ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง การผลิตน้ำส้มสายชูกลั่นโดยใช้สุราขาวเจือจางและแอลกอฮอล์

(THE USES OF WHITE SPIRIT AND ALCOHOL IN DISTILLED VINEGAR PRODUCTION)

โดย นายราเชนทร์ สุริยะสารพงศ์

ได้รับพิจารณาเห็นชอบจาก...

..... ๒../๒../๒๙ อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ
( )

..../.../.. กรรมการของภาควิชา
( )

..... ๒../๖../๒๙ กรรมการของภาควิชา
( )

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

.....
( )
หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ ๒ เดือน ..... พ.ศ. ๒๕๒๙

ปพ.
ร 43ฯก
๒๕๒๙

13888

ปัญหาพิเศษ (45497)

เรื่อง

การผลิตน้ำส้มสายชูกลั่นโดยใช้สุราขาวเจือจางและแอลกอฮอล์

(THE USES OF WHITE SPIRIT AND ALCOHOL IN

DISTILLED VINEGAR PRODUCTION)

T097108

โดย

นายราเชนทร์ สุริยะสารพงศ์

เสนอ

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

พ.ศ. 2529

ปพ.
ส437ก
2529

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 97108
วัน.เดือน.ปี.....

บทคัดย่อ

ในการทดลองผลิตน้ำส้มสายชูกลั่นโดยใช้ 75% ETHANOL และสุราขาวเจือจางกับเชื้อที่ทดลองคือ ACETOBACTER ACETIC 103 โดยหมักในสูตรอาหารต่าง ๆ จำนวน 6 สูตร ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญของแต่ละสูตรดังนี้

สูตรที่ 1 มี YEST EXTRACT, $MgSO_4$, K_2HPO_4 or KH_2PO_4

สูตรที่ 2 มี $(NH_4)SO_4$, KH_2PO_4 K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$

สูตรที่ 3 มี $(NH_4)_2SO_4$, YEST EXTRACT, TRYPTONE, LIVER EXTRACTS

สูตรที่ 4 มี CASEIN HYDROLYSATE, YEST EXTRACTS TRYPTONE, LIVER EXTRACTS

สูตรที่ 5 มี $(NH_4)SO_4$, CASEIN EXTRACTS, YEST EXTRACTS, TRYPTONE, LIVER EXTRACTS

สูตรที่ 6 มี COCOUNT WATER (ในภาคผนวก)

จากการทดลองครั้งแรก 6 สูตร ปรากฏว่ามีอยู่ 2 สูตรคือสูตรที่ 3 และ 5 ไม่มีปฏิกริยาใด ๆ เกิดขึ้นในการสร้างกรดเลย และเนื่องจากการทดลองครั้งแรกสารบางตัวยังไม่ครบ เช่น CASEIN HYDROLYSATE ในสูตรที่ 4 เป็นต้น ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองครั้งที่สองโดยคิดสูตรที่ 3และ 5 ออก เหลือการทดลอง 4 สูตร คือสูตรที่ 1,2,4 และ 6

จากการทดลองเมื่อสิ้นสุดการหมักในอาทิตย์ที่ 3 ผลปรากฏว่าสูตรที่ 1 และ 6 ให้ผลการผลิตกรดอะซิติกได้ดี

โดยสูตร 1 A ให้เปอร์เซ็นต์กรด = 3.83

1 B ให้เปอร์เซ็นต์กรด = 6.13

6 A ให้เปอร์เซ็นต์กรด = 6.07

6 B ให้เปอร์เซ็นต์กรด = 5.11

สำหรับสูตรที่ 2และ 4 ปรากฏว่ามีปฏิกริยาในการสร้างกรดน้อยมากแทบไม่มีผลตอบแทนในการทดลองเลย

โดยสูตร 2 A ให้เปอร์เซ็นต์กรด = .06

สูตรที่ 2B ให้เปอร์เซนต์กรด 0.03

4A ให้เปอร์เซนต์กรด 0.36

4B ให้เปอร์เซนต์กรด 3.94

และสูตรใดก็ตามที่มีการสร้างกรดเพิ่มขึ้นความขุ่นจะเพิ่มขึ้นด้วย

คำนิยม

ปัญหาพิเศษเรื่องนี้สำเร็จลงได้โดยได้รับคำแนะนำและความช่วยเหลือจาก อาจารย์ อนงค์ วรอุไร อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ อาจารย์ วราวุฒิ ครูส่ง อาจารย์ที่สอนทางด้านการหมักโดยตรง คุณรสสุคนธ์ เหล่าไพบูลย์ ผู้ช่วยนักวิจัย ศึกษาชีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ คณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร และคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง ทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้ลุล่วงด้วยดี

จึงใคร่ขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ. โอกาสนี้

(ราเชนทร์ สุริยะสารพงศ์)

13 กุมภาพันธ์ 2529

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์	17
สารเคมี	18
วิธีการทดลอง	19
ผลและวิจารณ์	28
สรุป	30
เอกสารอ้างอิง	31
ภาคผนวก	33

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของบักเตรีสกุล Gluconobacter, Acetobacter และ Pseudomonas	9
2	แสดงผลการหมักน้ำส้มสายชู	25
3	แสดงค่า pH ของแต่ละสูตรที่เวลาต่าง ๆ	26

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงขั้นตอนในการศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูกลั่น โดยใช้สุราขาว และแอลกอฮอล์	20
2	แสดงปริมาณการสร้างกรดอะซิติก	27
3	แสดงค่า pH	27

คำนำ

น้ำส้มสายชูเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการปรุงแต่งอาหารน้ำส้มสายชู (Vinegar) มาจากคำว่า Vin + aigre ซึ่งเท่ากับ wine + sour หรือ Sharp คือมาจากคำว่า Sour wine นั่นเองน้ำส้มสายชูปกติแล้วจะมีปริมาณกรดน้ำส้ม คือ Acetic acid ประมาณ 4 % คือ 4 แกรมของ Acetic Acid ใน 100 ซีซีของน้ำส้มสายชู

สำหรับน้ำส้มสายชูประเทศไทยเริ่มผลิตเป็นระดับอุตสาหกรรมเมื่อปี 2483 แต่คุณภาพยังไม่ดีพอที่จะส่งไปจำหน่ายต่างประเทศได้จนปัจจุบันน้ำส้มสายชูมีการพัฒนาปรับปรุงไปมาก ซึ่งน้ำส้มสายชูนั้นนักวิทยาศาสตร์ได้แบ่งเป็น 3 ชนิด ตามขั้นตอนการผลิต คือ น้ำส้มสายชูกลั่น น้ำส้มสายชูหมัก น้ำส้มสายชูเทียม จากทั้ง 3 ชนิด น้ำส้มสายชูกลั่นนับว่ามีบทบาทสำคัญมากในปัจจุบัน สำหรับโรงงานผลิตน้ำส้มสายชูกลั่น ก็เช่นที่องค์การผลิตอาหารสำเร็จรูป อ. บ้านโป่ง จ. ราชบุรี โดยใช้วัตถุดิบ คือเอธิลอัลกอฮอร์บริสุทธิ 95% ซึ่งมีโรงงานผลิตที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา น้ำส้มสายชูกลั่นนับว่ามีบทบาทสำคัญต่อการบริโภคของมนุษย์เราในปัจจุบัน การทำน้ำส้มสายชูกลั่นก็โดยการนำน้ำส้มสายชูที่ได้จากการนำเอาแอลกอฮอร์กลั่นเจือจางหรือสุราขาวเจือจางมาหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชู น้ำส้มสายชูที่ได้สามารถนำมารับประทานได้ทันที เพราะสะอาดไม่มีตะกอน

ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับทางด้านการผลิตน้ำส้มสายชูกลั่นให้มีคุณภาพดีขึ้น เพื่อยกระดับมาตรฐานการบริโภคน้ำส้มสายชูของประชาชนให้สูงขึ้น พยายามหาความเหมาะสมและวิธีการที่จะลดต้นทุนในการผลิต เพื่อราคาจำหน่ายจะได้ถูกกว่าเดิม ทำให้มีการผลิตน้ำส้มสายชูกลั่นแพร่หลายมากขึ้น มีผลให้ประชาชนโดยทั่วไปหันมาบริโภคน้ำส้มสายชูกลั่นแทนน้ำส้มสายชูเทียม ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์ในด้านความปลอดภัยของผู้บริโภคของประชาชนแล้ว ยังเป็นการส่งเสริมอุตสหกรรมที่ใช้น้ำส้มสายชูเป็นวัตถุดิบอีกด้วย

วัตถุประสงค์

1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชูกลั่น

2 เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชูกลั่น

การตรวจเอกสาร

การผลิตน้ำส้มสายชูทำกันมานานแล้ว โดยหมักจากเหล้าองุ่นที่เสียนำมาเติมด้วย Vinegar stock แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เกิดการหมักเป็นน้ำส้มสายชูเองตามธรรมชาติอย่างช้า ๆ ต่อมามีการปรับปรุงขบวนการหมักให้เร็วขึ้นด้วยการศึกษาค้นคว้าอย่างจริงจัง

