ผลของ $CaCl_2$ ต่อการสร้างกรดความเข้มข้นสูงด้วยหัวเชื้อทนกรด *Acetobacter aceti* WK

Effect $CaCl_2$ on high acetification by high acid tolerant *Acetobacter aceti* WK

เทียมรพี สุภาพรม
นิสากร ศรีคำ
มณีรัตน์ แซ่ลิ้ม

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของ $CaCl_2$ ต่อการสร้างกรดความเข้มข้นสูงด้วยหัวเชื้อทนกรด *Acetobacter aceti* WK

Effect $CaCl_2$ on high acetification by high acid tolerant *Acetobacter aceti* WK

T148866

เทียมรพี สุภาพรม
นิสากร ศรีคำ
มณีรัตน์ แซ่ลิ้ม

b.12876537
i.
สจพม.
เลขทะเบียน 148866
วัน เดือน ปี 30 พ.ย. 2560

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ผลของ $CaCl_2$ ต่อการสร้างกรดความเข้มข้นสูงด้วยหัวเชื้อทนกรด *Acetobacter aceti WK*

Effect $CaCl_2$ on high acetification by high acid tolerant *Acetobacter aceti WK*

จัดทำโดย

เทียมรพี	สุภาพรม	รหัสนักศึกษา 55080100
นิสากร	ศรีคำ	รหัสนักศึกษา 55080104
มณีรัตน์	แซ่ลิ้ม	รหัสนักศึกษา 55080130

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

(รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

16/ธ.ค./59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	ผลของ $CaCl_2$ ต่อการสร้างกรดความเข้มข้นสูงด้วยหัวเชื้อทนกรด *Acetobacter aceti* WK
ชื่อนักศึกษา	เทียมรพี สุภาพรม รหัสนักศึกษา 55080100
	นิสากร ศรีคำ รหัสนักศึกษา 55080104
	มณีรัตน์ แซ่ลิ้ม รหัสนักศึกษา 55080113
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของ $CaCl_2$ ต่อการสร้างกรดความเข้มข้นสูงด้วยหัวเชื้อทนกรด *Acetobacter aceti* WK ในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous fermentation) โดยมีการให้อากาศ พร้อมทั้งปรับความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration ; ผลรวมของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ และความเข้มข้นของกรดอะซิติกในน้ำหมักตามที่กำหนด) เท่ากับ 10% 10.5% 11% 11.5% และ 12% โดยคงความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เริ่มต้นเท่ากับ 5% และความเข้มข้นของกรดอะซิติกเริ่มต้นเท่ากับ 5% 5.5% 6% 6.5% และ 7% ตามลำดับ ซึ่งทำการศึกษา 2 สภาวะคือ สภาวะที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ และสภาวะที่ไม่มีการเติม 0.15 % $CaCl_2$ จากการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะการเจริญของแบคทีเรีย *A. aceti* WK ในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง พบว่าในสภาวะที่เติม 0.15% $CaCl_2$ ให้ผลในเชิงบวกกับการสร้างกรดมากกว่าไม่มีการเติม $CaCl_2$ และในระดับความเข้มข้นทั้งหมดต่างๆ นั้นพบว่า ที่สภาพระดับความเข้มข้นทั้งหมดต่ำจะทำให้การสร้างกรดได้ผลดีกว่าที่สภาพระดับความเข้มข้นทั้งหมดสูง ซึ่งการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 10% โดยเติม 0.15% $CaCl_2$ มีการสร้างปริมาณเซลล์สูงถึง 0.1668 g/l ใช้ระยะเวลาในการหมักเฉลี่ย 9 วัน และมี Acetification rate (ETA) เฉลี่ยเท่ากับ 0.15 %/วัน ส่วนการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 12% โดยไม่มีการเติม $CaCl_2$ มีการสร้างปริมาณเซลล์มากสุด 0.0156 g/l ใช้ระยะเวลาในการหมักเฉลี่ย 23 วัน และมี ETA เฉลี่ยเท่ากับ 0.05 %/วัน

คำสำคัญ: แคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นทั้งหมด กระบวนการผลิตแบบกึ่งต่อเนื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Effect $CaCl_2$ on high acetification by high acid tolerant *Acetobacter aceti* WK	
Student name	Tiemrapee Supaprom	Student ID 55080081
	Nisakorn Srikum	Student ID 55080082
	Manirat Saelim	Student ID 55080130
Program	Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology	
Year	2016	
Special problem advisor	Assoc. Prof. Dr.Warawut Krusong	

ABSTRACT

This is a study of CaCl2 on high acetification by acid tolerant Acetobacter aceti WK in the rice wine vinegar production process, semi-continuous fermentation with aeration. This fermentation process used various total concentrations (TC: the sum of the concentration of alcohol and acetic acid in the fermentation medium.), including 10%, 10.5%, 11%, 11.5% and 12% the initial concentration of alcohol was fixed at 5% and the initial acetic acid concentrations were 5%, 5.5%, 6%, 6.5% and 7% respectively. Two conditions include the addition of 0.15% $CaCl_2$ and non-addition were used in this study. The comparison of growth of A. aceti WK in semi-continuous fermentation found that the condition added 0.15% $CaCl_2$ could make the positive effect of the acid production higher than non-addition, and also found that at low TC could make the production of acetic acid higher than high TC. The vinegar fermentation from rice wine at TC 10% with adding 0.15% CaCl2 could produce cell mass reach to 0.1668 gl^{-1} at 9 days on average, and acetification rate (ETA) was 0.15% per day. Furthermore, the vinegar fermentation from rice wine at TC 12% without adding CaCl2 could produce the maximum cell mass at 23 days on average (0.0156 gl^{-1}), and ETA was 0.15% per day.

Keywords: calcium chloride, total concentration; TC, Semi-continuous fermentation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษเรื่อง ผลของ $CaCl_2$ ต่อการสร้างกรดความเข้มข้นสูงด้วยหัวเชื้อทนกรด *Acetobacter aceti* WK ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความช่วยเหลือและสนับสนุนจากบุคคลหลายฝ่ายตลอดมา ทางผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษเรื่องนี้ ที่สละเวลาอันมีค่าคอยช่วยเหลือให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆมาโดยตลอด ซึ่งคำแนะนำเหล่านั้นเป็นประโยชน์อย่างมาก รวมทั้งปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆที่เกิดขึ้น เพื่อให้ปัญหาพิเศษฉบับมีความสมบูรณ์และถูกต้องมากยิ่งขึ้น จึงต้องขอกราบขอบพระคุณอาจารย์มา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณกรรมการสอบปัญหาพิเศษที่ได้ให้คำแนะนำตลอดจนคำชี้แนะ ทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้มอบวิชาความรู้และประสบการณ์ที่ดีให้แก่กลุ่มผู้วิจัย

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากปัญหาพิเศษฉบับนี้ กลุ่มผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง

เทียมรพี สุภาพรม
นิสากร ศรีคำ
มณีรัตน์ แซ่ลิ้ม
16 มิถุนายน 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
2.1 ไวน์ข้าว	2
2.2 น้ำส้มสายชู	3
2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู	3
2.4 กลไกการผลิตน้ำส้มสายชู	3
2.5 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตน้ำส้มสายชู	4
2.6 การเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *Acetobacter* ในระหว่างการหมัก	6
2.7 การผลิตน้ำส้มสายชูแบบ Submerged culture	7
2.8 การหมักน้ำส้มสายชูแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous)	8
2.9 การใช้ประโยชน์น้ำส้มสายชูหมัก	8
2.10 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	9
บทที่ 3 อุปกรณ์และผลการทดลอง	10
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี	10
3.2 อุปกรณ์	10
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	11
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	15
4.1 การเปรียบเทียบสภาวะการเจริญของแบคทีเรีย *Acetobaceter aceti* WK ในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous Fermentation Process) ที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมดต่างกัน 5 ระดับ	15
4.2 ผลการศึกษาการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกของเชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* WK ในสภาวะต่างๆ	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ต่อสภาวะการเจริญของแบคทีเรีย *A. aceti* WK ในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous Fermentation Process) ที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมดต่างกัน 5 ระดับ 23

4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ Alcohol Dehydrogenase (ADH) และ Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) ต่อการสร้างกรดอะซิติกในสภาวะต่างๆ 24

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ 25

5.1 สรุปผล 25

5.2 ข้อเสนอแนะ 26

บรรณานุกรม 27

ภาคผนวก 29

ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์ทางเคมีและกายภาพ 30

ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อ 37

ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง 38

ภาคผนวก ง รูปภาพประกอบปัญหาพิเศษ 40

ประวัติผู้เขียน 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรดของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 10%	17
4.2	แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรดของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 10% และมีการเติม 0.15% $CaCl_2$	17
4.3	แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรดของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 10.5%	18
4.4	แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรดของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 10.5% และมีการเติม 0.15% $CaCl_2$	18
4.5	แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรดของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 11%	19
4.6	แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรดของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 11% และมีการเติม 0.15% $CaCl_2$	19
4.7	แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรดของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 11.5%	20
4.8	แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรดของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 11.5% และมีการเติม 0.15% $CaCl_2$	20
4.9	แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรดของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 12%	21
4.10	แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรดของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 12% และมีการเติม 0.15% $CaCl_2$	22
4.11	แสดงค่าเฉลี่ย Acetification rate (ETA) ระยะเวลาในการสร้างกรดและปริมาณเซลล์แห้งของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 10%, 10.5%, 11%, 11.5% และ12% ทั้งในสภาวะที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ และในสภาวะที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ ที่ใช้ระยะเวลาทั้งหมดในการศึกษานาน 70 วัน	22
4.12	ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Alcohol Dehydrogenase และ Aldehyde Dehydrogenase ที่ได้จากการผลิตน้ำส้มสายสายชูจากไวน์ข้าวด้วยหัวเชื้อทนกรด *A. aceti* WK	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ผลิตภัณฑ์ไวน์ข้าว	2
2.2	ผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชู	3
2.3	ลักษณะของ *Saccharomyces cerevisiae*	5
2.4	ลักษณะของ *Acetobacter* spp.	6
2.5	Frings acetator	8
2.6	ลักษณะของเครื่อง Versatile multipurpose SEM	14
4.1	ค่า Acidity (%) และ ค่า Alcohol (%) ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวในช่วงการเริ่มระบบ (Start up Phase) ที่มีไม่มีการเติม $CaCl_2$ และมีการเติม 0.15% $CaCl_2$	16
4.2	ค่า Acetification rate (ETA) เฉลี่ยในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว โดยเปรียบเทียบระหว่างระดับความเข้มข้นทั้งหมด (TC) 10%, 10.5%, 11%, 11.5% และ 12% ซึ่งมีการเติม 0.15% $CaCl_2$ และไม่มีการเติม $CaCl_2$ ในระยะเวลา 70 วัน	23
ก-1	อีบลูลิโอมิเตอร์	31
ก-2	แผ่นอ่านเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์	32
ก-3	เครื่อง Genesys 10 Vis	35
ก-4	เครื่อง Centrifuge	36
ค-1	ค่า Acidity (%) และ ค่า Alcohol (%) ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่มีไม่มีการเติม $CaCl_2$ และการเติม 0.15% $CaCl_2$	38
ค-2	ค่าปริมาณเซลล์แห้งในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว ที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ และมีการเติม 0.15% $CaCl_2$	39
ง-1	การผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวในขวดดูแรน ขนาด 2 ลิตร โดยใช้ *A. aceti* WK เป็นหัวเชื้อ	40
ง-2	เซลล์ *A. aceti* WK ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว ความเข้มข้นทั้งหมด 10% (TC10) ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ กำลังขยาย 30000X	40
ง-3	เซลล์ *A. aceti* WK ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว ความเข้มข้นทั้งหมด 10.5% (TC10.5) ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ กำลังขยาย 30000X	41
ง-4	เซลล์ *A. aceti* WK ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว ความเข้มข้นทั้งหมด 11% (TC11) ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ กำลังขยาย 30000X	41
ง-5	เซลล์ *A. aceti* WK ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว ความเข้มข้นทั้งหมด 11.5% (TC11.5) ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ กำลังขยาย 30000X	42
ง-6	เซลล์ *A. aceti* WK ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว ความเข้มข้นทั้งหมด 12% (TC12) ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous fermentation process) ด้วยเชื้อ Acetic acid bacteria (AAB) จะทำการหมักที่อุณหภูมิ 30°C (Lu *et al.*, 1999)

$CaCl_2$ เป็นแหล่ง Ca^{2+} ที่ได้รับการยอมรับ (Nedjimi and Daound, 2009; Zeng *et al.*, 2002) จะช่วยส่งเสริม cellular function ในการฟื้นฟูและทนสภาวะเครียด เป็นผลเชิงบวกสำหรับการเพาะเลี้ยง AAB โดยการรักษาโครงสร้างของ membrane (Denich *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2008) ช่วยกระตุ้น enzyme activity (Pejin *et al.*, 2015) เมื่อมีการเติม $CaCl_2$ ลงไป $CaCl_2$ มีผลทำให้ phospholipid, fatty acid, activities ของ membrane-bond enzyme มีการเพิ่มขึ้น ทำให้ *A. aceti* WK สามารถทนความเครียดและมีอัตราการสร้างกรดที่สูง (Krusong *et al.*, 2015)

ดังนั้นปัญหาพิเศษนี้จึงทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตน้ำส้มจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมดสูง เพื่อศึกษาผลของ $CaCl_2$ ต่อการสร้างกรดความเข้มข้นสูงด้วยหัวเชื้อทนกรด *A. aceti* WK

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวความเข้มข้นทั้งหมดสูงภายใต้สภาวะการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-Continuous Fermentation Process)

1.2.2 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ปริมาณความเข้มข้นทั้งหมดสูง

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบถึงประสิทธิภาพการทนความร้อนของหัวเชื้อทนกรด *A. aceti WK* เมื่อเติม $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นกรด

