans process โดยใช้ถังไม้ขนาดใหญ่และมีท่อสำหรับเติมไวน์สู่ก้นถัง ทำให้ไม่รบกวนแผ่นฝ้า และอากาศสามารถผ่านเข้าไปในถังได้แล้วปล่อยให้เกิดกรดจนมีปริมาณสูง แล้วปล่อยน้ำส้มสายชูออกทางก้นถัง แล้วเติมไวน์ลงไปใหม่เพื่อผลิตน้ำส้มสายชูต่อไปอีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันการผลิตน้ำส้มสายชูโดยวิธีนี้ไม่นิยมใช้ เนื่องจากต้องใช้ถังจำนวนมากวางไว้ในห้องโล่ง ต่อมาในประเทศญี่ปุ่นได้ปรับปรุงวิธีการผลิตเป็นแบบต่อเนื่อง โดยให้มีการรบกวนแผ่นฟ้าน้อยที่สุดควบคุมอุณหภูมิประมาณ 28-29 องศาเซลเซียส จะสามารถผลิตน้ำส้มสายชูที่มีกรดอะซิติก 5 เปอร์เซ็นต์ได้ 54.1 ลิตรต่อชั่วโมง คือ เกิดกรด 3.24 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน

2.4.2 วิธีการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็ว (quick process)

วิธีการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็วจะมีอัตราการเกิดกรดสูงกว่าวิธีการผลิตน้ำส้มสายชูแบบช้า โดยมีการเพิ่มพื้นที่ของการเจริญ ลดช่วงเวลาของ lag phase และเพิ่มออกซิเจนเพื่อให้เชื้อน้ำส้มสายชูในถังหมักมีกิจกรรมสูงขึ้น ถังหมักที่รู้จักกันแพร่หลาย คือ เจนเนอเรเตอร์ (generator) โดยวิธีนี้จะใช้ถังหมักที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของปากถังเล็กกว่าก้นถัง (flask shape) และมีตัวกลางบรรจุอยู่ภายในถังเพื่อให้เชื้อน้ำส้มสายชูเจริญเป็นแผ่น (film) อยู่บนตัวกลาง ปล่อยให้วัตถุดิบไหลจากด้านบนถังลงสู่ก้นถังและพ่นอากาศเข้าทางก้นถังวิธีการนี้สามารถนำน้ำส้มสายชูที่เกิดกรดไม่สมบูรณ์กลับมาผ่านถังหมักอีก จนเอทธานอลส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก รวมทั้งมีการปรับปรุงการไหลของวัตถุดิบให้กระจายสม่ำเสมอลงบนผิวของตัวกลาง ปรับปรุงการให้อากาศ ควบคุมอุณหภูมิ และการหมักเป็นแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous) ซึ่งเรียกว่า Frings generator

การผลิตน้ำส้มสายชูวิธีนี้จะต้องให้เชื้อน้ำส้มสายชูยึดเกาะกับตัวกลาง ดังนั้นตัวกลางที่ใช้จึงมักจะเป็นวัสดุจำพวกเซลลูโลส ได้แก่ เปลือกไม้ ก้านองุ่น หวาย ซังข้าวโพด ขี้เลื่อย ชานอ้อย ถ่านไม้ กระเบื้อง บางโอกาสจะใช้กากถ่านหิน และในการใช้ generator ผลิตน้ำส้มสายชูเป็นเวลานานเชื้อน้ำส้มสายชูพวก *Acetobacter xylinum* จะสร้างเซลลูโลสทำให้ตัวกลางเกาะกันแน่นและอุดตัน จึงต้องมีการเปลี่ยนตัวกลางใหม่ในการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็วมักใช้ระบบกึ่งต่อเนื่อง จึงต้องเติมเอทธานอลในน้ำส้มสายชูที่ได้เล็กน้อย เพื่อป้องกันการเกิด overoxidation ซึ่งจะเกิดในสภาพที่ไม่มีเอทธานอล โดยเชื้อน้ำส้มสายชูสามารถออกซิไดซ์กรดอะซิติกเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ และการเติมเอทธานอลลงไปเล็กน้อยยังช่วยให้น้ำส้มสายชูมีกลิ่นดีขึ้น เพราะในระหว่างการเก็บน้ำส้มสายชูเอทธานอลจะเปลี่ยนเป็นเอสเตอร์

2.4.3 การผลิตน้ำส้มสายชูแบบสับเมอร์จ (submerged culture)

เป็นวิธีการผลิตน้ำส้มสายชู โดยใช้น้ำส้มสายชูที่เหลืออยู่ในถังประมาณ 1/3 ของถังหมักเป็นกล้าเชื้อแล้วเติมแอลกอฮอล์หรือไวน์ลงไปใหม่ถังหมักที่นิยมใช้ เรียกว่า อะซิเตเตอร์ (acetator) โดยใช้เชื้อน้ำส้มสายชูสายพันธุ์ที่ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็งธรรมดาและสารอาหารที่เรียกว่า อะซิโตไซม์ (acetozyme) ซึ่งใช้ผสมกับเอทธานอลเป็นวัตถุดิบ ถังที่ใช้ในการหมักอาจเป็นไม้หรือสแตนเลส ก้นถังมีระบบการกวน (agitator) และระบบให้อากาศ (aeration) โดยการพ่นฟองให้เกิดเป็นฟองอากาศขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไปในถัง ส่วนการกำจัดฟองจะใช้เครื่องกำจัดฟอง (deformer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยแรงเหวี่ยง (centrifugal force) ติดอยู่ด้านบนของถัง การหมักโดยวิธีนี้จะได้กรดอะซิติกเร็วและมีคุณภาพดี

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตน้ำส้มสายชูโดย generator กับ acetator พบว่า acetator มีอัตราการผลิตสูงกว่า generator ถึง 10 เท่า และมีประสิทธิภาพการเปลี่ยนเอทธานอลเป็นกรดอะซิติกสูงถึง 94 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ generator มีประสิทธิภาพเพียง 85 เปอร์เซ็นต์

## 2.5 ประวัติการศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชู

Ebner และ Enenkel (1978) เสนอวิธีผลิตน้ำส้มสายชูที่มีปริมาณกรดสูงโดยการหมักต่อเนื่อง 2 ขั้นตอน เริ่มด้วยวัตถุดิบที่มีกรดอะซิติก 7-10 เปอร์เซ็นต์ และเอทธานอล 5 เปอร์เซ็นต์ (GK 12-15) เมื่อมีกรดเกิดขึ้น เอทธานอลจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่ง GK เป็น 15 จึงปล่อยลงสู่ถังที่สอง และหมักจนเอทธานอลหมดที่อุณหภูมิ 27-34 องศาเซลเซียส จะได้น้ำส้มสายชูที่มีกรดมากกว่า 15 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

Park, Ohtake และ Toda (1988) ศึกษาการผลิตกรดอะซิติก โดยให้ *Acetobacter aceti* M23 ยึดเกาะบน Hallow Fiber Filter Module โดยมีการให้อากาศที่มีปริมาณออกซิเจนสูงซึ่งออกซิเจนจำเป็นในการผลิตกรดอะซิติก

ในปี 1989, Park และ Ohtake ได้ทำการศึกษาผลของออกซิเจนที่ละลายและความเข้มข้นของกรดอะซิติกต่อการผลิตกรดอะซิติกแบบต่อเนื่องของ *Acetobacter aceti*

ในปี 1990, Park และ Toda ได้พบว่าการเพิ่มสารตัวกลาง คือ กรดอะซิติกใน TCA cycle จะมีผลต่อการผลิตกรดอะซิติกโดย *Acetobacter acti* M23 ทั้งในการหมักแบบรุ่นและการหมักแบบต่อเนื่อง

## 2.6 การพัฒนาการหมักน้ำส้มสายชู

กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูสามารถผลิตได้หลายวิธี วิธีที่เป็นดั้งเดิมนั้นเป็นวิธีที่เรียกว่า " ปล่อยทิ้งเฉยๆ " การผลิตทำการบรรจุแอลกอฮอล์ลงในถังหมักประมาณค่อนถังแล้วทิ้งให้เกิดการสร้างกรดเองโดยให้มีการถ่ายเทอากาศได้สะดวก การเจริญของจุลินทรีย์ *Acetobacter sp.* ในแอลกอฮอล์ สังเกตได้จากฝ้าขาวหรือฟิล์มบนผิวหน้าของแอลกอฮอล์ กระบวนการนี้ทำเป็นแบบที่ทำได้ทีละครั้ง คือ เมื่อหมักแอลกอฮอล์ให้ได้กรดอะซิติกจนมีความเข้มข้นที่ต้องการแล้วก็จะต้องหยุดทำการล้างถังหมักแล้วค่อยบรรจุแอลกอฮอล์เพื่อเริ่มหมักใหม่อีก ดังนั้นจุลินทรีย์จะเริ่มสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟิล์มทุกครั้งที่ทำการหมัก ซึ่งเชื้อต้องใช้สารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและสร้างฟิล์มและใช้เวลามาก นอกจากนี้การทำเช่นนี้มีโอกาสปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการมากและไม่ค่อยมีประสิทธิภาพมาก

ได้มีการปรับปรุงแก้ไขระบบการหมักให้มีประสิทธิภาพในการผลิตมีการพัฒนาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้ได้สายพันธุ์ที่สร้างกรดได้มากและยังสามารถทนกรดในปริมาณสูงได้ นอกจากนี้ในทางกระบวนการผลิตที่เรียกว่า กระบวนการโอลีน (Orlean process) โดยใช้หลักการทำการหมักให้ได้กรดในระดับที่ต้องการ แล้วทำการถ่ายน้ำส้มสายชูออกไปบางส่วนก่อนที่จะเติมแอลกอฮอล์เพิ่มโดยไม่ให้มีการกระเทือนฟิล์มที่ลอยอยู่บนผิวหน้า

การผลิตแบบโอลีนก็ยังช้าอยู่ เนื่องจากพื้นผิวหน้าของแอลกอฮอล์ที่มีเชื้อ *Acetobacter sp.* สัมผัสกับอากาศมีอยู่อย่างจำกัดจึงได้พัฒนาระบบเพื่อเริ่มการสัมผัสนั้นโดยการนำเอาวัสดุซึ่งเชื้อ *Acetobacter sp.* สามารถเกาะอยู่ เช่น เศษไม้องุ่น ซังข้าวโพด หรือขี้กบจากเศษไม้ต่างๆ มาใส่ลงในถังหมักอย่างหลวมๆให้อากาศสามารถผ่านได้ เมื่อจุลินทรีย์ *Acetobacter sp.* เกาะอยู่บนวัสดุที่เป็นเศษไม้แล้วค่อยๆเทแอลกอฮอล์ผ่านลงบนเศษไม้ที่มีจุลินทรีย์เกาะแอลกอฮอล์ที่เทลงไปจะไหลผ่านไปบนเศษไม้ที่มีจุลินทรีย์เกาะอยู่ จุลินทรีย์ใช้แอลกอฮอล์และเปลี่ยนให้เป็นกรดอะซิติก วิธีนี้เรียกว่า "Quick vinegar process" ซึ่งได้มีการเริ่มใช้มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1830 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ในลักษณะแบบกึ่งต่อเนื่อง ทำให้ได้น้ำส้มสายชูในปริมาณมากขึ้น และใช้เวลาในการผลิตที่น้อยลง