Person (1822) ทำการศึกษา mother of vinegar และเป็นคนแรกที่เรียกชื่อว่า Mycoderma Kutzing (1837) รายงานว่าสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ อยู่ในเหล่าองุ่นเปรี้ยวและเป็นตัวการที่ทำให้เกิดน้ำส้มสายชูต่อมา Pasteur (1864) ยืนยันข้อสังเกตุนี้แล้วตั้งเป็นชื่อสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ นี้ว่า Mycoderma aceti และให้ข้อสังเกตุเพิ่มเติมว่าเชื้อตัวนี้จะเจริญบนอาหารที่มีเกลือแร่เฉพาะอย่างเท่านั้นความรู้เกี่ยวกับบักเตรีที่ผลิตน้ำส้มสายชูนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นด้วยการค้นคว้าเพิ่มเติมของ Honsen (1879), Hennenberg (1898) Hoyer (1898) และ Beizerinch (1900) ในเรื่องความต้องการ O_2 และรูปร่างลักษณะของเชื้อ Bertrand (1904) เสริมความรู้ด้านชีวเคมีในการสร้างกรดอะซิติค Visser't Hooft (1925) สามารถบ่งชี้ลักษณะเฉพาะของบักเตรีผลิตกรดอะซิติคได้ซึ่งนิยมใช้กันมากในยุโรปมีผู้แต่งหนังสือกล่าวถึงประวัติและวิธีการผลิตน้ำส้มสายชูอย่างสมบูรณ์ ในอเมริการมีผู้แต่งหนังสือเกี่ยวกับน้ำส้มสายชูออกมาเช่นกัน เช่นหนังสือชื่อ Industrial Microbiology และ Industrial Fermentation ต่างก็มีบทหนึ่งที่กล่าวถึงการผลิตน้ำส้มสายชูอย่างละเอียด การผลิตน้ำส้มสายชูพัฒนาการมาเรื่อย ๆ ควบคู่กับการศึกษาทดลอง แม้จะมีเครื่องหมักน้ำส้มสายชูที่เรียกว่า Shavings Generator แล้วยังมีอุปสรรคอีกมากจึงมีการพัฒนาค้นการหมักแบบ Submerged Fermentation สามารถผลิตน้ำส้มสายชูได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงและแน่นอนโดยควบคุมการหมักให้เป็นไปตามความต้องการได้ดี Hromatka และ Ebner (1949) เป็นผู้ทำการศึกษาปัญหาและความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ในการผลิตน้ำส้มสายชูแบบใหม่นี้อย่างจริงจัง Frings (1954) เป็นผู้นำความรู้จากข้อมูลที่ได้มาใช้ในการผลิตขั้นอุตสหกรรมได้สำเร็จ โดยสร้างเครื่องหมักน้ำส้มสายชูชนิดใหม่ขึ้นเรียกว่า Acetator Cohee และ Steffan (1959) สามารถผลิตน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่องโดยใช้วิธีการ Submerged Fermentation นี้ได้สำเร็จ

การเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่จะใช้ในการหมัก

บักเตรีในธรรมชาติมีหลายชนิดที่สามารถผลิตกรดอะซิติก จากสารละลายวัตถุดิบที่มีอัลกอฮอล์ บักเตรีเหล่านี้นักวิทยาศาสตร์ได้ให้ชื่อ จีนัส ไว้หลายแบบด้วยกัน เช่น - Mycoderma

- Umbina
- Thermobacterium
- Acetobacterium
- Acetomonas
- Acetobacter
- และ Gluconobacter เป็นต้น

แต่ชื่อจีนัสที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปในปัจจุบันคือAcetobacter ซึ่งเสนอโดย Beijerinch (1900) โดยทั่วไปบักเตรีผลิตกรดอะซิติคสามารถผลิตกรดอะซิติคจากการออกซิไดส์-อัลกอฮอล์ได้ในช่วง 2-12%

การคัดเลือกชนิดของเชื้อบักเตรีเพื่อนำมาผลิตน้ำส้มสายชู นอกจากความสามารถในการผลิตกรดแล้ว ต้องคำนึงถึงวัตถุดิบและกรรมวิธีที่จะใช้ในการหมักอีกด้วย อย่างไรก็ตามเราควรเลือกใช้เชื้อที่มีความสามารถในการผลิตกรดอะซิติคได้สูงและรวดเร็ว สามารถเจริญในสูตรอาหารต่าง ๆ ได้ง่ายและไม่ควรออกซิไดส์กรดอะซิติคต่อไปได้ง่าย

การเปลี่ยนอัลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติค

การเปลี่ยนอัลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติค อาจเกิดขึ้นได้ภายใต้ภาวะปราศจากออกซิเจน แต่ต้องมีสารทำหน้าที่รับไฮโดรเจนแทน เช่นเมทิลีนบลูหรือคริโนน เป็นต้น การเปลี่ยนเอธิลอัลกอฮอล์ไปเป็นกรดอะซิติคโดยการออกซิเดชั่นเชื่อกันว่าเกิดดังนี้

1) ออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับไฮโดรเจนเปลี่ยนเอธิลอัลกอฮอล์เป็นอะซีตัลดีไฮด์ $CH_3CH_2OH + O_2 \longrightarrow CH_3CHO + H_2O$

2) อะซีตัลดีไฮดรวมกับน้ำแล้วกลายเป็นไฮเดรทอัลดีไฮด์ $CH_3CHO + H_2O \longrightarrow CH_3C(H)(OH)_2$

3) ไฮเดรทอัลดีไฮด์ ให้ไฮโดรเจน 2 อะตอมแก่ออกซิเจนแล้วกลายเป็นกรดอะซิติค $CH_3C(H)(OH)_2 + O_2 \longrightarrow CH_3COOH + H_2O$

ตามทฤษฎีเอธิลอัลกอฮอล์บริสุทธิ์ 1 ลิตร ถูกออกซิไดส์แล้วได้กรดอะซิติค 1.036 กรัมน้ำ 313 กรัม ฉะนั้นถ้าน้ำหมักมีอัลกอฮอล์โดยปริมาตร 10 % จำนวน 1000 ลิตร ตามทฤษฎีแล้วจะได้น้ำส้มสายชู 1030 ลิตร ซึ่งมีกรดอะซิติคอยู่ 103.6 ก.ก.แต่ในทางปฏิบัติถือว่าอัลกอฮอล์ 1 % โดยปริมาตรเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติค 1 กรัมต่อ 100 มล. ปฏิกริยาการเปลี่ยนอัลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติคเป็นปฏิกริยาการคลายความร้อน ความร้อนที่เกิดจากการที่ออกซิไดซ์อัลกอฮอล์ 1ลิตร ไปเป็นกรดอะซิติคมีค่าเป็น 2019 กิโลคาลอรี่ กรดอะซิติคในน้ำส้มสายชูอาจลดลำนวนลงได้เนื่องจากเชื้อบักเตรีขาวสายพันธุ์สามารถออกซิไดส์กรดอะซิติคต่อไปเป็นคาร์บอนไอออกไซด์และน้ำได้ดังสมการ $CH_3COOH + 2O_2 \longrightarrow 2CO_2 + 2H_2O$

ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์มีความสำคัญต่อการหมักเราต้องจัดระบบแอลกอฮอล์ให้มีความเข้มข้นประมาณ 10-13 % ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดน้ำส้มแต่ไม่นิยมให้แอลกอฮอล์สูงกว่า 14 % ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกริยาจะ Incomplete Oxidation แต่ในทำนองเดียวกันก็ไม่ควรให้เปอร์เซ็นต์ของแอลกอฮอล์ต่ำกว่า 10 % เพราะว่าจะทำให้เกิดความเสียปริมาณของน้ำส้มสายชูที่จะเกิดขึ้นปฏิกริยาที่ต้องระวัง คือปฏิกริยาที่ Acetic acid อาจจะรวมตัวกับอ๊อกซิเจนที่มีอยู่กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำไป คือหมายความว่าอ๊อกซิเจนมีมากเกินไปไม่สมดุลย์กับปริมาณของแอลกอฮอล์ด้วยเหตุนี้อ๊อกซิเจนจึงเลยไปทำปฏิกริยากับ Acetic Acid ที่เกิดขึ้นแล้ว ฉะนั้นหลักจึงมีอยู่ว่าปริมาณของแอลกอฮอล์จะต้องมีความเข้มข้นอยู่ในระยะที่กำหนดให้ การที่เติมอ๊อกซิเจนไปจะต้องมีปริมาณของอ๊อกซิเจนสมดุลย์กับปริมาณของแอลกอฮอล์ถ้าหากมีแอลกอฮอล์น้อยเกินไปอากาศหรืออ๊อกซิเจนจะทำปฏิกริยากับกรดอะซิติคแทนทำให้ปริมาณของน้ำส้มที่ควรจะได้เกิดขึ้นน้อยไป

<u>บักเตรีซึ่งสามารถผลิตกรดอะซิติคจากเอทธานอล</u>

De Ley และ Frateur (1974a,b) รายงานว่าบักเตรีกรดอะซิติค (acetic acid bacteria) มีลักษณะเซลล์กลม รี จนถึงรูปร่างเป็นท่อนการเรียงตัวของเซลล์มีหลายลักษณะอาจพบเซลล์อยู่เดี่ยว ๆ เป็นคู่เรียงตัวเป็นสายยาวหรือสายสั้น ๆ แตกต่างกันตามชนิด (Species)ไม่พบเอนโดสปอร์ (endospore) เซลล์ติดสี Gramnegative แต่เมื่อเซลล์อายุมากจนอาจพบ (Gram variable) บางลักษณะสำคัญที่สุดคือต้องการอ๊อกซิเจนเป็นอย่างยิ่งในการอ๊อกซิไดส์เอทธานอลให้เป็นกรดอะซิติค แล้วสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดอะซิติคตั้งแต่ 2-11 เปอร์เซ็นต์ (Rhodes และ Fletcher,1966.,Stanier-และคณะ 1976)

มีบักเตรีกรดอะซิติกแบ่งออกเป็น 2 สกุลคือ Acetobacter และ Gluconobacter ซึ่งแต่เดิมเรียกว่า Acetomonas (De Ley และ Frateur,1974a,b) บักเตรีทั้ง 2 สกุล มีคุณสมบัติเหมือนกันหลายประการและมักพบอยู่ปะปนกันในถังหมักน้ำส้มสายชูตามธรรมชาติ แต่บักเตรีสกุล Gluconobacter เจริญใน สับสเตรท (Substrate) ที่มีเอทธานอลได้น้อย และมีประสิทธิภาพในการออกซิไดส์เอทธานอลเป็นกรดอะซิติกต่อนข้างต่ำ (Gibbs และ Shapton,1968-,Asai,1968) ดังนั้นในการผลิตน้ำส้มสายชูจึงมักใช้บักเตรีสกุล Acetobacter เป็นส่วนมาก แต่อย่างไรก็ตามบักเตรีสกุล Acetobacter แต่ละสายพันธุ์ก็มีประสิทธิภาพในการออกซิไดส์เอทธานอลเป็นกรดอะซิติกต่างกัน ซึ่งในการผลิตน้ำส้มสายชูจะเลือกใช้เฉพาะสายพันธุ์ที่ให้กรดอะซิติกสูงกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรเท่านั้น และเรียกบักเตรีที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูนี้ว่า เชื้อน้ำส้มสายชู

แหล่งที่พบและคุณสมบัติที่ใช้ในการแยกเชื้อ Acetobacter spp.