1.3.2 ได้หัวเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงตัวเชลล์ให้สามารถเจริญและผลิตกรดน้ำส้มสายชูได้ในปริมาณความเข้มข้นกรดที่สูงได้

1.3.3 ทำให้ทราบปริมาณความเข้มข้นกรดสูงเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไวน์ข้าว

ไวน์ข้าว (rice wine) คือเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักข้าวให้เป็นแอลกอฮอล์โดยอาศัยการทำงานของเชื้อราที่จะทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสตาร์ชในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาลและจากนั้นอาศัยการทำงานของยีสต์เพื่อทำการหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ ปฏิกิริยาในการหมักไวน์ข้าวจัดเป็น Multiparallel fermentation หมายถึง กระบวนการหมักที่มีหลายปฏิกิริยาและจะเกิดขึ้น พร้อม ๆ กัน ซึ่งแบ่งเป็นสองขั้นตอนหลักตามสภาวะของการหมักและประเภทของจุลินทรีย์ เริ่มจากขั้นตอนที่หนึ่ง เป็นกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล (Saccharification) โดยรา จะสร้างเอนไซม์กลุ่มอะไมเลส ประกอบด้วย แอลฟาอะไมเลส (alpha amylase) เบต้าอะไมเลส (beta amylase) และกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ย่อยโครงสร้างแอลฟาฟอร์ม (a-form) ในโมเลกุลของเม็ดแป้ง ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่น้ำตาลโมเลกุลคู่ และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวตามลำดับ ส่วนของขั้นตอนที่สอง ที่เป็นกระบวนการรีดิวซ์น้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยใช้ยีสต์หมักแอลกอฮอล์ ได้แก่ *Saccharomyces* sp. เช่น *S. cerevisiae, S. diastaticus , Hensenula* sp. เพราะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทนต่อความเป็นกรดทนต่อ ความเข้มข้นของน้ำตาล และทนต่อระดับแอลกอฮอล์ได้ดี เมื่อต้องการให้ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์จะต้องปรับสภาวะให้อยู่ในสภาพไร้อากาศ (วิศณุ, 2556)

ภาพที่ 2.1 ผลิตภัณฑ์ไวน์ข้าว

ที่มา : http://www.japantoday.com/category/lifestyle/view/how-japanese-rice-wine-can-improve-your-looks

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 น้ำส้มสายชู

น้ำส้มสายชู (vinegar) หรือกรดอะซิติค (acetic acid) เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่ผลิตขึ้นมาจากกระบวนการหมัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว น้ำส้มสายชูเกิดจากการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ไวน์ โดยเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Acetobacter* ซึ่งก่อให้เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงแอลกอฮอล์ที่มีอยู่ในไวน์ให้เป็นกรดอะซิติค ในสภาพที่มีออกซิเจน ทำให้ไวน์มีรสเปรี้ยว ดังนั้นจึงเรียกผลิตภัณฑ์นี้ว่า “น้ำส้มสายชู : vinegar”

คุณสมบัติของน้ำส้มสายชูที่เป็นเครื่องปรุงอาหาร จะต้องเป็นของเหลวที่ใสปราศจากสีและสิ่งเจือปน ในกรณีที่มีสีจะต้องเป็นสีของวัตถุดิบที่ใช้เท่านั้น (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

ภาพที่ 2.2 ผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชู

ที่มา : http://reluctantentertainer.com/the-simplicity-of-salad-with-nakano-rice-vinegar/

2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู

วัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูสามารถแบ่งออกได้ ดังนี้

2.3.1 ผลไม้ เช่น องุ่น แอปเปิ้ล ส้ม แพร์ เป็นต้น

2.3.2 ผักที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก เช่น มันเทศ มันฝรั่ง มันสำปะหลัง ทั้งนี้แป้งที่มีอยู่ในผังจะต้องถูกนำไปผ่านการแปรสภาพ (pretreatment) เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลเสียก่อน

2.3.3 ธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวไรย์ ข้าวมอลท์ ข้าวสาลี ข้าวเหนียว ข้าวเจ้า ข้าวโพด เป็นต้น

2.3.4 วัตถุดิบพวกน้ำตาล เช่น กากน้ำตาล น้ำผึ้ง น้ำอ้อย น้ำเชื่อม

2.3.5 แอลกอฮอล์เพื่อใช้ในการหมักโดยตรง เช่น แอลกอฮอล์เจือจาง แอลกอฮอล์ที่สูญเสียสภาพธรรมชาติแล้ว (denatured ethyl alcohol) รวมถึงน้ำทิ้งจากโรงงานเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น โรงงานเบียร์ ซึ่งมีปริมาณแอลกอฮอล์เหลืออยู่ (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

2.4 กลไกการผลิตน้ำส้มสายชู

กลไกการผลิตน้ำส้มสายชูจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล มี 2 ขั้นตอนด้วยกัน คือ

2.4.1 การหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอล ซึ่งเป็นกระบวนการหมักแบบไม่ใช้อากาศ และอาศัยเชื้อยีสต์ในสกุล *S. cerevisiae* var. ellipsoideus ดังสมการที่แสดงอย่างง่ายๆ คือ

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตาม ในความจริงแล้ว การหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์จากน้ำตาลนี้จะต้องอาศัยปฏิกิริยาหลายขั้นตอนประกอบกันอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งจะเกิดผลพลอยได้หลายชนิด เช่น กลีเซลรอล รวมทั้งกรดอะซิติกอีกด้วย แต่มีในปริมาณน้อย

2.4.2 การเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก โดยอาศัยเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม acetic acid bacteria ทำการหมักในสภาพมีอากาศ สำหรับปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนแรก เป็นการเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นอะเซตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) โดยอาศัยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรเจนเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังนี้

$$C_2H_5OH + O_2 \longrightarrow CH_3CHO + 2H_2O$$

ขั้นตอนที่สอง เป็นการเปลี่ยนอะเซตัลดีไฮด์ ให้ไปเป็นไฮเดรตอะเซตัลดีไฮด์ (Hydratea cetaldehyde) โดยอาศัยเอนไซม์อะเซตัลดีไฮด์ดีไฮโดรเจนเนส (Acetaldehyde dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังนี้

$$CH_3CHO + H_2O \longrightarrow CH_3\text{-}C(H)(OH)\text{-}OH$$

ขั้นตอนที่สามเป็นขั้นตอนการสร้างกรดอะซิติก โดยที่เกิดปฏิกิริยาการส่งโปรตอน 2 ตัวของไฮเดรตอะเซทัลดีไฮด์ ไปยังอะตอมของออกซิเจนเกิดกรดอะซิติกออกมา ทั้งนี้โดยอาศัยเอนไซม์อะเซตัลดีไฮด์ดีไฮโดรเจนเนส (Acetaldehyde dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังนี้

$$CH_3\text{-}C(H)(OH)\text{-}OH + O \longrightarrow CH_3COOH + H_2O$$

อย่างไรก็ตามสามารถที่จะสรุปปฏิกิริยาการเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกได้ ดังนี้

$$C_2H_5OH + O_2 \longrightarrow CH_3COOH + H_2O$$

นอกจากนี้แล้วการสังเคราะห์กรดอะซิติก อาจเกิดขึ้นได้โดยอาศัยปฏิกิริยาการรวมตัวของอะเซตัลดีไฮด์ 2 โมเลกุล เราเรียกปฏิกิริยานี้ว่า Cannizzaro reaction (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532) ดังแสดงในสมการ

$$CH_3CHO + CH_3CHO \longrightarrow CH_3COOH + C_2H_5OH$$

2.5 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตน้ำส้มสายชู

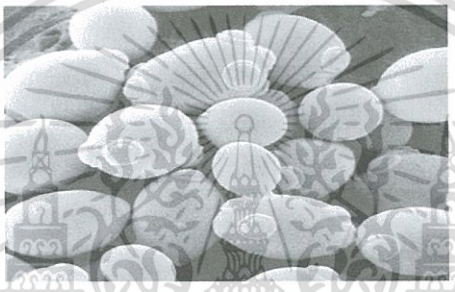
ในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักถ้าใช้วัตถุดิบประเภทต่างๆ ที่ไม่ใช้แอลกอฮอล์จะต้องมีการนำวัตถุดิบนั้นมาหมักให้ได้แอลกอฮอล์ก่อนด้วยเชื้อยีสต์ จากนั้นจึงหมักแอลกอฮอล์ที่ได้เพื่อผลิตกรดอะซิติกโดยอาศัยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติกได้ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจึงแบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1 เชื้อยีสต์

ยีสต์ที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดอะซิติคหรือน้ำส้มสายชูเป็นเชื้อชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ เพราะต้องการที่จะได้แอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักด้วยแบคทีเรียอีกต่อหนึ่ง อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันได้มีการคัดเลือกยีสต์ สำหรับผลิตแอลกอฮอล์เพื่อจะนำไปผลิตกรดอะซิติคโดยตรง เช่นกรณีการผลิตน้ำส้มจากไวน์หรือ wine vinegar ยีสต์ที่ใช้คือ *S. ellipsoideus* ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดเลือกขึ้นมาให้หมักไวน์ และได้น้ำส้มสายชูที่มีกลิ่นและรสดี เมื่อนำไวน์นั้นมาหมักที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้แล้วยังมียีสต์ที่สามารถใช้หมักแอลกอฮอล์เพื่อเป็นวัตถุดิบในการหมักน้ำส้มสายชูอีกหลายสายพันธุ์ โดยอยู่ในสกุล *Saccharomyes* เช่นเดียวกัน ได้แก่ *S. cerevisiae* เป็นต้น สำหรับลักษณะของยีสต์ *S. cerevisiae* (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532) แสดงในภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 ลักษณะของ *Saccharomyces cerevisiae*
ที่มา: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1509/*saccharomyces-cerevisiae*.

2.5.2 แบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติก (acetic acid bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดอะซิติกได้ คือแบคทีเรียในแฟมิลี *Acetobacteraceae* จีนัส *Acetobacter* และ *Gluconobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์มีรูปร่างแท่งสั้นอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เป็นคู่จัดเป็น obligate aerobes มีลักษณะเฉพาะคือสามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติกได้ในปริมาณที่มากและสามารถออกซิไดซ์กรดอะซิติกต่อไปได้จนกลายเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำจึงเรียกแบคทีเรียพวกนี้ว่า “โอเวอร์ออกซิไดเซอร์” (Overoxidizer) และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ในสภาพแวดล้อมที่มี pH 5.4-6.3 สำหรับจีนัส *Acetobacter* จะมี peritrichous flagella และสามารถออกซิไดกรดอะซิติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้โดยอาศัยวัฏจักรเครปส์ ส่วนจีนัส *Gluconobacter* มี polar flagella ไม่สามารถออกซิไดซ์กรดอะซิติกต่อได้เนื่องจากมีวัฏจักรเครปส์ที่ไม่สมบูรณ์จึงเรียกว่า “อันเดอร์ออกซิไดซ์เซอร์ (Underoxidizer) ซึ่งความสามารถในการออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติก สามารถที่จะไปใช้ประโยชน์ในด้านการผลิตน้ำส้มสายชูซึ่งมีรสเปรี้ยวที่เกิดจากกรดอะซิติกเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งตามมาตรฐานอุตสาหกรรมต้องมีกรดอะซิติกไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ดังนั้นการผลิตน้ำส้มสายชูจึงเลือกใช้ *Acetobacter* โดยเลือกใช้สายพันธุ์ที่สามารถให้ปริมาณกรดอะซิติกมากกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร นอกจากนี้ทั้ง 2 จีนัสยังมีความแตกต่างกันที่ปฏิกิริยาทางชีวเคมีด้วย แบคทีเรียกลุ่มนี้พบได้ทั่วไปในธรรมชาติที่มีแอลกอฮอล์ที่เกิดจากการหมักน้ำตาลหรือแป้งในพืชของยีสต์พบในน้ำหวานของดอกไม้ (Morin, 2012) ทั้งนี้ลักษณะของเชื้อ *Acetobacter* spp. แสดงในภาพ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.4 ลักษณะของ *Acetobacter* spp.
ที่มา: http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Acetobacter_aceti

เชื้อ AAB เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ต้องการอากาศ และไม่สร้างสปอร์ ซึ่งแบคทีเรียนี้จะสามารถผลิตกรดอะซิติคความเข้มข้นสูงจากเอทานอล ที่มีความสำคัญสำหรับอุตสาหกรรมน้ำส้มสายชู (Sengun และ Karabiyikli, 2011)

การใช้ AAB เป็นการเพาะเชื้อเริ่มต้น (starter culture) ในการผลิตน้ำส้มสายชูจะช่วยทำให้กระบวนการหมักน้ำส้มสายชูมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพมากขึ้น (Gullo และ Giudici, 2008)

ในปัจจุบัน submerged semi-continuous process ส่วนใหญ่จะใช้สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มสายชูโดยแบคทีเรียกรดอะซิติก โดยปกติ 40%-50% ของปริมาณรวมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักถูกปล่อยออกมาเมื่อวงจรการหมักเสร็จสิ้น ในขณะที่ส่วนผสมที่เหลืออยู่ใช้สำหรับเริ่มวงจรต่อมา โดยการคำนวณปริมาณไวน์ที่มีส่วนผสมของเอทานอลและกรดอะซิติกขึ้นอยู่กับการกำหนดความเข้มข้นรวม (TC) เป็นการเติมน้ำและสารอาหารเพิ่มเข้าไปสำหรับการเริ่มต้นของรอบถัดไป ความเข้มข้นรวม (TC) มีผลต่อการสร้างกรดอะซิติก ความเข้มข้นรวม (TC) สูงถูกนำมาใช้เมื่อต้องการกรดอะซิติกสูงในผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ต้องการ ถึงอย่างไรก็ตาม AAB ที่ใช้ในสภาพ TC สูงจะต้องมีเงื่อนไขที่ดีเหมาะสำหรับความทนกรดเพื่อให้อยู่รอดและเพิ่มจำนวนระยะเวลาการสร้างกรดอะซิติก (Krusong et al, 2014)