ในปัจจุบันการผลิตน้ำส้มสายชูทำในถังหมักแบบที่ให้เชื้อจุลินทรีย์ผสมรวมอยู่กับอาหาร (แอลกอฮอล์) การผลิตวิธีนี้สามารถผลิตน้ำส้มสายชูในปริมาณ 750-1200 ลิตรต่อวัน การผลิตทำในถังสแตนเลส (Stainless fermenter) ที่มีใบพัดหมักโดยใส่แอลกอฮอล์และสารอาหารที่ให้เชื้อ *Acetobacter sp.* สามารถเจริญพร้อมทั้งปรับสภาพกรดด่างให้เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักจะทำการให้อากาศและใช้ใบพัดกวนเพื่อให้อากาศกระจายไปทั่ว การทำเช่นนี้จะทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายในแอลกอฮอล์ได้มากและทั่วถึง ทำให้จุลินทรีย์สามารถสร้างกรดได้ทุกจุดในถังหมัก การผลิตจึงดำเนินไปอย่างรวดเร็วและสามารถผลิตได้ในปริมาณมากๆด้วย โดยทั่วไปจะใช้วิธีผลิตแบบนี้กับการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (สุเมธ, 2536)

ปัญหาของการผลิตมักเกิดจากระบบควบคุมอัตโนมัติ (Adams, 1958) ได้แก่การขัดข้องของระบบควบคุมอุณหภูมิ การให้อากาศ และการกวน เป็นต้น การขัดข้องของระบบให้อากาศมีผลรุนแรงมาก ส่วนปัญหาของการผลิตที่เคยพบในประเทศไทยได้แก่ มีการขัดข้องทางกระแสไฟฟ้าทำให้ระบบควบคุมอัตโนมัติหยุดการทำงานในช่วงเวลาเพียง 5 นาที เชื้อน้ำส้มสายชูในถังหมักตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลงอย่างรวดเร็วและไม่สามารถดำเนินการผลิตต่อไปได้ซึ่งต้องปรับปรุงให้มีระบบไฟฟ้าสำรองซึ่งจะทำงานทันทีโดยอัตโนมัติเมื่อเกิดการขัดข้องทางกระแสไฟฟ้า

การเปรียบเทียบปัจจัยต่างๆ ในการผลิตน้ำส้มสายชูโดยเจนเนอเรเตอร์และอะซิเตเตอร์พบว่าอะซิเตเตอร์มีอัตราการผลิตสูงกว่าถึง 10 เท่า ประสิทธิภาพการเปลี่ยนเอทธานอลเป็นกรดอะซิติกสูงถึง 94 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เจนเนอเรเตอร์มีประสิทธิภาพเพียง 85 เปอร์เซ็นต์ (conner and Allgeier, 1976) วิธีการใช้และควบคุมการหมักของอะซิเตเตอร์ง่ายและเหมาะสมต่อระบบโรงงานเนื่องจากต้องการคนงานและพื้นที่น้อยกว่าเจนเนอเรเตอร์ครึ่งหนึ่ง แต่ข้อเสียเปรียบของอะซิเตเตอร์คือ ต้นทุนการผลิตสูงเนื่องจากต้องใช้พลังงานสูงเมื่อมีการขัดข้องเกี่ยวกับระบบควบคุมอัตโนมัติจะได้รับความเสียหายสูงมากและน้ำส้มสายชูที่ผลิตโดยอะซิเตเตอร์ขุ่นมากจึงต้องมีขั้นตอนการทำให้ใสที่ดี (Ebner *et. al*, 1967;Adams, 1985)

## 2.7 ขั้นตอนการหมักน้ำส้มสายชู

กรดซึ่งทำให้เกิดรสเปรี้ยวในน้ำส้มสายชูได้แก่ กรดอะซิติก ผลิตโดยกระบวนการหมัก 2 ขั้นตอน คือ ขั้นที่ 1 น้ำตาลในวัสดุหมักจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทธานอลโดยการกระทำของยีสต์สายพันธุ์ทั่วไป คือ *Saccharomyces cerevisiae* และขั้นที่ 2 แบคทีเรียในจีนัส Acetobacter จะออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก

วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูสามารถใช้ได้หลายชนิด กรณีที่สับสเตรทมีปริมาณน้ำตาลน้อยอาจจะต้องมีการเติมหรือทำให้เข้มข้นขึ้น เช่น น้ำสกัดจากผลไม้ต่างๆ หรือถ้าสับสเตรทมีปริมาณน้ำตาลสูงมาก เช่น โมลาส (molasses) อาจจะต้องมีการเจือจางลงให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมเพื่อหมักให้ได้เอทธานอลในปริมาณที่ต้องการ แต่ถ้าสับสเตรทเป็นพวกแป้ง เช่น ธัญพืชต่างๆ จะต้องมีการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของน้ำตาลก่อนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ หรือไฮโดรไลซ์ด้วยกรด โดยทั่วไปมักจะปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นให้อยู่ประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และอาจจะมีการปรับพีเอช (pH)ให้ค่อนข้างเป็นกรด คือ ประมาณ 4.5 แล้วปล่อยให้การหมักเกิดขึ้นโดยยีสต์ และมักควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 30 องศาเซลเซียส การหมักจะเสร็จสมบูรณ์ใช้เวลาประมาณ 48-72 ชั่วโมง จึงจะได้แอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำการหมักต่อไปโดยเชื้อน้ำส้มสายชู กรณีที่เป็นน้ำส้มสายชูกลั่นสับสเตรทที่ใช้เป็นแอลกอฮอล์เจือจางอาจจะต้องมีการเติมสารบางอย่างเพื่อเร่งการเจริญ และเนื่องจากเชื้อน้ำส้มสายชูต้องใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก ดังนั้นประสิทธิภาพของการให้อากาศจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการหมักน้ำส้มสายชูด้วยวิธีการต่างๆ (Adams, 1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.8 แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอะซิติกจากเอทธานอล

ปี ค.ศ. 1974 De Ley and Frateur ได้รายงานว่าแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติก (acetic acid bacteria) จะมีรูปร่างลักษณะเซลล์กลม รี จนถึงเป็นท่อน การเรียงตัวของเซลล์มีทั้งอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่และเรียงตัวเป็นสายทั้งแบบสายสั้น ๆ และสายยาว แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ (spacies) และไม่พบเอนโดสปอร์ (endospore) ในแบคทีเรียชนิดนี้ การย้อมสีแกรมพบว่าติดสีแกรมลบแต่เมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้นอาจติดสีเปลี่ยนไปบ้าง (gram variable) แบคทีเรียที่ผลิต กรดอะซิติกมีลักษณะที่สำคัญ คือ ต้องการออกซิเจนในการออกซิไดซ์เอธานอลให้เป็นกรดอะซิติก และสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดอะซิติกตั้งแต่ 2-11 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติกแบ่งออกได้เป็น 2 สกุล คือ *Acetobacter sp.* และ *Gluconobacter sp.* ซึ่งแต่เดิมเรียก *Acetomonas* แบคทีเรียทั้งสองสกุลนี้มีคุณสมบัติเหมือนกันหลายประการ และมักพบอยู่ปะปนกันในถังหมักน้ำส้มสายชูตามธรรมชาติ แต่แบคทีเรียสกุล *Gluconobacter sp.* จะเจริญได้ในอาหารที่มีปริมาณเอทธานอลต่ำ ๆ และมีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์เอทธานอลเป็นกรดอะซิติกค่อนข้างต่ำ (Gibbs and Shapton 1996; Asai 1968) ส่วนแบคทีเรียสกุล *Acetobacter sp.* ก็จะมีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์เอทธานอลเป็นกรดอะซิติกได้ต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ดังนั้นในการผลิตน้ำส้มสายชูจึงต้องเลือกใช้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์เอทธานอลได้สูงกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

## 2.9 แหล่งที่พบและคุณสมบัติที่ใช้ในการแยกเชื้อ Acetobacter sp.

### 2.9.1 แหล่งที่พบ *Acetobacter sp.*

แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถพบได้ในผักชนิดต่าง ๆ น้ำผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว น้ำส้มสายชู เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์และผิวของพืชต่าง ๆ โดยเฉพาะที่ดอกและผล (De ley and Frateur, 1974) แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นสาเหตุให้ผักเกิดการเน่าเสียต่อเนื่องจากยีสต์ได้ ในสภาวะที่มีอากาศและเป็นตัวการในการเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก

สำหรับในประเทศไทยนั้น นภา (2519) และนันทพร (2517) ได้รายงานว่าพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในน้ำตาลสด น้ำตาลปึบ น้ำตาลเมา กระแช่ ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้าและเหล้าขาว ซึ่งจะเจริญเป็นแผ่นฟิมล์บาง ๆ บนผิวหน้าของสารละลายที่มีแอลกอฮอล์ และเชื้อน้ำส้มสายชูบางชนิดสามารถสร้างเซลลูโลสได้ จะมีลักษณะเป็นแผ่นหนาเจริญร่วมกับยีสต์ในน้ำชาที่เติมน้ำตาลซึ่งเรียกว่า เห็ดรัสเซีย (tea fungus) เพราะมีลักษณะคล้ายดอกเห็ด (Hesseltine, 1965)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.9.2 คุณสมบัติที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียสกุล *Acetobacter sp.***

โดยทั่ว ๆ ไปจะพบแบคทีเรียสกุล *Acetobacter sp* .และ *Gluconobacter sp.* อยู่ปะปนกัน ดังนั้นในการแยก *Acetobacter sp.* ออกจาก *Gluconobacter sp.* จะอาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันของแบคทีเรียสองสกุลนี้ ในทางปฏิบัติจะใช้คุณสมบัติในการออกซิไดซ์กรดอะซิติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (Norris and Riobbons, 1970) เรียกคุณสมบัตินี้ว่า overoxidation ในสภาวะที่ขาดเอทธานอล *Acetobacter sp.* จะสามารถออกซิไดซ์กรดอะซิติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ *Gluconobacter sp.* จะไม่มีคุณสมบัตินี้ นอกจากนี้อาจใช้คุณสมบัติในการออกซิไดซ์แลกเตท (lactate) เป็นคาร์บอนไดออกไซด์โดยแบคทีเรียสกุล *Acetobacter sp.* (Cirigliano, 1982) จึงอาจเรียก *Acetobacter sp.* ว่าเป็นแล็กตาไฟล์ (Lactaphile)

**2.10 คุณสมบัติทั่วไปของ Acetobacter sp.**

เซลล์ของ *Acetobacter sp.* มีหลายลักษณะ (pleomorphic) ปกติพบรูปร่างค่อนข้างรีจนกระทั่งเป็นท่อนชัดเจน ขนาดกว้างประมาณ 0.6-0.8 ไมครอน ยาวประมาณ 1.0-3.0 ไมครอนอาจพบเซลล์เดี่ยวๆจับเป็นคู่หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ บางครั้งพบเซลล์ที่มีรูปร่างแปลกไปจากที่กล่าวมาแล้ว เช่น รูปร่างกลม ยืดยาวออก บวมหรือรูปกระบอก บางชนิดมีแฟล็กเจลลาแบบรอบเซลล์(peritrichous flagella) ทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้ (De Ley and Frateur, 1974) นอกจากนั้นมีรายงานว่าเซลล์ที่มีอายุน้อยของ *A. peroxydans* สามารถเคลื่อนที่ได้ แต่ไม่พบการเคลื่อนที่เมื่อเซลล์มีอายุมาก แสดงว่าอายุของเซลล์มีผลต่อการเคลื่อนที่และการสร้างแฟล็กเจลลา ส่วน *Acetobacter sp.* บางชนิดไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เช่น *A. xylinum* (Rao, 1957)