แหล่งที่พบ Acetobacter spp.

De Ley และ Frateur (1974b) รายงานว่าอาจพบบักเตรีกลุ่มนี้ในผักชนิดต่าง ๆ น้ำผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว น้ำส้มสายชู และเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ นอกจากนั้นมักพบที่ผิวของพืชต่าง ๆ โดยเฉพาะที่ดอกและผล บักเตรีกลุ่มนี้สามารถทำให้ผักเกิดการเน่าเสียต่อเนื่องจากยีสต์ในสภาวะที่มีอากาศได้ และเป็นตัวการสำคัญในการทำให้คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์เสียไป โดยเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก (Stanier และคณะ,1976) ในประเทศไทยมีผู้รายงานว่าพบบักเตรีกลุ่มนี้ในน้ำตาลสด น้ำตาลปี๊บ น้ำตาลเมา กระแช่ ลูกแป้งข้าวหมัก ลูกแป้งเหล้า (นภา 2520) และเหล้าขาว (มันพร 2517) พบเจริญเป็นแผ่นบาง ๆ ลอยอยู่ผิวหน้าของสารละลายที่มีแอลกอฮอล์ และเชื้อน้ำส้มสายชูบางชนิดสามารถสร้างเซลลูโลสได้ทำให้เห็นเป็นแผ่นหนาเจริญร่วมกับยีสต์ในน้ำชาเติมน้ำตาลซึ่งเรียกว่าเห็ดรัสเซีย (tea Fungus) เพราะลักษณะคล้ายดอกเห็ด (Hesseltine,1965)

คุณสมบัติที่ใช้ในการแยกเชื้อ Acetobacter spp.

บักเตรีสกุล Acetobacter และ Gluconobacter มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกันหลายประการ ทั้งยังมีคุณสมบัติลักษณะใกล้เคียงกับบักเตรีสกุล Pscudomonas ทำให้มีปัญหาในการจำแนกเชื้อทั้งสามสกุลนี้ซึ่ง Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (De Ley และ Frateus,1974a) ได้รวบรวมลักษณะที่แตกต่างกันของจุลินทรีย์ทั้งสามสกุลไว้ดังแสดงในตารางที่ 1

โดยทั่วไปแล้วมักพบบักเตรีสกุล Acetobacter และ Gluconobacter อยู่ปะปนกัน เนื่องจากบักเตรีทั้งสองสกุลนี้เจริญได้ดีในสภาวะแวดล้อมคล้ายคลึงกัน การแยก Acetobacter spp. ออกจาก Gluconobacter spp. จะทำได้โดยอาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันบางประการของบักเตรีกลุ่มนี้ ซึ่งในทางปฏิบัติแล้วนิยมใช้คุณสมบัติในการออกซิไดส์กรดอะซิติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (Norris และ Ribbons,1970) คุณสมบัตินี้เรียกว่าการเกิด overoxidation กล่าวคือ ในสภาวะที่ขาดเอทธานอล Acetobacter spp. จะสามารถออกซิไดส์กรดอะซิติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำซึ่งถือว่าเป็นการออกซิไดส์ที่สมบูรณ์ในขณะที่ Gluconobacter spp. ขาดคุณสมบัติดังกล่าว นอกจากนั้นอาจใช้คุณสมบัติในการออกซิไดส์แล็กเตท (lactate) เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (Cirigliano,1982) ของบักเตรีในสกุล Acetobacter ดังนั้นอาจพบว่าบางรายงานเรียก Acetobacter spp. เป็นแล็กตาไฟส์ (lactaphile)

คุณสมบัติทั่วไป Acetobacter spp.

เซลล์ของ Acetobacter spp. มีหลายลักษณะ (pleomorphic) ปกติพบรูปร่างค่อนข้างรีจนกระทั่งเป็นท่อนชัดเจน ขนาดกว้างประมาณ 0.6-0.8 ไมครอน ยาวประมาณ 1.0-3.0 ไมครอน อาจพบเซลล์เดี่ยว ๆ จับเป็นคู่หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ บางครั้งพบเซลล์ที่มีรูปร่างแปลกไปจากที่กล่าวมาแล้ว เช่น รูปร่างกลม ยืดยาวออก บวมหรือรูปกระบอก บางชนิดมีแฟล็กเจลล่า (Flagella) แบบรอบเซลล์ (peritrichous) ทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้ (De Ley และ Frateur,1974b) นอกจากนั้นมีรายงานว่า เซลล์ที่มีอายุน้อยของ Acetabacter peraxydans สามารถเคลื่อนที่ได้ แต่ไม่พบการเคลื่อนที่เมื่อเซลล์มีอายุมาก แสดงว่าอายุของเซลล์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงและการสร้างแฟล็กเจลล่า ส่วน Acetobacter spp. บางชนิดไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เช่น Acetobacter xylinum (Rao,1957)

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

เมื่อย้อมสีพบว่าเซลล์ของ Acetobacter spp. ในระยะแรกของการเจริญติดสี Gram negative เมื่ออายุมากขึ้นจะติดสี Gram Variable ไม่พบการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุ แต่เมื่อเซลล์อยู่รวมกันมาก ๆ อาจมีสีชมพู เนื่องจากอิทธิพลของพอร์ไฟรินส์ (porphyrins) และบางสายพันธ์สามารถสร้างรงควัตถุ

สีน้ำตาล (De Ley และ Frateur,1974b)

Acetobacter spp. เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการดำรงชีวิต (obligate aerobes) เนื่องจากไม่สามารถ ใช้สารอื่นนอกจากออกซิเจนเป็นตัวรับไฮโดรเจนตัวสุดท้ายในขบวนการเปลี่ยนอาหารเป็นพลังงาน (De Ley และ Frateur, 1974b) จึงมักพบว่าในถังหมักน้ำส้มสายชูซึ่งไม่มีการพ่นอากาศ เชื้อน้ำส้มสายชูจะเจริญอยู่ที่ผิวหน้ามองเห็นเป็นแผ่นฝ้า (Film) (Adams,1980;Conner และ Allgeier,1976)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของบักเตรีสกุล Gluconobacter, Acetobacter และPseudomonas

	Glucono-bacter	Acetobacter	Pseudomonas
Flagellation	Polar or none	Pertrichous or none	Polar
Growth at pH 4.5	+	+	-
Oxidation of :			
Ethanol to acetic acid at pH 4.5	+(M)[1/]	+(S)	-
Acetic acid to CO_2	-	+	d
Lactate to CO_2	-	+	+
Glucose to gluconate	+	d	d
Amino acid by resting cells	-	+	+
Krebs cycle	-	+	+
Production of 5-Ketogluconate	+	d	-
Production of 5-Ketogluconate	+	d	-
Ketogenesis	+	d	-
Quinones Q_{10}	+	-	
Q_9	-	+	
Hydrolysis of :			
Lactose and starch	-	-	d
Gelatin	-/W	-	d
Greenish and/or Fluorescent pigment	-	-	d

1/M = moderate; S = strong; W = week

ที่มา : De Ley and Frateur (1974a)

องค์ประกอบของน้ำส้มสายชู

ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะองค์ประกอบของน้ำส้มสายชู ซึ่งได้จากกรรมวิธีการหมัก องค์ประกอบของน้ำส้มสายชูเหล่านี้ได้แก่ น้ำ กรดอะซิติก และสารอื่น ๆ อีกเล็กน้อย กรดอะซิติกทำให้น้ำส้มสายชูมีรสเปรี้ยว มีคุณสมบัติป้องกันการเน่าเสีย และเป็นตัวทำละลายที่ดี พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารกำหนดว่าน้ำส้มสายชูหมัก และน้ำส้มสายชูกลั่นต้องมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกไม่ต่ำกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่อุณภูมิ 27 องศาเซลเซียส (รจซกิจจานุเบกษา 2523) ส่วนสารอื่น ๆ ในน้ำส้มสายชูนั้นมีความสำคัญ ในด้านกลิ่นรส ทำให้น้ำส้มสายชูมีกลิ่นรสดีกว่าน้ำส้มสายชูเทียม สารเหล่านี้มีปริมาณเพียงเล็กน้อย อาจมาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชู หรือเป็นสารที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำส้มสายชู หรืออาจเกิดจากทั้งสองอย่างข้างต้นทำปฏิกิริยากัน เช่น เอทธานอลทำปฏิกิริยากับกรดอะซิติกเป็นเอทธิลอะซิเตท ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสในน้ำส้มสายชูชนิดหนึ่ง ในน้ำส้มสายชูได้จากกรรมวิธีการหมักธรรมชาติจะพบสารระเหย 4 ชนิดได้แก่ อะซิตัลดีไฮด์ อะซิตัล (acetal) เอทธิลอะซิเตท และเอทธานอล นอกจากนี้ในน้ำส้มสายชูกลั่นพบสารละลายระเหยอีก 7 ชนิด ส่วนน้ำส้มสายชูหมักพบสารระเหยมากกว่าน้ำส้มสายชูกลั่น สารที่ทำให้กลิ่นรสของน้ำส้มสายชูดี คือ คาร์บอนิล (Carbony) แอลกอฮอล์ และเอสเตอร์ (ester) (Aurand และคณะ, 1966)

การศึกษาการใช้ประโยชน์จากน้ำมะพร้าวในเรื่องการผลิตน้ำส้มสายชู

อัจฉรา มีวาสนา (2510) วิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมะพร้าวแก่ พบว่าประกอบด้วย น้ำ 94.6 กรัม โปรตีน 1.0 กรัม คาร์โบไฮเดรท 2.1 กรัม เถ้า 0.5 กรัม แคลเซียม 20.7 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 25.4 มิลลิกรัม เหล็ก 0.4 มิลลิกรัม ไวตามินซี 1.4 มิลลิกรัม และไวตามินซีรวมในน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตร

Child และ Nathanael (1950) พบว่าน้ำตาล 3 ชนิดในน้ำมะพร้าว ซึ่งได้รายงานไว้เมื่อปี ค.ศ. 1924 ได้แก่ เด็กซ์โตส ลีวุโลส และซูโครส และแมนนิตอล (Child and Nathanael, 1947) นั้นเกิดจากการรีดิวซ์ เด็กโตสโดยแบคเตรี