2.6 การเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *Acetobacter* spp. ในระหว่างการหมัก

ในระหว่างการหมักเพื่อผลิตน้ำส้มสายชูจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *Acetobacter* spp. ที่ใช้ เนื่องจากผลของการเปลี่ยนแปลงปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการหมัก ผลของการเปลี่ยนแปลง แบ่งออกได้ดังนี้

2.6.1 ผลของการขาดออกซิเจน

การหมักเพื่อผลิตน้ำส้มสายชูเป็นการหมักในสภาพที่ต้องการอากาศ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการให้อากาศ (aeration) อย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตาม ถ้าการให้อากาศเกิดขัดข้องขึ้นมาในระหว่างการหมักจะเกิดผลกระทบต่อเชื้อ *Acetobacter* spp. อย่างมากเพราะเชื้อนี้จะถูกทำลายลงอย่างรวดเร็ว

ผลของการทำลายเซลล์ *Acetobacter* spp. ในระหว่างการขาดออกซิเจนนี้ยังเกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการหมักอีกด้วย ได้แก่ ความเข้มข้นทั้งหมดของกรดอะซิติกและแอลกอฮอล์ในน้ำหมัก (total concentration) ความเข้มข้นของกรดอะซิติก (acetic acid concentration) อัตราเร็วของการหมัก (acetification rate) เป็นต้น นอกจากนี้ยังรวมถึงระยะเวลาที่ขาดออกซิเจนอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับสาเหตุที่ทำให้เซลล์ *Acetobacter* spp. ถูกทำลายไปเมื่อมีการขาดออกซิเจนนั้น ได้มีสมมุติฐานที่อธิบายถึงสาเหตุที่เกิดขึ้นหลายประการ ตามปกติแล้วเซลล์ *Acetobacter* spp. จะมีเอนไซม์อไพเรส (apyrase enzyme) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลาย ATP (ซึ่งเป็นแหล่งพลังงาน และมีการสะสมในระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก) อย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้เหลือ ATP สำหรับกิจกรรมของเมตาบอลิซึ่มอื่นๆ ของเซลล์ในระดับต่ำ ดังนั้นในเมื่อการให้อากาศหยุดชะงักจึงทำให้ ATP ในแหล่งเก็บพลังงานที่เรียกว่า ATP Pool สูญหายไปอย่างรวดเร็วซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเซลล์ทันที ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ *Acetobacter* spp. นี้ไม่สามารถทนต่อสภาพการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้

2.6.2 ผลของการขาดแอลกอฮอล์

เชื้อ *Acetobacter* spp. จะถูกทำลายลงไปในเมื่อการหมักเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จนกระทั่งปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักถูกเปลี่ยนไป (ออกซิไดซ์) จนหมดและในขณะเดียวกันมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบลงไปในน้ำหมักนั้นช้าจนเกินไป ผลของการทำลายเซลล์ *Acetobacter* spp. ซึ่งเนื่องมาจากการขาดแอลกอฮอล์นี้เกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของกรดอะซิติกและแอลกอฮอล์ทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำหมัก และระยะเวลาที่ขาดแอลกอฮอล์โดยผลที่เกิดขึ้นมีลักษณะเช่นเดียวกันกับกรณีการขาดออกซิเจน

2.6.3 ผลของอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง

การหมักจะเกิดขึ้นอย่างปกติ เมื่อควบคุมอุณหภูมิให้เปลี่ยนแปลงระหว่าง 32 และ 26 องศาเซลเซียสทุกๆ 2 ชั่วโมง

ตามปกติแล้วมักควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการหมักไม่ให้สูงเกินไปด้วยระบบหล่อเย็น แต่ถ้าระบบหล่อเย็นเกิดขัดข้องจะทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น จนกระทั่งจะทำลายเซลล์ *Acetobacter* spp. ได้ ซึ่งในที่สุดจะทำให้การหมักหยุดลง

นอกจากปัจจัยที่กล่าวมาแล้วนี้ในบางครั้งการทำลายเซลล์ *Acetobacter* spp. อาจจะเกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญที่จำเพาะ (specific growth rate) ของเชื้อและความเข้มข้นของกรดอะซิติกกับแอลกอฮอล์ที่มีอยู่ในน้ำหมักอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามผลจากการขาดออกซิเจน การขาดแอลกอฮอล์ และอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงเป็นปัจจัยหลักที่เราต้องคำนึงถึงก่อนเสมอ (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)

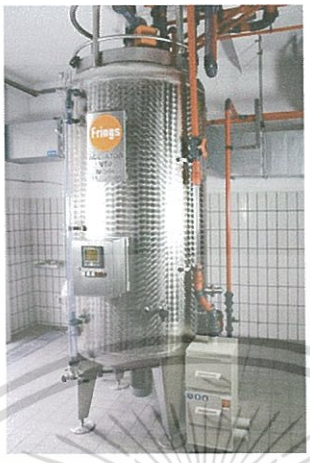
2.7 การผลิตน้ำส้มสายชูแบบ submerged culture

กรรมวิธีการผลิตน้ำส้มสายชูแบบ Submerged culture เป็นกรรมวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน โดย ฮะโรมัตกะ (Hromatka) และ เอบเนอร์ (Ebner) ได้เป็นผู้คิดค้นถังหมักแบบ Acetator เพื่อใช้ในการผลิตน้ำส้มแบบนี้ เรียกถังหมักชนิดนี้ว่า Frings acetator (Hromatka และEbner, 1959)

Frings acetator หรือ acerator เป็นถังหมักที่ได้รับการออกแบบให้มีระบบการให้อากาศ ซึ่งสามารถให้อากาศได้อย่างต่อเนื่องและไม่หยุดชะงัก อีกทั้งฟองอากาศที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กเพียงพอที่จะสามารถให้อากาศกระจายไปทั่วน้ำหมักได้อย่างทั่วถึง จังทำให้สามารถผลิตน้ำส้มสายชูได้ในระดับที่ต้องการ ถังหมักชนิดนี้ได้รับการพัฒนาขึ้นมาโดย Heinrich Frings Co., Bonn. ทำให้ผลิตน้ำส้มสายชูได้สูงกว่า 12% ในสภาพการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous fermentation) ลักษณะของถังหมัก จะทำขึ้นมาจากโลหะปลอดสนิมหรือไม้ ส่วนอุปกรณ์ต่างที่ใช้ในการควบคุมจะทำจากโลหะปลอดสนิมหรืออาจใช้โพลีไวนิลคลอไรด์ (polyvinyl chloride) เครื่องให้อากาศจะทำงานโดยมีการให้อากาศผ่านเข้าไปในน้ำหมักด้วยตัวเอง หรือที่เรียกว่า “self aspiration” การกำจัดฟองในถังหมัก Frings acetator มักใช้เครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำจัดฟองเชิงกล ซึ่งติดกับส่วยของเครื่องให้อากาศ สามารถกำจัดฟองได้อย่างอัตโนมัติตามต้องการได้ (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532)



ภาพที่ 2.5 Frings acetator

ที่มา: http://www.frings.com/ACETATOR-Essigfermenter.52.0.html

2.8 การหมักน้ำส้มสายชูแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous)

การหมักกรดอะซิติกที่นิยมใช้ในทางการค้าคือ การหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous) (de Ory *et al.* 2004) ซึ่งจะทำการถ่ายน้ำหมัก (กรดอะซิติกที่หมักเสร็จแล้ว) ออกจากถังหมักบางส่วนเมื่อมีการหมักเสร็จสิ้นแล้วในทุกๆ ไซเคิล และปรับปริมาตรความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำหมักใหม่ โดยการเติมไวน์และสารอาหารอาหารใหม่ลงไป จากนั้นการหมักไซเคิลใหม่จะเริ่มต้นขึ้น (Kocher *et al.*, 2014)

2.9 การใช้ประโยชน์น้ำส้มสายชูหมัก

น้ำส้มสายชูหมักจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์มากในหลายๆด้าน นับตั้งแต่ด้ายอาหารโดยใช้ในการแปรรูปอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์ผักสเตอไลส์เพื่อการส่งออก น้ำพริก ซอสพริก น้ำจิ้มไก่ น้ำสลัด มายองเนส เครื่องปรุง เป็นต้น

น้ำส้มสายชูหมักมีประโยชน์หลายด้าน ตั้งแต่ด้านสุขภาพโดยช่วยลดความดันโลหิตสูง เป็นแหล่งของสารโพลีฟีนอล (poluphenol) ซึ่งเป็นสารช่วยต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในร่างกาย หรือที่เรียกกันว่า “สารต้านอนุมูลอิสระ (anitioxidant)” ชนิดหนึ่ง ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด รวมถึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมแร่ธาตุจากอาหารที่บริโภคโดยเฉพาะการดูดซึมแคลเซียม นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในด้านยารักษาโรค เช่น การใช้น้ำส้มสายชูเป็นน้ำยาล้างแผล เนื่องจากประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การใช้น้ำส้มสายชูหมักผสมกับน้ำผึ้งเพื่อใช้เป็นยาแก้ไอ ใช้ในการรักษาพิษจากแมงกะพรุนและใช้เป็นสารต่อต้านมะเร็ง (วราวุฒิ, 2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)

การเติม Ca^{2+} จะสามารถทำให้เชื้อทนความเครียดได้สูงขึ้น ซึ่ง $CaCl_2$ เป็นแหล่ง Ca^{2+} ที่ได้รับการยอมรับ (Nedjimi และDaound, 2009; Zeng *et al.*, 2002) จะช่วยส่งเสริม cellular function ในการฟื้นฟูและทนสภาวะเครียด เป็นผลเชิงบวกสำหรับการเพาะเลี้ยง AAB โดยการรักษาโครงสร้างของ membrane (Denich *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2008) ช่วยกระตุ้น enzyme activity เช่น เอนไซม์อะไมเลส (amylase) (Pejin *et al.*, 2015)

ผลของ $CaCl_2$ มีส่วนไปเพิ่ม Phospholipid, fatty acid และ activity ของ membrance-bond enzyme ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาในการสร้างกรดอะซิติก (acetification) ได้แก่ alcohol dehydrogenase (ADH) และ aldehyde dehydrogenase (ALDH) จากภาพ Transmission electron microscope จะแสดงให้เห็นถึงผนังเซลล์ที่แน่นขึ้น เมื่อเติม 0.15% $CaCl_2$ ลงไป จะทำให้มีการผลิตกรดอะซิติคและมีอัตราการสร้างกรดที่สูงขึ้น (Krusong *et al.*, 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

ไวน์ข้าว

น้ำส้มสายชูหมักจากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เชื้อ *Acetobacter aceti* WK จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

น้ำกลั่น

น้ำกรอง

3.1.2 สารเคมี

แอลกอฮอล์ 95%

ฟีนอฟทาลีน 0.5%

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1N

กลูโคส

ไดแอมโมเนียมฟอสเฟส (DAP)

แมกนีเซียมซัลเฟส ($MgSO_4$)

Yeast Extract

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)

3.2 อุปกรณ์

ขวด Durant ขนาด 2 ลิตร

เครื่อง High speed Centrifuge บริษัท แอพเพนดอร์ฟ (ประเทศไทย) จำกัด
รุ่น3804R ประเทศเยอรมัน

เครื่องชั่ง รุ่น Sl 234 Denver Instrucment

เครื่อง Scanning Electron Microscopy บริษัท CARL ZEISS CO., LTD.
รุ่น EVO MA 10 ประเทศอังกฤษ

Spectrophotometer รุ่น Thermo Electron corporation

Dissolved oxygen meter บริษัท Hanna Instruments Inc.
รุ่น HI 9146 ประเทศโรมาเนีย

Ebulliometer รุ่น Dujadin-salleron

หลอด Centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vortex
เทอร์โมมิเตอร์
ปิเปต 10 และ 50 มิลลิลิตร
โถดูดความชื้น
ขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร
คิวเวต
บิวเรต 50 มิลลิลิตร
Foil
กระบอกตวง 50 มิลลิลิตร
ลูกยาง
หลอดทดลองขนาด 16x150
Stand & Camp
บีกเกอร์ ขนาด 1000 มิลลิลิตร
บีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลตร
ขวดปรับปริมาตร ขนาด 1000 มิลลิลิตร
ขวด M
เครื่องกรองน้ำส้มสายชู
สายยางซิลิโคน
Air filter
หม้อสแตนเลส
ไฟแช็ก
เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมน้ำหมัก

นำน้ำส้มสายชูหมักที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์และไวน์ที่ทราบเปอเซนต์ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดที่แน่นอน นำมาผสมกันในถังหมักให้ได้ความเข้มข้นทั้งหมด Total Concentation (TC) ตามที่ต้องการศึกษา มีการเติมหัวเชื้อทนกรด *Acetobacter aceti* WK และ เติมสารอาหาร (0.1% glucose, 0.05% Yeast Extract, 0.05% DAP, 0.02% $MgSO_4$, 0.15% $CaCl_2$ (Krusong *et al.*, 2015) จากนั้นทำการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous fermentation)

3.3.2 การหมักน้ำส้มสายชู

นำน้ำส้มสายชูหมักและไวน์ข้าวเตรียมเพื่อใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูหมักในขวดดูแรน 2 ลิตร พร้อมทั้งปรับความเขมข้นทั้งหมด (Total concentration (TC) ; ผลรวมของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และความเข้มข้นของกรดอะซิติกในน้ำหมักตามที่กำหนด) เท่ากับ 10%, 10.5% , 11% 11.5% และ 12% ตามที่กำหนด คือ TC10 มีกรดเริ่มต้น 5% และแอลกอฮอล์เริ่มต้น 5%, TC10.5 มีกรดเริ่มต้น 5.5% และแอลกอฮอล์เริ่มต้น 5% , TC11 มีกรดเริ่มต้น 6% และแอลกอฮอล์เริ่มต้น 5% , TC11.5 มีกรดเริ่มต้น 6.5% และแอลกอฮอล์เริ่มต้น 5%และ TC12 มีกรดเริ่มต้น 7% และแอลกอฮอล์เริ่มต้น 5% ติดตามผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัปดาห์ละ 1 ครั้ง จนปริมาณเปอร์เซนต์แอลกอฮอล์ต่ำกว่า 0.5% จะครบ 1 cycle จะทำการดึงน้ำหมักออกจากระบบ 40% ของที่มีอยู่ในถังหมัก (Krusong *et al.*, 2014) จากนั้นทำการเติมไวน์ลงไปให้มีปริมาตรน้ำหมักทั้งหมดในขวดไม่ต่ำกว่า 1600 มิลลิลิตรและปรับ TC ตามที่กำหนดแล้วเติมอาหารเข้าไปใหม่