จากรายงานพบว่ามีอยู่หลาย species ที่สามารถสร้างแคปซูลได้ เช่น *A. turbidans*, *A. viscosum* และ *A. capsulatum* (Rao, 1957)

เมื่อย้อมสีพบว่าเซลล์ของ *Acetobacter sp.* ในระยะแรกของการเจริญติดสี Gram negativeเมื่ออายุมากขึ้นจะติดสี Gram variable ไม่พบการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุ แต่เมื่อเซลล์อยู่รวมกันมากๆ อาจมีสีชมพู เนื่องจากอิทธิพลของพอร์ไฟรินส์ (porphyrins) และบางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล (De Ley and Frateur, 1974)

*Acetobacter sp.* เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการดำรงชีวิต (obligate aerrobes) เนื่องจากไม่สามารถใช้สารอื่นนอกจากออกซิเจนเป็นตัวรับไฮโดรเจนตัวสุดท้ายในขบวนการเปลี่ยนอาหารเป็นพลังงาน (De Ley and Frateur, 1974) จึงมักพบว่าในถังหมักน้ำส้มสายชูซึ่งไม่มีการพ่นอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อน้ำส้มสายชูจะเจริญอยู่ที่ผิวหน้ามองเห็นเป็นแผ่นฝ้า (film) (Adams, 1980; Conner and Allgeier, 1976)

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของ *Acetobacter sp.* จะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ซึ่งเชื้อส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 15-34 องศาเซลเซียส *Acetobacter sp.* ชอบ pH ค่อนข้างต่ำพบว่าเจริญได้ที่ pH 4.0-4.5 และเจริญได้ดีที่ pH 5.4-6.3 ในระดับ pH 7-8 จะเจริญได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (De Ley and Frateur, 1974)

## 2.11 สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเจริญของ Acetobacter sp.

อาหาร : ความต้องการสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญของ *Acetobacter sp.* จะแตกต่างกันแต่ละสายพันธุ์

- แหล่งคาร์บอน : Conner and Allgeier (1976) รายงานว่า *Acetobacter aceti* สามารถใช้กลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ โดยสามารถเปลี่ยนกลูโคสเป็นกลูโคเนท (gluconate) ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ได้แก่ แมนนิทอล ฟรุกโตส แมนโนส กาแล็กโตส ไซโลส กลีเซอรอล อิริธริตอล โซเดียมแล็กเตท เอทธานอล และโซเดียมอะซิเตท

- แหล่งไนโตรเจน : แหล่งไนโตรเจนที่ดีของแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติกได้มาจากกรดอะมิโนต่าง ๆ พวก วาลีน (Valine) ไอโซลูซีน (Isoleucine) อะลานีน (Alanine) ซีสติน (Cystine) โปรลีน (Proline) แอสปาร์เตท (Aspartate) รวมทั้งสารอาหารพวกสารที่สกัดจากยีสต์ (Yeast extract) น้ำที่ใช้เลี้ยงยีสต์ (Yeast water) สารสกัดจากข้าวมอลล์ (Malt extract) หรือน้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor) และบางสายพันธุ์ยังสามารถใช้เกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดี

- วิตามิน : Rao (1957) รายงานว่า *Acetobacter suboxydans* 621, *A. aceti* และ *A. pasteurianus* ต้องการ PABA (p-aminobenzoic acid) กรดนิโคตินิก (nicotinic acid) และกรดแพนโตธีนิก (pantothenic acid) เป็นสารช่วยในการเจริญ ส่วน *A. melanogenus* และ *A. rancens* ต้องการไธอามีน (thiamine) และพบว่าเชื้อน้ำส้มสายชูสามารถใช้พาราอะมิโนฟีนิลอะลานีน (p-aminophenylalanine) แทน PABA

อากาศ : *Acetobacter sp.* เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการดำรงชีวิต (obligate aerobes) เนื่องจากใช้ออกซิเจนเป็นตัวสุดท้ายในการรับไฮโดรเจนในกระบวนการเปลี่ยนอาหารเป็นพลังงาน ดังนั้นในถังหมักน้ำส้มสายชูที่ไม่มีอากาศจะพบเชื้อน้ำส้มสายชูเจริญอยู่ที่ผิวหน้าอาหารเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ : *Acetobacter sp.*จะเจริญได้ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันขึ้นอยู่แต่ละสายพันธุ์ ซึ่งส่วนใหญ่เชื้อน้ำส้มสายชูจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 15-34 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิประมาณ 12-15 องศาเซลเซียสเชื้อจะมีการเจริญที่ช้าลง ส่วนที่อุณหภูมิสูงประมาณ 42-45 องศาเซลเซียส เชื้ออาจเจริญได้ดี แต่จะมีความสามารถในการเปลี่ยนเอธานอล เป็นกรดอะซิติกได้น้อยลง

ความเป็นกรดด่าง : *Acetobacter sp.*ชอบค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ค่อนข้างต่ำเชื้อจะเจริญได้ดีที่ pH 4.0-4.5 และเจริญได้ดีที่ pH 5.4-6.3 ส่วนที่ระดับ pH 7-8 เชื้อจะเจริญได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

## 2.12 การออกซิไดซ์เอทธานอลเป็นกรดอะซิติก

Conner and Allgeier (1976) ได้สรุปรายงานเกี่ยวกับปฏิกิริยาการเปลี่ยนเอทธานอลเป็นกรดอะซิติกดังนี้

ขั้นที่ 1 เกิดการออกซิไดซ์เอทธานอลเป็นอะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) โดยใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ดังสมการที่ 1

$$CH_3CH_2OH + O \longrightarrow CH_3CHO + H_2O \qquad (1)$$

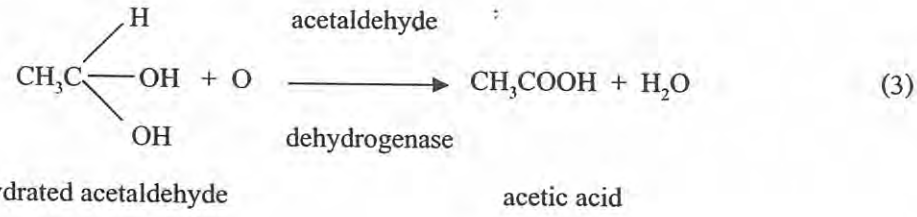
Ethanol acetaldehyde

ขั้นที่ 2 เป็นการสร้างกรดอะซิติกจากอะซิตัลดีไฮด์ ปฏิกิริยาแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกอะซิตัลดีไฮด์รวมกับน้ำเป็นไฮเดรต อะซิตัลดีไฮด์ (hydrated acetaldehyde) ดังสมการที่ 2 จากนั้นปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2 ไฮเดรต อะซิตัลดีไฮด์ถูกออกซิไดซ์หรือดีไฮโดรจีเนส(dehydrogenase) เป็นกรดอะซิติกโดยเอนไซม์อะซิตัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (Acetaldehyde dehydrogenase) ทำให้โปรตอน (proton) 2 ตัวของไฮเดรต อะซิตัลดีไฮด์ ถูกส่งผ่านไปสู่อะตอมของออกซิเจน ดังสมการที่ 3

$$CH_3CHO + H_2O \longrightarrow CH_3C(H)(OH)(OH) \qquad (2)$$

Acetaldehyde hydrated acetaldehyde

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

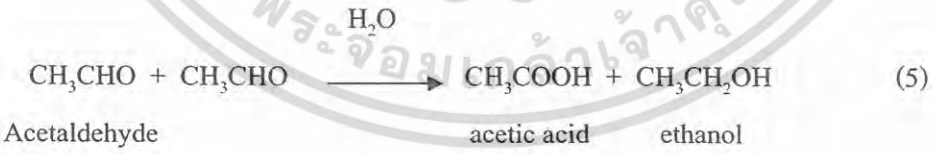



(3)

เมื่อเติมแคลเซียมซัลไฟต์ (calcium sulfite) หรือแคลเซียมไบซัลไฟต์ (calcium bisulfite) ซึ่งสามารถจับกับสารอัลดีไฮด์ได้ดังสมการที่ 4 ลงในถังหมักน้ำส้มสายชู ตรวจพบว่าไม่มีกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นเป็นการยืนยันว่าอะซิตัลดีไฮด์ที่สร้างมาตามสมการที่ 1 เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในการเกิดกรดอะซิติก

(4)

อะซิตัลดีไฮด์อาจเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกได้อีกแนวทางหนึ่งโดยอะซิตัลดีไฮด์สองโมเลกุลจากสมการที่ 1 ทำปฏิกิริยากันเองได้กรดอะซิติกและเอทธานอลดังสมการที่ 5 ซึ่งปฏิกิริยานี้เรียกว่าปฏิกิริยาแคนนิซซาโร (cannizaro reaction) ส่วนเอทธานอลที่เกิดขึ้นจะเข้าสู่สมการที่ 1 อีกเป็นวัฏจักรจนกระทั่งกลายเป็นกรดอะซิติกทั้งหมด ในทางทฤษฎีพบว่า เอทธานอล 1 กรัม สามารถเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกได้ 1.31 กรัม (Adams, 1985)




(5)

**2.13 การเปลี่ยนแปลงของเชื้อ Acetobacter ในระหว่างการหมักเพื่อผลิตน้ำส้มสายชู**

ในระหว่างการหมักเพื่อผลิตน้ำส้มสายชูจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ Acetobacter ที่ใช้ ทั้งนี้เนื่องจากผลของการเปลี่ยนแปลงปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการหมักนั่นเอง ผลของการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวแบ่งออกได้ดังนี้ (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ผลของการขาดออกซิเจน (effect of lack in oxygen supply)

การหมักเพื่อผลิตน้ำส้มสายชูนี้เป็นการหมักในสภาพที่ต้องการอากาศ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการให้อากาศ (aeration) อย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตาม ถ้าการให้อากาศเกิดขัดข้องขึ้นมาในระหว่างการหมักจะเกิดผลกระทบต่อเชื้อ Acetobacter อย่างมากเพราะเชื้อนี้จะถูกทำลายลงอย่างรวดเร็ว

ผลของการทำลายเซลล์ Acetobacter ในระหว่างการขาดออกซิเจนนี้ยังเกี่ยวข้องกับปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในการหมักอีกด้วยได้แก่ ความเข้มข้นทั้งหมดของกรดอะซิติกและแอลกอฮอล์ในน้ำหมัก (total concentration) ความเข้มข้นของกรดอะซิติก (acetic acid concentration) อัตราเร็วของการหมัก (fermentation rate) เป็นต้น นอกจากนี้ยังรวมถึงระยะเวลาที่ขาดออกซิเจนอีกด้วย

สำหรับสาเหตุที่ทำให้เซลล์ Acetobacter ถูกทำลายไปเมื่อมีการขาดออกซิเจนนั้น ได้มีสมมุติฐานที่อธิบายถึงสาเหตุที่เกิดขึ้นหลายประการ จนกระทั่ง Meyrath (1973) ได้ตั้งสมมุติฐานขึ้นว่า ตามปกติแล้วเซลล์ Acetobacter จะมีเอนไซม์อไพเรส (apyrase enzyme) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลาย ATP (ซึ่งเป็นแหล่งสะสมพลังงาน และมีการสะสมในระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก) อย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้เหลือ ATP สำหรับกิจกรรมของเมทาบอลิซึมอื่น ๆ ของเซลล์ในระดับต่ำ ดังนั้นในเมื่อการให้อากาศหยุดชะงักจึงทำให้ ATP ในแหล่งเก็บพลังงานที่เรียกว่า ATP Pool สูญหายไปอย่างรวดเร็วซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเซลล์ทันที ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ Acetobacter นี้ไม่สามารถทนต่อสภาพการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้

2. ผลของการขาดแอลกอฮอล์ (effect of lack in alcohol)

เชื้อ Acetobacter จะถูกทำลายลงไปเมื่อการหมักเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จนกระทั่งปริมาณแอลกอฮอล์ (เอทธานอล : $C_2H_5OH$) ในน้ำหมักถูกเปลี่ยนไป (ออกซิไดซ์) จนหมดและในขณะเดียวกันมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบลงไปในน้ำหมักนั้นช้าจนเกินไป ผลของการทำลายเซลล์ Acetobacter ซึ่งเนื่องมาจากการขาดแอลกอฮอล์นี้เกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของกรดอะซิติกและแอลกอฮอล์ทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำหมัก และระยะเวลาที่ขาดแอลกอฮอล์โดยผลที่เกิดขึ้นมีลักษณะเช่นเดียวกับกรณีการขาดออกซิเจน

3. ผลของอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง (effect of changes in temperature)

การหมักเกิดขึ้นอย่างปกติ เมื่อควบคุมอุณหภูมิให้เปลี่ยนแปลงระหว่าง 32 และ 26 องศาเซลเซียส ทุก ๆ 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามปกติแล้วมักควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการหมักไม่ให้สูงเกินไปด้วยระบบหล่อเย็น (cooling system) แต่ถ้าระบบหล่อเย็นเกิดขัดข้องจะทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น จนกระทั่งจะทำลายเซลล์ Acetobacter ได้ ซึ่งในที่สุดจะทำให้การหมักหยุดลง

นอกจากปัจจัยที่กล่าวมาแล้วนี้ในบางครั้งการทำลายเซลล์ Acetobacter อาจจะเกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญเติบโตที่จำเพาะ (specific growth rate) ของเชื้อและความเข้มข้นของกรดอะซิติกกับแอลกอฮอล์ที่มีอยู่ในน้ำหมักอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ผลจากการขาดออกซิเจน การขาดแอลกอฮอล์ และอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงเป็นปัจจัยหลักที่เราต้องคำนึงถึงก่อนเสมอ

## 2.14 เครื่องวัด pH

pH คือ ค่าที่ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จำเป็นต้องวัด เนื่องจากปฏิกิริยาทางเคมีจำนวนมากขึ้นอยู่กับค่าของความเป็นกรด-ด่าง หรือ pH กล่าวคือ (http://www.mst.or.th/MsWord/upd20021.doc)

- ความเร็ว (speed) หรืออัตรา (rate) ของการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีอาจเปลี่ยนแปลงได้โดยการเปลี่ยนค่า pH ของสารละลาย
- คุณภาพของการถูกทำละลายของสารเคมีในตัวทำละลาย และจะขึ้นอยู่กับค่าของ pH
- Physiological Chemistry ของสิ่งมีชีวิต (living organism) โดยปกติจะต้องอยู่ภายในสภาวะของ pH ที่เป็นค่าเฉพาะจึงต้องมีการตรวจวัด pH

pH ได้มาจากการเอาตัวอักษร p ที่มีความหมายว่า power และ H ที่เป็นสัญลักษณ์ของไฮโดรเจนมารวมกัน

pH ก็คือ ค่า negative log of activity of hydrogen ions

$$\therefore \quad pH = -\log_{10} a_{H^+}$$

pH คือ ค่าที่แสดงถึง activity ของ hydrogen ions ในสารละลายที่อุณหภูมิใดอุณหภูมิหนึ่ง

คนส่วนใหญ่มักจะคุ้นเคยกับการวัด pH โดยใช้กระดาษลิตมัส (litmus paper) ซึ่งเป็นการวัด pH แบบหยาบ ๆ หากต้องการวัด pH ให้ได้ผลที่น่าเชื่อถือจะเป็นการวัดด้วยวิธีทางไฟฟ้า คือ วัดด้วย Potentiometric electrode ซึ่งจะเป็นการวัดปริมาณของแรงดันไฟฟ้า (voltage) ที่เกิดขึ้นเนื่องจากความเข้มข้นที่ต่างกันของ hydrogen ions ในสารละลาย

นอกจากนี้ pH electrode ยังมีส่วนที่ดีอยู่หลายประการ คือ

- wide linear range
- good precision
- ไม่มีผลกระทบเนื่องจากสีหรือความขุ่นของตัวอย่างวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96955

- ราคาไม่แพง
- มีการตอบสนองที่รวดเร็ว (fast response)
- วัดค่าที่เป็นปัจจุบัน
- วัดได้ ณ ที่ใช้งาน

ระบบที่ทำให้เกิด Potential หรือ Voltage ที่เป็นระบบของการวัด pH จะเรียกว่า electochemical measurement system ซึ่งจะประกอบด้วย reference electrode , sensing electrode และ voltmeter

ในปัจจุบัน pH electrode ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย reference electrodes และ sensing electrode รวมอยู่เป็นชิ้นเดียวกัน การใช้ electrode แยกชิ้นอาจมีอยู่บ้าง โดยเฉพาะงานวัดที่ต้องการความแม่นยำสูงเช่นงานวิจัยเป็นต้น

โดยทั่วไป pH combination electrode จะมีใช้อยู่ 3 ชนิด คือ calomal electrode , silver chloride electrode , และ Solid –state electrode

Calomel electrode

เป็น pH combination electrode ที่สามารถ refill สารละลายใน electrode ได้และโดยที่ refill solution มีปฏิกิริยาต่อตัวอย่างที่วัดน้อย จึงอาจเหมาะสมกับตัวอย่างบางชนิด อย่างไรก็ตาม electrode ชนิดนี้จะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และมี drift ค่อนข้างสูง

Silver chloride electrode

เป็น pH combination electrode ที่ไม่สามารถ refill ได้ เพราะปิดสนิท ภายในบรรจุด้วย silver chloride ที่มีลักษณะเป็น gel ส่วนดีของ electrode ชนิดนี้คือ

- ใช้งานได้ทนทาน
- ราคาไม่แพง
- ใช้งานง่าย
- แต่อายุการใช้งานค่อนข้างสั้น

Solid-state electrode

เป็น pH combination electrode ที่ออกแบบสร้างขึ้นโดยอาศัยคุณสมบัติทางไฟฟ้า-อิเล็คทรอนิคส์มีความแม่นในการวัดดี และใช้งานได้สดวก-ทนทาน ราคาพอสมควร

สมการการคำนวณค่า pH ของเครื่องวัด pH และตัวแปรที่มีผลกระทบต่อการวัด จากทฤษฎีของ Nernst ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสมการของ Nernst ที่เป็นความสัมพันธ์ที่วัดได้จาก electrode คือ

$$E = \frac{E_0 + 2.303RT \log A_H^+}{nF}$$

เมื่อ $E$ = electrode Potential

$E_0$ = Standard Potential of the electrode

$R$ = gas constant ($8.314\ JK^{-1}mol^{-1}$)

$T$ = temperature (Kelvin)

$n$ = valence (n=1 for hydrogen ions)

$F$ = Faraday constant

$A_H^+$ = activity of hydrogen ions

ซึ่ง pH meter ที่ใช้อยู่จะคำควณค่า pH ด้วยสมการนี้ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาสมการจะเห็นได้ว่า

- Potential E จะวัดได้ด้วยelectrode
- Standard potential $E_0$ จะหาได้โดยการสอบเทียบกับ Solution ที่เป็นกลาง (pH 7)
- อุณหภูมิมีความสัมพันธ์ที่สำคัญกับค่า pH ที่วัดได้จึงต้องวัดอุณหภูมิด้วย และต้องรายงานพร้อมค่า pH
- Slope ของสมการจะสามารถหาได้โดยการสอบเทียบกับ Solution ที่รู้ค่าความเข้มข้นตั้งแต่ 2 ค่าขึ้นไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการ

## 3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อน ได้รับจาก บริษัท แอกโกรออน (ประเทศไทย) จำกัด อ. สามชุก จ. สุพรรณบุรี

## 3.2 เชื้อจุลินทรีย์

3.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* M30 ได้จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2.2 *Acetobacter sp.* สป.5 ได้จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## 3.3 สารเคมี

| | ชื่อสารเคมี | บริษัทหรือประเทศที่ผลิต |
|---|---|---|
| 3.1.1 | กรดอะซิติก ($CH_3COOH$) | Merck Co.,Ltd |
| 3.1.2 | โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) | Merck Co.,Ltd |
| 3.3.3 | แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) | Merck Co.,Ltd |
| 3.3.4 | แอมโมเนียม $((NH_4))_2SO_4$) | Merck Co.,Ltd |
| 3.3.5 | โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) | Merck Co.,Ltd |
| 3.3.6 | โพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท ($KHC_8H_4O_4$) | Merck Co.,Ltd |
| 3.3.7 | แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) | Merck Co.,Ltd |
| 3.3.8 | แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ | โรงงานสุรา องค์การสุรา กรมสรรพสามิต |
| 3.3.9 | Phenolphthalein | Riedel-desaen |
| 3.3.10 | Diatomaceous earth | Eagle/Ticher minerals, inc. |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

203619



**3.4 สารอาหาร**

| ชื่อสารอาหาร | บริษัทหรือประเทศที่ผลิต |
|---|---|
| 3.4.1 กลูโคส | Merck Co.,Ltd |
| 3.4.2 น้ำตาลทราย | มิตรผล |
| 3.4.3 Yeast extract | HIMEDIA |
| 3.4.4 Malt extract | HIMEDIA |
| 3.4.5 Peptone | Merck Co.,Ltd |
| 3.4.6 Agar | S.P. SCIENCE |

**3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ**

3.5.1 อาหาร Glucose Yeast Extract Broth (GYE Broth)

3.5.2 อาหาร Glocose Yeast Extract Agar (GYE Agar)

3.5.3 อาหาร MY Broth

3.5.4 อาหาร MY Agar

**3.6 เครื่องมือและอุปกรณ์**

| ชื่ออาหาร | รุ่น | บริษัทหรือประเทศที่ผลิต |
|---|---|---|
| 3.6.1 Peristaltic pump | Watson-Marlow, 302S | England |
| 3.6.2 เครื่องปั๊มอากาศ (Air pump) | Ladybird, 4000 | Thailand |
| 3.6.3 ถังหมักน้ำส้มสายชูสแตนเลส | | Thailand |
| 3.6.4 สายยางซิลิโคน | | Thailand |
| 3.6.5 ตัวกรองอากาศ (Membrane filter) | Satorius | Germany |
| 3.6.6 เครื่องชั่ง | OHAUS, 4120 | Switzerland |
| 3.6.7 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ | Tomy, SS-245 | Japan |
| 3.6.8 Shaker | Gerhardt Bonn | Germany |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

| ชื่ออาหาร | รุ่น | บริษัทหรือประเทศที่ผลิต |
|---|---|---|
| 3.6.9 PH Meter | Jenway, 3510 | England |
| 3.6.10 Ebuliometer | ARCUEUEIL, 94117 | France |
| 3.6.11 Hand refractometer | ATAGO, N-1E | Japan |
| 3.6.12 ใยพลาสติก | | Thailand |
| 3.6.13 ตู้ปลอดเชื้อ | | Thailand |
| 3.6.14 ถังพลาสติก | | Thailand |

**3.7 สถานที่ดำเนินงาน**

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

**3.8 วิธีการดำเนินงาน**

**3.8.1 การคงสภาพเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ในสภาพไม่สร้างเจลเพื่อการหมักน้ำส้มสายชู**

3.8.1.1 เตรียมกล้าเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 โดยเขี่ยเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter sp.* สป.5 ที่เลี้ยงบนอาหาร GYE Agar ( ประกอบด้วย กลูโคส 10% ยีสต์สกัด 1% วุ้น 2% และ $CaCO_3$ 2% ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที )มา 1 โคโลนี ใส่ลงในฟลาสก์ซึ่งบรรจุอาหาร GYE Broth 30 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง

3.8.1.2 นำกล้าเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ที่เตรียมจากข้อ 3.8.1.1 ปริมาณ 0.4 มิลลิลิตร (7.5 เปอร์เซ็นต์) มาเลี้ยงไว้ในหลอดทดลองบรรจุอาหาร GYE Broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ปรับปริมาณแอลกอฮอล์ 8% และปรับปริมาณกรดด้วยกรดอะซิติคให้มีปริมาณกรดเริ่มต้น 1% ในสภาพที่มีการให้อากาศแบบต่อเนื่องและควบคุมอุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส

3.8.1.3 ทำการถ่ายเชื้อลงหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อถัดไปทุก 5 วัน เป็นจำนวน 4 ครั้ง จากนั้นนำไปแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ทำการแยกโคโลนีเดี่ยวที่เกิด Clear zone บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.1.4 นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้จากข้อ 3 ไปเตรียมเป็นกล้าเชื้อดังเช่นข้อ 1 (7.5 เปอร์เซ็นต์) ถ่ายใส่ฟลาสก์ที่มีไวน์น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนที่ปรับปริมาณแอลกอฮอล์ 8% ปรับปริมาณกรดด้วยกรดอะซิติคให้มีปริมาณกรดเริ่มต้น 1% และเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.3% ทำการหมักสภาพนิ่งเพื่อ ติดตามการสร้างเจล

3.8.1.5 นำเชื้อในฟลาสก์ที่ไม่เกิดเจลมาเลี้ยงอีกครั้งในหลอดทดลองบรรจุอาหาร GYE Broth ที่ปรับปริมาณแอลกอฮอล์ 10% ปรับปริมาณกรดด้วยกรดอะซิติคให้มีปริมาณกรดเริ่มต้น 1%ในสภาพที่มีการให้อากาศแบบต่อเนื่องและควบคุมอุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อลงหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อถัดไปทุก 5 วัน เป็นจำนวน 4 ครั้ง จากนั้นนำไปแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ทำการแยกโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บรักษาเชื้อไว้ในหลอด GYE Agar slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้งานต่อไป

### 3.8.2 การผลิตไวน์น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อน

3.8.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ (Starter) บรรจุอาหาร MY Broth 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นถ่ายเชื้อ *S. cerevisiae* M30 ที่เลี้ยงบน MY Agar slant ที่บ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่งโมง มาใส่ในอาหาร MY Broth แล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่งโมง เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.8.2.2 การเตรียมน้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนสำหรับหมักไวน์ นำน้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนมาปรับปริมาณน้ำตาลโดยเติมน้ำตาลทรายให้ได้ค่าประมาณ 15-16 องศาบริกซ์ (เพื่อต้องการให้ไวน์มีปริมาณเอทานอล 8 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งวัดด้วยเครื่องรีแฟคโตมิเตอร์ (Refractometer) จากนั้นเติมแอมโมเนียมซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาณ 0.05 , 0.02 และ 0.08 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ ปรับพีเอชเป็น 4.0-4.5 นำไปใส่ในถังพลาสติกแล้วเติมกล้าเชื้อยีสต์ที่เตรียมในข้อ 3.8.2.1 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง 2 - 3 วัน กรองผ่านไดอะตอมเมเชียสเอิร์ธ (diatomaceous earth) นำไวน์ที่กรองได้ไปพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อสำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.8.3 การติดตามการสร้างน้ำส้มสายชูโดยอาศัยการวัดค่า pH ด้วยเครื่อง

3.8.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. สป.5 โดยเขี่ยเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. สป.5 ที่เลี้ยงบนอาหาร GYE Agar slant มา 1 ลูป ใส่ลงในฟลาสก์ซึ่งบรรจุอาหาร GYE Broth 100 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำไปใช้ศึกษาต่อไป

3.8.3.2 การผลิตน้ำส้มสายชูเริ่มต้นโดยนำไวน์น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนที่ปรับปริมาณแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในถังหมักน้ำส้มสายชูทรงสูงที่เป็นสแตนเลสซึ่งมีการให้อากาศอย่างต่อเนื่องบริเวณด้านล่างของทั้งสองถัง ในสภาพการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous fermentation) โดยมีวัสดุยึดเกาะ คือ ใยพลาสติก ปรับปริมาณกรดโดยใช้อะซิติกให้มีปริมาณกรดเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.3 เปอร์เซ็นต์ ถ่ายกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. สป.5 ปริมาณ 7.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักที่อุณหภูมิห้องจนได้ปริมาณกรด 4 เปอร์เซ็นต์และสุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างทุก 3 ชั่วโมง พร้อมทั้งติดตามค่า pH ที่ได้ในระหว่างการหมักทุก 1 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ (Jenway, 3510) ในระดับทศนิยม 3 ตำแหน่ง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

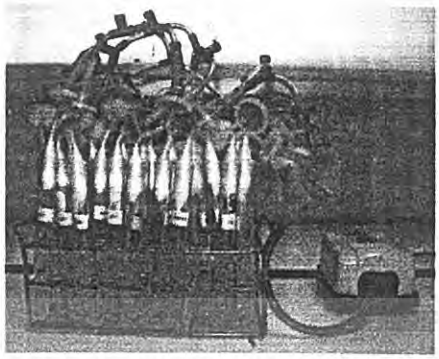
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4
# ผลการทดลองและวิจารณ์

## 4.1 การคงสภาพเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ในสภาพไม่สร้างเจลเพื่อการหมักน้ำส้มสายชู

ในการทดลองการคงสภาพเชื้อในสภาพไม่สร้างเจลเพื่อการหมักน้ำส้มสายชูโดยใช้เชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE Broth ที่มีการปรับปริมาณแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ และปรับปริมาณกรดด้วยกรดอะซิติกให้มีปริมาณกรดเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง และควบคุมอุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อถัดไปทุก 5 วัน เป็นจำนวน 4 ครั้ง ดังแสดงในภาพที่ 4.1 พบว่ามีเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ทั้งหมด 6 isolates ที่ผ่านการปรับสภาพโดยสามารถทนสภาพที่มีปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้น 8 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรดเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียสแล้วทำการหมักสภาพนิ่งในไวน์น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนที่ปรับปริมาณแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งปรับปริมาณกรดด้วยกรดอะซิติกให้มีปริมาณกรดเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ และเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อติดตามการสร้างเจล พร้อมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดที่เชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 สร้างขึ้นในระหว่างการหมักสภาพนิ่งได้ดังแสดงในภาพที่ 4.2 พบว่ามีเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ทั้ง 6 isolates ไม่พบการสร้างเจลในระยะเวลา 68 วัน หลังจากนั้นนำเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 มาเลี้ยงในอาหาร GYE Broth เช่นเดิม แต่ทำการปรับปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ทั้ง 6 isolates ผ่านการปรับสภาพโดยสามารถทนสภาพที่มีปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



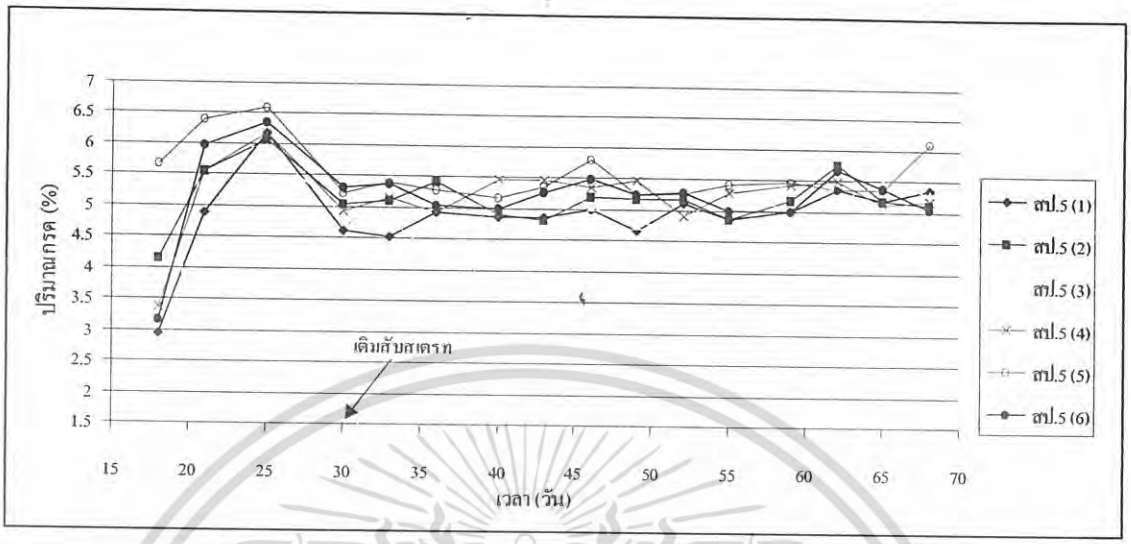
**ภาพที่ 4.1** การคงสภาพเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE Broth ที่มีการปรับปริมาณแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ และปรับปริมาณกรดด้วยกรดอะซิติกให้มีปริมาณกรดเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง และควบคุมอุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส

**ภาพที่ 4.2** แสดงการหมักสภาพนิ่งเพื่อติดตามผลการสร้างเจล และปริมาณกรดที่เชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 สร้างขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดที่เชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ทั้ง 6 isolatesสามารถสร้างขึ้นได้ในระหว่างการหมักสภาพนิ่ง พบว่า

*Acetobacter sp.* สป.5 (1) ให้ปริมาณกรดสูงสุด 6.18 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 25 ของการหมักสภาพนิ่ง
*Acetobacter sp.* สป.5 (2) ให้ปริมาณกรดสูงสุด 6.06 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 21 ของการหมักสภาพนิ่ง
*Acetobacter sp.* สป.5 (3) ให้ปริมาณกรดสูงสุด 6.00 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 25 ของการหมักสภาพนิ่ง
*Acetobacter sp.* สป.5 (4) ให้ปริมาณกรดสูงสุด 6.18 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 25 ของการหมักสภาพนิ่ง
*Acetobacter sp.* สป.5 (5) ให้ปริมาณกรดสูงสุด 6.60 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 25 ของการหมักสภาพนิ่ง
*Acetobacter sp.* สป.5 (6) ให้ปริมาณกรดสูงสุด 6.36 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 25 ของการหมักสภาพนิ่ง
(ตัวเลขในวงเล็บแสดงถึง isolates ของเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5) ดังแสดงในภาพที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

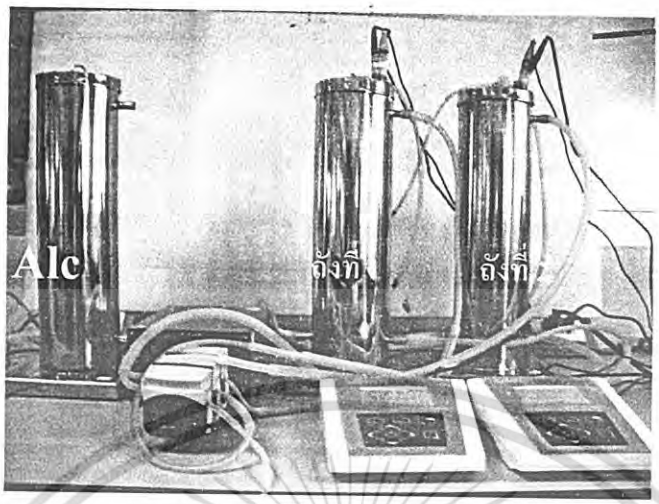



**ภาพที่ 4.3** ผลการเปรียบเทียบปริมาณกรดที่เชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ทั้ง 6 isolates สามารถสร้างขึ้นได้ในระหว่างการหมักสภาพนิ่งในไวน์น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนที่ปรับปริมาณแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งปรับปริมาณกรดด้วยกรดอะซิติกให้มีปริมาณกรดเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์

**4.2 ผลการติดตามการสร้างน้ำส้มสายชูโดยอาศัยการวัดค่า pH ด้วยเครื่อง**

เมื่อได้ทำการหมักน้ำส้มสายชูในถังหมักน้ำส้มสายชูสแตนเลสทรงสูง ในสภาพแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi – continuous fermentation) ดังแสดงในภาพที่ 4.4 โดยใช้ไวน์น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนที่ปรับปริมาณแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งปรับปริมาณกรดด้วยกรดอะซิติกให้มีปริมาณกรด เริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตรทและใช้เชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 เป็นเชื้อสำหรับการหมักน้ำส้มสายชู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.4** ถังหมักน้ำส้มสายชูสแตนเลสทรงสูงในสภาพแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi – continuous fermentation) ที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง
Alc คือ ถังบรรจุไวน์น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนในการผลิตน้ำส้มสายชู
ถังที่ 1 คือ ถังหมักน้ำส้มสายชูที่มีใยพลาสติกเป็นตัวตรึงเซลล์
ถังที่ 2 คือ ถังหมักน้ำส้มสายชูที่มีใยพลาสติกเป็นตัวตรึงเซลล์

เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลาหนึ่งได้วิเคราะห์ปริมาณกรดทุก 3 ชั่วโมง และติดตามค่า pH โดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ Jenway, 3510 ในระดับทศนิยม 3 ตำแหน่ง ทุก 1 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรด กับค่า pH พบว่า ปริมาณกรดกับค่า pH แสดงความสัมพันธ์ไม่แน่ชัดในทางสถิติ กล่าวคือ ปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในระดับทศนิยม 3 ตำแหน่งที่แน่นอน ดังแสดงในภาพที่ 4.5 – 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.1** แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดทุก 3 ชั่วโมง และติดตามค่า pH ทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในการหมักน้ำส้มสายชูระบบกึ่งต่อเนื่อง

| เวลา | ถังที่ 1 | | ถังที่ 2 | | เวลา | ถังที่ 1 | | ถังที่ 2 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (ชั่วโมง) | pH* | ปริมาณกรด (%) | pH* | ปริมาณกรด (%) | (ชั่วโมง) | pH* | ปริมาณกรด (%) | pH* | ปริมาณกรด (%) |
| 0 | 2.741 | 2.49 | 2.596 | 4.041 | 28 | 2.706 | - | 2.590 | - |
| 1 | 2.728 | - | 2.598 | - | 29 | 2.705 | - | 2.590 | - |
| 2 | 2.727 | - | 2.596 | - | 30 | 2.703 | 2.287 | 2.589 | 4.485 |
| 3 | 2.725 | 2.406 | 2.594 | 3.861 | 31 | 2.700 | - | 2.588 | - |
| 4 | 2.724 | - | 2.592 | - | 32 | 2.699 | - | 2.587 | - |
| 5 | 2.723 | - | 2.592 | - | 33 | 2.696 | 2.465 | 2.586 | 4.129 |
| 6 | 2.723 | 2.317 | 2.591 | 4.158 | 34 | 2.714 | - | 2.584 | - |
| 7 | 2.721 | - | 2.591 | - | 35 | 2.710 | - | 2.583 | - |
| 8 | 2.721 | - | 2.590 | - | 36 | 2.707 | 2.168 | 2.583 | 3.802 |
| 9 | 2.720 | 2.435 | 2.589 | 4.455 | 37 | 2.689 | - | 2.582 | - |
| 10 | 2.718 | - | 2.588 | - | 38 | 2.687 | - | 2.581 | - |
| 11 | 2.717 | - | 2.587 | - | 39 | 2.685 | 2.435 | 2.579 | 3.936 |
| 12 | 2.716 | 2.435 | 2.586 | 4.158 | 40 | 2.679 | - | 2.576 | - |
| 13 | 2.713 | - | 2.584 | - | 41 | 2.678 | - | 2.575 | - |
| 14 | 2.711 | - | 2.583 | - | 42 | 2.674 | 2.495 | 2.572 | 4.069 |
| 15 | 2.711 | 2.435 | 2.585 | 4.250 | 43 | 2.674 | - | 2.569 | - |
| 16 | 2.711 | - | 2.581 | - | 44 | 2.670 | - | 2.566 | - |
| 17 | 2.715 | - | 2.584 | - | 45 | 2.668 | 2.495 | 2.564 | 4.203 |
| 18 | 2.721 | 2.153 | 2.589 | 3.906 | 46 | 2.665 | - | 2.561 | - |
| 19 | 2.723 | - | 2.594 | - | 47 | 2.668 | - | 2.563 | - |
| 20 | 2.721 | - | 2.594 | - | 48 | 2.671 | 2.242 | 2.566 | 3.935 |
| 21 | 2.717 | 2.347 | 2.591 | 3.995 | 49 | 2.672 | - | 2.567 | - |
| 22 | 2.715 | - | 2.592 | - | 50 | 2.673 | - | 2.570 | - |
| 23 | 2.715 | - | 2.593 | - | 51 | 2.674 | 2.200 | 2.573 | 3.802 |
| 24 | 2.714 | 2.228 | 2.593 | 3.980 | 52 | 2.677 | - | 2.573 | - |
| 25 | 2.711 | - | 2.592 | - | 53 | 2.675 | - | 2.572 | - |
| 26 | 2.711 | - | 2.591 | - | 54 | 2.675 | 2.138 | 2.573 | 4.039 |
| 27 | 2.710 | 2.317 | 2.592 | 4.158 | 55 | 2.677 | - | 2.573 | - |

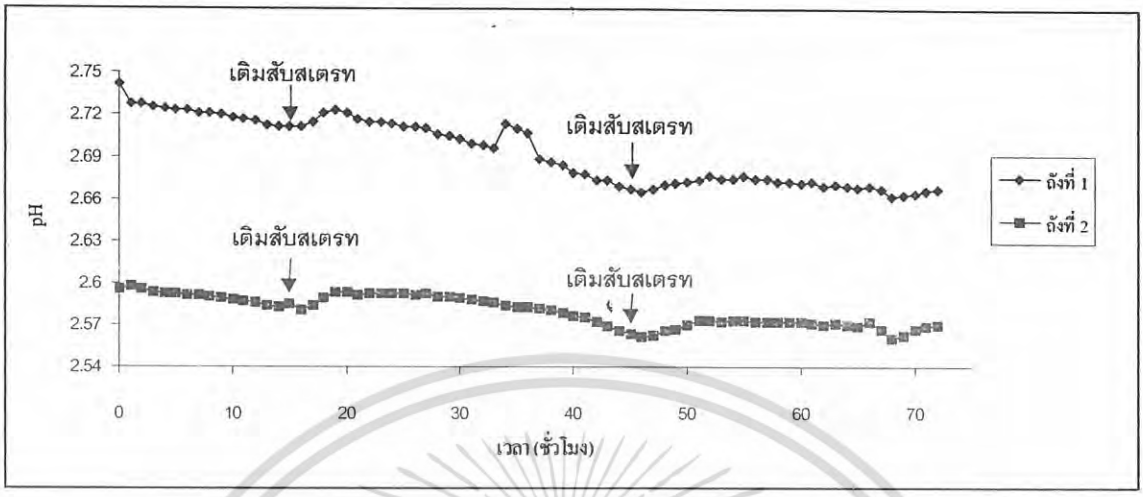
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.1 (ต่อ)** แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดทุก 3 ชั่วโมง และติดตามค่า pH ทุก 1 ชั่วโมงเป็น เวลา 72 ชั่วโมงในการหมักน้ำส้มสายชูระบบกึ่งต่อเนื่อง

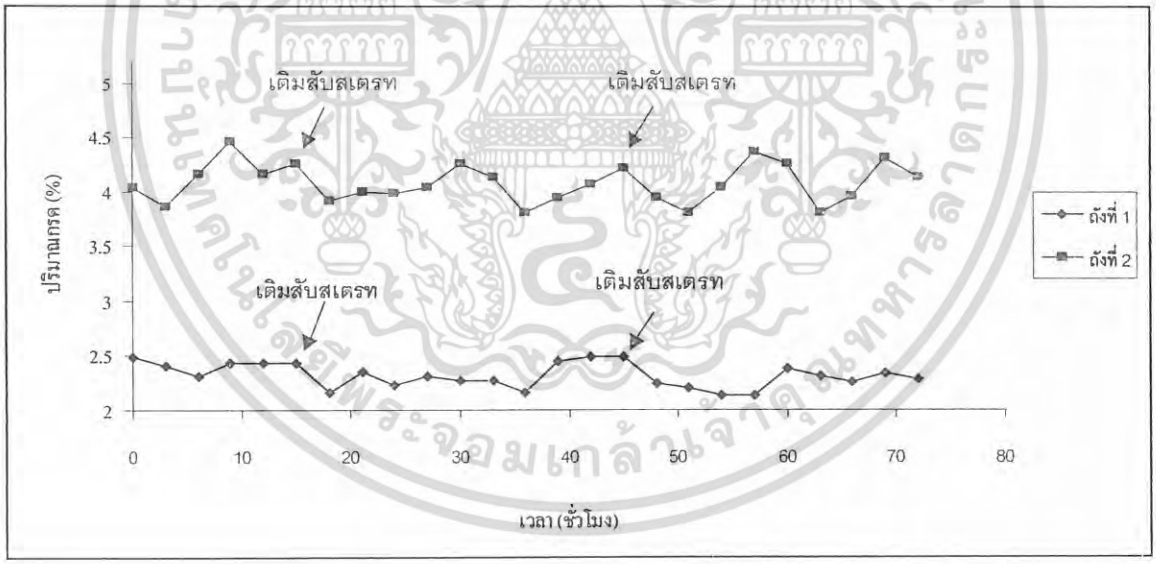
| เวลา | ถังที่ 1 | | ถังที่ 2 | | เวลา | ถังที่ 1 | | ถังที่ 2 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (ชั่วโมง) | pH* | ปริมาณกรด (%) | pH* | ปริมาณกรด (%) | (ชั่วโมง) | pH* | ปริมาณกรด (%) | pH* | ปริมาณกรด (%) |
| 56 | 2.675 | - | 2.572 | - | 65 | 2.669 | - | 2.569 | - |
| 57 | 2.675 | 2.138 | 2.572 | 4.366 | 66 | 2.670 | 2.257 | 2.572 | 3.951 |
| 58 | 2.673 | - | 2.572 | - | 67 | 2.667 | - | 2.567 | - |
| 59 | 2.673 | - | 2.572 | - | 68 | 2.662 | - | 2.560 | - |
| 60 | 2.672 | 2.376 | 2.572 | 4.247 | 69 | 2.663 | 2.331 | 2.563 | 4.307 |
| 61 | 2.673 | - | 2.571 | - | 70 | 2.664 | - | 2.567 | - |
| 62 | 2.670 | - | 2.570 | - | 71 | 2.666 | - | 2.569 | - |
| 63 | 2.671 | 2.317 | 2.571 | 3.802 | 72 | 2.667 | 2.287 | 2.570 | 4.128 |
| 64 | 2.670 | - | 2.570 | - | - | - | - | - | - |

pH * แสดงถึง ค่า pH ± 0.003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.5 ก** ผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH กับปริมาณกรดในถังหมักน้ำส้มสายชูของถังที่ 1 และถังที่ 2




**ภาพที่ 4.5 ข** ผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH กับปริมาณกรดในถังหมักน้ำส้มสายชูของถังที่ 1 และถังที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# สรุปผลการทดลอง

## 5.1 การคงสภาพเชื้อ Acetobacter sp. สป.5 ในสภาพไม่สร้างเจลเพื่อการหมักน้ำส้มสายชู

จากการคงสภาพเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ในสุภาพไม่สร้างเจลเพื่อการหมักน้ำส้มสายชูทำให้ได้เชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ทั้งหมด 6 isolates ที่ไม่พบการสร้างเจลในระหว่างการหมักสภาพนิ่งในไวน์น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนที่ปรับปริมาณแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งปรับปริมาณกรดด้วยกรดอะซิติกให้มีปริมาณกรดเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 68 วัน และสามารถทนสภาพเครียดที่กำหนดให้ได้ คือ สามารถทนสภาพที่มีปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ในการนำมาปรับสภาพใน GYE Broth อีกครั้งหลังจากการหมักสภาพนิ่ง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดที่เชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ทั้ง 6 isolates สร้างขึ้นในระหว่างการหมักสภาพนิ่งพบว่า เชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ทั้ง 6 isolates สามารถสร้างกรดได้สูงสุดอยู่ในช่วง 6.0 - 6.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่วนใหญ่ปริมาณกรดสูงสุดนี้จะสร้างได้ในวันที่ 25 ของการหมักสภาพนิ่ง

## 5.2 ผลการติดตามการสร้างน้ำส้มสายชูโดยอาศัยการวัดค่า pH ด้วยเครื่อง

จากการติดตามการสร้างน้ำส้มสายชูในสภาพการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง(semi–continuous fermentaion) โดยอาศัยการวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter (Jenway, 3510) ทุก 1 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณกรดโดยวิธีการไตเตรทด้วย 0.1N NaOH ทุก 3 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในระดับทศนิยม 3 ตำแหน่งที่แน่นอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ข้อเสนอแนะ**

1. ในการคงสภาพเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ในสภาพไม่สร้างเจลเพื่อการหมักน้ำส้มสายชู ผลที่ได้ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ทั้ง 6 isolates จะไม่มีการสร้างเจลในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชู เนื่องจาก Casida, 1968 ได้รายงานว่าเชื้อ Acetobacter จะสร้างเมือกและเจริญเติบโตเป็นฟิล์ม เรียกว่า "vinegar mother" ลอยเป็นแพบนผิวหน้าของแอลกอฮอล์ ซึ่งเซลล์ของเชื้อ Acetobacter ที่พบในถังหมักน้ำส้มสายชูจะมีแคปซูลเป็นชั้นเมือกรอบเซลล์แต่ละเซลล์เอย่างเห็นได้ชัด แสดงว่าเชื้อในจีนัส Acetobacter จะมีการสร้างเจลเกิดขึ้น ควรใช้เวลาในการปรับสภาพเชื้อยาวนานขึ้นเพื่อเพิ่มโอกาสในการพบเชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 ที่ไม่สร้างเจลในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชู

2. ในการติดตามการสร้างน้ำส้มสายชูโดยอาศัยการวัดค่า pH ด้วยเครื่องไม่สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดกับค่า pH ได้ เนื่องจากค่าที่วัดได้จากเครื่อง pH meter (Jenway, 3510 ) ซึ่งเป็นทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยังไม่มีความละเอียดพอ อีกทั้งยังมีค่า error ถึง ± 0.003 จึงทำให้ไม่สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดกับค่า pH ได้ ควรใช้ pH meter ที่สามารถวัดค่า pH ได้เป็นทศนิยมที่ละเอียดกว่าทศนิยม 3 ตำแหน่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บรรณานุกรม

นภา โล่ห์ทอง. 2519. เอกสารประกอบการบรรยายวิชาจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์และอักษรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.(โรเนียว)

นันทพร วรวุฒิพงศ์. 2517. การคัดสายพันธุ์บักเตรีเพื่อใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วราวุฒิ ครูส่ง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์

สุเมธ ตันตระเธียร.2536. น้ำส้มสายชู.วิทยาศาสตร์.47(2) : 79-84.

"เครื่องวัด pH" [Online]. Available http://www.mst.or.th/MsWord/upd20021.doc "5/4/48"

"ประเภทของน้ำส้มสายชู" [Online]. Available http://www1.fda.moph.go.th/consumer/csmb/csmb2545.nsf/c5fea1b96750d7b880256849004e9ab4/ccc25aff22a1a622c7256cbb00229962?OpenDocument "7/11/47"

24. "ข้าวโพดอ่อนในน้ำส้มฯหมักสู่ตลาดโลกด้วยนวัตกรรมไทย." ฐานเศรษฐกิจ (11-14 กรกฎาคม 2547) : 31

AOAC. Official method of analysis. 1995. 16th ed. Association of Analysis Chemistrys. Virginia, 1995.

Adams, M. R. 1980. The Small-Scale Production of Vinegar from Banana. Rep. Trop. Prod. Inst. G 132.

Adams, M. R. 1985. Vinegar. Microbiology of Fermented Foods. London : Elsevier Applied Science Publishers.

Conner, H. A. and R. J. Allgeier. 1976. Vinegar : Its History and Development. Adv. Appl. Microbiol. 20 : 81-133.

De Ley, J. and J. Frateur. 1974. The Genus Acetobacter. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkin Co. Baltimore.

Ebner, H. and A. Enenkel. 1978. U.S. Patents. 4 076 844.

Gibbs, B.M. and D.A. Shapton. 1968. Identification Method for Microbiologist. Part B. New York : Academic Press.

Hesseltine, C.W. 1965. Industrial mycology. Mycologia. 57:177-179

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

L.E. Casida, JR. 1968. Industrail Microbiology. Microbial Oxidation Transformations of Substrate. John Wiley and sons, inc. United States of America.

Norris, J.R. and D.W. Ribbons. 1970. Method in Microbiology. New York, Academic Press.

Park, Y., Ohtake,H. Toda. 1990. Effects of tricarboxylic acid cycle intermediates on acetic acid production by *Acetobacter aceti*. J. Gen. Appl. Microbial., 36 :105-110.

Rao, M. R. R. 1957. Acetic Acid Bacteria. Ann. Review of Microbiol. 11 : 317-337

Seppi, A. and A. Sperando. 1980. Free amino acid composition of vinegar. Revista della Societa Italiana di Scienza Alimentazione. 9(5) : 315-324.

Yanazida, F., J. Fukui, N. Kaneko, Y. Yamamoto and Loizumi. 1974. Acetic acid bacteria and their utilization XI. Amino acid contained in vinegar mash by various treatments. Journal of the Society of Brewing Japan. 69(11) : 759-764.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก
# วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. อาหาร Glucose Yeast Extract Broth (GYE Broth)

มีองค์ประกอบดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | 100.0 | กรัม |
| Yeast Extract | 10.0 | กรัม |
| Distilled water | 1000.0 | กรัม |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 2. อาหาร Glucose Yeast Extract Agar (GYE Agar)

มีองค์ประกอบดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | 100.0 | กรัม |
| Yeast Extract | 10.0 | กรัม |
| Calcium carbonate | 20.0 | กรัม |
| Agar | 20.0 | กรัม |
| Distilled water | 1000.0 | กรัม |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นด้วยความร้อนจน Agar ละลาย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3. อาหาร MY Broth**

มีองค์ประกอบดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | 10.0 | กรัม |
| Peptone | 5.0 | กรัม |
| Yeast Extract | 3.0 | กรัม |
| Malt Extract | 3.0 | กรัม |
| Distilled water | 1000.0 | กรัม |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**4. อาหาร MY Agar**

มีองค์ประกอบดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | 10.0 | กรัม |
| Peptone | 5.0 | กรัม |
| Yeast Extract | 3.0 | กรัม |
| Malt Extract | 3.0 | กรัม |
| Agar | 2.0 | กรัม |
| Distilled water | 1000.0 | กรัม |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นด้วยความร้อนจน Agar ละลาย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข
# วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

## 1. การวิเคราะห์แอลกอฮอล์โดยใช้ Ebuliometer

### 1.1 การหาจุดเดือดของน้ำ

ล้าง Ebuliometer ให้สะอาดแล้วเติมน้ำให้ได้ปริมาตรที่ขีดไว้ตอนล่างของกระบอกตวง (25 มิลลิลิตร) โดยเติมลงในช่องใส่เทอร์โมมิเตอร์ไว้ตามเดิม จุดไฟตะเกียงแอลกอฮอล์ใส่ไว้ใต้เครื่อง รอประมาณ 8-9 นาที น้ำจะร้อนขึ้น จะเห็นปรอทของเทอร์โมมิเตอร์ขึ้น เมื่อน้ำเดือดและปรอทอยู่คงที่ อ่านค่าอุณหภูมิที่ได้จะเป็นจุดเดือดของน้ำ (ควรจะได้ใกล้เคียงกับ 100) ข้อสังเกต ไม่ต้องเติมน้ำในส่วนคอนเดนเซอร์ข้างบนในขณะที่หาจุดเดือดของน้ำ

### 1.2 การหาจุดเดือดของตัวอย่าง

เทน้ำออกแล้วใช้ตัวอย่างล้างและเททิ้งให้หมด ตวงตัวอย่างด้วยกระบอกตวงโดยใช้ปริมาตรของขีดบน (50 มิลลิลิตร) เติมน้ำลงในคอนเดนเซอร์จุดตะเกียงแอลกอฮอล์สังเกตปรอทที่เริ่มขึ้นสูงจนกระทั่งปรอทหยุดคงที่อ่านค่าอุณหภูมิที่ได้

ข้อสังเกต จุดเดือดที่ถูกต้องจะคงที่อยู่ระยะหนึ่ง ถ้าปล่อยไว้นานขึ้นจุดเดือดจะสูงขึ้นไปเรื่อยๆ เพราะน้ำในคอนเดนเซอร์ร้อน ค่าที่อ่านได้จะผิดไป จำเป็นต้องเฝ้าสังเกตให้ดี เครื่องมือนี้เหมาะสำหรับหาตัวอย่างที่มีแอลกอฮอล์ไม่เกิน 20% ถ้าสูงกว่านั้นจำเป็นต้องทำให้เจือจางลงตามอัตราส่วน

### 1.3 การอ่านค่าแอลกอฮอล์

อ่านค่าได้โดยใช้แป้นกลม หมุนปุ่มวงกลมให้จุดเดือดของน้ำตรงกับค่าแอลกอฮอล์ที่ 0 ดีกรี จากนั้นอ่านค่าจุดเดือดของตัวอย่างและด้านตรงข้ามจะเป็นค่าแอลกอฮอล์ที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยวิธีนี้ก็อ่านค่าได้โดยตรงไม่ตรงปรับค่าของอุณหภูมิทำให้สะดวกและรวดเร็วขึ้น

Ebuliometer จะวัดค่าแอลกอฮอล์ได้แม่นยำในช่วงที่มีแอลกอฮอล์น้อยกว่า 5% ค่าอุณหภูมิที่อ่านได้ในช่วงที่เหมาะสมคือประมาณ 96-100 องศาเซลเซียส ถ้าตัวอย่างที่ต้องการหามีปริมาณแอลกอฮอล์สูงควรจะเติมน้ำให้เจือจางลงมา เมื่ออ่านค่าได้แล้วจึงคำนวณกลับไปหาปริมาตรเดิมก่อนเติมน้ำ นอกจากนี้ตัวอย่างที่ใช้หาควรจะมีน้ำตาลน้อยกว่า 2% จึงจะอ่านค่าได้ใกล้เคียงที่สุดและมีความผิดพลาดไม่เกิน 0.1%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ebuliometer ควรจะต้องไม่มีคราบตะกอน โดยปกติเมื่อใช้หาตัวอย่างไปแล้วทุกๆ 50 ครั้ง ทำความสะอาดโดยต้มกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกซ์ 2 % สัก 5-10 นาที แล้วล้างน้ำให้สะอาดและต้มด้วยน้ำเปล่าสองสามครั้ง

**2. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด** (AOAC , 1995)

**2.1 สารเคมี**

2.1.1 น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เตรียมโดยนำน้ำกลั่นมาต้มเดือดเป็นเวลา 20 นาที

2.1.2 สารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH เตรียมจาก NaOH 4 กรัม ที่เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดแก้วที่กันคาร์บอนไดออกไซด์ได้และเป็นแก้วทนด่างก่อนใช้นำมาหาความเข้มข้นมาตรฐานก่อน

การหาความเข้มข้นมาตรฐานของ 0.1 N NaOH ทำได้โดยชั่งโพแทสซียมไฮโดรเจนพาทาเลท (อบ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นในโถดูดความชื้น) อย่างละเอียดประมาณ 0.3 กรัม เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จึงเติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 90-100 มิลลิลิตร เมื่อโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท (มีสูตรเป็น $KHC_8O_4H_4$) ละลาย จึงเติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลาย 0.1 N NaOH ความเข้มข้นมาตรฐาน คำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (N)} = \frac{\text{กรัม } KHC_8O_4H_4 \times 1,000}{\text{มิลลิลิตร NaOH} \times 204.229}$$

2.1.3 สารละลายฟีนอฟทาลีน (Phenolphthalein) ชั่ง 1 กรัม ฟีนอฟธาลีนละลายในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร

**2.2 วิธีวิเคราะห์**

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด แล้วไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึงจุดยุติ (End point) สีชมพู แต่ถ้าตัวอย่างมีสีให้ใช้พีเอชมิเตอร์วัด โดยจุดยุติ (End point) ของฟีนอฟธาลีน คือ พีเอช 8.6 ปริมาณกรดคำนวณเป็นกรดอะซิติคตามสูตร

$$\text{กรดทั้งหมด (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)} = \frac{N \times V \times 60 \times 100}{1,000 \times 1}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

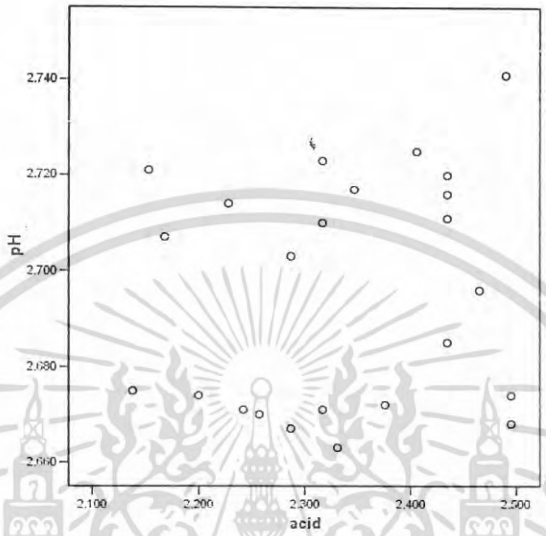
## ภาคผนวก ค
## ข้อมูล

**ตารางที่ 1 ผ.** ผลของปริมาณกรดที่เชื้อ *Acetobacter sp.* สป.5 6 isolates สร้างขึ้นในระหว่างการหมักสภาพนิ่งในไวน์น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อน ที่ปรับแอลกอฮอล์และกรด 8 เปอร์เซ็นต์ และ 1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

| *Acetobacter sp.* สป.5 / เวลา (วัน) | ปริมาณกรด (%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | สป.5 (1) | สป.5 (2) | สป.5 (3) | สป.5 (4) | สป.5 (5) | สป.5 (6) |
| 18 | 2.94 | 4.14 | 1.74 | 3.36 | 5.67 | 3.18 |
| 21 | 4.89 | 5.55 | 6 | 5.55 | 6.39 | 5.97 |
| 25 | 6.18 | 6.06 | 5.94 | 6.18 | 6.6 | 6.36 |
| 30 | 4.62 | 5.04 | 4.86 | 4.92 | 5.22 | 5.31 |
| 33 | 4.53 | 5.1 | 4.8 | 5.16 | 5.4 | 5.37 |
| 36 | 4.93 | 5.41 | 4.22 | 4.93 | 5.29 | 5.05 |
| 40 | 4.87 | 4.9 | 5.11 | 5.46 | 5.17 | 4.99 |
| 43 | 4.87 | 4.81 | 5.52 | 5.46 | 5.35 | 5.26 |
| 46 | 4.99 | 5.2 | 5.05 | 5.35 | 5.79 | 5.49 |
| 49 | 4.66 | 5.17 | 4.75 | 5.46 | 5.23 | 5.23 |
| 52 | 5.11 | 5.17 | 4.84 | 4.9 | 5.26 | 5.29 |
| 55 | 4.87 | 4.87 | 5.35 | 5.29 | 5.41 | 4.99 |
| 59 | 4.99 | 5.17 | 4.99 | 5.41 | 5.46 | 4.99 |
| 62 | 5.35 | 5.76 | 5.2 | 5.49 | 5.35 | 5.67 |
| 65 | 5.17 | 5.17 | 5.46 | 5.11 | 5.35 | 5.38 |
| 68 | 5.35 | 5.11 | 5.29 | 5.17 | 6.12 | 5.05 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2 ผ.** ผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดกับค่า pH ในการหมักน้ำส้มสายชูของถังที่ 1

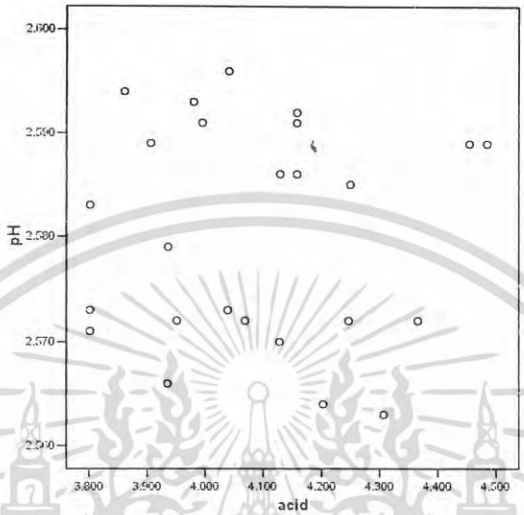



**Correlations**

| | | pH | acid |
|---|---|---|---|
| pH | Pearson Correlation | 1 | .195 |
| | Sig. (2-tailed) | . | .349 |
| | N | 73 | 25 |
| acid | Pearson Correlation | .195 | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | .349 | . |
| | N | 25 | 25 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 3 ผ.** ผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดกับค่า pH ในการหมักน้ำส้มสายชูของถังที่ 2




**Correlations**

| | | pH | acid |
|---|---|---|---|
| pH | Pearson Correlation | 1 | .003 |
| | Sig. (2-tailed) | . | .990 |
| | N | 73 | 25 |
| acid | Pearson Correlation | .003 | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | .990 | . |
| | N | 25 | 25 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

| | |
|---|---|
| ชื่อ-สกุล | นางสาวพรรณธิดา สุนทรพนาเวศ |
| วัน เดือน ปี เกิด | 14 ตุลาคม 2525 |
| สถานที่อยู่ปัจจุบัน | 33/1 หมู่ 8 ตำบลบางขันแตก อำเภอเมืองฯ<br>จังหวัดสมุทรสงคราม |
| ประวัติการศึกษา | ปีการศึกษา 2543 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย<br>จากโรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์<br>ปีการศึกษา 2547 จบการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต<br>สาขาเทคโนโลยีการหมัก<br>จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง |

| | |
|---|---|
| ชื่อ-สกุล | นางสาววนิดา ปานอุทัย |
| วัน เดือน ปี เกิด | 14 สิงหาคม 2525 |
| สถานที่อยู่ปัจจุบัน | 77/21 สุขุมวิท 46 พระโขนง คลองเตย กรุงเทพฯ |
| ประวัติการศึกษา | ปีการศึกษา 2542 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย<br>จากโรงเรียนมักกะสันพิทยา<br>ปีการศึกษา 2547 จบการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต<br>สาขาเทคโนโลยีการหมัก<br>จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้