Verderbelt (1954) รายงานว่าน้ำมะพร้าว 1 มิลลิลิตรประกอบด้วยไวตามินบีรวมดังนี้ คือ กรดนิโคตินิก 0.64 ไมโครกรัม กรดแพนโตธีนิก 0.52 ไมโครกรัม ไบโอติน (biotin) 0.02 ไมโครกรัม ไรโบฟลาวิน (riboflavin) 0.01 ไมโครกรัม กรดโฟลิก (folic acid) 0.003 ไมโครกรัม นอกจากนั้นยังพบไวตามินซี 0.7-3.7 มิลลิกรัม

และมีส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์ซึ่งได้แก่ โปแตสเซี่ยมเป็นส่วนใหญ่ (Child,1964)

Tulcake และคณะ (1961) พบว่าในน้ำมะพร้าวแก่มีกรดมาลิก กรดไซคิมิก (shikimic acid) และกรดควินิก (quinic acid) นอกจากนั้นยังพบอะลานีน กรดแกมมาอะมิโนบิวทิรัก (γ-aminobutyric acid) กรดกลูตามิก ในทั้งสภาพกรดอะมิโนอิสระ (Free amino acid) และกรดอะมิโนไม่อิสระ (combined amino acid)

ดังนั้นน้ำมะพร้าวจึงจัดเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีเกลือแร่และธาตุอาหารมาก ทั้งโปรตีน คาร์โบไฮเดรท เกลือแร่ และไวตามิน ในปีหนึ่ง ๆ ทิ้งน้ำมะพร้าวไม่ต่ำกว่า 3,000 ล้านลิตร ซึ่งสูญเปล่า และยังก่อให้เกิดมลภาวะ (pollution) ได้ง่าย เพราะน้ำมะพร้าวมีบีโอดีสูงถึง 22,837 มิลลิกรัมต่อลิตร (วิเชียร 2521)

สำหรับการใช้ประโยชน์จากน้ำมะพร้าวในด้านการเพาะเลี้ยงเชื้อน้ำส้มสายชู และการผลิตน้ำส้มสายชู ได้มีรายงานปรากฏหลายรายงานด้วยกัน เช่น สายชล ชีวปรีชา (2517,2521) ใช้น้ำมะพร้าวเติมเอทธานอล 4 เปอร์เซนต์ เลี้ยงเชื้อน้ำส้มสายชู พบว่าให้การเจริญใกล้เคียงกับการเจริญบนอาหารอะซิโตแบคเตอร์ (acetobacter medium) แต่ใช้การเก็บเชื้อให้มีชีวิตรอดอยู่ได้นานกว่า นอกจากนั้นได้มีรายงานการใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำส้มสายชูมาแต่เดิมแล้ว (ปุ๋ย 2479) ต่อมาสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร (2519) ได้แนะนำการทำน้ำส้มสายชูจากน้ำมะพร้าวโดยใช้สับปะรดที่ปล่อยทิ้งไว้ในอากาศจนเริ่มมีกลิ่นเหล้าเกิดขึ้น เป็นกล้าเชื้อน้ำส้มสายชู Lotong (1977) ทดลองใช้น้ำมะพร้าวเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อเพื่อหมักน้ำส้มสายชู โดยใช้น้ำมะพร้าวที่มีเอทธานอล 4 เปอร์เซ็นต์ ปลูกเชื้อแล้วเข้าเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30-36 ชั่วโมง ตรวจพบเซลล์ 10^8-10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเขย่าครบ 48 ชั่วโมง แล้วตั้งขวดหมักไว้ให้ในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อจะผลิตกรดได้สูงสุดภายใน 5-8 วัน

<u>การเก็บเชื้อน้ำส้มสายชูในรูปเชื้อแห้ง</u>

เชื้อน้ำส้มสายชูมีชีวิตอยู่ในสภาพธรรมชาติปะปนกับจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้ดี แต่ในสภาพเชื้อบริสุทธิ์มักมีชีวิตรอดอยู่ในช่วงสั้น ๆ แม้การเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในที่อุณหภูมิต่ำ 5-10 องศาเซลเซียส ก็ต้องมีการเปลี่ยนอาหารทุกเดือน เมื่อได้มีการพัฒนาวิธีเก็บเชื้อโดยการไลโอฟิลไลซ์ (lyophilization) ขึ้น ทำให้สามารถเก็บเชื้อบริสุทธิ์ได้ในช่วงเวลานานประมาณ 2-5 ปี

แต่บางครั้งการนำเชื้อน้ำส้มสายชูที่ไลโอฟิลไลซ์ไว้มาเพาะเลี้ยงก็อาจไม่พบการเจริญและการเก็บเชื้อวิธีนี้ยังขาดความสะดวกเหมาะสม (Nickol,1979)

ในประเทศไทยมีวิธีเก็บเชื้อจุลินทรีย์ไว้ในรูป "ลูกแป้ง" ที่สามารถใช้เป็นกล้าเชื้อในสภาพแห้ง (dried inoculum) ลูกแป้งสามารถเก็บไว้ในสภาพต่าง ๆ ได้ง่ายและสะดวกต่อการนำมาใช้ ลูกแป้งมีหลายชนิดด้วยกันตามวัตถุประสงค์ของการใช้ได้แก่ ลูกแป้งข้าวหมาหรือลูกหวาน ซึ่งเป็นกล้าเชื้อสำหรับทำข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้าหรือลูกขมใช้เป็นกล้าเชื้อในการทำเหล้ากระแช่หรือ อุ และลูกแป้งน้ำส้มสายชูหรือลูกเปรี้ยว ใช้เป็นกล้าเชื้อในการทำน้ำส้มสายชู ซึ่งลูกแป้งน้ำส้มสายชูนี้ไม่ค่อยแพร่หลายนัก วิธีทำลูกแป้งทั้ง 3 ชนิดนี้ มีหลักการคล้ายกันแต่แตกต่างกันที่ส่วนผสมเท่านั้น (พิไลพรรณ 2523)

ส่วนประกอบของลูกแป้งมี 3 ส่วน คือ (พิไลพรรณ 2523, ขุนกฤษณามรวิสิฐ 2490, วรชิน 2492) จุลินทรีย์ที่ต้องการเก็บ เครื่องเทศและสมุนไพรซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น ๆ ที่จะเจริญแข่งกับจุลินทรีย์ที่ต้องการเก็บ และแป้งหรือข้าวบูด การทำลูกแป้งมีมานานแต่วิธีการไม่เป็นที่เปิดเผย มีการถ่ายทอดความรู้เฉพาะในเครือญาติหรือมิตรสนิทเท่านั้น จึงน่าสนใจศึกษาเพื่อเผยแพร่วิธีการทำลูกแป้งให้ขยายออกไป

การเก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจอีกวิธีหนึ่งคือ การเก็บเชื้อในรูปเชื้อผง(powder) วิธีการเตรียมเชื้อผงนี้ใกล้เคียงกับวิธีทำลูกแป้งมากคือ ประกอบด้วยจุลินทรีย์ สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ และฟิลเลอร์ ซึ่งพบว่าลูกแป้งในบางท้องถิ่นไม่ทำเป็นลูก แต่จะมีลักษณะร่วนประกอบด้วยแกลบและรำ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเชื้อผงมาก

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์ และนภา โลห์ทอง(2524) ได้ศึกษาการเตรียมเชื้อผงของ Lactobacillus casei เพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสุกร โดยเพิ่มจำนวนบักเตรีแล็กติกในสภาพ solid substrate ในถุงพลาสติกคือ ใช้รำละเอียดผสมน้ำกรองของกากถั่วเหลือง 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ต้มกับน้ำมะพร้าว ปรับให้PH 6.5-6.8 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อลงในรำละเอียดโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ส่วน เติมลงในรำ 2 ส่วน (ปริมาณต่อน้ำหนัก) จากนั้นเติมเชื้อบักเตรีแล็กติก 10^3-10^4 เซลล์ต่อกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อบ่มไว้ 24 ชั่วโมง เซลล์จะเพิ่มจำนวนเป็น 10^8 เซลล์ต่อกรัมของอาหาร จึงเติมฟิลเลอร์คือ รำละเอียดผสมโปแตสเซียมซอร์เบท (potassium sorbate) 0.1 เปอร์เซ็นต์ หรือกรดโปรบีโวนิก (propionic acid) 0.3 เปอร์เซ็นต์ เชื้อผงที่ได้มีความชื้นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

สามารถเก็บในตู้เย็นได้นานกว่า 3 เดือน โดยเซลล์มีชีวิตลดลงไม่ถึง 1
วิลาวัณย์ อัจจิมากุล (2524) ทดลองผลิตเชื้อแห้งของ
ตามวิธีของเพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐกิจ และคณะ ไลท์ทอง (2524) ซึ่งเมื่อเก็บไว้ในตู้เย็น
เป็นเวลา 2 เดือน พบเซลล์รอดชีวิต 10^5-10^6 เซลล์ต่อกรัมของเชื้อแห้ง

<u>มาตรฐานของประเทศไทยเกี่ยวกับน้ำส้มสายชูนั้นได้มีการควบคุมมาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุข ดังนี้</u>

ประกาศของกระทรวงสาธารณสุข (7 ตุลาคม 2508) ฉบับที่ 10 อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 5 (2) (5) และ (7) แห่งพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหาร 2507

<u>ข้อที่ 1</u> น้ำส้มสายชูแบ่งออกเป็น

1) น้ำส้มสายชูหมัก -ได้แก่ผลิตผลที่ได้จากธัญพืช ผลไม้ หรือน้ำตาล แล้วหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชู ตามกรรมวิธีธรรมชาติ
2) น้ำส้มสายชูกลั่น -ได้แก่การนำสุราขาวเจือจางหรือแอลกอฮอล์เจือจาง หมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีธรรมชาติ หรือได้มาจากการกลั่นน้ำส้มสายชูหมัก หรือน้ำส้มสายชูกลั่น
3) น้ำส้มสายชูเทียม -ได้แก่การเอากรดอะซิติกมาเจือจางกับน้ำ