3.3.3 ผลของ TC ต่อการหมักในสภาวะที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$

เติม $CaCl_2$ 0.15% ในการหมักที่ TC 10%, 10.5% , 11% 11.5% และ 12% ใช้ในการทดลองซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาสม (Krusong *et al.*, 2015) โดยหมักในอุณหภูมิห้องและมีการให้อากาศ

3.3.4 การตรวจวิเคราะห์น้ำส้มสายชูหมัก

3.3.4.1 การวิเคราะห์กรด (AOAC, 2000)

ปิเปตตัวอย่างมา 6 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ นำมาไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1N สังเกตจุดยุติจะมีสีชมพูอ่อน โดยมีฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ (ปฏิบัติตามขั้นตอนของ AOAC, 2000)

3.3.4.2 การวิเคราะห์แอลกอฮอล์โดยใช้ Ebulliometer

นำตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในเครื่องอีบูลลิโอมิเตอร์ สังเกตอุณหภูมิที่เทอร์โมมิเตอร์จะสั่นและคงที่นำอุณหภูมิที่อ่านค่าได้มาเทียบกับแผ่น Dosage de l' Alcooldans les Vins จะทราบเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์

3.3.4.4 ผลของปริมาณเชื้อที่หมักน้ำส้มสายชู

นำตัวอย่างนำหมักที่เก็บมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dry weight) โดยนำตัวอย่างมาเหวี่ยงด้วยเครื่อง Hi speed Centrifuge ความเร็วรอบ 7000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาทำกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จะหาปริมาณเชื้อในการหมักได้จากกราฟมาตรฐาน

1. การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell Dry Weight)

นำ foil ไปอบที่ อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่โถดูดความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและนำไปชั่งน้ำหนัก (A) จากนั้นนำตัวอย่างน้ำส้มสายชูหมักปริมาตร 250 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดเซนตริฟิวจ์หลอดละ 50 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอดแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่อัตราเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยนำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เมื่อปั่นเหวี่ยงเสร็จจะพบว่าเกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำกับตะกอน ให้เทส่วนใสทิ้ง แล้วใส่น้ำกลั่นลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนอยู่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในหลอดทดลองด้วยอัตราส่วน100:0, 80:20, 60:40, 40:60 และ 20:80 (ตะกอนเซลล์แบคทีเรีย:น้ำกลั่น) เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง จากนั้นแบ่งออกเป็นสองส่วน โดยส่วนแรกจะดูดใส่ foil ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนัก(B) แล้วนำไปคิดค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมการที่ใช้ในการคำนวณหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งคือ

$$\text{น้ำหนักแห้งของเซลล์ } (g/l) = \left| \frac{(B - A) \times 1{,}000}{\text{ปริมาตรที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยง}} \right|$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักของ foil เริ่มต้น

B คือ น้ำหนัก foil หลังการอบ

2. การวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง

นำส่วนที่สองนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำค่าทั้งสองมาหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นกับน้ำหนักแห้งของเซลล์แบคทีเรีย *Acetobacter aceti* WK

$$\text{ปริมาณเซลล์ของแต่ละ } cycle \left(\frac{g}{l}.day\right) = \left| \frac{\text{ปริมาณเซลล์แห้งวันสุดท้ายของ } cycle - \text{ปริมาณเซลล์แห้งเริ่มต้น}}{\text{จำนวนวันทั้งหมดที่ใช้ในการหมัก}} \right|$$

3.3..5 การตรวจลักษณะหัวเชื้อ SEM

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างจุลินทรีย์ในของเหลวสำหรับ SEM

1. กรองตัวอย่างด้วยเมมเบรนชนิด polycarbonate เลือกขนาดของรูเมมเบรนให้เหมาะสมกับขนาดของตัวอย่าง

2. แช่ตัวอย่างในน้ำยา 2.5 % glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 1-2 ชั่วโมง

3. ล้างน้ำยาออกด้วย phosphate buffer 2 ครั้ง แล้วตามด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

4. Dehydrate ด้วย ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 30%, 70% และ 95% ความเข้มข้น ละ 5 นาที แล้วตามด้วย 100% เปลี่ยน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

5. นำไปทำแห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่อง critical point dryer (Quorum K850,UK) (squttercoater,Balzer model SCD 040, liechtenstein)

6. ส่องด้วยกล้อง SEM (EVO MA 10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.6 ลักษณะของเครื่อง Versatile multipurpose SEM
บริษัท carl zeissรุ่น EVO MA 10 ประเทศ อังกฤษ
ที่มา: https://www.pinterest.com/pin/502573639639057801/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

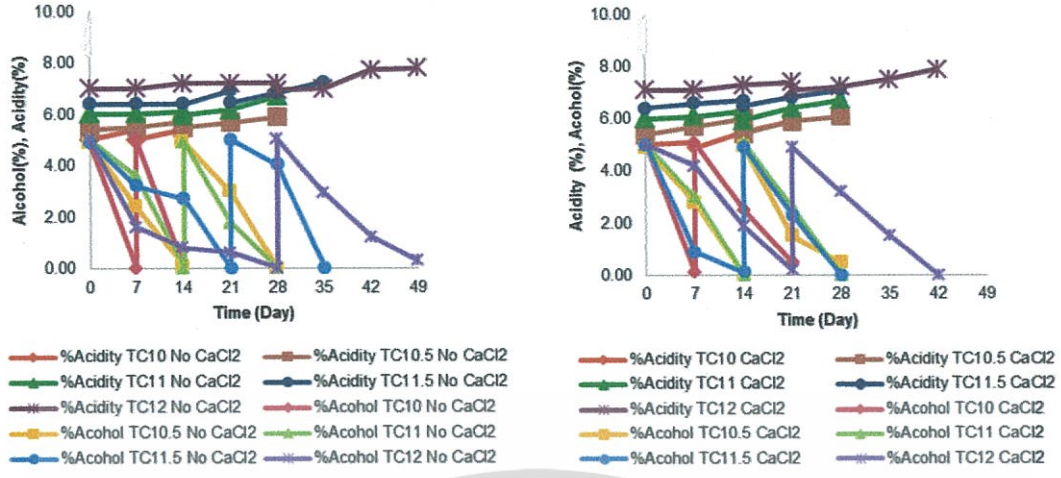
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

บทนี้จะกล่าวถึงผลที่ได้จากการทดลองในบทที่ 3 ซึ่งจะนำเสนอในรูปแบบต่างๆที่เหมาะสม เช่น กราฟ ตาราง รวมไปถึงอภิปรายผลให้เกิดความเข้าใจมากขึ้น พร้อมทั้งวิเคราะห์ผล ทิศทางแนวโน้มของค่าต่างๆ ที่เป็นไปได้เมื่อเทียบกับทฤษฎีที่ได้ศึกษา เพื่อนำไปเป็นแนวทางของบทสรุปของการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว 2 สภาวะ คือเมื่อมีการเติม 0.15 % $CaCl_2$ และเมื่อไม่มีการการเติม $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมด (Total Concentration; TC) 10% (Acidity 5%, Alcohol 5%) , 10.5% (Acidity 5.5%, Alcohol 5%), 11% (Acidity 6%, Alcohol 5%), 11.5% (Acidity 6.5%, Alcohol 5%) และ 12% (Acidity 7%, Alcohol 5%) และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสร้างกรดความเข้มข้นสูงเมื่อมีการเติม 0.15 % $CaCl_2$ และเมื่อไม่มีการเติม $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมดต่างๆ ด้วยหัวเชื้อทนกรด *A. aceti* WK ภายใต้สภาวะการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-Continuous Fermentation Process) โดยควบคุมสภาวะการให้อากาศที่เท่ากันและหมักอยู่ในอุณหภูมิห้อง ในขวดดูแรนขนาด 2 ลิตร ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ผล ได้แก่ %Acidity, %Alcohol, ปริมาณเซลล์แห้ง (g/l) ในการติดตามผลทุกๆ 7 วันเป็นเวลา 70 วัน และ เอนไซม์ Alocohol Dehydrogenase (ADH), Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) ในทุกระดับความเข้มข้นทั้งหมดทั้งในสภาวะที่เติม 0.15 %$CaCl_2$ และสภาวะที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$

4.1 การเปรียบเทียบสภาวะการเจริญของแบคทีเรีย *A. aceti* WK ในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-Continuous Fermentation Process) ที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมดต่างกัน 5 ระดับ

จากการศึกษาผลของการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวความเข้มข้นทั้งหมด (Total Concentration; TC) สูงภายใต้สภาวะการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-Continuous Fermentation Process) ในขวดดูแรนขนาด 2 ลิตรทั้ง 5 ระดับความเข้มข้นซึ่งมีการแบ่งเป็น 2 สภาวะคือมีการเติม 0.15% $CaCl_2$ และไม่เติม $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมดที่แตกต่างกันได้แก่ 10% 10.5% 11% 11.5% และ 12% โดยในช่วงเริ่มระบบ (Start up Phase) เป็นช่วงที่เชื้อแบคทีเรีย A. aceti WK มีการปรับตัว (Lag Phase) ซึ่งจะเป็นช่วงที่เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตน้อย จึงมีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตกรดน้ำส้มสายชูได้ยังไม่สมบูรณ์ โดยสภาวะที่แตกต่างกันนี้ ก็อาจจะมีผลต่อการปรับตัวของเชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* WK ที่ต่างกัน โดยสังเกตจากระยะเวลาที่ใช้ในการหมักจากภาพที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าเส้นกราฟในช่วง Start up Phase ของแต่ระดับความเข้มข้นไม่เท่ากัน ทั้งเติมมีการเติม 0.15 % $CaCl_2$ และเมื่อไม่มีการเติม $CaCl_2$ โดยเส้นกราฟที่สั้นจะหมายถึงเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการปรับตัวที่เร็ว พบว่าที่ความเข้มข้นทั้งหมด 12% เมื่อไม่มีการเติม $CaCl_2$ ใช้ระยะเวลาในการหมัก 28 วัน ซึ่งใช้เวลานานที่สุด โดยสิ่งที่เป็นตัวกำหนดให้หยุดระบบได้คือ %Alcohol เมื่อมี %Alcohol ต่ำกว่า 0.5 % ต้องทำการถ่ายน้ำหมักออกแล้วเติมไวน์ข้าวใหม่ลงไป ตามวิธีกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-Continuous Fermentation Process) จากนั้นจะทำการเริ่มหมักในรอบถัดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 ค่า Acidity (%) และ ค่า Alcohol (%) ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวในช่วงการเริ่มระบบ (Start up Phase) ที่มีไม่มีการเติม $CaCl_2$ และมีการเติม 0.15% $CaCl_2$

เมื่อแบคทีเรีย *A. aceti* WK สามารถปรับตัวได้ซึ่งจะเป็นช่วงที่แบคทีเรียเข้าสู่ช่วง Operation Phase ซึ่งเป็นช่วงที่มีการนำผลมาทำการวิเคราะห์ โดยจากการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะการเจริญของแบคทีเรีย *A. aceti* WK ในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-Continuous Fermentation Process) ที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมดต่างกัน 5 ระดับ ใน 2 สภาวะ คือเมื่อมีการเติม 0.15% $CaCl_2$ และเมื่อไม่มีการเติม $CaCl_2$ จากตารางที่ 4.1-4.11 พบว่าปริมาณเซลล์แห้ง (g/l) ที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมดต่ำกว่ามีปริมาณมากกว่าที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมดที่สูงกว่า โดยที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมด 10% เมื่อมีการเติม 0.15% $CaCl_2$ มีปริมาณเซลล์แห้ง 0.1668 g/l ซึ่งมีปริมาณมากที่สุด และที่ระดับความเข้มข้น 12% เมื่อไม่มีการเติม $CaCl_2$ มีปริมาณเซลล์แห้ง 0.0156 g/l ซึ่งมีปริมาณที่น้อยที่สุดโดยปริมาณเซลล์แห้งมีค่าลดลงตามลำดับในระดับความเข้มข้นทั้งหมดที่มากขึ้น (ตารางที่ 4.11) จะพบว่าปริมาณเซลล์แห้ง (g/l) เมื่อมี 0.15% $CaCl_2$ มีปริมาณที่มากกว่าเมื่อไม่มีการเติม $CaCl_2$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรด ของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 10% ที่ใช้ระยะเวลาทั้งหมดในการศึกษานาน 70 วัน

Cycle	Acidity เริ่มต้น (%)	Acidity สุดท้าย (%)	Acidity ที่สร้าง (%)	ระยะเวลาที่สร้างกรด (Day)	ETA (%/Day)	ปริมาณเซลล์แห้ง (g/L)
Start up	5	5.4	0.40	7	0.06	0.0256
1	5	5.4	0.40	7	0.06	0.0500
2	4.93	5.67	0.74	7	0.10	0.0545
3	4.97	5.8	0.83	7	0.12	0.0700
4	5	6	1.00	7	0.14	0.0800
5	4.9	5.97	1.07	7	0.15	0.0733
6	5	6	1.00	7	0.14	0.0880
7	4.9	6.1	1.20	14	0.09	0.1033
8	5	6.1	1.10	14	0.08	0.1050
Average				9	0.11	0.0780