<u>ข้อที่ 2</u> น้ำส้มสายชูหมักและน้ำส้มสายชูกลั่นต้องมีคุณภาพและมาตรฐานดังนี้

1) ต้องมีกรดอะซิติกไม่น้อยกว่า 4 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร
2) ต้องไม่มีกรดน้ำส้ม (กรดอะซิติก) ที่มิได้มาจากการผลิตน้ำส้มสายชูหมักหรือน้ำส้มสายชูกลั่นตามกรรมวิธีธรรมชาติ
3) ต้องไม่มีการเจือกรดซัลฟูริคหรือกรดแร่อิสระอย่างอื่น
4) ต้องไม่มีตะกอนเว้นแต่ตะกอนอันเกิดขึ้นตามธรรมชาติ และจากกรรมวิธีที่ผลิต
5) ต้องไม่มีหนอนน้ำส้ม (Vinegar Eel)

<u>ข้อ 3</u>

การแต่งสีน้ำส้มสายชูหมักหรือน้ำส้มสายชูกลั่น ให้ใช้สีน้ำตาลไหม้ (caramel)

<u>ข้อ 4</u>

น้ำส้มสายชูเทียมต้องมีคุณภาพและมาตรฐาน ดังนี้

1) ต้องมีกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4 กรัม และไม่เกิน 7 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

2) ต้องไม่มีกรดซัลฟูริค หรือแร่อิสระอย่างอื่น

3) ต้องไม่มีตะกอน

4) ไม่มีการเจือสีชนิดใด ๆ

ข้อ 5

น้ำส้มสายชูหมัก น้ำส้มสายชูกลั่น และน้ำส้มสายชูเทียมที่ผลิตและจำหน่ายต้องมีฉลาก และในการแสดงฉลากนั้น อย่างน้อยต้องมีข้อความเป็นอักษรหรือภาษาไทยเห็นได้ชัดเจนดังต่อไปนี้

1) คำว่าน้ำส้มสายชูหมัก
คำว่าน้ำส้มสายชูกลั่น
คำว่าน้ำส้มสายชูเทียม
และแต่กรณีและเลขทะเบียนอาหาร

2) ปริมาตรของน้ำส้มสายชูเป็นมิลลิลิตร

3) ชื่อผู้ผลิต และตำบลหรือแหล่งที่ตั้งของโรงงาน

4) กรณีน้ำส้มสายชูกลั่นมีกรดน้ำส้มเกินกว่า 7 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จะต้องระบุปริมาณของน้ำส้มคิดเป็นกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และวิธีทำให้เจือจางก่อนนำไปบริโภค

<u>การปฏิบัติหลังจากได้น้ำส้มสายชูจากถังหมัก</u>

<u>การเก็บ</u> การเก็บน้ำส้มสายชูเพื่อให้มีปริมาณของน้ำส้มสายชูที่มีความเข้มข้นสูงสุดจะต้องเก็บหลังจากกรรมวิธีสมบูรณ์แล้ว คือหมายความว่าแอลกอฮอล์เปลี่ยนสภาพเป็นกรดสมบูรณ์แล้ว และถ้าเก็บไม่ดี ACETIC BACTERIA หรือ ENZYME ของมันจะทำให้น้ำส้มสายชูเปลี่ยนเป็น CO_2 และ H_2O ดังได้กล่าวมาแล้วในตอนต้น การเก็บนี้ต้องมีการหยุดปฏิกริยาป้องกันไม่ให้มีออกซิเจนอยู่ในนั้น เพราะฉะนั้นการเก็บต้องมีการบรรจุในภาชนะซึ่งไม่มีอากาศเข้าไปเจือปนได้อีก ให้ความร้อนที่จะทำลายเอนไซม์ ถ้าเราเก็บในสภาพที่อากาศสามารถเข้าไปเจือปนอยู่แล้วปริมาณของออกซิเจนจะเข้าไปช่วยให้น้ำส้มเปลี่ยนสภาพไปโดยในน้ำส้มนั้นยังมีพวกแบคทีเรียอยู่ การเก็บจึงเป็นหลักอีกอันหนึ่งที่จะต้องคำนึงถึง

<u>การบ่ม</u> การเก็บน้ำส้มไว้โดยไม่ให้มีอากาศเข้าไปเจือปนและเก็บอยู่ในระยะเวลาหนึ่ง จะช่วยทำให้น้ำส้มสายชูใสขึ้นและกลิ่นดีขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำส้มสายชูซึ่งทำจากไวน์หรือน้ำผลไม้มักจะมีพวก ester เกิดขึ้น ester นี้จะทำให้กลิ่นและรสของวัตถุดิบหายไป การบ่มอาจใช้ระยะเวลาเป็นปีหรือมากกว่าก็ได้แต่ว่าการทำน้ำส้มจากแอลกอฮอล์โดยตรงแล้วการ

บ่มจะไม่ได้ให้กลิ่นหรือรสดีขึ้น

การทำให้ใส (Clarification)

น้ำส้มสายชูที่จะจำหน่ายต้องใส การนำให้ใสอาจทำได้โดยผ่านเครื่องกรองหรือใช้สารตกตะกอน (Fining agent) ต่าง ๆ เช่น CASIEN,TANNIN GELATIN, ISINGLASS BANTONITE, ไข่ขาว หรือจะปล่อยให้ตกตะกอนเองในระหว่างบ่มก็ได้ ส่วนใหญ่มักจะไม่ใช้วิธีเติมสาร FINING AGENT เพราะสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และต้องสูญเสียน้ำส้มสายชูที่ติดลงไปกับตะกอนของสารนั้น ๆ อีกด้วย โดยมากใช้เครื่องกรอง เพราะทำได้เร็วไม่มีการสูญเสีย และค่าใช้จ่ายน้อยกว่าแต่ต้องระวังในเรื่องการปะปนของโลหะที่ไม่ต้องการ เพราะน้ำส้มสายชูสามารถกัดกร่อนโลหะได้

การ PASTEURIZING , และบรรจุขวด

หลังจากที่น้ำส้มสายชูได้เก็บไว้มีอายุพอควรแล้วสะอาดและใสจะต้องมีการบรรจุขวดและอุดหรือปิดให้แน่นด้วยก็อก จะต้องไม่มีอากาศเข้าเจือปน การฆ่าเชื้อต้องทำในอุณภูมิ 60-66 °C ประมาณ 30 นาที หรือ 140°-150°F ในการที่เราแช่ขวดให้ได้ความร้อนที่กำหนดเป็นเวลา 30 นาที ก็เพื่อให้อุณภูมิจากภายนอกเข้าไปถึงภายในได้ เมื่ออุณภูมิของน้ำส้มสายชูถึงอุณภูมิที่ 60 °C หรือ 140 °F ก็เป็นอันใช้ได้ หลังจากนั้นก็ต้องเอามาทำให้เย็นลงเหลือ 21 °C หรือ 70 °F อาจมีการผ่านน้ำส้มลงไปในระหว่าง SILVER ELECTRODE เป็นการทำลายเชื้อน้ำส้มที่เหลืออยู่ให้ตายไป การทำเช่นนี้พึ่งจะพบเมื่อ 2-3 ปีที่แล้วมานี้ SILVER จะทำให้หยุดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย การทำเช่นนี้จะทำหน้าที่ GERMI CIDE และ ANTISEPTIC ไปด้วยในตัว

อุณภูมิในการทำน้ำส้ม

แบคทีเรียที่จะเปลี่ยนสภาพแอลกอฮอล์ให้เป็นน้ำส้มสายชูนี้ อุณภูมิที่เหมาะสมที่สุดจะให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้เร็วคือระหว่าง 15-34 °C จะเห็นว่า 34 °C เราพอจะทำได้เพราะเป็นอุณภูมิธรรมดา และในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียนี้ นักวิทยาศาสตร์ได้พบว่าอุณภูมิมีความสำคัญอย่างมาก และจะเกี่ยวกับลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ที่จะเจริญขึ้นเป็นอย่างยิ่งในระหว่าง 12-15 °C จะให้ลักษณะของแบคทีเรียชนิดหนึ่ง แต่ถ้าอุณภูมิ 32-35 °C จะให้ลักษณะของเชื้ออีกอย่างหนึ่ง อย่างไรก็ตามมีผู้พบว่าอุณภูมิที่เหมาะสมที่สุดและนิยมใน U.S.A. คือ 80 - 85 °F หรือ 26.7-29.4 °C ซึ่งสามารถผลิตน้ำส้มได้ปริมาณสูงและคุณภาพดี

<u>การตรวจสอบน้ำส้มสายชู</u>

เนื่องจากในปัจจุบันนี้ ได้มีการปลอมแปลงน้ำส้มสายชูโดยนำเอากรดซัลฟูริค หรือกรดเร่อิสระมาละลายน้ำทำให้มีรสเปรี้ยวเหมือนกันนำมาขายแต่กรดทั้งสองนี้มีพิษต่อระบบทางเดินอาหารของคนเรา การนำกรดอื่นแปลกปลอมผสมกับน้ำส้มสายชูในอัตราส่วนเท่าๆ กันผู้บริโภคไม่มีโอกาสรู้ด้วยการชิมแต่สามารถรู้ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีทางเคมีดังนี้

<u>วิธีตรวจหาน้ำส้มสายชูที่ทำด้วยกรดไฮโดรคลอริค (HCL)</u>

1) นำน้ำส้มสายชูที่ต้องการตรวจหาะใส่ บิกเกอร์ ประมาณ 25-50 ซีซี

2) ทำให้เป็นกรดโดยการหยดกรดไนตริคลงไป 2-3 หยด

3) ค่อยๆ หยดน้ำยาเกลือซิลเวอร์ไนเตรท ($Ag\ NO_3$)ลงไป 2-3 หยดถ้ามีตะกอนสีขาวขึ้นมาแสดงว่ามี HCL ปะปนอยู่ ซึ่งเป็นตะกอนสีขาวของเกลือซิงเวอร์คลอไรด์ ซึ่งละลายได้ในน้ำยา แอมโมเนียมไฮดรอคไซด์

$$HCL + Ag\ NO_3 \xrightarrow{(HNO_3)} Ag\ Cl + NHO_3$$

<u>ตรวจหากรดซัลฟูริค</u> ($H_2\ SO_4$)

1) นำน้ำส้มที่ต้องการตรวจมาใส่ บิคเกอร์ 20-50 มิลลิลิตร

2) เติมHCL ลงไป 2-3 หยด เพื่อปรับความเป็นกรด

3) ค่อยๆ เติม $Ba\ CL_2$ ลงไป ถ้าได้ตะกอนสีขาวละเอียดแสดงว่ามี $H_2\ SO_4$ ปะปนอยู่

$$H_2\ SO_4 + Ba\ Cl_2 \xrightarrow{HCL} Ba\ SO_4 + 2HCL$$

อุปกรณ์

1. เครื่องมือตรวจสอบ % กรด ได้แก่

   beaker 100 ml.

   burette 50 ml.

   pipette 5 ml., 10 ml.

   erlenmeyer flask 100 ml.

   volumetric flask ขนาด 1 ลิตร

   ขวดฉีดน้ำ

   กรวยกรอง

   ขวดใส่ indicator และใส่สารละลายต่างมาตรฐาน 1 ลิตร

2. เครื่องมือในการทดลองแบบ Shaker flask culture ได้แก่

   - Erlenmeyer flask 500ml.
   - สำลี
   - Shaker

3. เครื่องมือเตรียม media ได้แก่

   - Beaker ขนาด 2 ลิตร
   - Graduated cylinder 100 ml.
   - Erlenmeyer flash 250 ml. และ 500 ml.
   - Analytical balance
   - ช้อนตัก
   - กระดาษรองชั่ง
   - เทาแก๊ส
   - autoclave

4. Flask ที่ใช้ในการหมัก(Flask ขนาด 500 ml.)

97108

สารเคมี

1 สารเคมีที่ใช้ประกอบสูตรอาหารได้แก่

- 75% ETHANOL
- 28° สูราขาวเจือจาง
- $(NH_4)_2\ SO_4$
- $KH_2.PO_4$
- $K_2H\ PO_4$
- $MnSO_4.\ 4H_2O$
- $FeSO_4.\ 7H_2O$
- HCl CONE
- $CaCO_3$
- NaOH
- $Mg\ SO_4.\ 7H_2O$
- $FeCl_3.\ 6H_2O$
- NaCl
- YEAST EXTRACTS
- TRYPTONE
- AGAR POWDER
- CASEIN HYDROLYSATE
- DISTILLED WATER

2 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบ % กรด

- 0.1 $\bar{N}$ NaOH
- 1.0 % PHENOLPHTHALEIN INDICATOR

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนการทดลอง

1 เตรียม SLANT เพื่อเลี้ยงเชื้อและต่อเชื้อเพื่อใช้ในการทดลอง (เชื้อที่ใช้ ACETOBACTER ACETIC 103)

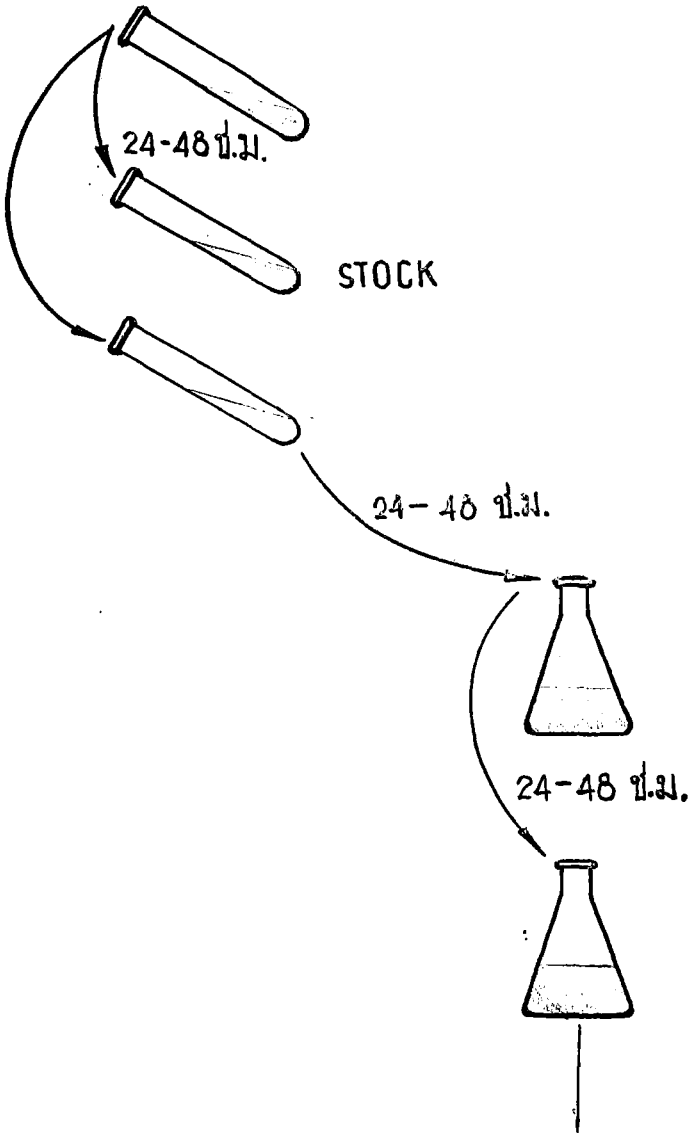
2 เตรียม STARTER จากการ เลี้ยงเชื้อ ACETIC ACID BACTERIA ในที่นี้คือ ACETOBACTER ACETIC 103 ในสูตรอาหารมาตรฐานโดยเขี่ยเชื้อจากข้อ 1 ประมาณ 2 loop ใส่ลง STARTER จนมีอายุใช้งานคือ 24–48 ชั่วโมง

3 เตรียมสูตรต่าง ๆ เพื่อทำการทดลองโดยแบ่งเป็น 2 ชุด คือชุด A และชุด B โดยชุด A ใช้แอลกอฮอล์ ชุด B ใช้สุราขาวเจือจาง ดังนั้น สูตรที่ทำการทดลองมีสูตร 1 A, 2 A, 3 A, 4 A, 5A, 6 A และ 1B, 2B, 3 B, 4B, 5 B , 6 B, แต่ละสูตรทำ 2 ซ้ำ เพราะฉะนั้น FLASK ที่ใช้ในการหมักใช้ทั้งหมด 24 FLASK สูตร A และสูตร B ขั้นตอนการเตรียมทุกอย่างเหมือนกันหมด จะแตกต่างกันหลังจากออกจาก AUTOCLAVE โดยสูตร A เติม ETHANOL แต่สูตร B เติมสุราขาว 28° แต่ละ FLASK เตรียมเป็นจำนวน 300 มิลลิลิตร ใน FLASK ขนาด 500 มิลลิลิตรเข้า AUTOCLAVE ที่ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^2 นาน 15 นาที หลังจากอาหารเย็นจึงเติม 75% ETHANOL ให้ได้ 10% (v/v) ในชุด A และ 28° สุราขาวให้ได้ 30% (v/v) ในชุด B

4 ถ่าย STARTER ที่มีอายุ 24–48 ชั่วโมงลงสูตรต่าง ๆ ทั้ง 24 FLASK ในข้อ 3 ให้ได้ปริมาตร 4% (v/v)

5 หมักและดึงตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุกวันวันละ 1 ครั้ง เพื่อศึกษา

- เปอร์เซนต์กรดโดยใช้ NaOH 0.1 N
- PH โดยใช้ PH meter
- ตรวจสอบสีและลักษณะทั่วไป



เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุกวัน

ภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนในการศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูกล้วยโดยใช้สุราขาวเจือจาง และแอลกอฮอล์

องค์ประกอบและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

A.) เอทธานอลปลอดเชื้อ อตรียมโดยนำเอทธานอล 75 เปอร์เซนต์มาเจือจางแล้วผ่าน MILLIPORE FILTER สำหรับกรองบักเตรี

B) เตรียม SLANT สามารถเตรียมได้ 2 สูตรคือ

ก	- YEST EXTRACT	1.0	กรัม
	- $MgSO_4$	0.02	กรัม
	- K_2HPO_4 or KH_2PO_4	0.1	กรัม
	- $CaCO_3$	0.2	กรัม
	- AGAR	1.5	กรัม
	- DISTILLED WATER	100	มิลลิลิตร
	- ETHANOL	4.0	มิลลิลิตร
ข	- COCONT WATER	100	มิลลิลิตร
	- ETHANOL	4	มิลลิลิตร

ETHANOL เติมหลังจาก AUTOCLAVE ให้ได้ 4 % (v/v)

C) สูตรเลี้ยง ACETOBACTER ACETI (ใช้เป็นสูตรมาตรฐาน)

- YEST EXTRACT	1.0	กรัม
- $MgSO_4$	0.02	กรัม
- K_2HPO_4 or KH_2PO_4	0.1	กรัม
- ETHANOL	4.0	มิลลิลิตร
- DISTILLED WATER	100	มิลลิลิตร

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

สูตรที่ทำการทดลอง

สูตร 1) สูตรมาตรฐาน

- YEST EXTRACT	1.0	กรัม
- $MgSO_4$	0.02	กรัม
- K_2HPO_4 or KH_2PO_4	0.1	กรัม
- DISTILLED WATER	100	มิลลิลิตร

สูตร 2) ประกอบด้วย

- $(NH_4)SO_4$	0.1	%
- KH_2PO_4	0.09	%
- K_2HPO_4	0.01	%
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.025	%
- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.005	%
- DISTILLED WATER	100	มิลลิลิตร

สูตร 3) ประกอบด้วย

- $(NH_4)_2\ SO_4$	0.1	%
- YEST EXTRACT	0.1	%
- TRYPTONE	0.1	%
- LIVER EXTRACTS	0.1	%
- SALT SOLUTION A	0.5	%
- SALT SOLUTION B	0.5	%
- DISTILLED WATER	100	มิลลิลิตร