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรด ของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 10% และมีการเติม 0.15% $CaCl_2$ ที่ใช้ระยะเวลาทั้งหมดในการศึกษานาน 70 วัน

Cycle	Acidity เริ่มต้น (%)	Acidity สุดท้าย (%)	Acidity ที่สร้าง (%)	ระยะเวลาที่สร้างกรด (Day)	ETA (%/Day)	ปริมาณเซลล์แห้ง (g/L)
Start up	5	5.1	0.10	7	0.01	0.0910
1	4.9	5.9	1.00	14	0.07	0.1360
2	4.9	5.97	1.07	14	0.08	0.1500
3	5.1	5.93	0.83	7	0.12	0.1438
4	5.03	6.13	1.10	7	0.16	0.1590
5	5.03	6.17	1.14	7	0.16	0.1653
6	4.97	6.4	1.43	7	0.20	0.1870
7	4.97	6.5	1.53	7	0.22	0.1934
8	5	6.53	1.53	7	0.22	0.1996
Average				9	0.15	0.1668

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
148866

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรด ของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 10.5% ที่ใช้ระยะเวลาทั้งหมดในการศึกษานาน 70 วัน

Cycle	Acidity เริ่มต้น (%)	Acidity สุดท้าย (%)	Acidity ที่สร้าง (%)	ระยะเวลาที่สร้างกรด (Day)	ETA (%/Day)	ปริมาณเซลล์แห้ง (g/L)
Start up	5.4	5.7	0.30	14	0.02	0.0256
1	5.47	5.87	0.40	14	0.03	0.0580
2	5.4	6.13	0.73	7	0.10	0.0600
3	5.4	6.3	0.90	7	0.13	0.0625
4	5.5	6.8	1.30	14	0.09	0.0850
5	5.43	6.6	1.17	7	0.17	0.0767
6	5.4	6.43	1.03	7	0.15	0.0625
7	5.5	6.63	1.13	14	0.08	0.0830
Average				10	0.11	0.0697

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรด ของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 10.5% และมีการเติม 0.15% $CaCl_2$ ที่ใช้ระยะเวลาทั้งหมดในการศึกษานาน 70 วัน

Cycle	Acidity เริ่มต้น (%)	Acidity สุดท้าย (%)	Acidity ที่สร้าง (%)	ระยะเวลาที่สร้างกรด (Day)	ETA (%/Day)	ปริมาณเซลล์แห้ง (g/L)
Start up	5.4	6	0.60	14	0.04	0.0965
1	5.43	6.1	0.67	14	0.05	0.1350
2	5.4	6.03	0.63	7	0.09	0.1200
3	5.5	6.13	0.63	14	0.05	0.1400
4	5.4	6.17	0.77	7	0.11	0.1432
5	5.47	6.23	0.77	7	0.11	0.1569
6	5.4	6.37	0.97	7	0.14	0.1624
7	5.4	6.6	1.20	7	0.17	0.1660
8	5.53	6.93	1.40	7	0.20	0.1700
Average				8.75	0.11	0.1492

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรด ของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 11% ที่ใช้ระยะเวลาทั้งหมดในการศึกษานาน 70 วัน

Cycle	Acidity เริ่มต้น (%)	Acidity สุดท้าย (%)	Acidity ที่สร้าง (%)	ระยะเวลาที่ สร้างกรด (Day)	ETA (%/Day)	ปริมาณเซลล์แห้ง (g/L)
Start up	6	6.1	0.10	14	0.01	0.0167
1	5.93	6.7	0.77	14	0.05	0.0533
2	6	6.5	0.50	7	0.07	0.0460
3	5.97	7.23	1.27	14	0.09	0.0620
4	5.9	7.27	1.37	14	0.10	0.0720
5	5.93	7.4	1.47	14	0.10	0.0775
6	6	7.37	1.37	7	0.20	0.0760
Average				12	0.10	0.0645

ตารางที่ 4.6 แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรด ของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 11% และมีการเติม 0.15% $CaCl_2$ ที่ใช้ระยะเวลาทั้งหมดในการศึกษานาน 70 วัน

Cycle	Acidity เริ่มต้น (%)	Acidity สุดท้าย (%)	Acidity ที่สร้าง (%)	ระยะเวลาที่ สร้างกรด (Day)	ETA (%/Day)	ปริมาณเซลล์แห้ง (g/L)
Start up	6	6.3	0.30	14	0.02	0.0533
1	5.93	6.73	0.80	14	0.06	0.0920
2	5.97	6.4	0.43	14	0.03	0.0765
3	6.03	6.47	0.43	14	0.03	0.0830
4	5.93	6.8	0.87	7	0.12	0.1090
5	6.03	6.8	0.77	7	0.11	0.1140
6	6	7.33	1.33	7	0.19	0.1380
7	6	7.63	1.63	7	0.23	0.1480
Average				10	0.11	0.1086

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรด ของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 11.5% ที่ใช้ระยะเวลาทั้งหมดในการศึกษานาน 70 วัน

Cycle	Acidity เริ่มต้น (%)	Acidity สุดท้าย (%)	Acidity ที่สร้าง (%)	ระยะเวลาที่สร้างกรด (Day)	ETA (%/Day)	ปริมาณเซลล์แห้ง (g/L)
Start up	6.4	6.9	0.50	21	0.02	0.0138
1	6.43	7.23	0.80	14	0.06	0.0145
2	6.57	7.63	1.07	21	0.05	0.0460
3	6.47	7.93	1.47	21	0.07	0.0575
4	6.6	7.57	0.97	14	0.07	0.0233
Average				18	0.06	0.0353

ตารางที่ 4.8 แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรด ของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 11.5% และมีการเติม 0.15% $CaCl_2$ ที่ใช้ระยะเวลาทั้งหมดในการศึกษานาน 70 วัน

Cycle	Acidity เริ่มต้น (%)	Acidity สุดท้าย (%)	Acidity ที่สร้าง (%)	ระยะเวลาที่สร้างกรด (Day)	ETA (%/Day)	ปริมาณเซลล์แห้ง (g/L)
Start up	6.4	6.7	0.30	14	0.02	0.0264
1	6.5	7.1	0.60	14	0.04	0.0600
2	6.53	7.23	0.70	14	0.05	0.0654
3	6.47	7.27	0.80	14	0.06	0.0888
4	6.47	7.5	1.03	14	0.07	0.0987
5	6.53	8.07	1.54	14	0.11	0.1100
Average				14	0.07	0.0846

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรด ของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 12% ที่ใช้ระยะเวลาทั้งหมดในการศึกษานาน 70 วัน

Cycle	Acidity เริ่มต้น (%)	Acidity สุดท้าย (%)	Acidity ที่สร้าง (%)	ระยะเวลาที่สร้างกรด (Day)	ETA (%/Day)	ปริมาณเซลล์แห้ง (g/L)
Start up	7	7.2	0.20	28	0.01	0.0111
1	6.93	7.77	0.83	21	0.04	0.0104
2	6.9	7.9	1.00	21	0.05	0.0165
3	6.93	8.4	1.47	28	0.05	0.0200
Average				23	0.05	0.0156

ตารางที่ 4.10 แสดงค่า Acetification rate (ETA) และระยะเวลาในการสร้างกรด ของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 12% และมีการเติม 0.15% $CaCl_2$ ที่ใช้ระยะเวลาทั้งหมดในการศึกษานาน 70 วัน

Cycle	Acidity เริ่มต้น (%)	Acidity สุดท้าย (%)	Acidity ที่สร้าง (%)	ระยะเวลาที่สร้างกรด (Day)	ETA (%/Day)	ปริมาณเซลล์แห้ง (g/L)
Start up	7.1	7.4	0.30	21	0.01	0.0734
1	7.1	7.9	0.80	21	0.04	0.0750
2	6.93	8.6	1.67	28	0.06	0.0865
3	6.93	8.63	1.70	21	0.08	0.0900
Average				23	0.06	0.0838

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

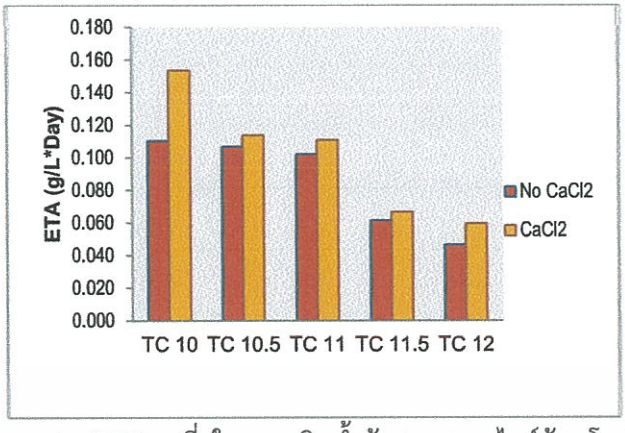
ตารางที่ 4.11 แสดงค่าเฉลี่ย Acetification rate (ETA) ระยะเวลาในการสร้างกรด และปริมาณเซลล์แห้งของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ความเข้มข้นทั้งหมด 10%, 10.5%, 11%, 11.5% และ12% ทั้งในสภาวะที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ และในสภาวะที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ ที่ใช้ระยะเวลาทั้งหมดในการศึกษานาน 70 วัน

Sample	ระยะเวลาที่สร้างกรดเฉลี่ย (Day)	ETA (%/Day)	ปริมาณเซลล์แห้ง (g/L)
rice wine vinegar TC 10	9	0.11	0.0780
rice wine vinegar TC 10 + 0.15% $CaCl_2$	9	0.15	0.1668
rice wine vinegar TC 10.5	10	0.11	0.0697
rice wine vinegar TC 10.5 + 0.15% $CaCl_2$	9	0.11	0.1492
rice wine vinegar TC 11	12	0.10	0.0645
rice wine vinegar TC 11 + 0.15% $CaCl_2$	10	0.11	0.1086
rice wine vinegar TC 11.5	18	0.06	0.0353
rice wine vinegar TC 11.5 + 0.15% $CaCl_2$	14	0.07	0.0846
rice wine vinegar TC 12	23	0.05	0.0156
rice wine vinegar TC 12 + 0.15% $CaCl_2$	23	0.06	0.0838

4.2 ผลการศึกษาการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกของเชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* WK ในสภาวะต่างๆ

จากผลการศึกษาการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกของเชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* WK ในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi Continuous Fermentation Process) ที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมดต่างกัน 5 ระดับ โดยทำการศึกษาปัจจัยที่สำคัญในการสร้างกรดอะซิติกได้ผลการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 4.1-4.11 พบว่าที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมด 12% จะมี %Acidity มากที่สุดและที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมด 11.5% 11% 10.5% และ 10% จะมี %Acidity น้อยลงตามลำดับ ซึ่งที่ความเข้มข้นทั้งหมด 12% จะใช้ระยะเวลาในการหมักมากที่สุด แต่ที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมด 10% ใช้ระยะเวลาในการหมักน้อยที่สุด ทำให้ที่ระดับความเข้มข้น 10% สามารถผลิตกรดอะซิติกได้จำนวนรอบที่มากที่สุด และที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมด 12% จะใช้เวลาในการลด %Alcohol นานที่สุด ระยะเวลาในการหมักจึงมากที่สุด ทำให้ในระยะเวลา 70 วัน การหมักน้ำส้มสายชูไวน์ข้าวที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมด 12% มีจำนวนรอบในการผลิตกรดอะซิติกน้อยที่สุด และที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมด 11.5% 11% 10.5% และ 10% จะมีจำนวนรอบในการผลิตมากขึ้นตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 ค่า Acetification rate (ETA) เฉลี่ยในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว โดยเปรียบเทียบระหว่างระดับความเข้มข้นทั้งหมด (TC) 10%, 10.5%, 11%, 11.5% และ 12% ซึ่งมีการเติม 0.15% $CaCl_2$ และไม่มีการเติม $CaCl_2$ ในระยะเวลา 70 วัน

เมื่อนำ %Acidity และระยะเวลาในการหมักหาค่า Acetification rate (ETA) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นที่สูงใช้ระยะเวลาในการหมักนาน จะมีผลให้ค่า ETA ต่ำลง เพราะฉะนั้นที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมด 12% จะมีค่า ETA น้อยที่สุด และที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมด 11.5% 11% 10.5% และ 10% มีค่า ETA ลดลงตามลำดับ

แต่เมื่อเปรียบเทียบ 2 สภาวะคือ เมื่อมีการเติม 0.15% $CaCl_2$ และเมื่อไม่มีการเติม $CaCl_2$ พบว่าในกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูไวน์ข้าวที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ จะมีค่า ETA เฉลี่ยของแต่ละระดับความเข้มข้นทั้งหมดมากกว่า ในกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูไวน์ข้าวที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ และปริมาณเซลล์แห้งที่ได้ก็จะมีค่ามากตามไปด้วย

4.3 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ต่อสภาวะการเจริญของแบคทีเรีย *A. aceti* WK ในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-Continuous Fermentation Process) ที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมดต่างกัน 5 ระดับ

เมื่อเปรียบเทียบผลของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ต่อสภาวะการเจริญของแบคทีเรีย *A. aceti* WK ในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-Continuous Fermentation Process) ที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมดต่างกัน 5 ระดับ โดยเปรียบเทียบ 2 สภาวะคือ เมื่อมีการเติม 0.15% $CaCl_2$ กับไม่มีการเติม $CaCl_2$ พบว่ากระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมด 5 ระดับ ในสภาวะที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ จะให้ผลไปในเชิงบวกมากกว่าเมื่อเทียบกับในสภาวะที่ไม่เติม $CaCl_2$ โดยจะสังเกตได้จากปริมาณเซลล์แห้ง (g/l) ของเมื่อเติม 0.15% $CaCl_2$ มีค่ามากกว่าเมื่อไม่มีการเติม $CaCl_2$

ETA (%/Day) เมื่อมีการเติม 0.15% $CaCl_2$ มีค่ามากกว่าเมื่อไม่เติม $CaCl_2$ และมีระยะเวลาในการสร้างกรดเฉลี่ย (Day) ของเมื่อเติม 0.15% $CaCl_2$ ที่ใช้ระยะเวลาสั้นกว่าเมื่อไม่เติม $CaCl_2$ เมื่อเทียบในสภาวะเดียวในแต่ละระดับความเข้มข้นทั้งหมดจะพบว่าระดับความเข้มข้นทั้งหมดที่น้อยกว่าจะทำให้มีปริมาณเซลล์แห้งและ ETA ที่สูงกว่าที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมดสูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในส่วนของระยะเวลาที่สร้างกรดเฉลี่ยพบว่าเมื่อมีการเติม 0.15% $CaCl_2$ ลงไปในที่ระดับความเข้มข้น 10% และ 12% พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน แต่ที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมด 10.5% 11% และ 11.5% ผลของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) มีผลทำให้ระยะเวลาที่สร้างกรดเฉลี่ยสั้นลงกว่าเมื่อไม่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)

4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase (ADH) และ Aldehyde dehydrogenase (ALDH) ต่อการสร้างกรดอะซิติกในสภาวะต่างๆ

จากการติดตามผลกิจกรรมของเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase (ADH) และ Aldehyde dehydrogenase (ALDH) ที่ได้จากการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวด้วยหัวเชื้อทนกรด *A. aceti* WK ที่ 2 สภาวะ ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ และไม่มีการเติม $CaCl_2$ พบว่าในสภาวะที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ มีกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าในสภาวะที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ ในที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมดของทั้งสองสภาวะ เมื่อมีความเข้มข้นทั้งหมดมากขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์ ADH และ ALDH จะมีปริมาณลดลงตามลำดับ ดังตารางที่ 4.12 ซึ่งการลดลงของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะสอดคล้องกับ ETA ปริมาณเซลล์แห้ง โดยคาดว่าเมื่อมีระดับความเข้มข้นทั้งหมดที่มากขึ้น ทำให้เชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* WK มีสภาพเครียดมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นทั้งหมดที่สูงขึ้น และความเข้มข้นทั้งหมดที่สูงขึ้นมีผลเชิงลบต่อกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูไวน์ข้าวในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-Continuous Fermentation Process) จึงทำให้เมื่อความเข้มข้นทั้งหมดที่มากขึ้น ETA ปริมาณเซลล์แห้ง เอนไซม์ ADH และเอนไซม์ ALDH มีค่าลดลงตามลำดับของระดับความเข้มข้นทั้งหมดที่มากขึ้น

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Alcohol Dehydrogenase และ Aldehyde Dehydrogenase ที่ได้จากการผลิตน้ำส้มสายสายชูจากไวน์ข้าวด้วยหัวเชื้อทนกรด *A. aceti* WK

Sample	ADH Activity (Unit/ml)	ALDH Activity (Unit/ml)
rice wine vinegar TC10	0.6295	1.1080
rice wine vinegar TC10 + 0.15% $CaCl_2$	1.1620	1.5207
rice wine vinegar TC10.5	0.6295	1.1080
rice wine vinegar TC10.5 + 0.15% $CaCl_2$	1.1447	1.4588
rice wine vinegar TC11	0.6171	0.9902
rice wine vinegar TC11 + 0.15% $CaCl_2$	1.0952	1.3475
rice wine vinegar TC11.5	0.4990	0.9642
rice wine vinegar TC11.5 + 0.15% $CaCl_2$	0.8540	1.3351
rice wine vinegar TC12	0.4248	0.8033
rice wine vinegar TC12 + 0.15% $CaCl_2$	0.6685	1.0643

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากการศึกษากระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวความเข้มข้นทั้งหมดสูงภายใต้สภาวะการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-Continuous Fermentation Process) เพื่อศึกษาผลของ $CaCl_2$ ต่อการสร้างกรดความเข้มข้นสูงด้วยหัวเชื้อทนกรด *A. aceti* WK ที่มีการควบคุมการให้อากาศและหมักที่อุณหภูมิห้อง ทำการเปรียบเทียบการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมด (Total Concentration; TC) 10% (Acidity เริ่มต้น 5%, Alcohol เริ่มต้น 5%) , 10.5% (Acidity เริ่มต้น 5.5%, เริ่มต้น Alcohol 5%), 11% (Acidity เริ่มต้น 6%, Alcohol เริ่มต้น 5%), 11.5% (Acidity เริ่มต้น 6.5%, เริ่มต้น Alcohol 5%) และ 12% (Acidity เริ่มต้น 7%, Alcohol เริ่มต้น 5%) โดยที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมดต่างๆ จะแบ่งออกเป็น 2 สภาวะ คือ ในสภาวะที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ และในสภาวะที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ ทำการติดตามผลทุกๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 70 วัน จากการทดลองติดตามผลของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวในสภาวะที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ พบว่าน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวความเข้มข้นทั้งหมด 10% ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ สามารถผลิตกรดได้ 0.15 %/day มีปริมาณเซลล์แห้ง 0.1668 g/l มีระยะเวลาในการหมักเฉลี่ย 9 วัน ซึ่งเป็นค่าที่ดีที่สุด น้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวความเข้มข้นทั้งหมด 10.5% ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ สามารถผลิตกรดได้ 0.11 %/day มีปริมาณเซลล์แห้ง 0.1492 g/l มีระยะเวลาในการหมักเฉลี่ย 9 วัน น้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวความเข้มข้นทั้งหมด 11% ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ สามารถผลิตกรดได้ 0.11 %/day มีปริมาณเซลล์แห้ง 0.1086 g/l มีระยะเวลาในการหมักเฉลี่ย 10 วัน น้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวความเข้มข้นทั้งหมด 11.5% ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ สามารถผลิตกรดได้ 0.07 %/day มีปริมาณเซลล์แห้ง 0.0846 g/l มีระยะเวลาในการหมักเฉลี่ย 14 วัน และน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวความเข้มข้นทั้งหมด 12% ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ สามารถผลิตกรดได้ 0.06 %/day มีปริมาณเซลล์แห้ง 0.0880 g/l มีระยะเวลาในการหมักเฉลี่ย 23 วัน จะเป็นค่าที่น้อยที่สุด และจากการทดลองติดตามผลของการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ พบว่าน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวความเข้มข้นทั้งหมด 10% ที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ สามารถผลิตกรดได้ 0.11 %/day มีปริมาณเซลล์แห้ง 0.0780 g/l มีระยะเวลาในการหมักเฉลี่ย 9 วัน ซึ่งเป็นค่าที่ดีที่สุด น้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวความเข้มข้นทั้งหมด 10.5% ที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ สามารถผลิตกรดได้ 0.11%/day มีปริมาณเซลล์แห้ง 0.0697 g/l มีระยะเวลาในการหมักเฉลี่ย 10 วัน น้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวความเข้มข้นทั้งหมด 11% ที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ สามารถผลิตกรดได้ 0.10%/day มีปริมาณเซลล์แห้ง 0.0645 g/l มีระยะเวลาในการหมักเฉลี่ย 13 วัน น้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวความเข้มข้นทั้งหมด 11.5% ที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ สามารถผลิตกรดได้ 0.06 %/day มีปริมาณเซลล์แห้ง 0.0353 g/l มีระยะเวลาในการหมักเฉลี่ย 18 วัน และน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวความเข้มข้นทั้งหมด 12% ที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ สามารถผลิตกรดได้ 0.05 %/day มีปริมาณเซลล์แห้ง 0.0156 g/l มีระยะเวลาในการหมักเฉลี่ย 23 วัน จะเป็นค่าที่น้อยที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเกตได้ว่าทั้งในสภาวะที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ และในสภาวะที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ เมื่อระดับความเข้มข้นทั้งหมดสูงขึ้นจะทำให้ใช้ระยะเวลาในการหมักนานขึ้น ทำให้ได้ ETA น้อยลง และมีปริมาณเซลล์แห้งน้อยลง เนื่องจากเมื่อมีระดับความเข้มข้นทั้งหมดที่สูงขึ้น สภาวะที่เชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* WK เจริญอยู่ก็จะมีสภาพที่กดดันมากขึ้น ทำให้เชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* WK มีสภาวะเครียดมากขึ้น ทำให้เชื้อ *A. aceti* WK ต้องใช้ระยะเวลาในการปรับตัว แต่เมื่อมีการเติม 0.15% $CaCl_2$ เข้าไป จะทำให้เชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* WK สามารถสร้างกรดได้ดีขึ้นกว่าไม่มีการเติม และใช้ระยะเวลาในการหมักที่เร็วกว่าเมื่อเทียบกับเมื่อไม่มีการเติม $CaCl_2$ เนื่องจาก $CaCl_2$ ช่วยในการสนับสนุนให้เชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* WK สามารถทนต่อสภาวะเครียดได้ดี ซึ่งเห็นได้จากการหมักน้ำส้มที่ความเข้มข้นทั้งหมด 12% ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ ซึ่งอยู่ในสภาวะเครียดมากที่สุด จะมีค่าใกล้เคียงกับการหมักน้ำส้มสายชูที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมด 10% เมื่อไม่มีการเติม $CaCl_2$ ที่มีสภาวะเครียดน้อยกว่าแต่ $CaCl_2$ มีผลเข้าไปช่วยให้เกิดผลในเชิงบวกต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* WK ให้ทนกับสภาวะเครียดดังกล่าว ค่าจึงออกมาใกล้เคียงกัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรหมั่นเปลี่ยนที่กรองอากาศบ่อยๆ เพื่อช่วยให้อากาศสามารถถ่ายเทได้สะดวกและควรหมั่นคอยระวังไม่ให้เมือกของเชื้อไปอุดตันสายยางที่เป็นอุปกรณ์ที่ช่วยในการให้อากาศ ซึ่งถ้าไปอุดตันจะทำให้ผลการทดลองมีค่าไม่เสถียร อาจจะทำให้ผลการทดลองเกิดการคาดเคลื่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2556. *Saccharomyces cerevisiae*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1509/*saccharomyces-cerevisiae*. เข้าถึงเมื่อวันที่ 17 พฤศจิกายน 2558

วราวุฒิ ครูส่ง. 2551. การบริหารจัดการจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหาร (Microbial Management in Food Industry). พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ:สถาบันอาหาร.

วิศนุ พันธุ์ครุ. 2556. สาโท. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://l3lackmann.blogspot.com/2013/05/blog-post.html. เข้าถึงเมื่อวันที่ 17 พฤศจิกายน 2558

Denich, T.J., Beaudette, L.A., Lee, H. and Trevors, J.T. (2003) Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J Microbiol Methods* 52, 149–182.

Gullo, M. and Giudici, P. (2008). Acetic acid bacteria in Traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter culture selection. *International Journal of Food Microbiology* 125, 46-53.

Hromatka, O. and Ebner, H. (1959). Vinegar by submerged oxidative fermentation. *Ind. Eng. Chem* 51(10), 1279-1280.

Kocher, G.S., Dhillon, H.K. and Joshi, N. (2014) Scale up ofsugarcane vinegar production by recycling of successivefermentation batches and its organoleptic evaluation. JFood Process Preserv 38, 955–963.

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

Krusong, W., Pornpukdeewatana, S. and Kerdpiboon, S. (2014). 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., Yaiyen, S. and Pornpukdeewatana, S. (2015)Impact of high initial concentrations of acetic acid andethanol on acetification rate in an internal Venturiinjector bioreactor. J Appl Microbiol 118, 629–640.

Morin, D. 2012. *Acetobacter aceti*. [Online]. Available: http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Acetobacter_aceti. เข้าถึงเมื่อวันที่ 17 พฤศจิกายน 2558

Nedjimi, B. and Daoud, Y. (2009) Ameliorative effect of $CaCl_2$ on growth, membrane permeability and nutrient uptake in Atriplex halimus subsp. schweinfurthii grown at high (NaCl) salinity. *Desalination* 249, 163–166.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

de Ory, I., Romero, L.E. and Cantero, D. (2004) Operationin semi-continuous with a closed pilot plant scaleacetifier for vinegar production. J Food Eng 63,39–45.

Pejin, J.D., Mojovi c, L.V., Pejin, D.J., Koci c-Tanackov, S.D., Savi c, D.S., Nikoli c, S.B. and Djuki c-Vukovi c, A.P. (2015) Bioethanol production from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with magnesium or calcium ions addition. *Fuel* 142,58–64.

Sengun, I. Y. and Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control* 22,647-656.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
วิธีวิเคราะห์ทางเคมีและกายภาพ

ก.1 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรด (AOAC,2000)

ก.1.1 วิธีเตรียมรีเอเจนต์

ก.1.1.1 น้ำปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ เตรียมโดยน้ำต้มกลั่น 20 นาที ปิดฝาเพื่อป้องกันไม่ให้ CO_2ละลายลงในน้ำกลั่น แล้วทิ้งให้เย็น

ก.1.1.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 N เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40 กรัม ลงในบีกเกอร์ ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลตร ด้วยน้ำกลั่นต้ม

ก.1.2 วิธีตรียมฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphtalein)

ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphtalein) 1% เตรียมโดยชั่งฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphtalein) 1 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย 95% แอลกอฮอล์

ก.1.3 วิธีทำ Standardization

ก.1.3.1 อบโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท ใช้แท่งแก้วค่อยๆกดให้ผลึกของ $KHC_8H_4O_4$ ละเอียดเป็นผงใส่ลงในขวดชั่ง วางขวดชั่งลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกนาฬิกา แล้วนำไปอบที่ 120 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

ก.1.3.2 ชั่ง $KHC_8H_4O_4$ ที่แห้งแล้วให้ได้น้ำหนักโดยละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่งให้น้ำหนักอยู่ระหว่าง 0.51-0.52 กรัม ใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นปราศจาก CO_2 50 มิลลิลิตร คนจนสารละลายหมด

ก.1.3.3 หยด 1% ฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นปราศจาก CO_2 50 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปกรวดโดยไม่ต้องเติม $KHC_8H_4O_4$ หยดฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด

ก.1.3.4 ไทเทรต blank กับสารละลาย NaOH ที่เตรียมไว้ประมาณ 2-3 หยด เมื่อถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู ให้ว่าง blank ไว้ข้างบิวเรต

ก.1.3.5 ไทเทรตกับ 1 N NaOH จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูใสจางๆ

ก.1.3.6 บันทึกปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ (ปริมาตรของNaOH ไม่ควรแต่งต่างกันเกิน 0.1 มิลลิลิตร)

ก.1.3.7 คำนวณNormality ตามสูตร

$$\text{Normality} = \frac{\text{กรัมของ } \mathbf{KHC8H4O4} \times 1000}{204.22 \times \mathbf{ml} \text{ ของ } \mathbf{NaOH}}$$

ก.1.4 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ก.1.4.1 ตวงน้ำกลั่นที่ต้มแล้ว 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพุ่ขนาด 200 มิลลิลิตร เติม 1% ฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด

ก.1.4.2 ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน1 N NaOH จนได้สีชมพูจางๆ หรือพีเอชเท่ากับ 8.2 ปริมาตรที่ไทรเทรตเป็นค่า blank และใช้เป็นสารละลายเทียบสีมาตรฐาน

ก.1.4.3 ปิเปตตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นที่ต้มแล้ว 200 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร เติม 1% ฟีนอลีฟทาลีน 1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.1.4.4 ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน 1 N NaOH เทียบสีจุดยุติให้ได้สีเดียวกับสารละลายมาตรฐาน

ก.1.4.5 ทำการไทเทรตตัวอย่างอย่างน้อย 3 ซ้ำ

ก.1.4.6 คำนวณความเป็นกรดตามสูตร

$$\text{ค่าความเป็นกรด} = \frac{(V)(N)(Eq.Wt)(100)}{(1000)(V)}$$

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน NaOH

N = นอร์มัลที่แท้จริงของสารละลายมาตรฐานNaOH

V = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้

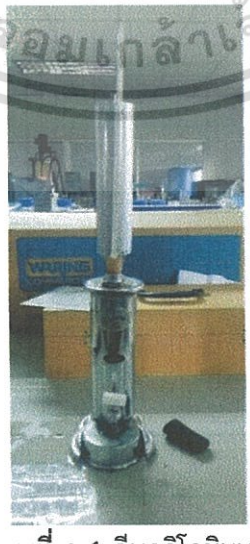
Eq.Wt = น้ำหนักสมดุลของกรดทาร์ทาริค (tartaric) = 75, มาลิค (malic)= 67, ซิตริก (citric) = 64, แลคติต (lactic) = 90, ซัลฟูริก (sulfuric) = 49,อะซิติก (aceti)=60)

ก.1.4.7 บันทึกค่าที่คำนวณได้

ก.2 วิธีการวิเคราะห์แอลกอฮอล์โดยวิธี Ebulliometricanalyssis (Zoeckein และคณะ ,1989)

2.1 หลักการ

ในการหาปริมาณแอลกอฮอล์โดยวิธีนี้อาศัยหลักการวัดจุดเดือด (boiling point) ของสารตัวอย่างที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์ โดยถ้าปริมาณของแอลกอฮอล์ในสารตัวอย่างเพิ่มขึ้นจะทำให้จุดเดือดของสารตัวอย่างลดลงจากจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์มากขึ้น เครื่องมือสำหรับวัดปริมาณแอลกอฮอล์ โดยอาศัยหลักการนี้ เรียกว่า อีบลูลิโอมิเตอร์ ซึ่งมีลักษณะตามภาพที่ ก-1 เครื่องมือนี้นิยมนำไปใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตไวน์ ไวน์ผลไม้ สุรากลั่นและอุตสาหกรรมผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์อื่นๆ เนื่องจากเป็นเครื่องมือที่ใช้ง่ายให้ความสะดวก และรวดเร็วในการวิเคราะห์



ภาพที่ ก-1 อีบลูลิโอมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 วัสดุอุปกรณ์

2.2.1 ชุดเครื่องอีบลูลิโอมิเตอร์

2.2.2 กระบอกตวง ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.3 สารเคมี

2.3.1 น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (double distilled water)

2.3.2 น้ำเย็นหรือน้ำแข็ง

2.3.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2.4 วิธีการ

2.4.1 หาจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์

1) ตวงน้ำบริสุทธิ์ 30 มิลลิลิตร หรือใช้หลอดที่มากับเครื่องมือ โดยตวงให้ถึง "EAU" ใส่ลงใน Boiling chamber

2) ใส่เทอร์โมมิเตอร์ให้ปลายอยู่เหนือน้ำใน Boiling chamber

3) ต้มจนกระทั่งเดือดด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner) เมื่อถึงจุดเดือดอุณหภูมิจะคงที่ อ่านอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์จากเทอร์โมมิเตอร์

4) นำจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์ที่อ่านได้ไปหมุนปรับค่าในแผ่นอ่านเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (Dosage de 1' Alcohol dans les Vins) โดยตั้งค่าจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์ที่อ่านได้ (สเกลด้านใน) ให้ตรงกับ 0.0% แอลกอฮอล์ (ดูสเกลด้านนอก) หรือตำแหน่งที่มีเครื่องหมาย ♂

ภาพที่ ก-2 แผ่นอ่านเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3 วิธีกรวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียโดยการวัดค่า DO ที่ 600 nm โดยใช้เครื่อง Genesys 10Vis

4.1 ลักษณะโดยทั่วไปของเครื่อง

เครื่อง Genesys 10 Vis เป็นเครื่องหาปริมาณของสารตัวอย่างโดยการเทียบสี ควบคุมการทำงานด้วยไมโครโปรเซสเซอร์ มีระบบตรวจสอบตัวเองทุกครั้งเมื่อเปิดเครื่องแหล่งกำเนิดแสงเป็นหลอดทังสแตนฮาโรเจน การกระจายลำแสงความยาวคลื่นต่างๆ ใช้ grating ชนิด 1200 เส้น ใน ระยะ 1 มิลลิเมตร สามารถเลือกความยาวคลื่นในการตรวจจับสารได้จาก 325 ถึง 1100 นาโนเมตร โดยที่ความถูกต้องในการเลือกความยาวคลื่นที่ใช้งาน ± 1 นาโนเมตร มีค่าความถูกต้องในการอ่านค่า (photometric accuracy) 0.005A มีความกว้างของลำแสงที่ใช้ในการตรวจจับสาร (spectral slit width) ไม่เกิน 5 นาโนเมตร สามารถตรวจผลการตรวจจับได้ดังนี้

- ค่าปริมาณร้อยละของแสงที่ผ่านตัวกลาง 0.3 ถึง 125 % T
- ค่าปริมาณการดูดกลืนแสง -0.1 ถึง 9999 C
- มีพลังงานแสงที่ไม่ต้องการ (stray light) ≤ 0.1% T ที่ 340และ 400นาโนเมตร มีความเบี่ยงเบน (dift) ≤ 0.2%mA/hr.หลังการอุ่นเครื่อง สัญญาณของการรบกวน(noise) ≤ 1mA ที่ 0A และ 2mA ที่ 2A ที่ความยาวคลื่น 340นาโนเมตรแสดงผลด้วยตัวเลข LCD แบบมองเห็นได้ในที่มืด ขนาดหน้าจอ กว้าง 3.8 นิ้ว ยาว 2.8 นิ้ว สามารถแสดงผลเป็นกราฟได้ มีโปรแกรมใช้งานได้โดน ตรงกับเครื่องสามารถทำได้ดังต่อไปนี้
- วัดหาค่าอัตราการดูดกลืนคลื่นแสงตามลำดับของการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นแสง (scaning)
- วัดหาค่าอัตราการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนคลื่นแสงของสารตัวอย่างตามเวลาที่เปลี่ยนไป (kinetic)
- วัดหาปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างเทียบกับสารมาตรและแสดงผลกราฟมาตรฐานได้ (standard curve)
- วัดอัตราการดูดกลืนแสงของแสงตัวอย่างที่มีความยาวคลื่นแสงต่างๆ ได้ถึง 31 ค่าต่อครั้งตัวอย่างได้ (multiwavelength)
- วัดค่าอัตราส่วนดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง (absorbance ratio)
- วัดหาค่าความแตกต่างของสารละลายที่ความยาวคลื่น 2 ค่า (absorbance difference)
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 3 ค่า (3-point net)
- มีโปรแกรมสำหรับตรวจสอบความถูกต้องของเครื่อง (performance validiation)

4.2 หลักการของการดูดกลืนแสง

เมื่อให้แสงผ่านสารละลายของสารที่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ตั้งไว้ แสงบ้างส่วนจะถูกสารดูดไว้ ทำให้แสงที่ผ่านออกจากสารละลายมีความเข้มข้นน้อยลง ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณแสงภายในเครื่องและแสดงออกมาทางหน้าปัด ที่มีสเกลบอกทั้งเปอร์เซ็นต์ที่แสงผ่าน (% Transmission) และการดูดกลืนแสง (absorbance; A) ปริมาณแสงที่ถูกดูดไว้ขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลของสารที่ดูดกลืนแสงได้ตั้งตามที่แสงผ่านซึ่งเป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's law) คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{ค่าการดูดกลืนแสง} = -\log\frac{I}{I_0} = Kcl$$

เมื่อ I_0 = ความเข้มข้นของแสง

I = ความเข้มข้นของแสงหลังผ่านสารละลาย

K = ค่าคงที่ของการดูดแสงซึ่งมีค่าเฉพาะสำหรับสารหนึ่งๆ และช่วงคลื่นหนึ่งๆ

c = ความเข้มข้นของสารละลาย

l = ระยะทางที่แสงผ่านสารละลาย

ค่า K อาจกำหนดเป็น $E_{1\%}$ 1 cm คือ เป็นการดูดกลืนแสงของสารละลายของสารที่มีความเข้มข้น1 เปอร์เซ็นต์ และความยาวของระยะทางที่แสงผ่าน 1 cm หรือกำหนดเป็น EM หรือสัมประสิทธิการดูดกลืนแสง M คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีความเข้มข้น 1 $gmoll^{-1}$ และความยาวของระยะทางที่แสงผ่าน 1 cm

นอกจากนี้การดูดกลืนแสงของสารอาจแสดงได้เป็นเปอร์เซ็นต์ที่แสงผ่าน ตามสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์แสงผ่าน} = \frac{I}{I_0} \times 100$$

จะเห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงกับค่าเปอร์เซ็นต์แสงผ่าน ตรงกันข้ามกัน คือ ค่าการดูดกลืนแสง 0หน่วยเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และค่าการดูดแสง $\propto$ เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ แสงผ่านสเกลค่าดูดกลืนแสงเป็น log ส่วนเปอร์เซ็นต์แสงผ่านเป็น linear โดยทั่วไปแล้ว มักวัดค่าดูดกลืนแสงซึ่งเป็นปฏิภาคตรง กับความเข้มข้นของสารละลาย

4.3 วิธีการใช้เครื่องมือ

4.3.1 การวัดค่าดูดกลืนและการส่องผ่าน

1) กดปุ่ม A/T/C เลือกโหมดในการวัดการดูดกลืนแสง การส่องผ่าน ซึ่งจะมีตัวอักษรปรากฏหน้าจอเครื่อง

2) กดปุ่ม ▲ nm หรือ ▼nm เลือกค่าความยาวคลื่น (หากกดปุ่มค้างไว้ความยาวคลื่นจะเปลี่ยนไปอย่างรวดเร็ว)

3) ใส่ Blank (ตัวทำละลายอ้างอิง) ลงในช่องใส่สารตัวอย่างและปิดฝา (ตำแหน่งของ Cell ที่ส่องผ่านจะมีทิศทางตามลูกศร)

4) กดปุ่ม 0 ABS/100% T เพื่อตั้งค่า blank0 A หรือ 100% T

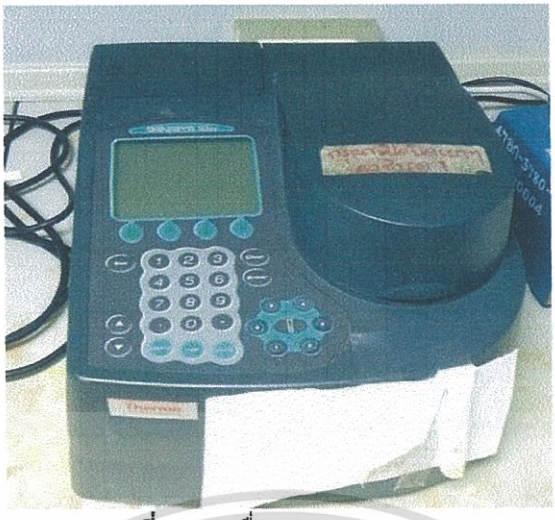
5) นำ Blank ออกและใส่ตัวอย่างไปวัด และอ่านค่าที่หน้าจอแสดงผล

4.3.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

1) ทำการเปิดเครื่อง เลือกความยาวคลื่นที่ 660 nm ใส่ Blank (น้ำหมัก 0 ชั่วโมง) กดปุ่ม 0 ABS/100% T เพื่อตั้งค่า blank 0 A หรือ 100%T

2) นำ Blank ออกและใส่ตัวอย่างไปวัด อ่านค่าแล้วบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ก-3 เครื่อง Genesys 10 Vis

ก.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ Cell dry weight โดยการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge

5.1 หลักการทำงานของเครื่องหมุนเหวี่ยง

การเหวี่ยงทำให้เกิดแรงหนีศูนย์กลางขึ้น ทำให้วัตถุหรือสารละลายตกตะกอนลงสู่ก้นหลอดเหวี่ยงได้ อัตราเร็วของการตกตะกอนจะขึ้นอยู่กับขนาดและความหนาแน่นของโมเลกุลของสาร นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับแรงหนีศูนย์กลางที่ใช้เหวี่ยงอีกด้วย โดยทั่วไปเครื่องหมุนเหวี่ยงแต่ละชนิดมักแสดงสเกลของแรงเหวี่ยงที่หน้าปัดเป็นอัตราเร็วของหัวหมุนเหวี่ยง มีหน่วยเป็นรอบต่อนาที (Revolution per minute,RPM) แต่ในขั้นตอนการทดลองที่ปรากฏในเอกสารวิชาการทั่วไป อาจกำหนดเป็นค่าของแรงหนีศูนย์กลางมีหน่วยเป็นจำนวนเท่าของแรงดึงดูดของโลก (g) หรือแรงหนีศูนย์กลาง เปรียบเทียบเป็นจำนวนเท่าของแรงดึงดูดโลก (Relative centrifugal force, RCF) เช่น RCF เท่า 1000xg หมายความว่า ปั่นตกตะกอนสารด้วยแรง 1000 เท่า ของแรงดึงดูดโลก ซึ่งมีค่าต่างๆจะสัมพันธ์ตามสมการดังนี้

$$\text{แรงหนีศูนย์(คิดเป็นเท่าของแรงดึงดูดโลก)} = 4\pi^2(\text{RPM})^2 \cdot r$$

เมื่อ RPM = อัตราเร็วการหมุนเหวี่ยงคิดเป็นรอบต่อนาที

r = ระยะห่างจากจุดศูนย์ของแกนหมุนถึงอนุภาคสาร มีหน่วยเป็น cm

RCT = G/g

g = ความเร่งเนื่องจากแรงดึงดูดของโลกซึ่งมีค่าเท่ากับ 980 cm/sec^{2-}

5.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1) นำตัวอย่างใส่ลงในหลอดเหวี่ยง 6 หลอด หลอดละ 50 ml ปิดฝาให้สนิท นำหลอf เหวี่ยงทั้ง 6 หลอด ใส่ลงในกระบอกโลหะสำหรับบรรจุหลอดเหวี่ยงอีกที่หนึ่ง จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Centrifuge ตั้งค่าความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

2) ทำการเปิดเครื่อง Centrifuge ตั้งค่าความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) เมื่อครบ 20 นาที จะได้ของเหลวใสแยกส่วนกับตะกอนเซลล์อยู่ โดยส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์ตกอยู่ที่ก้นหลอดและส่วนใสจะอยู่ด้านบน

4) เทส่วนใสออก ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำสเตอร์ แล้วเติมน้ำสเตอร์ให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 50 ml

5) นำไป Centrifuge อีกครั้งที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที

6) นำตะกอนที่ได้เทลงบน cans ที่ทราบน้ำหนักแน่นนอน จากนั้นนำไปอบจนได้น้ำหนักที่คงที่

7) นำไปหาน้ำหนักของเซลล์แห้งโดยคำนวณจาก น้ำหนัก cans หลังจากอบ – น้ำหนัก cans ก่อนอบ

ภาพที่ ก-4 เครื่อง Centrifuge

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อ

ข.1 สารอาหาร

ประกอบด้วย

1.1 0.1% glucose

1.2 0.05% Yeast Extract

1.3 0.05% DAP

1.4 0.02% $MgSO_4$

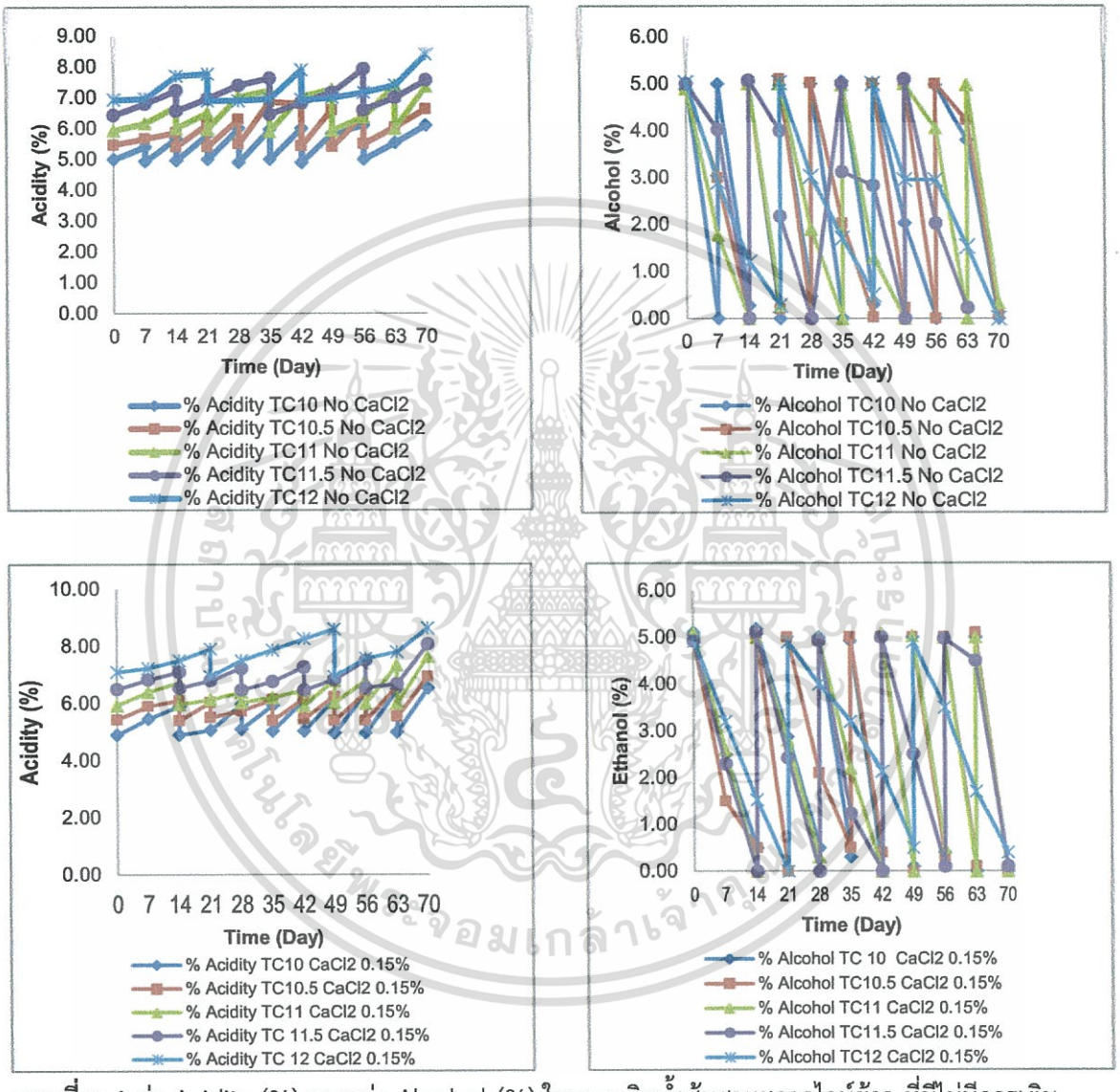
1.5 0.15% $CaCl_2$

ดึงน้ำหมักออกมาบางส่วนเพื่อนำมาละลายสารอาหารทั้งหมด เมื่อสารอาหารละลายเข้ากับน้ำหมักแล้วจึงเติมลงไปในดูแรน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
ข้อมูลการทดลอง

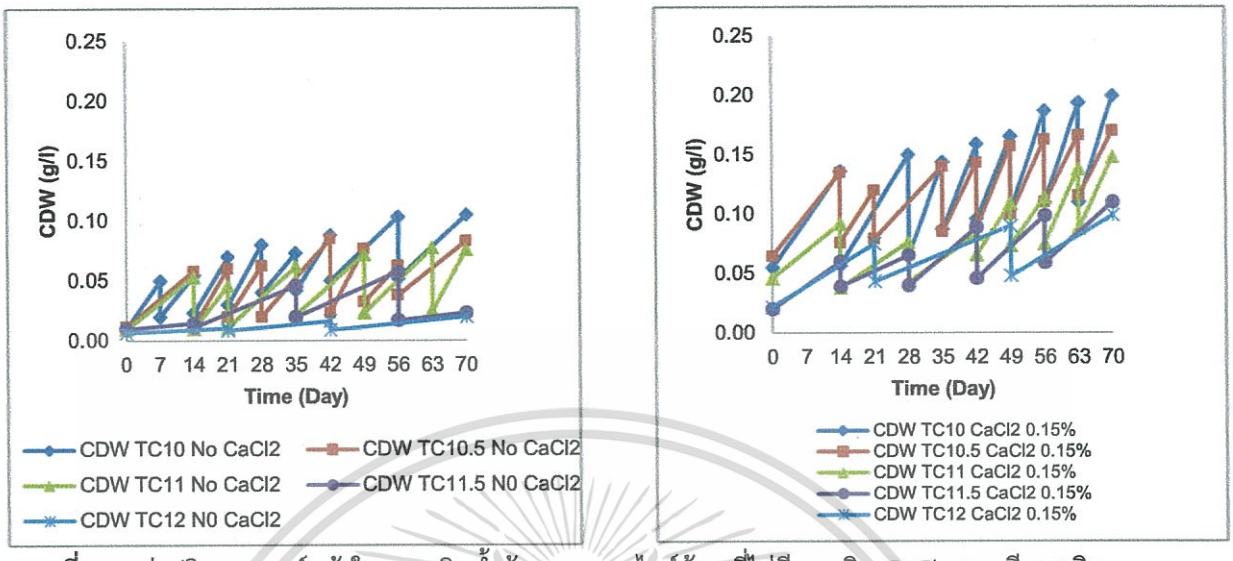
ค.1 ผลวิเคราะห์ ค่า Acidity(%) และ ค่า Alcohol(%)



ภาพที่ ค-1 ค่า Acidity (%) และ ค่า Alcohol (%) ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว ที่มีไม่มีการเติม $CaCl_2$ และมีการเติม 0.15% $CaCl_2$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.2 ผลวิเคราะห์ ค่าปริมาณเซลล์แห้งในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว



ภาพที่ ค-2 ค่าปริมาณเซลล์แห้งในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว ที่ไม่มีการเติม $CaCl_2$ และมีการเติม 0.15% $CaCl_2$

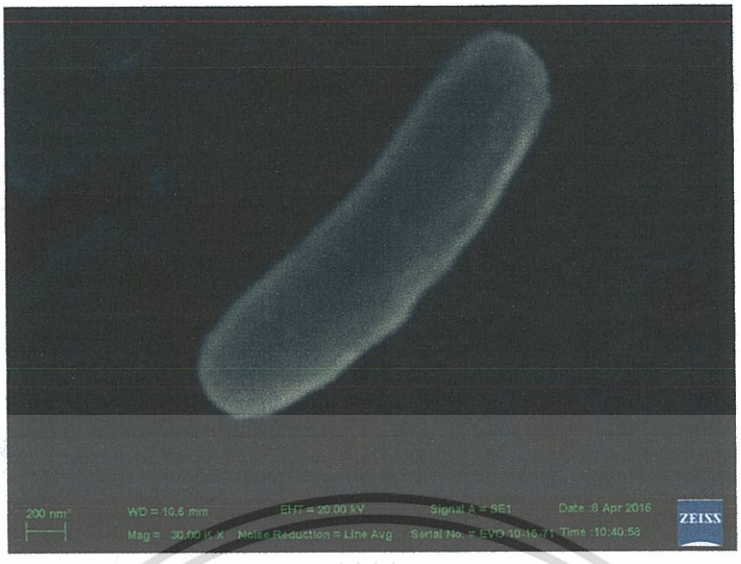
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
รูปภาพประกอบปัญหาพิเศษ

ภาพที่ ง-1 การผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวในขวด Durant ขนาด 2 ลิตร โดยใช้ *Acetobacer aceti* WK เป็นหัวเชื้อ

ภาพที่ ง-2 เซลล์ *Acetobacer aceti* WK ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว ความเข้มข้นทั้งหมด 10% (TC10) ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ กำลังขยาย 30000X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ง-3 เซลล์ *Acetobacer aceti* WK ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว ความเข้มข้นทั้งหมด 10.5% (TC10.5) ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ กำลังขยาย 30000X

ภาพที่ ง-4 เซลล์ *Acetobacer aceti* WK ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว ความเข้มข้นทั้งหมด 11% (TC11) ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ กำลังขยาย 30000X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ง-5 เซลล์ *Acetobacer aceti* WK ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว ความเข้มข้นทั้งหมด 11.5% (TC11.5) ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ กำลังขยาย 30000X

ภาพที่ ง-6 เซลล์ *Acetobacer aceti* WK ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว ความเข้มข้นทั้งหมด 12% (TC12) ที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ กำลังขยาย 30000X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวเทียมรพี สุภาพรม
วัน เดือน ปี เกิด	26 ธันวาคม 2536
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาจากโรงเรียนมัธยมวัดหนองจอก
	ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
	หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	บริษัท ส.ขอนแก่น ฟู้ดส์ จำกัด มหาชน
และผลงานวิจัย	ผลของ $CaCl_2$ ต่อการสร้างกรดความเข้มข้นสูงด้วยหัวเชื้อทนกรด *Acetobacter aceti WK*
ชื่อ-นามสกุล	นางสาวนิสากร ศรีคำ
วัน เดือน ปี เกิด	10 พฤษภาคม 2537
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาจากโรงเรียนนวมินทราชินูทิศ
	หอวัง นนทบุรี
	ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
	หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	บริษัท การบินไทย จำกัด มหาชน
และผลงานวิจัย	ผลของ $CaCl_2$ ต่อการสร้างกรดความเข้มข้นสูงด้วยหัวเชื้อทนกรด *Acetobacter aceti WK*
ชื่อ-นามสกุล	นางสาวมณีรัตน์ แซ่ลิ้ม
วัน เดือน ปี เกิด	3 มกราคม 2537
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาจากโรงเรียนบางกะปิ
	ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
	หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	บริษัท กรีนสปอต จำกัด
และผลงานวิจัย	ผลของ $CaCl_2$ ต่อการสร้างกรดความเข้มข้นสูงด้วยหัวเชื้อทนกรด *Acetobacter aceti WK*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้