สูตร 4) ประกอบด้วย

- CASEIN HYDROLYSATE	0.5	%
- YEST EXTRACTS	0.1	%
- TRYPTONE	0.1	%
- LIVER EXTRACTS	0.1	%

- SALT SOLUTION A	0.5	%
- SALT SOLUTION B	0.5	%
- DISTILLED WATER	100	มิลลิลิตร

สูตร 5) ประกอบด้วย

- $(NH_4)_2\ SO_4$	0.1	%
- CASBIN EXTRACTS	0.5	%
- YEST EXTRACTS	0.1	%
- TRYPTONE	0.1	%
- LIVER EXTRACTS	0.1	%
- SALT SOLUTION A	0.5	%
- SALT SOLUTION B	0.5	%
- DISTILLED WATER	100	มิลลิลิตร

สูตร 6) ประกอบด้วย

- COCONUT WATER	100	มิลลิลิตร

SALT SOLUTION A และ SALT SOLUTION B ประกอบด้วย ดังนี้

SALT SOLUTION A

- KH_2PO_4	50	กรัม
- K_2HPO_4	50	กรัม
- H_2O	500	มิลลิลิตร

SALT SOLUTION B

- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	20	กรัม
- NaCl	1	กรัม
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1	กรัม
- $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	1	กรัม
- HCl CONC	1	มิลลิลิตร
- H_2O	500	มิลลิลิตร

หมายเหตุ สูตร 1,2,3,4,5 และ 6 เตรียมเป็นจำนวน 2 ชุด

ชุดแรกใช้ 75 % ETHANOL 10 % (v/v)

ชุดที่สองใช้ 28 สุราขาว 30 % (v/v)

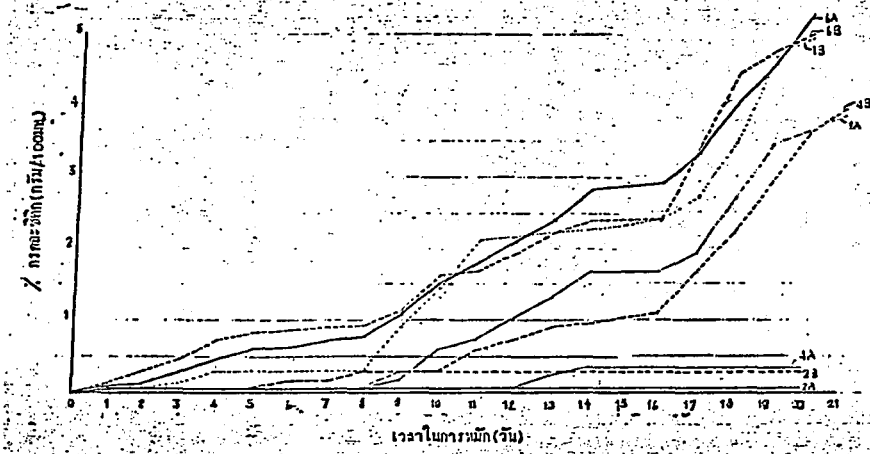
แต่ละสูตรเตรียมเป็นจำนวน 300 มิลลิลิตร (ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 1.5 กรัม) เข้าไป AUTOCLAVE ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อ/ ตารางนิ้ว นาน 15 นาที หลังจากอาหารเย็นลงจึงเติม ETHANOL ปลอดเชื้อและสุราขาวให้มีความเข้มข้นตามสูตร

ตารางที่ 2 แสดงผลการหมักน้ำสมสายชู

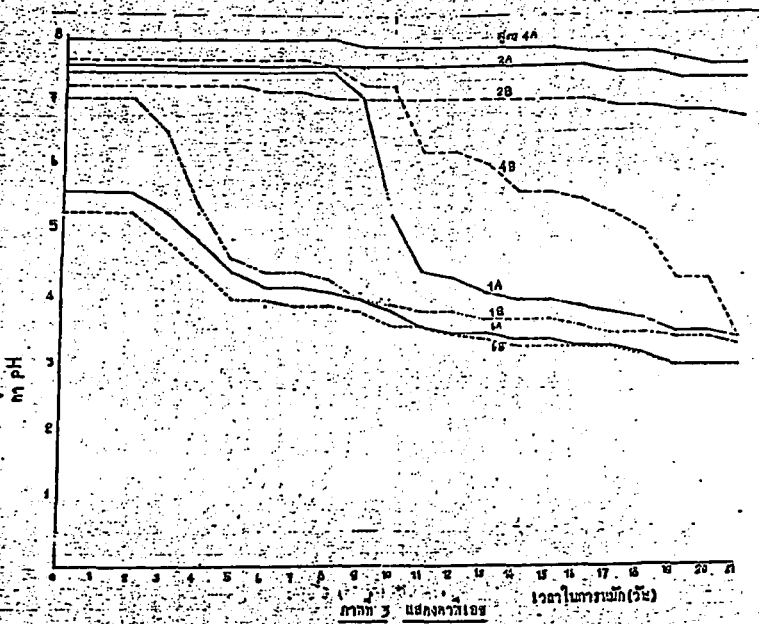
จำนวนวัน / สูตรอาหาร	% กรด																				
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
สูตร 1 เอ	0	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.18	.60	.72	1.02	1.32	1.68	1.68	1.68	1.92	2.70	3.43	3.61	3.85
สูตร 1 บี	0	.06	.06	.12	.30	.30	.30	.30	.30	.90	1.44	2.10	2.16	2.22	2.28	2.34	2.40	2.70	3.49	4.69	4.93	6.13
สูตร 2 เอ	0	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06
สูตร 2 บี	0	.06	.06	.06	.06	.06	.18	.18	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30
สูตร 4 เอ	0	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.24	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36
สูตร 4 บี	0	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.30	.30	.60	.72	.90	.96	1.02	1.10	1.68	2.22	2.94	3.61	3.94
สูตร 6 เอ	0	.10	.12	.30	.48	.60	.62	.72	.78	1.08	1.50	1.80	2.10	2.40	2.83	2.88	2.90	3.31	4.03	4.57	5.29	6.07
สูตร 6 บี	0	.15	.18	.48	.72	.84	.88	.90	.92	1.14	1.62	1.68	1.92	2.22	2.40	2.40	2.40	3.43	4.43	4.75	4.99	5.11

ตารางที่ 3 แสดงค่า พี.เอช. ของแต่ละสูตรที่เวลาต่าง ๆ

สูตรอาหาร \ จำนวนวัน	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
สูตร 1 เอ	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.0	5.2	4.4	4.3	4.1	4.0	4.0	3.9	3.8	3.7	3.5	3.5	3.4
สูตร 1 บี	7.0	7.0	7.0	6.5	5.4	4.6	4.4	4.4	4.3	4.0	3.9	3.8	3.8	3.7	3.7	3.7	3.6	3.5	3.5	3.4	3.4	3.3
สูตร 2 เอ	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.4	7.4	7.3	7.3	7.3
สูตร 2 บี	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.1	7.1	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	6.9	6.9	6.8	6.8	6.7
สูตร 4 เอ	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.7	7.7	7.7	7.6	7.5	7.5
สูตร 4 บี	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.5	7.2	7.2	6.2	6.2	6.0	5.6	5.6	5.5	5.3	5.0	4.3	4.3	3.4
สูตร 6 เอ	5.6	5.6	5.6	5.3	4.9	4.4	4.2	4.2	4.1	4.0	3.8	3.6	3.5	3.5	3.4	3.4	3.3	3.3	3.2	3.0	3.0	3.0
สูตร 6 บี	5.3	5.3	5.3	4.9	4.5	4.0	4.0	3.9	3.9	3.8	3.6	3.6	3.5	3.4	3.3	3.3	3.3	3.3	3.2	3.0	3.0	3.0



ภาพที่ 2 แสดงปริมาณการสร้างกรดอะซิติก



ภาพที่ 3 แสดงค่าพีเอช

ผลและวิจารณ์

ในการทดลองผลิตน้ำส้มสายชูครั้งนี้ใช้เชื้อ ACETOBACTER ACETIC 103 ในสูตรอาหารมาตรฐานและสูตรต่างๆ ในการทดลองครั้งแรก ได้ทำการทดลองทั้งหมด 6 สูตร ด้วยกัน และได้คัดเหลือ 4 สูตรที่มีอัตราการสร้างกรดดีกว่าอีก 2 สูตร เพื่อทำการทดลองครั้งที่ 2 สูตรที่ทำการทดลองครั้งที่ 2 มีสูตรที่ 1,2,4 และ 6 การทดลองครั้งแรกสูตร 1 และ 6 ให้ผลการสร้างกรดดีมากและรองลงมาได้แก่สูตร 4 และ 3 แต่เกณฑ์การสร้างกรดยังน้อยมากเมื่อเทียบกับสูตร 1 และสูตร 6 (ตารางที่ 2)

การทดลองครั้งที่ 2 ผลปรากฏว่าสูตรที่ 1 ในช่วงอาทิตย์แรกมีอัตราการสร้างกรดสูงมากรองลงมาคือสูตรที่ 1 อาทิตย์ที่สองสูตรที่ 1 จะมีอัตราการสร้างกรดเร็วมากจนมี % กรดใกล้เคียงกับสูตรที่ 6 (ภาพที่ 2)สำหรับสูตร 2 และ 4 มีอัตราการสร้างกรดต่ำมากทั้ง 2 สูตร โดยเฉพาะสูตร 2 แทบไม่เกิดปฏิกริยา อะไรเลยแต่สูตร 3 ที่ใช้สุราขาวเจือจางมีอัตราการสร้างกรดบ้างแต่ยังจัดอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสูตรที่ใช้สุราขาวจะมีสภาวะที่เหมาะสมกว่าการใช้แอลกอฮอล์ เนื่องจากส่วนใหญ่สูตรที่ใช้สุราขาวจะมี % กรดสูงกว่ายกเว้นสูตรที่ 6 ตั้งแต่วันที่ 11 ของสัปดาห์ที่ 2 แบบใช้แอลกอฮอล์จะมี % กรดสูงกว่าใช้สุราขาวเล็กน้อย (ภาพที่ 2)

สำหรับ PH จะเห็นได้ว่าไม่ว่าสูตรใดก็ตาม เมื่อมีการสร้างกรดเพิ่มขึ้น PH จะลดลง จากกราฟจะเห็นได้ว่าสูตร 2 และสูตร 4 ค่อนข้างมีพีเอชคงที่มีการเปลี่ยนน้อยมาก ตรงข้ามสูตร 1 กับ สูตร 6 PH จะลดลงอย่างมากโดยเฉพาะวันที่ 2 ถึงวันที่ 5แต่พอวันที่ 5 เป็นต้นไปก็จะอ่อย ๆ ลดลงในอัตราที่ไม่แตกต่างกันนักในแต่ละวัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อมีการสร้างกรดเพิ่มขึ้น PH กลับลดลง (ภาพที่ 2 และ 3 ประกอบกัน)

สำหรับสีและลักษณะทั่วไป เมื่อเริ่มทดลอง สูตร 1 มีสีเหลืองค่อนข้างเข้ม สูตร 2 มีสีขาวใส สูตร 4 สีขาวใสค่อนข้างเหลืองเล็กน้อย สูตร 6 มีสีเหลืองอ่อน เมื่อหมักถึงวันที่ 2 สูตรที่ 1 และ 6 เริ่ม ขุ่นขึ้น สูตร 4 ขุ่นเพียงเล็กน้อยแต่สูตร 2 ยังคงเดิม วันที่ 5 ของการหมักปรากฏว่าสูตร 6 และสูตร 1 เกิดฝ้าขาว ๆ ขึ้นปกคลุมบาง ๆ ที่ผิวหน้าอาหาร และสีก็เข้มและขุ่นเพิ่มขึ้นและมีตะกอนที่ส่วนล่างเล็กน้อย วันที่ 7 ของการหมักปรากฏว่าฝ้าที่ผิวหน้าของสูตร 1 และสูตร 6 มากขึ้นแต่สูตร 4 เกิดฝ้าที่ผิวหน้าเล็กน้อยสำหรับ

สูตร 2 ไม่ปรากฏฝ้าที่ผิวหน้าเลย เมื่อการหมักถึงวันที่ 13 ปรากฏว่าทุกสูตรฝ้าที่เคยเกิดจะมีเพียงเล็กน้อย แต่ความขุ่นเพิ่มมากขึ้นและเกิดตะกอนขึ้นด้วย เมื่ออาทิตย์สุดท้ายของการหมักปรากฏว่าจะไม่มีฝ้าเกิดขึ้นเลยแต่ความขุ่นสูงมากเช่นเดิม

แหล่งอาหารที่มีในสูตรทดลองที่เป็นอาหารของจุลินทรีย์ก็ เช่น เคซีน ไฮโดรไลเสท ซึ่งเป็นแหล่งของกรดอมิโนที่จำเป็นได้แก่ วาลีน ไฮโซลูซิน อะลานีน ฮิสติดีน เมธิโอนิน และโปรตีน แหล่งของวิตามินก็เช่น ทริปโตน ยีสต์ เอ็กซแทร็ก ซึ่งเป็นแหล่งของวิตามินมีคอมเพล็กที่ดีจากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าแหล่งอาหารมีอย่างสมบูรณ์ แต่สูตรที่ใช้แหล่งอาหารได้ดีมีเพียงสูตร 1 ซึ่งเป็นสูตรมาตรฐาน และสูตร 6 ซึ่งเป็นสูตรน้ำมะพร้าวซึ่งสาเหตุดังกล่าวข้างต้นสามารถตั้งเป็นสมมุติฐานได้คือ ประการแรก จุลินทรีย์ไม่สามารถสร้างเอนไซม์มาย่อยอาหารได้ตามปกติ เหมือนในสูตรอาหารมาตรฐานและสูตรน้ำมะพร้าว ประการที่สอง เชื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้อาจมีความจำเพาะกับสูตร 1 และสูตร 6 มากกว่าสูตรอื่นๆ ก็ได้ หรืออาจเนื่องจากใช้ปริมาณแอลกอฮอล์มากกว่าสุราขาวก็ได้ซึ่งผู้เคยทดลองเกี่ยวกับเรื่องนี้ก็เคยประสบปัญหานี้มาแล้วเช่นกัน ดังนั้นผู้ที่คิดว่าจะทำการทดลองที่เกี่ยวกับเรื่องนี้หรือมีส่วนคล้ายกันควรจะทำการศึกษา ปรับปรุง เปลี่ยนแปลงสูตรอาหารดูบ้างแม้กระทั่งเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

สรุป

ในการทดลองครั้งนี้สูตรที่ให้ผลการผลิตกรดได้ดีคือสูตรที่ 1และสูตรที่ 6 ส่วนสูตรที่ 2 และสูตรที่ 4 ไม่ให้ผลการผลิตกรดที่ดีเนื่องจากอัตราการผลิตกรดอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำมาก - เปอร์เซนติกรดที่ได้ในวันสุดท้ายของอาทิตย์ที่ 3 ของการหมักปรากฏดังนี้

สูตร 1 A ให้เปอร์เซนต์กรด = 3.85 %

สูตร 1 B ให้เปอร์เซนต์กรด = 6.13 %

สูตร 6 A ให้เปอร์เซนต์กรด = 6.07 %

สูตร 6 B ให้เปอร์เซนต์กรด = 5.11 %

สูตร 2 A ให้เปอร์เซนต์กรด = 0.06 %

สูตร 2 B ให้เปอร์เซนต์กรด = 0.30 %

สูตร 4 A ให้เปอร์เซนต์กรด = 0.36 %

สูตร 4 B ให้เปอร์เซนต์กรด = 3.94 %

ดังนั้นสำหรับผู้คิดจะทำการหมักเพื่อผลิตกรดน้ำส้มสายชูสูตรที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้คือสูตรที่ 1 และสูตรที่ 6 เพราะให้อัตราการผลิตกรดได้เร็วและสูงแต่สูตรที่เหมาะสมที่สุดที่น่าจะนำไปใช้คือสูตรที่ 6 ซึ่งเป็นสูตรน้ำมะพร้าว เพราะนอกจากจะให้ผลการผลิตกรดได้สูงและเร็วแล้วยังสามารถใช้ทั้ง 75 % ETHANOL และสุราขาวเจือจางในการสร้างกรดได้ดี ในอัตราที่สูงใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังมีขั้นตอนที่ไม่มากนัก สะดวก เพราะไม่ต้องการสารเคมีหรือสารอาหารยุ่งยากเหมือนสูตรอื่น ๆ เนื่องจากในน้ำมะพร้าวมีสารอาหารที่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผลิตกรดน้ำส้มสายชูอยู่แล้วอย่างอุดมสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

เฉลียว วรรณวัสดี, 2512 "น้ำส้มสายชู" สัมมนา ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นันทพร วรวุฒิพงษ์. 2517. การคัดสายพันธุ์บักเตรี เพื่อใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู กรุงเทพ : วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปุ่ย โรจน์ยุรานนท์. 2479. การทำน้ำส้มสายชูจากน้ำมะพร้าว. กสิกร. (6) : 966-967

วิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2521. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไวตามินบี 12 ของเชื้อ Bacillus megaterium ATCC 13699 ในน้ำมะพร้าวแก่. กรุงเทพฯ :

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2526. แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก เอกสารประกอบการสอน, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สายชล ชีวปรีชา และนภา โล่ห์ทอง. 2517. การใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อบักเตรีที่ผลิตกรดแลคติกและกรดน้ำส้ม. รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยาครั้งที่ 13 กรุงเทพฯ : สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัย-เกษตรศาสตร์.

Aurand, L.W., J.A. singleton, T.A Bell and J.L. Etchells 1966. of Tokyo Press, 1968. pp. 105-199,124.

Cohee, R.F. and Steffen, G. "Makes Vinegar Continuously." In Manufacturing Food Engineering: 31 (3), 1960. pp. 317-59.

De Ley & Frateur. "Acetic Acid Bacteria. W In Annval Review of Microbiology volume 11, 1957. pp. 317-323

Ebner, H. "Vinegar-Making Leaps Ahead." In Food Engineering, August, 1965.pp. 42-44.

Honsen, F. Fundamental Principles of Bacteriology. 5th edition. New York; Me Grow-Hill Book Company, Inc., 1961. pp.160-195.

Kutzing, H. Acetic Acid Bacteria. Tokyo; University of Tokyo Press, 1968.pp. 105-199, 124.

Peson, A. Relerf. (1822) "Acetic Acid Bacteria" chemical Publishing Co. Inc. N.Y.

Underkofler, A. lelard. 1954, "Industrial Fermentation " Chemical Publishing Co. Inc. N.Y.

ภาคผนวก

การวิเคราะห์เคมีและการเตรียมสาร

1. หากรดทั้งหมด (TOTAL ACID) ปรับปรุงจาก AOAC (1980)

1.1 สารเคมี

ก) น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เตรียมโดยนำน้ำกลั่นมาต้มเดือด 20 นาที

ข) สารละลายมาตรฐาน 0.1 $\bar{N}$ NaOH เตรียมจาก NaOH 4 กรัม เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดแก้วที่กันคาร์บอนไดออกไซด์ได้ และเป็นแก้วทนด่าง ก่อนนำมาใช้นำมาหาความเข้มข้นมาตรฐานก่อน

การหาความเข้มข้นมาตรฐานของ 0.1 $\bar{N}$ NaOH ทำได้โดยการชั่ง acid potasium phthalate (อบ 2 ชั่วโมงที่ 120 องศาเซลเซียสแล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง) อย่างละเอียดประมาณ 0.3 กรัม เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จึงเติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 90-100 มิลลิลิตร เมื่อ acid potassium phthalate ($K_2HC_8H_4O_4$) ละลาย จึงเติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด แล้วไตรเตรทด้วยสารละลาย 0.1 $\bar{N}$ NaOH ความเข้มข้นมาตรฐานคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน } (\bar{N}) = \frac{\text{กรัม } KHC_8H_4O_4 \times 1000}{\text{มิลลิลิตร NaOH} \times 204.229}$$

ค) สารละลายฟีนอฟธาลีน (PHENOLPHTHALEIN) ชั่ง 1 กรัม ฟีนอฟธาลีนละลายในแอลกอฮอล์ 95% 100 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด แล้วไตรเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 $\bar{N}$ NaOH จนกระทั่งถึง END POINT สีชมพู ปริมาณกรดคำนวณเป็น

หากรดอะซิติคตามสูตร

$$\text{กรดทั้งหมด (กรัม/100มล.)} = \frac{N \times V \times 60.1 \times 100}{1000 \times 1}$$

N = ความเข้มข้นมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH