การผลิตน้ำส้มสายชูโดยการตรึงเซลล์ในถังหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่อง

PRODUCTION OF VINEGAR BY FIXING CELL IN AIRLIFT FERMENTER

นภัสร บุญเพ็ชรแก้ว
NAPASORN BOONPHETKAEW

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2545

ISBN 974-324-100-4

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตน้ำส้มสายชูโดยการตรึงเซลล์ในถังหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่อง

PRODUCTION OF VINEGAR BY FIXING CELL IN AIRLIFT FERMENTER

นภษร บุญเพ็ชรแก้ว

NAPASORN BOONPHETKAEW

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....44976
วัน, เดือน, ปี.....16 ส.ค. 2546

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2545

ISBN 974 – 324 – 109 - 4

PRODUCTION OF VINEGAR BY FIXING CELL IN AIRLIFT FERMENTER

NAPASORN BOONPHETKAEW

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2002

ISBN 974 – 324 – 109 - 4

COPYRIGHT 2002

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLUGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตน้ำส้มสายชูโดยการตรึงเซลล์ในถังหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่อง
ชื่อนักศึกษา	นภษร บุญเพ็ชรแก้ว
รหัสประจำตัว	43066002
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การอาหาร
ภาควิชา	อุตสาหกรรมเกษตร
คณะ	เทคโนโลยีการเกษตร
พ.ศ.	2545
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. วราวุฒิ ครูส่ง

บทคัดย่อ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ในการผลิตน้ำส้มสายชูในขวดหมักทรงสูงที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง พบว่า ปริมาณและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด คือ รำข้าวเจ้าปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเอทธานอลเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณอากาศ 0.5 vvm

สำหรับการศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูในถังหมักทรงสูงที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่องในระบบการตรึงเชื้อบนวัสดุตัวกลาง วัสดุตัวกลางที่ใช้ในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู 4 ชนิด ได้แก่ ใยบวบ ใยพลาสติก ใยกรองน้ำสีขาว และผ้าฝ้าย พบว่า วัสดุตัวกลางที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Batch, Repeated batch และ Fed-batch คือ ใยบวบ ส่วนวัสดุตัวกลางที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Batch, Repeated batch และ Fed-batch คือ ใยพลาสติก โดยการหมักแบบ Batch เชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ให้ปริมาณกรดสูงสุด 2.4 และ 1.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการหมักแบบ Repeated batch เชื้อ *Acetobacter* sp. WK ให้ประมาณกรดสูงสุด 3.2-3.3 เปอร์เซ็นต์ ในรอบที่ 1-3 ของการเปลี่ยนสับสเตรท ส่วนเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ให้ปริมาณกรด 3.3 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 ของการหมัก และปริมาณกรดลดลงในการเปลี่ยนสับสเตรทครั้งต่อไป ส่วนการหมักแบบ Fed-batch เชื้อ *Acetobacter* sp. WK ให้ปริมาณกรดสูงสุด 4.6 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 26 ของการหมัก ส่วนเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ให้ปริมาณกรดสูงสุด 3.4 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 20 ของการหมัก

ประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK บนใยบวบ ใยพลาสติก และผ้าฝ้ายมี ประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK มากกว่า 28 วัน ใยกรองน้ำมีประสิทธิภาพ การยึดเกาะของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK ประมาณ 21 วัน ส่วนประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 บนใยพลาสติกมีประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ประมาณ 28 วัน ส่วนใยบวบ ใยกรองน้ำ และผ้าฝ้าย มีประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อ ประมาณ 21 วัน

Thesis Title	Production of Vinegar by Fixing Cell in Airlift Fermenter
Student	Miss Napasorn Boonphetkaew
Student ID	43066002
Degree	Master of Science
Programme	Food Science
Department	Agricultural Industry
Faculty	Agricultural Technology
Year	2002
Thesis Advisor	Assoc.Prof.Dr. Warawut Krusong

ABSTRACT

The optimum conditions for vinegar production by *Acetobacter* sp. WK and TISTR102 in cylindrical high-shaped fermentation bottle with continuous aeration were investigated. The 0.1% rice bran as nitrogen source, 1% acetic acid, 6% ethanol, 5% of *Acetobacter* sp. WK and TISTR102 starter and air supply 0.5 vvm were obtained.

Vinegar production in airlift fermenter with continuous aeration using fixing cell on carrier was studied. Four types of carriers used were natural gourd fiber, plastic fiber, white water filtration fiber and cotton fabric. It was found that the suitable types carriers for fixing cell of *Acetobacter* sp. WK and TISTR102 were natural gourd fiber and plastic fiber, respectively when operated in batch, repeated batch and fed-batch culture. For batch fermentation, *Acetobacter* sp. WK and TISTR102 yielded the highest acid content of 2.4% and 1.6% respectively. In repeated batch fermentation, *Acetobacter* sp. WK yielded the highest acid content of 3.3% in the first 3 cycles of substrate changes while *Acetobacter* sp. TISTR102 yielded 3.3% acid on the 7^{th} day of fermentation and then the acid content decreased on the next cycle of substrate changes. For fed-batch fermentation, *Acetobacter* sp. WK yielded the highest acid content of 4.6% on the 26^{th} day of fermentation while *Acetobacter* sp. TISTR102 yielded the highest acid content of 3.4% on the 20^{th} day of fermentation.

Holding efficiency of *Acetobacter* sp. WK to attach natural gourd fiber, plastic fiber and cotton fabric were found to be more than 28 days while white water filtration fiber had holding efficiency of *Acetobacter* sp. WK about 21 days. Holding efficiency of *Acetobacter* sp. TISTR102

on plastic fiber was about 28 days and on natural gourd fiber, white water filtration fiber and cotton fabric, the holding efficiency of about 21 days was observed.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ต้องขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. วราวุฒิ ครูส่ง อาจารย์ที่ปรึกษาเป็นอย่างสูง ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำในวิธีการดำเนินงาน การแก้ไขปัญหา ตลอดจนการหาเครื่องมือ, อุปกรณ์ และสารอาหารบางชนิดที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ และดร. ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด ที่ได้ให้เกียรติเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งช่วยให้คำแนะนำตรวจสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอพระขอบคุณบิดา มารดา พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ รวมทั้งน้องปาจรีย์ สุทธิผล อรวดี บุญชู อานนท์ ร่มลำดวน พรนิภา โพธิ์แฉล้ม และนิสา แสงอินทร์ ที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยครั้งนี้มาโดยตลอด

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการในการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ประโยชน์ ความรู้ และคุณค่าที่ได้จากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้แด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นภษร บุญเพ็ชรแก้ว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....V

สารบัญ.....VI

สารบัญตาราง.....IX

สารบัญภาพ.....XI

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 ขอบเขตของการวิจัย.....2

1.3 วัตถุประสงค์.....2

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 น้ำอ้อย (Sugar Cane Juice) และองค์ประกอบที่สำคัญ.....3

2.2 บวบ.....6

2.3 ฝ้าย.....8

2.4 เส้นใยเซลลูโลส.....9

2.5 พลาสติก.....10

2.6 ไฟเบอร์กล๊าส (Fiber glass).....13

2.7 *Acetobacter* sp.....16

2.8 ขั้นตอนการหมักน้ำส้มสายชู.....19

2.9 การพัฒนาการหมักน้ำส้มสายชู.....19

2.10 ถังหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่อง (Airlift Fermenter).....22

2.11 การหมักโดยวิธีการใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง.....23

2.12 การผลิตน้ำส้มสายชูโดยการตรึงเซลล์.....25

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ 27

3.1 วัตถุดิบ 27

3.2 เชื้อจุลินทรีย์ 27

3.3 สารเคมี 27

3.4 สารอาหาร 28

3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ 28

3.6 เครื่องมือและอุปกรณ์ 28

3.7 สถานที่ดำเนินงาน 29

3.8 วิธีการดำเนินงาน 29

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 33

4.1 ผลสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำส้มสายชูในขวดหมักทรงสูง ที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง 33

4.1.1 ผลของปริมาณและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 33

4.1.2 ผลของปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 35

4.1.3 ผลของปริมาณเอทธานอลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 36

4.1.4 ผลของปริมาณกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 37

4.1.5 ผลของปริมาณอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 38

4.2 ผลวัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูในถังหมักทรงสูง ที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง 39

4.2.1 วัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู ในลักษณะการหมักแบบ Batch 39

4.2.2 วัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch 44

4.2.3 ประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อน้ำส้มสายชูในวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ 48

4.2.4 วัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch 49

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....53

5.1 สรุปผลการทดลอง.....53

5.2 ข้อเสนอแนะ.....55

บรรณานุกรม.....56

ภาคนวก.....60

ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....61

ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี.....64

ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์ทางชีววิทยา.....70

ภาคผนวก ง รูปภาพ.....72

ภาคผนวก จ ข้อมูล.....75

ประวัติผู้เขียน.....86

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ปริมาณส่วนประกอบที่สำคัญในแต่ละส่วนของอ้อย....4

2.2 ส่วนประกอบของลำต้นอ้อยและของแข็งในน้ำอ้อย....5

2.3 แร่ธาตุต่าง ๆ ในน้ำอ้อย, Syrup และ Molasses....6

4.1 ผลของปริมาณและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด....34

4.2 ผลของปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด....36

4.3 ผลของปริมาณเอทธานอลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด....37

4.4 ผลของปริมาณกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด....38

4.5 ผลของปริมาณอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด....39

6.1 ผลปริมาณกรด pH ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต และปริมาณเชื้อ กับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Batch....76

6.2 ผลปริมาณกรด pH ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต และปริมาณเชื้อ กับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Batch....77

6.3 ผลปริมาณกรด และปริมาณแอลกอฮอล์กับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch....78

6.4 ผลปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต และปริมาณเชื้อกับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch....79

6.5 ผลปริมาณกรด และปริมาณแอลกอฮอล์กับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch....80

6.6 ผลปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต และปริมาณเชื้อกับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch....81

6.7 ผลปริมาณกรด และปริมาณแอลกอฮอล์กับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch....82

6.8 ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต และปริมาณเชื้อกับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch....83

6.9 ผลปริมาณกรด และปริมาณแอลกอฮอล์กับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch....84

สารบัญตาราง (ต่อ)

6.10 ผลปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต และปริมาณเชื้อกับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch.....85

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 โครงสร้างโมเลกุลเซลลูโลส....10

2.2 Air-lift fermenter....22

2.3 รูปแบบการตรึงเซลล์....24

4.1 การตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Batch....42

4.2 การตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Batch....43

4.3 การตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch....46

4.4 การตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch....47

4.5 การตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch....50

4.6 การตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch....51

6.1 การหมักน้ำส้มสายชูในขวดหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่อง....73

6.2 การหมักน้ำส้มสายชูโดยการตรึงเซลล์บนวัสดุตัวกลางในถังหมักทรงสูง ที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่อง....74

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำส้มสายชูเป็นเครื่องปรุงแต่งรสและกลิ่นของอาหาร เป็นสารให้ความเปรี้ยว ใช้ทำอาหารและถนอมอาหาร (สมใจ ศิริโภค. 2537) น้ำส้มสายชูหมักจัดเป็นน้ำส้มสายชูที่มีกลิ่นหอมและรสชาติดี มีสีต่างกันตามสีของวัตถุดิบ กลิ่นหอมของน้ำส้มสายชูได้จากสารบางชนิดที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก และกลิ่นรสจะดียิ่งขึ้นเมื่อเก็บไว้นาน ๆ (นภา โล่ทอง. 2520)

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยซึ่งมีส่วนประกอบที่เป็นน้ำ 73-76 เปอร์เซ็นต์ และในน้ำอ้อยส่วนที่เป็น soluble solid มีปริมาณน้ำตาลอยู่ถึง 75-92 เปอร์เซ็นต์ (James and Chung. 1993) จึงจัดเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักต่าง ๆ น้ำส้มสายชูหมักจะต้องอาศัยกิจกรรมจากจุลินทรีย์ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทธานอล และขั้นที่สองจึงใช้เชื้อน้ำส้มสายชูออกซิไดซ์เอทธานอลเป็นกรดอะซิติกอีกครั้งหนึ่ง (สุเมธ ตันตระเธียร. 2536) ในระยะต้นวิธีการหมักน้ำส้มสายชูเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบจะเจริญเป็นแผ่นฝ้าอยู่ที่ผิวหน้าของสารละลายเอทธานอลหรือไวน์และเปลี่ยนเอทธานอลเป็นกรดอะซิติก กระบวนการนี้การผลิตจะเกิดขึ้นช้าและมักไม่มีประสิทธิภาพ (Cruess. 1958) ต่อมามีการปรับปรุงกระบวนการผลิตโดยใช้วิธีแบบกึ่งต่อเนื่องเพื่อลดระยะเวลาและการสูญเสียสับสเตรทเนื่องจากการสร้างแผ่นฝ้าของเชื้อใหม่ (Conner and Allgeier. 1976; Adams. 1985) อย่างไรก็ตามอัตราการผลิตกรดยังช้าอยู่ ต่อมามีการเปลี่ยนมาใช้ถังหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ (Generator) ที่มีการบรรจุวัสดุตัวกลางประเภทต่าง ๆ (Allgeier, *et.al.* 1954; Greenshield. 1978; Nickol. 1979; Adams. 1985) เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของแผ่นฝ้าของเชื้อน้ำส้มสายชู มีระบบให้อากาศและควบคุมอุณหภูมิ ถังหมักที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรม คือ ฟริงค์เจนเนอเรเตอร์ (Frings generator) ซึ่งมีการควบคุมอัตโนมัติ แม้ว่าอัตราการผลิตกรดจะสูงกว่าการหมักโดยให้เชื้อเจริญที่ผิวหน้า แต่มักพบปัญหาการอุดตันของวัสดุตัวกลาง ทำให้ส่งผลต่อการส่งผ่านของออกซิเจนในถัง ปัจจุบันจึงนิยมใช้การหมักแบบสับเมอร์ก (Submerged fermentation) โดยใช้ถังหมักแบบอะซิเตเตอร์ (Acetator) (Ebner, *et al.* 1976) ซึ่งเป็นถังหมักที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถผลิตกรดได้รวดเร็ว แต่ต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูงทั้งในด้านเครื่องมือราคาแพงและการใช้พลังงาน อีกทั้งจำเป็นต้องใช้สูตรอาหารเฉพาะและเชื้อของบริษัทที่ผลิตเครื่องมือ หากมีเหตุขัดข้องจากระบบควบคุมอัตโนมัติ จะได้รับความเสียหายสูง (Adams. 1985) จะมีการสูญเสียเซลล์ในระหว่างการผลิต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการหมักด้วยถังหมักทรงสูงที่มีการให้อากาศแบบต่อเนื่อง (Airlift fermenter) และปรับปรุงวัสดุที่ใช้เป็นตัว

กลาง เพื่อแก้ไขปัญหาการอุดตันของตัวกลางและการส่งผ่านของออกซิเจนในถังหมัก รวมทั้งลดต้นทุนการผลิตและการใช้พลังงานที่ค่อนข้างสูงจากการใช้ถังหมักแบบอะซิเตเตอร์ด้วยโดยการให้อากาศแบบไม่ใช้ใบพัดกวน และอาศัยคุณสมบัติของเชื้อน้ำส้มสายชูในการเจริญที่ผิวหน้าและยึดเกาะกับตัวกลาง ซึ่งจะเอื้ออำนวยให้เซลล์ที่ยึดเกาะกับวัสดุตัวกลางสามารถที่จะออกซิไดซ์เอทธานอลไปเป็นกรดอะซิติกได้อย่างทั่วถึงและยังสามารถทำการผลิตได้อย่างต่อเนื่อง (Continuous) รวมทั้งแยกผลผลิตออกมาได้ง่าย โดยเซลล์ที่ถูกตรึงจะมีความคงทนและมีประสิทธิภาพการใช้งานนานกว่า (สมใจ ศิริโภค. 2537)

1.2 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 บนวัสดุตัวกลางประเภทต่าง ๆ ในถังหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่องในลักษณะการหมักแบบ Batch, Repeated batch และ Fed-batch

1.3 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชูของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 จากไวน์อ้อยในถังหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่อง
2. ศึกษาวัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ในถังหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่องในลักษณะการหมักแบบ Batch, Repeated batch และ Fed-batch

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำอ้อยในถังหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่อง โดยการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูบนวัสดุตัวกลางในลักษณะการหมักแบบ Batch, Repeated batch และ Fed-batch โดยช่วยลดต้นทุนการผลิตในด้านเครื่องมือ อาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณกล้าเชื้อ และพลังงานที่ใช้ ทำให้สามารถมีโอกาสแข่งขันในกลไกการตลาดได้เป็นอย่างดี

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำอ้อย (Sugar Cane Juice) และองค์ประกอบที่สำคัญ

อ้อย ประกอบด้วยน้ำและน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจะมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส และฟรุกโตส ที่อยู่เป็นอิสระน้อยมากเมื่อเทียบกับน้ำตาลซูโครส ดังตารางที่ 2.1 บริเวณลำต้นของอ้อย (Millable cane) จะมีน้ำและน้ำตาลซูโครสสูงมาก จึงนิยมนำไปใช้มากกว่าส่วนอื่น ๆ

องค์ประกอบพื้นฐานของน้ำอ้อย ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสในส่วนของของเหลว และเซลลูโลสในส่วนของกากอ้อยในของเหลว น้ำตาลซูโครสเป็น Disaccharide ประกอบด้วย monosaccharide สองชนิด คือ กลูโคส และฟรุกโตสอย่างละหนึ่งหน่วย เชื่อมด้วยพันธะ 1,2-glycosidic และไม่มีคุณสมบัติในการรีดิวส์ (Non-reducing sugar) น้ำตาลซูโครสจะเป็นผลผลิตส่วนใหญ่ที่ได้จากเมตะบอลิซึมของพืชที่มีคลอโรฟิล เช่น อ้อย และหัวบีท ส่วนเซลลูโลสเป็น Homopolysacchride ที่ประกอบด้วยน้ำตาล monosaccharide ที่เป็นกลูโคสตั้งแต่ 10 หน่วยขึ้นไป เชื่อมต่อด้วยพันธะ β1,4-glycosidic ซึ่งเซลลูโลสเป็นโครงสร้างหลักของพืชโดยเฉพาะผนังเซลล์พืช

ลำต้นอ้อย ประกอบด้วยของแข็งประมาณ 24-27% ซึ่งเป็นกากอ้อยและของแข็งที่ละลายได้ ดังตารางที่ 2.2 ของแข็งที่ละลายได้จะน้อยมาก ซึ่งแป้งนี้จะมีขนาดโมเลกุลระหว่าง 1-10 μm ประกอบด้วย amylose 29-49% และสามารถละลายได้ในน้ำร้อน ในน้ำอ้อยที่หีบใหม่จะมีความเข้มข้นของสารละลาย polysaccharides ประมาณ 620 ppm และไม่พบ dextran ที่ฟอร์มตัวอยู่เลย แต่เมื่อน้ำอ้อยเสีย dextran จะเกิดการฟอร์มตัวทำให้มีปริมาณ gum มากขึ้น มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ในของเหลว ทำให้น้ำอ้อยมีความหนืดมากขึ้นด้วย สำหรับโปรตีนในน้ำอ้อยจะคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปจาก 0.5% dry solid

แร่ธาตุในน้ำอ้อยมี Potassium เป็นแร่ธาตุที่มากที่สุด ซึ่งมีมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของเถ้าทั้งหมด ดังตารางที่ 2.3 ปริมาณแร่ธาตุนี้จะเพิ่มขึ้นตามอายุหรือความแก่ของอ้อยที่ใช้

น้ำอ้อยปกติจะมี pH ประมาณ 4.73-5.63 กรดที่พบมากที่สุด คือ Aconitic acid มีปริมาณ 1.54 เปอร์เซ็นต์ของของแข็งที่ละลายในน้ำ หรือ 3 เท่าของกรดอื่น ๆ ทั้งหมดรวมกัน ในการเก็บน้ำอ้อยโดยการแช่แข็งอาจทำให้ pH ของน้ำอ้อยลดลงได้ถ้าเก็บไม่ดี

ลักษณะของน้ำอ้อยที่สังเกตได้คือ ขุ่น มีสีเขียว (Dark-green) ปนสีเหลือง ซึ่งสีเขียวเกิดจาก pigment ได้แก่ Chlorophylls A, B, Carotene และ Xanthophyll (James and Chung. 1993)

ตารางที่ 2.1 ปริมาณส่วนประกอบที่สำคัญในแต่ละส่วนของอ้อย

Part	Portion of Whole (%)	Juice extraction (%)	Juice analyses (mg/ml)[a]				
			Starch	Soluble Polysaccharide	Sucrose	Fructose	Glucose
Leaf blade	11.1	40.0	0.32	5.40	7.72	3.75	6.76
Leaf sheath	4.3	38.6	0.05	4.03	14.20	3.33	5.92
Leaf roll	2.0	48.2	0.09	5.58	6.85	7.56	13.6
Stem tip	1.6	47.6	0.08	5.90	14.82	12.94	17.52
Millable cane							
Top 60 cm	14.0	69.3	0.07	1.81	130.46	6.88	9.84
2^{nd} 60 cm	14.8	71.3	0.06	1.45	154.88	5.38	6.08
3^{rd} 60 cm	17.8	73.6	0.04	1.47	181.85	3.63	4.04
4^{th} 60 cm	19.5	71.1	0.03	1.30	185.10	3.06	2.80
Stubble	9.3	65.3	0.07	2.01	152.50	3.01	5.94
Roots[b]	1.3	27.2	0.00	1.28	8.76	1.25	2.50
Dead leaves	4.3	37.1	0.00	5.42	0.00	0.00	0.00

[a] Starch was determined iodometrically ; soluble polysaccharides were measured as the alcohol-insoluble reactants with phenol-sulfuric acid and sugar were separated and measured by high-pressure liquid chromotrography.

[b] The entire root system was not used, only the partattached to the stubble as it came from the ground was tested.

ที่มา : James and Chung (1993)

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบของลำต้นอ้อยและของแข็งในน้ำอ้อย

Millable Cane	Cane (%)
Water	73-76
Solids	24-27
Soluble solids	10-16
Fiber (dry)	11-16
Juice Consituents	**Soluble Solids (%)**
Sugars	75-92
Sucrose	70-92
Glucose	2-4
Fructose	2-4
Salts	3.0-4.5
Inorganic acids	1.5-4.5
Organic acids	1.0-3.0
Organic acids	1.5-5.5
Carboxylic acids	1.1-3.0
Amino acid	0.5-2.5
Other organic nonsugars	
Protein	0.5-0.6
Starch	0.001-0.100
Gums	0.30-0.60

ที่มา : James and Chung (1993)

ตารางที่ 2.3 แร่ธาตุต่าง ๆ ในน้ำอ้อย Syrup และ Molasses

Constituent	Concentration (%solid)			
	Raw juice	Clarified juice	Syrup	Molasses
Potassium (K_2O)	0.4-2.0	0.3-1.0	0.7-1.0	2.3-6.5
Sodium (Na_2O)	0.3-1.0	0.03-0.09	0.02-0.04	0.03-0.06
Sulfate (SO_3)	0.11-0.52	0.16-0.44	0.20-0.61	1.10-3.39
Chloride (Cl)	0.10-0.29	0.10-0.26	0.16-0.46	0.13-1.11
Calcium (CaO)	0.17-0.32	0.27-0.55	0.35-0.37	0.86-1.64
Magnesium (MgO)	0.20-0.33	0.20-0.40	0.03-0.32	0.68-1.87
Silica (SiO2)	0.06-0.71	0.07-0.33	0.01-0.07	0.05-1.41
Phosphate (P2O4)	0.01-0.40	0.02-0.08	0.01-0.02	0.07-0.14
Iron (Fe2O3)	0.06-0.14	0.01-0.03	0.007-0.01	0.04-0.07
Sulphated ash	3.6-4.4	2.8-3.9	3.1-6.5	12.0-19.0
Conductivity ash	3.4-4.4	3.7-4.5	3.9-4.7	14.2-17.7

ที่มา : James and Chung (1993)

2.2 บวบ

บวบเป็นพืชชนิดหนึ่ง มีลักษณะกลมยาว มีลายรอบ ๆ พืชชนิดนี้เป็นไม้เลื้อยที่มีสรรพคุณช่วยขับความร้อนในร่างกาย สามารถลดอาการอักเสบต่าง ๆ ได้ เนื้อบวบมีธาตุเหล็ก ช่วยสร้างเม็ดเลือด กระดูกและฟัน กินเป็นผักมีแร่ธาตุมาก วิตามินน้อย เนื้อบวบดูสะอาด เขียวใส หวานนิด ๆ ตามธรรมชาติ และไม่ค่อยปนเปื้อนด้วยยาฆ่าแมลง เพราะบวบไม่ค่อยมีแมลงรบกวน บวบเป็นทั้งพืชผัก และพืชสมุนไพรมี 2 ชนิด คือ

(1) บวบเหลี่ยม (Angled Loofah Ridged of Gourd)

ชื่อสามัญ : Angled Loofah Ridged of Ribbed Gourd

ชื่อทางวิทยาศาสตร์ : Luffa acutangula (Linn.) Roxb.

เป็นพันธุ์ที่นิยมของผู้บริโภคอย่างแพร่หลายมีทั้งพันธุ์เบา ผลเล็กสั้น ขนาดยาวไม่เกิน 12 นิ้ว อายุจากวันปลูกถึงวันเก็บผลครั้งแรกประมาณ 50 วัน เหมาะสำหรับปลูกรับประทานเองใน

ครอบครัว พันธุ์หนัก ชนิดผลยาว 2-3 ฟุต อายุจากวันปลูกถึงวันเก็บผลครั้งแรก 70-75 วัน เหมาะสำหรับปลูกเป็นการค้า

(2) บวบหอม

ชื่อสามัญ : Sponge Gourd Vegetable Sponge

ชื่อทางวิทยาศาสตร์ : Luffa cylindrica Roem.

ตระกูล : Cucurbitaceae

ชนิดผลสั้น มีลักษณะกลมรี ความยาว 5-6 นิ้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-4 นิ้ว และชนิดผลยาว ลักษณะกลมรี ความยาวของผลประมาณ 24 นิ้ว เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-6 นิ้ว อายุเก็บเกี่ยวตั้งแต่ 75-120 วัน

บวบเหลี่ยมเป็นผักที่ใช้บริโภคสด และเส้นใยของผลแก่ยังใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรม นิยมบริโภคกันในเขตร้อน เพราะบวบเหลี่ยมสามารถขึ้นได้ดีในแถบประเทศเขตร้อน ปลูกกันมากในประเทศจีน อินเดีย ฮ่องกง และประเทศไทย

ผลของบวบเหลี่ยมจะยาวและมีเหลี่ยมไปตลอดตามความยาวของผล ตั้งแต่ขั้วจรดปลายผล ผิวค่อนข้างขรุขระ เมื่อผลแก่เต็มที่ จะมีส่วนของผลที่เป็นเส้นใย ซึ่งมีประโยชน์ในการประดิษฐ์ทำเป็นเครื่องใช้ต่าง ๆ ได้ ขนาดผล 5-7 x 22-30 เซนติเมตร ลำต้นเลื้อยยาวประมาณ 2-3 เมตร มีสีเขียวอ่อน เมื่อเจริญเต็มที่จะมีขี้ผึ้ง (Wax) ฉาบอยู่ที่ผิว น้ำจากลำต้นของบวบเหลี่ยม (Sap) สามารถทำเครื่องสำอาง และใช้ทำยาสมุนไพรได้ (อรษา แสงอุทัย. 2527)

ดอกบวบเหลี่ยมมีสีน้ำตาลเหลือง ดอกตัวผู้อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ส่วนดอกตัวเมียเป็นดอกเดี่ยว เถาเจริญเติบโตทางด้านความสูงหลายเมตร ดอกตัวเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าดอกตัวผู้ และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 เซนติเมตร จนกระทั่งถึง 8 เซนติเมตรขึ้นไปก็ได้

เมล็ดของบวบเหลี่ยม สามารถนำไปทำเมล็ดพันธุ์ต่อไปได้ เมล็ดบวบเหลี่ยมมีสีดำ แบน รูปร่างกลมรี ส่วนปลายแหลมเล็กน้อย ผิวเมล็ดขรุขระ ภายในมี Edible oil ที่รับประทานได้ เมล็ดพันธุ์มีน้ำหนัก 1 กรัมต่อจำนวน 9-11 เมล็ด (Rice. 1990)

2.2.1 ส่วนที่นำมาใช้

(1) ผลสด เส้นใยจากผล ยอดอ่อน

(2) น้ำมันจากเมล็ดแก่

2.2.2 สารที่มีคุณประโยชน์ในบวบเหลี่ยม

(1) ผลอ่อนมีแคลเซียม เหล็ก และฟอสฟอรัสมาก

(2) เมล็ดแก่มีรสขม เพราะมีสาร Cucurbitacin B, D, G, และ H

2.2.3 การนำไปใช้

ใยบวบมาใช้ขัดผิวได้ มักจะนิยมใช้ใยบวบในการขัดถูชำระคราบสกปรกตามร่างกาย ดังนั้นด้วยเหตุนี้จึงเป็นตัวจุดประกายความคิดขึ้นมาในการที่จะทำผลิตภัณฑ์จากใยบวบ เพื่อให้เกิดคุณค่ามากกว่าที่จะนำไปทิ้งอย่างไร้คุณค่า การแปรรูปวัสดุเหลือใช้จากใยบวบก็เป็นอีกตัวอย่างหนึ่ง ที่สามารถสร้างงานสร้างรายได้อย่างงดงาม ส่วนขั้นตอนการผลิตคือ นำบวบที่แห้งแล้วจากต้นมาลอกเปลือกด้านนอกออก จากนั้นทำความสะอาดด้วยการล้างน้ำสบู่อ่อน ๆ นำไปผึ่งแดดให้แห้งเพียงเท่านี้ก็จะได้ฟองน้ำถูตัวจากธรรมชาติอย่างดี ลักษณะเป็นเส้นใยพันกันไปมา (ธรณิศวร์ พิรุณละออ. 2545) [Internet]

2.3 ฝ้าย

ฝ้าย (Cotton) เป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกในทุกภาคของประเทศไทย เพราะเป็นพืชเขตอากาศร้อน ชอบดินเหนียวปนทราย อากาศโปร่ง ไม่ชอบที่ร่มเงาบัง เส้นใยของฝ้ายดูดความชื้นได้ง่าย เป็นตัวนำความร้อนที่เลว จึงเหมาะสำหรับทอเป็นเครื่องนุ่งห่มในเขตเมืองร้อน เพราะเมื่อฝ้ายดูดความชื้นแล้ว ความชื้นจะระเหยกลายเป็นไอ ผู้ที่สวมเสื้อผ้าด้วยผ้าฝ้ายจะรู้สึกเย็นสบาย ชาวบ้านทุกครัวเรือน สามารถปลูกฝ้ายได้ แล้วนำเส้นใยของฝ้ายมาทอเป็นผืนผ้าสำหรับนุ่งห่มและใช้สอยในชีวิตประจำวัน ฝ้ายปั่นด้วยมือสามารถทอเป็นผืนผ้าได้หลากหลายรูปแบบ และสวยงามเหมาะสมกับสภาพเศรษฐกิจปัจจุบัน

ฝ้าย (Cotton) ที่ใช้กันทั่วไปได้มาจากปุยที่ติดอยู่กับเมล็ดของฝ้ายดอก เป็นใยสั้น ๆ ประกอบด้วยเซลลูโลสเกือบทั้งหมด เซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่เป็นของแข็ง (เนื้อ) ของพืชทุกชนิด ฝ้ายมีหลายพันธุ์ ให้ใยที่แตกต่างกันเล็กน้อย บางชนิดให้ใยยาวบางชนิดให้ใยสั้น บางชนิดปุยจะมีสีขาวกว่าอีกชนิดหนึ่ง หลังจากฝ้ายดอกเติบโตเต็มที่และเก็บแล้ว จะต้องนำมาแยกชั้นคุณภาพและจำหน่ายให้กับแหล่งตลาดใหญ่ ผู้ที่มีทักษะเท่านั้นจึงจะสามารถตัดสินชั้นคุณภาพของฝ้ายได้ โดยใช้ความยาว สีและปริมาณสิ่งเจือปนที่มีอยู่ในมัดฝ้ายเป็นเกณฑ์ (นวลแข ปาลิวนิช. 2534)

2.3.1 ส่วนประกอบทางเคมีของเส้นใยฝ้าย (จากการทดลองของกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา เมื่อความชื้นของฝ้าย = 8%) มีดังนี้

(1) เซลลูโลส	94%
(2) โปรตีน (%N x 6.25)	1.3%
(3) สารเพคติก	1.2%
(4) ขี้ผึ้ง (Wax)	0.6%
(5) เถ้า (Ash)	1.2%

2.3.2 คุณสมบัติทางกายภาพบางประการของเส้นใยฝ้าย

คุณสมบัติของฝ้ายที่สำคัญมีหลายประการ เช่น ความยาว ความเหนียว และความละเอียดอ่อน ความแก่ เป็นต้น คุณสมบัติต่าง ๆ เหล่านี้ล้วนมีผลต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์ฝ้ายทั้งสิ้น

2.3.2.1 ฝ้ายที่มีความยาวมากกว่าจะละเอียด (เส้นเล็ก) กว่าฝ้ายปุยสั้น ฝ้ายที่มีความยาว 1 นิ้วขึ้นไป ใช้ปั่นเป็นเส้นด้ายและทอผ้าซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันทั่วไป ความยาวยิ่งมากขึ้นก็จะปั่นเป็นด้ายเส้นเล็กลง หรือทอเป็นผ้าเนื้อละเอียดมากขึ้น ส่วนฝ้ายที่ความยาวต่ำกว่า 1 นิ้วลงมาจะปั่นเป็นด้ายเส้นใหญ่ ซึ่งใช้ทอเป็นผ้าเนื้อหยาบมาก ๆ ได้แก่ จำพวกผ้าใบ ถ้าสั้นกว่านี้มาก ๆ ก็จะไปใช้ทำของอื่น ๆ เช่น ไส้ผ้านวม สำลี เป็นต้น

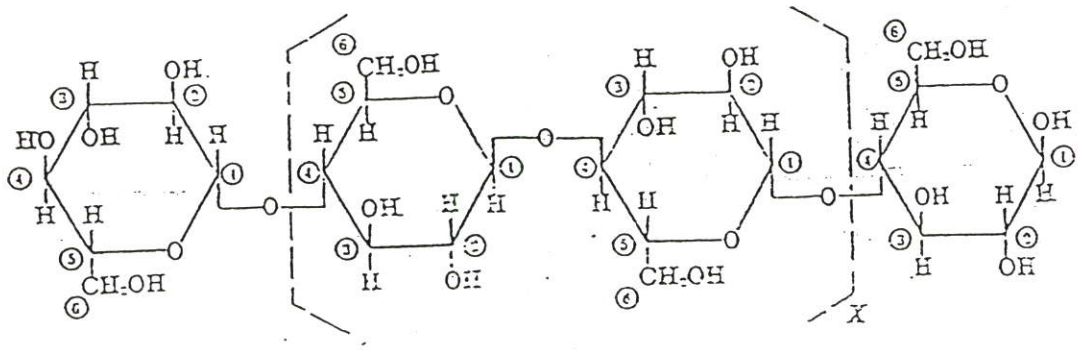
2.3.2.2 ความละเอียดอ่อน (ไมโครแนร์) ทดสอบโดยเครื่องวัดความละเอียดอ่อน (WIRA cotton fineness meter) เป็นค่าที่แสดงความละเอียดอ่อน และความแก่ของเส้นใยในเวลาเดียวกัน เมื่อทดสอบเส้นใยที่ค่าความแก่ (maturity) ใกล้เคียงกัน ค่า micronaire ที่ต่ำกว่าแสดงว่าฝ้ายมีความละเอียดดีกว่า ซึ่งสามารถปั่นเป็นด้ายเบอร์สูง (เส้นเล็ก) กว่าฝ้ายที่หยาบ แต่เมื่อเปรียบเทียบฝ้ายที่มีความละเอียดเท่า ๆ กัน หรือฝ้ายพันธุ์เดียวกัน ฝ้ายที่แก่กว่า จะมีค่า micronaire สูงกว่าฝ้ายที่ไม่แก่

2.3.2.3 ความเหนียวของกลุ่มเส้นใย (fibre bundle strength) เป็นการวัดความเหนียวของกลุ่มเส้นใยด้วยเครื่องสเตโลเมเตอร์ (Stelometer) หน่วยเป็นกรัม/เท็กซ์ (g/tex) ใช้แรงดึงให้กลุ่มเส้นใยขาดออกจากกัน แล้วหาค่าความเหนียว (tenacity)

2.3.2.4 ความสมบูรณ์ (maturity) ความแก่ของฝ้าย ถือเอาความหนาของผนังชั้นใน (secondary wall) ซึ่งเป็นส่วนที่สะสมของเซลลูโลสเป็นเกณฑ์ ฝ้ายที่เส้นใยผนังหนามาก แสดงว่าแก่มาก ในทางปฏิบัติจะนำเส้นใยมาจำนวนหนึ่ง ส่องกล้องจุลทรรศน์หา % เส้นใยแก่ และเส้นตาย (ผนังบางมาก) แล้วคำนวณค่าเป็นอัตราส่วนความแก่ (maturity ratio) เส้นใยที่มีความสมบูรณ์ต่ำ ทำให้เกิดปัญหาในการปั่นด้าย เช่น เป็นไข่ปลา (nep) มาก ทำให้ลักษณะ (appearance) ของผ้าไม่ดี นอกจากนี้ยังเกิดปัญหาเกี่ยวกับการย้อมสี และอาจทำให้ความเหนียวของด้ายลดลง (กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2527)

2.4 เส้นใยเซลลูโลส

เส้นใยเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งซึ่งได้จากธรรมชาติ เช่น เยื่อไม้ ใยฝ้าย ใยบวบ ก่อนใช้งานต้องมีการปรับปรุงสมบัติให้ดีขึ้นก่อนเพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งาน โครงสร้างของเซลลูโลส เป็นพอลิแซคคาไลด์ที่เกิดจากเบตากลูโคส ต่อกันเป็นสายโซ่ยาว ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส
ที่มา : นภา เหลืองพิริยะชาติ และเปรมหทัย ขำเกษม (2537)

เซลลูโลสที่ได้มาจากเยื่อไม้จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 160,000 น้ำหนักโมเลกุลของเซลลูโลสมีความสำคัญต่อสมบัติทางกายภาพ ดังนั้นจึงสามารถปรับปรุงสมบัติได้โดยการเพิ่มน้ำหนักโมเลกุล การกระจายโมเลกุลของเซลลูโลสมีความสำคัญเพราะส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะส่งผลให้มีสมบัติทางกายภาพไม่ดี และจากการศึกษาโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส พบว่า โมเลกุลของเส้นใยเซลลูโลสมีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบส่วนที่เป็นผลึกจะแยกออกจากส่วนที่เป็นอสัณฐานอย่างชัดเจน

2.4.1 สมบัติทางกายภาพของเซลลูโลส

2.4.1.1 การดูดซับความชื้น เซลลูโลสจะมีการดูดหรือคายไอน้ำ และของเหลวอื่น ๆ ซึ่งปริมาณความชื้นในเซลลูโลสจะมีผลต่อสมบัติเชิงกล

2.4.1.2 การละลายและความหนืด เซลลูโลสไม่ละลายในน้ำ แต่จะละลายในกรดเข้มข้น และจะเกิดไฮโดรไลซ์อย่างรวดเร็วเมื่อแช่ไว้ในกรดที่อุณหภูมิห้อง

2.4.1.3 ความหนาแน่น พบว่าความหนาแน่นของเซลลูโลสที่เป็นเส้นใยเดี่ยว จะมีค่าไม่แน่นอน ค่าเฉลี่ยของเส้นใยเซลลูโลสจะแปรตามชนิด และอาจจะเปลี่ยนเนื่องจากการปรับปรุงทางเคมี (นภา เหลืองพิริยะชาติ และเปรมหทัย ขำเกษม. 2537)

2.5 พลาสติก

พลาสติก นับว่าเป็นวัสดุที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวันของเราอย่างมาก และกำลังเป็นวัสดุสร้างที่มีคุณค่าควบคู่ไปกับเหล็กและไม้ถ้ารู้จักเลือกใช้พลาสติกให้เหมาะสมกับงาน ทั้งนี้เพราะสามารถสร้าง ดัดแปลง และแปรรูปได้ง่าย มนุษย์เราได้รู้จักวัสดุที่มีคุณสมบัติเหนียว ทนต่อการฉีกขาด ยืดหยุ่นได้ และทนต่อการสึกหรอได้ดี แต่ยังไม่รู้จักโครงสร้างที่แท้จริงของวัสดุนี้ดีนัก

ซึ่งเป็นสารประกอบของมาโครโมเลกุล (Macromolecule) และยังมีใช้อยู่ในปัจจุบัน เช่น เซลลูโลส (Cellulose)โปรตีน และยางธรรมชาติ

พลาสติก คือ วัสดุที่ประกอบด้วยมาโครโมเลกุลที่มีอยู่ตามธรรมชาติ (เช่น ยางธรรมชาติ เซลลูโลส โปรตีน ฯลฯ) หรือได้จากการสังเคราะห์สารประกอบโมเลกุลต่ำ (เช่น Ethylene Benzol Formaldehyde ฯลฯ)

มาโครโมเลกุลนั้นเราสามารถทำได้โดยการสังเคราะห์ โดยนำเอาสารประกอบจาก 2 ธาตุ หรือหลาย ๆ ธาตุ ที่เรียกว่า Monomer มาทำปฏิกิริยาเชิงซ้อน (Polyreaction) ซึ่งประกอบด้วย ขบวนการ Polymerisation ขบวนการ Polyaddition และขบวนการ Polycondensation (บรรเลง ศรนิล. 2525)

พลาสติกที่ใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมจำแนกออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

(1) พลาสติกที่ได้จากสารพอลิเมอร์ในธรรมชาติ เช่น เนื้อไม้ เส้นใยธรรมชาติ (ฝ้ายและไหม เป็นต้น) โปรตีน และไบโอพอลิเมอร์ เป็นต้น

(2) พลาสติกที่ได้จากพอลิเมอร์สังเคราะห์ ได้มาจากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรซ์ (Polymerization) ของโมโนเมอร์ เช่น พอลิเอธิลีน พอลิสไตรีน และพอลิเอสเทอร์ เป็นต้น

พลาสติกที่ผลิตจากพอลิเมอร์ในธรรมชาติทุกชนิดสามารถย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ในขณะที่พลาสติกที่ผลิตได้จากพอลิเมอร์สังเคราะห์จำนวนมากมายหลายชนิดไม่สามารถย่อยสลายได้ พลาสติกที่มีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถไฮโดรไลซ์ได้ เช่น อะลิฟาติก พอลิเอสเทอร์ พอลิเอไมด์ และพอลิยูรีเทน การสลายตัวของพลาสติกเกิดขึ้นได้เนื่องจากสาเหตุหลาย ๆ ประการ แต่ที่น่าสนใจคือ การสลายตัวของพลาสติกอันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ (Microorganism) โดยเฉพาะแบคทีเรีย และรา

2.5.1 สาเหตุที่พลาสติกที่ผลิตจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้

พลาสติกที่ผลิตจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ได้จากน้ำมันปิโตรเลียม และมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากพอ เมื่อโซ่โมเลกุลมีขนาดยาวมาก ๆ ทำให้ความทนทานต่อการย่อยสลายโดยเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี จากการค้นคว้าวิจัยของบริษัทยูเนียนคาร์ไบด์ได้นำพอลิเอทิลินชนิดความหนาแน่นสูงที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 123,000 และมีน้ำหนักโมเลกุลลดลงมาเรื่อย ๆ มาทดสอบสมบัติการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ พบว่า พอลิเอทิลินความหนาแน่นสูง ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ จะไม่สามารถย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้ พอลิเอทิลินสามารถย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ได้เมื่อน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 3,200

พลาสติกที่ผลิตจากพอลิเมอร์สังเคราะห์มีสมบัติไม่ชอบน้ำ การซึมผ่านของความชื้นต่ำมีลักษณะเป็นรูพรุนและมีพื้นที่น้อย เนื่องจากในระหว่างการย่อยสลายโดยเชื้อจุลินทรีย์ทำให้

พลาสติกมีขนาดเล็กลงโดยผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนให้เป็นสารชนิดอื่นต่อไป พลาสติกที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำและมีการซึมผ่านของความชื้นต่ำจะทำให้เอนไซม์สัมผัสกับผิวหน้าของพลาสติกน้อยลง การที่พลาสติกไม่เป็นรูพรุนทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสยิ่งน้อยลง จึงย่อยสลายได้ยาก (ลลิดา บุญโฉม และวราภรณ์ พุทธัสสะ. 2542)

2.5.2 ประเภทของพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้จำแนกเป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

2.5.2.1 พลาสติกที่สามารถสลายตัวได้ในทางชีวภาพ (Biodegradable plastics)

การย่อยสลายทางชีวภาพ หมายถึง การย่อยสลายที่มาจากกิจกรรมทางชีวภาพ โดยเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์ที่มาจากเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งการย่อยสลายนี้จะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีที่สำคัญ พลาสติกที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติเนื่องมาจากการกระทำของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียและรา เป็นต้น

การสลายตัวของพลาสติกในทางชีวภาพมี 3 ลักษณะคือ

(1) พลาสติกไม่ได้เสื่อมสลายเนื่องจากจุลินทรีย์โดยตรง แต่ถูกจุลินทรีย์เข้าไปย่อยสลายสารเติมแต่งในส่วนอื่น ๆ ทำให้เหลือพลาสติกอยู่ในสภาพโครงสร้างรูพรุน และต่อไปก็จะกลายเป็นผงละเอียด

(2) การเสื่อมสลายที่เกิดขึ้นเนื่องจากเปอร์ออกไซด์เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยตัวเอง (Auto oxidation) ซึ่งทำให้สายโซ่โมเลกุลของพลาสติกสลายตัวสั้นลงเพื่อให้จุลินทรีย์สลายต่อเพื่อเปลี่ยนให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำต่อไป

(3) การเสื่อมสลายเนื่องจากการกระทำของจุลินทรีย์โดยตรง นั่นคือจุลินทรีย์จะปล่อยเอนไซม์เพื่อทำการย่อยสลายพลาสติกประเภทนั้นได้โดยตรง เช่น พอลลิคาร์โปรแลคโตน และพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรทอารีเรท เป็นต้น

2.5.2.2 พลาสติกที่สามารถสลายตัวได้โดยแสง (Photo degradable plastics)

เป็นพลาสติกที่สลายตัวได้เมื่อได้รับแสง ซึ่งพลาสติกชนิดนี้จะมีหมู่คาร์บอนิล เมื่อได้รับแสงอาทิตย์จะสามารถดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตทำให้สายโซ่โมเลกุลของพอลิเมอร์สลายตัว ดังนั้นถ้านำพลาสติกชนิดนี้ไปทิ้งไว้กลางแจ้งหลังจากการใช้งานแล้ว โดยปล่อยทิ้งไว้ให้โดนแสงอาทิตย์พลาสติกชนิดนี้จะเสื่อมสลายและค่อย ๆ สลายตัวได้

2.5.2.3 พลาสติกที่สามารถสลายตัวด้วยวิธีอื่น ๆ

พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้โดยวิธีอื่นยังมีอีกมากมายหลายชนิด ซึ่งจะยกตัวอย่างเพียงบางชนิดเท่านั้น เช่น พลาสติกที่สามารถสลายตัวได้โดยน้ำและพลาสติกที่สามารถสลายตัวทั้งทางชีวภาพและแสง เป็นต้น เนื่องจากพลาสติกสามารถสลายตัวได้ดังกล่าวเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เพราะการ

รวมเอาข้อดีของพลาสติกที่สามารถสลายตัวได้ในแต่ละวิธีเอาไว้ เช่น พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยเอโซอะโรมาติกและหมู่คีโตนไวต่อแสงในระหว่างใช้งาน หมู่อะซิโตนที่ไวต่อแสงในระหว่างใช้งาน หมู่เอโซจะช่วยป้องกันการสลายตัวเนื่องจากแสงและหลังจากการเลือกใช้งานแล้ว พลาสติกชนิดนี้จะถูกทิ้งไว้ในสภาพแวดล้อมทำให้หมู่เอโซถูกจุลินทรีย์เข้าทำลายและเหลือหมู่ที่สามารถสลายตัวเนื่องจากแสง ดังนั้นเมื่อทิ้งไว้กลางแจ้งจะสามารถสลายตัวได้ต่อไป (ลลิดา บุญโฉม และ วราภรณ์ พุทธัสสะ. 2542)

2.6 ไฟเบอร์กล๊าส (Fiber Glass)

เมื่อไม่นานมานี้พลาสติกยังเป็นรองวัสดุอื่นๆ เช่น ไม้ เหล็ก ยาง กระดาษ แก้ว ฯลฯ ได้เริ่มมีบทบาทต่อมวลมนุษย์มากขึ้นทุกวันดังจะสังเกตเห็นได้จากสิ่งแวดล้อมในชีวิตประจำวันของเราซึ่งมีพลาสติกหลายชนิดเข้ามาเกี่ยวพันด้วยทั้งนี้ เนื่องจากการที่ได้มีการปรับปรุงเทคโนโลยีการผลิตวัตถุดิบและการนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ได้ถูกทาง จึงทำให้พลาสติกซึ่งเป็นรองวัสดุพวกอื่นมาก่อนในด้านความแข็งแรง (โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อถูกความร้อน) กลับถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากคุณสมบัติที่ดีกว่า เช่น ความคงทนต่อการผุกร่อนหรือเป็นสนิมน้ำหนักเบา สามารถออกแบบเพื่อนำไปใช้งานได้อย่างถูกต้องตามความต้องการได้ดีและสวยงาม อีกทั้งยังเป็นฉนวนไฟฟ้าและฉนวนที่กันความร้อนที่ดีอีกด้วย การปรับปรุงทางด้านการเสริมความแข็งแรงของพลาสติกให้ใช้งานได้ทัดเทียมกับโลหะนั้น ทำได้โดยการใช้วัสดุซึ่งมีคุณสมบัติที่เรียกได้ทั้งแข็ง และเหนียวมาเสริมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ถ้าจะเปรียบเทียบกับสิ่งก่อสร้างอาคารคอนกรีตเสริมเหล็ก คอนกรีต (ปูนซีเมนต์+หิน+ทราย) เป็นรูปร่าง เหล็กเส้นภายในเป็นส่วนเสริมความแข็งแรง ใส่เหล็กมากอาคารจะยิ่งแข็งแรงมากขึ้น ผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ได้รับการปรับปรุงดังกล่าวโดยใส่วัสดุอื่นเพื่อเสริมความแข็งแรง เราจึงเรียกว่า "ผลิตภัณฑ์พลาสติกเสริมแรง" (Reinforced Pastic) วัสดุที่มีคุณสมบัติที่ดีและเหมาะสมที่สุดที่จะเอามาเสริมแรงให้พลาสติกก็คือ "ใยแก้ว" (Glass Fiber) ซึ่งมีลักษณะอ่อนนุ่มแต่เหนียว ทั้งทนการผุกร่อนได้ดี ทนความร้อนได้สูง เป็นฉนวนความร้อนและทนสารเคมี ส่วนพลาสติกที่นำมาใช้เป็นเนื้อ ต้องเป็นชนิดที่มีความแข็งแรงมากซึ่งถ้าไม่มีการเสริมแรงแล้วจะเปราะดังนั้นเราจึงเลือกเอาพลาสติกประเภท"เทอร์โมเซ็ตติ้ง" มาใช้งานซึ่งได้แก่พวกโพลิเอสเทอร์เรซิน (Unsaturated Polyester Resin) และอีพอกซี่เรซิ่น (Epoxy Resin) เป็นต้น พลาสติกจำพวกนี้เป็นพลาสติกเหลวซึ่งภายหลังจากผสมกับตัวช่วยเร่งปฏิกริยา (Accelerator หรือ Promoter) และตัวทำให้แข็ง (Hardener) หรือตัวคะตะลิสต์ (Catalyst) หรือตัวเร่งปฏิกริยา แล้วจะเกิดปรากฏการณ์ทางเคมี (Polymerization) มีความร้อนสูงเกินกว่า 100 องศา แล้วจะเปลี่ยนสภาพเป็นพลาสติกแข็งไม่คืนรูปอีก ดังนั้นการสร้างผลิตภัณฑ์ขึ้นมาโดยใช้วิธีดังกล่าวแล้วจึงเรียกได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกเสริมแรงด้วยใยแก้ว หรือ FRP หรือ GRP (Fiber Glass Reingorced Plastics) ซึ่งเราเรียกง่ายๆว่า ผลิต

ภัณฑ์ไฟเบอร์กล๊าส หรือ ผลิตภัณฑ์เอฟอาร์พี อุตสาหหรรมการทำผลิตภัณฑ์ไฟเบอร์กล๊าส หรือ เอฟอาร์พี พึ่งเจริญในประเทศไทยเมื่อ 20 กว่าปีมานี้ โดยในระยะแรกนิยมนำไปทำเรือเร็วต่างๆ เฟอร์นิเจอร์ และที่กำลังได้รับความนิยมจากประชาชนอย่างมากในขณะนี้คือ ชิ้นส่วนประดับยนต์ เพื่อเสริมประสิทธิภาพทางด้านอากาศพลศาสตร์และความสวยงาม ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาไปมาก จนก้าวไปสู่ FRP ที่มีโครงสร้างทางวิศวกรรมศาสตร์ มีการคำนวนโครงสร้างในการผลิตชั้นสูง จนกระทั่งพัฒนาเป็นเคฟลาร์ไฟเบอร์ และคาร์บอนไฟเบอร์ซึ่งทนความร้อนสูงและมีความแข็งแรงเป็นพิเศษ

2.6.1 คุณสมบัติ

ใยแก้วเป็นชื่อที่ใช้เพื่อผลิตไฟเบอร์ซึ่งแก่นสารของไฟเบอร์คือแก้ว แก้วเป็นวัสดุชนิดหนึ่งทำมาจากซิลิโคนไดออกไซด์ กับออกไซด์ของโลหะต่างๆ และส่วนประกอบอื่นๆ ผ่านการหลอมละลายไฟเบอร์จัดเป็นอนุภาคด้วยขนาดความยาวต่อเส้นผ่าศูนย์กลางในอัตราเกณฑ์ 3 ต่อ 1 หรือมากกว่า ไฟเบอร์ที่เข้าสู่ระบบการหายใจมีน้ำหนักปานกลาง เคลื่อนไหวอยู่ในอากาศด้วยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 3.5 mm หรือเล็กกว่าไฟเบอร์ที่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 1 mm มีโอกาสเข้าไปตกตะกอนในเซลล์เนื้อเยื่อปอด ซึ่งเป็นที่เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซได้สูง ใยแก้วผลิตโดยการเคลื่อนตัวจากศูนย์กลางหรือการเป่าก๊าซเหลว และประกอบขึ้นเป็นไฟเบอร์รูปกระบอกขนาดสั้น

2.6.2 การนำไปใช้

ใยแก้วส่วนใหญ่ถูกผลิตขึ้นเพื่อเป็นฉนวนความร้อนและฉนวนกันเสียงสะท้อนในงานก่อสร้างและโครงสร้างเรือในปี ค.ศ. 1980 ใยแก้วประมาณ 80% ถูกผลิตขึ้นเพื่อเป็นฉนวนใช้ในบ้านใยแก้วในรูปใยบรรจุถุง นำไปเทลงในพื้นที่ที่กำหนด เช่น ระหว่างช่อง รองพื้นกระดานในเพดาน ในระบบปั๊ม และระบบแอร์ก็มีความต้องการใช้ฉนวนเหมือนกัน ใยแก้ว และ ไฟเบอร์กล๊าสถูกใช้เพื่อเป็นฉนวนต้านความร้อน ท่อโลหะมักจะหุ้มด้วยไฟเบอร์กล๊าสเช่นกัน เส้นผ่าศูนย์กลางของไฟเบอร์กล๊าส (0.005 - 3.8 mm) ได้ถูกนำมาใช้ในอากาศ กรองของเหลว และไฟเบอร์กล๊าสถูกใช้ในเตาหลอมโลหะและระบบปรับอากาศ ตัวกรองไฟเบอร์กล๊าสถูกนำไปใช้ ในการผลิตเครื่องดื่ม การปรุงยา กระดาษ เป็นตัวกรองในสระว่ายน้ำและประโยชน์ใช้งานอย่างอื่นอีกมากมาย

ใยแก้วเป็นตัวเสริมความแข็งแรงให้กับโพลีเอสเตอร์เรซิ่นในทางรับแรง (mechanical Strength) โดยมีรูปร่างแตกต่างกันไป เช่น เส้นยาว (Roving) เส้นสั้น (Chopped Strand) แบบรีดเป็นผืน (Mat) และแบบถักเป็นเส้น (Fabrics) ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ใยแก้วต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับคุณสมบัติและขนาดชิ้นงานไฟเบอร์กล๊าสที่ต้องการ

เส้นใยแก้วเหล่านี้จะมีน้ำยาอาบผิวหลายชนิด เช่น Silane finish หรือ Chrome finish เป็นต้น มีคุณสมบัติในการทำให้การยึดเกาะระหว่างเส้นใยแก้วกับโพลีเอสเตอร์เรซิ่นดียิ่งขึ้น

ใยแก้วมีส่วนผสมทางเคมี ดังนี้

Silicone dioxide	52-56%
Calcium oxide	16-25%
Aluminium oxide	12-16%
Boron oxide	8-13%
Sodium	น้อยกว่า 1%
Potassium oxide	
Magnesium oxide	0-6%

ใยแก้วชนิดเส้นยาว (Roving) มีลักษณะคล้ายเส้นด้ายม้วนเป็นหลอด เหมาะสำหรับกรรมวิธีการผลิตแบบใช้เครื่องพ่น (Spray up) แบบพันท่อ (Filament winding) และแบบดึงแนวยาว (Pultrusion) ให้ความแข็งแรงในด้านการรับแรงดึง และแรงบิดงอได้สูงมาก

ใยแก้วชนิดเส้นสั้น (Chopped Strands) เป็นใยแก้วชนิดเส้นสั้นเหมาะสำหรับใช้กับกรรมวิธีการผลิตแบบอัดเหลว (Premix molding) คือ ใช้ใยแก้วชนิดเส้นสั้นผสมกับโพลีเอสเตอร์เรซิ่นเสียก่อนแล้วจึงเทอัดลงไปในแม่แบบ ขนาดเส้นมาตรฐานยาว 3 และ 6 มิลลิเมตร

ใยแก้วชนิดผืนเส้นสั้น (Chopped Strands Mat) เป็นใยแก้วชนิดที่นิยมใช้กับงานทั่ว ๆ ไป มีผืนขนาดแตกต่างกันไปแล้วแต่การใช้งาน เช่น ผืนเบอร์ 300 450 และ 600 (ตัวเลขของผืนเบอร์ คือ น้ำหนักเป็นกรับต่อหนึ่งตารางเมตร ดังนั้นใยแก้วเบอร์ 300 จะบางกว่าเบอร์ 450) ใยแก้วบางชนิดนิยมใช้กับชิ้นงานขนาดเล็ก ต้องการน้ำหนักเบา ใยแก้วหนาใช้กับชิ้นงานใหญ่

ใยแก้วชนิดผืนเส้นยาว (Continuous Strand Mat) ใยแก้วชนิดนี้เสริมให้ชิ้นงานแข็งแรงกว่าชนิดผืนเส้นสั้น เพราะเส้นใยแก้วยาวตลอดเป็นเส้นเดียวกัน ใช้กับชิ้นงานที่มีผิวเรียบตลอด โดยปกติจะใช้กับการผลิตที่ใช้เครื่องจักร เช่น เครื่องอัด ขนาดที่นิยมใช้คือ ขนาดเบอร์ 450 และ 750

ใยแก้วชนิดผืนเส้นใยละเอียด (Surfacing Mat) ใช้สำหรับเสริมชั้นแรกต่อจากเจลโค๊ต ในชิ้นงานพิเศษหรือขนาดเล็ก ขนาดที่นิยมใช้คือ เบอร์ 30 และ 60 แต่ความเป็นจริงแล้วในโรงงานมาตรฐานจะใช้ใยแก้วชนิดผืนเส้นสั้น (Chopped Strands Mat) เบอร์ 300 เป็นชิ้นแรกต่อจากเจลโค๊ต

ใยแก้วชนิดผืนทอละเอียด (Fabrics) ใช้กับชิ้นงานที่ต้องการความแข็งแรงเป็นพิเศษ หรือชั้นที่ 2-3 ต่อจากเจลโค๊ต มีชื่อเรียกง่าย ๆ ทั่วไปว่า ใยแก้วสานเล็ก ขนาดที่นิยมใช้คือ เบอร์ 100 130 200 และ 300

ใยแก้วชนิดผืนทอหยาบ (Woven Roving) ใช้กับชิ้นงานขนาดใหญ่ที่ต้องการความแข็งแรงมาก ๆ เช่น เรือ โดยใช้สลับกับใยแก้วชนิดผืนเส้นสั้น มีชื่อเรียกง่าย ๆ ทั่วไปว่า ใยแก้วสานใหญ่ ขนาดที่นิยมใช้คือ เบอร์ 600 และ 800 (พิชิต เลี่ยมพิพัฒน์. 2530)

2.7 *Acetobacter* sp.

2.7.1 คุณสมบัติทั่วไปของ *Acetobacter* sp.

เซลล์ของ *Acetobacter* sp. มีหลายลักษณะ (pleomorphic) ปกติพบรูปร่างค่อนข้างรีจนกระทั่งเป็นท่อนชัดเจน ขนาดกว้างประมาณ 0.6-0.8 ไมครอน ยาวประมาณ 1.0-3.0 ไมครอน อาจพบเซลล์เดี่ยว ๆ จับเป็นคู่หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ บางครั้งพบเซลล์ที่มีรูปร่างแปลกไปจากที่กล่าวมาแล้ว เช่น รูปร่างกลม ยืดยาวออก บวม หรือรูปกระบอก บางชนิดมีแฟล็กเจลล่าแบบรอบเซลล์ (peritrichous flagella) ทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้ (De Ley and Frateur. 1974b) นอกจากนั้นมีรายงานว่าเซลล์ที่มีอายุน้อยของ *A. peroxydans* สามารถเคลื่อนที่ได้ แต่ไม่พบการเคลื่อนที่เมื่อเซลล์มีอายุมาก แสดงว่าอายุของเซลล์มีผลต่อการเคลื่อนที่และการสร้างเฟล็กเจลล่า ส่วน *Acetobacter* sp. บางชนิดไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เช่น *A. xylinum* (Rao. 1957)

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

เมื่อย้อมสี พบว่า เซลล์ของ *Acetobacter* sp. ในระยะแรกของการเจริญติดสี Gram negative เมื่ออายุมากขึ้นจะติดสี Gram variable ไม่พบการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุ แต่เมื่อเซลล์อยู่รวมกันมาก ๆ อาจมีสีชมพู เนื่องจากอิทธิพลของพอร์ไฟรินส์ (porphyrins) และบางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล (De Ley and Frateur. 1974b)

Acetobacter sp. เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการดำรงชีวิต (obligate aerobes) เนื่องจากไม่สามารถใช้สารอื่นนอกจากออกซิเจนเป็นตัวรับไฮโดรเจนตัวสุดท้ายในขบวนการเปลี่ยนอาหารเป็นพลังงาน (De Ley and Frateur. 1974b) จึงมักพบว่าในถังหมักน้ำส้มสายชูซึ่งไม่มีการพ่นอากาศเชื้อน้ำส้มสายชูจะเจริญอยู่ที่ผิวหน้ามองเห็นเป็นแผ่นฝ้า (film) (Adams. 1980; Conner and Allgeier. 1976)

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของ *Acetobacter* sp. จะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ ซึ่งเชื้อส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 15-34 องศาเซียลเซียส *Acetobacter* sp. ชอบ pH ค่อนข้างต่ำ พบว่าเจริญได้ที่ pH 4.0-4.5 และเจริญได้ดีที่ pH 5.4-6.3 ในระดับ pH 7-8 จะเจริญได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (De Ley and Frateur. 1974b)

2.7.2 การออกซิไดซ์เอทธานอลเป็นกรดอะซิติก

Conner and Allgeier (1976) ได้สรุปรายงานเกี่ยวกับปฏิกิริยาการเปลี่ยนเอทธานอลเป็นกรดอะซิติกดังนี้

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

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

$$CH_3CH_2OH + O \rightarrow CH_3CHO + H_2O \qquad (2.1)$$

Ethanol acetaldehyde

ขั้นที่ 2 เป็นการสร้างกรดอะซิติกจากอะซิตัลดีไฮด์ ปฏิกิริยาแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกอะซิตัลดีไฮด์รวมกับน้ำเป็นไฮเดรตเตดอะซิตัลดีไฮด์ (hydrated acetaldehyde) ดังสมการที่ 2 จากนั้นเกิดปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2 ไฮเดรตเตดอะซิตัลดีไฮด์ถูกออกซิไดส์หรือดีไฮโดรจิเนท (dehydrogenate) เป็นกรดอะซิติกโดยเอนไซม์อะซิตัลดีไฮด์ไฮโดรจิเนส (Acetaldehyde dehydrogenase) ทำให้โปรตอน (proton) 2 ตัวของไฮเดรตเตดอะซิตัลดีไฮด์ถูกส่งผ่านไปสู่อะตอมของออกซิเจน ดังสมการที่ 3

$$CH_3CHO + H_2O \rightarrow CH_3C(H)(OH)(OH) \qquad (2.2)$$

Acetaldehyde hydrated acetaldehyde

$$CH_3C(H)(OH)(OH) + (O) \xrightarrow[\text{dehydrogenase}]{\text{acetaldehyde}} CH_3COOH + H_2O \qquad (2.3)$$

Hydrated acetaldehyde acetic acid

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

$$2CH_3CHO + Ca(HSO_3)_2 \rightarrow 2CH(H)(O-H)-C-SO_3Ca^{1/2} \qquad (2.4)$$

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

$$\underset{\text{Acetaldehyde}}{CH_3CHO} + CH_3CHO \xrightarrow{H_2O} \underset{\text{acetic acid}}{CH_3COOH} + \underset{\text{ethanol}}{CH_3CH_2OH} \qquad (2.5)$$

2.7.3 เมตาบอลิสมของแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

Conner and Allgeier (1976) รายงานว่า *A. aceti* ใช้กลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ โดยที่ 80 เปอร์เซ็นต์ของกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคเนท (gluconate) และใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ ตามวิถีเฮกโซไคเนส (hexokinase pathway) ในวัฏจักรเฮกโซสโมโนฟอสเฟต (Hexose monophosphate cycle) ส่วนน้ำตาลอื่น ๆ เช่น กาแล็กโตส ไซโลส อะราบิโนส และไรโบส จะถูกออกซิไดซ์เป็นกรดที่เกี่ยวข้องได้ แต่น้ำตาลเหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชูส่วนใหญ่ *A. aceti* สายพันธุ์ต่าง ๆ จะสามารถออกซิไดซ์แมนนิตอล ฟรุคโตส แมนโนส กาแล็กโตส ไซโลส กลีเซอรอล อิริธริตอล (erythritol) โซเดียมแล็กเตท เอทธานอล และโซเดียมอะซิเตทได้ ถึงแม้ *Acetobacter* sp. สามารถ เปลี่ยนน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นกรดที่เกี่ยวข้องได้ แต่ไม่พบว่ามีวัฏจักรไกลคอไลติก (glycolytic cycle) ซึ่งขัดแย้งกับความเชื่อถือเดิม แต่พบเอนไซม์ใน วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid cycle) ในเชื้อน้ำส้มสายชูหลายชนิด (Rao. 1957; Conner and Allgeier. 1976) นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ในวัฏจักรเพนโตสหรือเฮกโซสโมโนฟอสเฟต (Pentose or hexose monophosphate cycle) ในเชื้อน้ำส้มสายชูบางชนิด ได้แก่ *A. oxydans, A. mesoxydans* และ *A. suboxydans*

2.7.4 เมตาบอลิสมของไนโตรเจน

เชื้อน้ำส้มสายชูสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนจากอนินทรีย์ไนโตรเจนได้เริ่มจากการสังเคราะห์กลูตาเมทโดยเอนไซม์กลูตามิกดีไฮโดรจิเนส (glutamic dehydrogenase) ทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียม และ 2-ออกซิกลูตาเรท (2-oxyglutarate) ซึ่งเกิดจากวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก ได้กลูตาเมท ส่วนการสังเคราะห์แอล-กลูตาเมท และออกซาโลอะซิเตท (oxaloacetate) และคาดว่ากรดอะมิโนอื่น ๆ อาจเกิดขึ้นโดยวิธีคล้ายกันนี้ (Rainbow. 1966)

2.8 ขั้นตอนการหมักน้ำส้มสายชู

กรดซึ่งทำให้เกิดรสเปรี้ยวในน้ำส้มสายชูได้แก่ กรดอะซิติก ผลิตโดยกระบวนการหมัก 2 ขั้นตอนคือ ขั้นที่ 1 น้ำตาลในวัสดุหมักจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทธานอลโดยการกระทำของยีสต์สายพันธุ์ทั่วไปคือ *Saccharomyces cerevisiae* และขั้นที่ 2 แบคทีเรียในจีนัส Acetobacter จะออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก

วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูสามารถใช้ได้หลายชนิด กรณีที่สับสเตรทมีปริมาณน้ำตาลน้อยอาจจะต้องมีการเติมหรือทำให้เข้มข้นขึ้น เช่น น้ำสกัดจากผลไม้ต่าง ๆ หรือถ้าสับสเตรทมีปริมาณน้ำตาลสูงมาก เช่น โมลาส (molasses) อาจจะต้องมีการเจือจางลงให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมเพื่อหมักให้ได้เอทธานอลในปริมาณที่ต้องการ แต่ถ้าสับสเตรทเป็นพวกแป้ง เช่น ธัญพืชต่าง ๆ จะต้องมีการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของน้ำตาลก่อนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ หรือไฮโดรไลซ์ด้วยกรด โดยทั่วไปมักจะปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นให้อยู่ประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และอาจจะมีการปรับพีเอช (pH) ให้ค่อนข้างเป็นกรด คือ ประมาณ 4.5 แล้วปล่อยให้การหมักเกิดขึ้นโดยยีสต์ และมักควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 30 องศาเซลเซียส การหมักจะเสร็จสมบูรณ์ใช้เวลาประมาณ 48-72 ชั่วโมง จึงจะได้แอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำการหมักต่อไปโดยเชื้อน้ำส้มสายชู กรณีที่เป็นน้ำส้มสายชูกลั่นสับสเตรทที่ใช้เป็นแอลกอฮอล์เจือจาง อาจจะต้องมีการเติมสารบางอย่างเพื่อเร่งการเจริญ และเนื่องจากเชื้อน้ำส้มสายชูต้องใช้ออกซิเจนในการออกซิไดส์แอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก ดังนั้นประสิทธิภาพของการให้อากาศจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการหมักน้ำส้มสายชูด้วยวิธีการต่าง ๆ (Adams. 1985)

2.9 การพัฒนาการหมักน้ำส้มสายชู

กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูสามารถผลิตได้หลายวิธี วิธีที่เป็นวิธีดั้งเดิมนั้นเป็นวิธีเรียกว่า "ปล่อยทิ้งเฉยๆ" การผลิตทำโดยบรรจุแอลกอฮอล์ลงในถังหมักประมาณค่อนถัง แล้วทิ้งไว้ให้เกิดการสร้างกรดเอง โดยให้มีการถ่ายเทอากาศได้สะดวก การเจริญของจุลินทรีย์ *Acetobacter* sp. ในแอลกอฮอล์ จะสังเกตได้จากฝ้าขาวหรือฟิล์มบนผิวหน้าของแอลกอฮอล์ กระบวนการนี้ทำเป็นแบบที่ทำได้ทีละครั้ง คือ เมื่อหมักแอลกอฮอล์ให้ได้กรดอะซิติกจนมีความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว ก็จะต้องหยุดทำการล้างถังหมัก แล้วค่อยบรรจุแอลกอฮอล์เพื่อเริ่มหมักใหม่อีก ดังนั้นจุลินทรีย์จะต้องสร้างฟิล์มทุกครั้งที่ทำการหมัก ซึ่งเชื้อจะต้องใช้สารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและสร้างฟิล์ม และใช้เวลามาก นอกจากนี้การทำเช่นนี้มีโอกาสปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการมาก และไม่ค่อยมีประสิทธิภาพ

ได้มีการปรับปรุงแก้ไขการหมักให้มีประสิทธิภาพในการผลิต มีการพัฒนาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้ได้สายพันธุ์ที่สร้างกรดได้มากและยังสามารถทนกรดในปริมาณสูงได้ นอกจากนี้ในทางกระบวนการผลิตได้นำกระบวนการผลิตที่เรียกว่ากระบวนการโอลีน (Orlean process) โดยใช้หลักการทำการหมักให้ได้กรดในระดับที่ต้องการ แล้วทำการถ่ายน้ำส้มสายชูออกไปบางส่วน ก่อนที่จะเติมแอลกอฮอล์เพิ่มโดยไม่ให้มีการกระเทือนฟิล์มที่ลอยอยู่บนผิวหน้า

การผลิตแบบโอลีนก็ยังช้าอยู่ เนื่องจากพื้นที่ผิวหน้าของแอลกอฮอล์ที่มีเชื้อ *Acetobacter* sp. สัมผัสกับอากาศมีอยู่จำกัด จึงได้พัฒนาระบบเพื่อเพิ่มการสัมผัสอากาศนั้น โดยการนำเอาวัสดุซึ่งเชื้อ *Acetobacter* sp. สามารถจะเกาะอยู่ เช่น เศษไม้องุ่น ซังข้าวโพด หรือขี้กบจากไม้ชนิดต่าง ๆ มาใส่ลงในถังหมัก การใส่จะใส่อย่างหลวม ๆ ให้อากาศสามารถผ่านได้ เมื่อจุลินทรีย์ *Acetobacter* sp. เกาะอยู่บนวัสดุที่เป็นเศษไม้แล้ว ค่อย ๆ เทแอลกอฮอล์ผ่านลงบนเศษไม้ที่มีจุลินทรีย์เกาะ แอลกอฮอล์ที่เทลงไปจะไหลผ่านไปบนเศษไม้ที่มีจุลินทรีย์เกาะอยู่ จุลินทรีย์ใช้แอลกอฮอล์และเปลี่ยนให้เป็นกรดอะซิติก วิธีนี้เรียกว่า "Quick vinegar process" ซึ่งได้มีการเริ่มใช้มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1830 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ในลักษณะแบบกึ่งต่อเนื่อง ทำให้ได้น้ำส้มสายชูในปริมาณที่มากขึ้น และใช้เวลาในการผลิตน้อยลง

ในปัจจุบันการผลิตน้ำส้มสายชูทำในถังหมักแบบที่ให้เชื้อจุลินทรีย์ผสมรวมอยู่กับอาหาร (แอลกอฮอล์) การผลิตวิธีนี้สามารถผลิตน้ำส้มสายชูในปริมาณ 750-1200 ลิตรต่อวัน การผลิตทำในถังสแตนเลส (Stainless fermenter) ที่มีใบพัด หมักโดยใส่แอลกอฮอล์และสารอาหารที่ช่วยให้เชื้อ *Acetobacter* sp. สามารถเจริญ พร้อมทั้งปรับสภาพกรดด่างให้เหมาะในการเจริญของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักจะทำการให้อากาศและใช้ใบพัดกวนเพื่อให้อากาศกระจายไปทั่ว การทำเช่นนี้จะทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายในแอลกอฮอล์ได้มากและทั่วถึง ทำให้จุลินทรีย์สามารถสร้างกรดได้ทุกจุดในถังหมัก การผลิตจึงดำเนินไปอย่างรวดเร็วและสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก ๆ ด้วย โดยทั่วไปจะใช้วิธีผลิตแบบนี้กับการผลิตน้ำส้มสายชูกลั่น (สุเมธ ตันตระเธียร. 2536)

ปัญหาของการผลิตมักเกิดจากระบบควบคุมอัตโนมัติ (Adams. 1985) ได้แก่ การขัดข้องของระบบควบคุมอุณหภูมิ การให้อากาศ และการกวน เป็นต้น การขัดข้องของระบบให้อากาศมีผลรุนแรงมาก ส่วนปัญหาของการผลิตที่เคยพบในประเทศไทยได้แก่มีการขัดข้องทางกระแสไฟฟ้าทำให้ระบบควบคุมอัตโนมัติหยุดการทำงานในช่วงเวลาเพียง 5 นาที เชื้อน้ำส้มสายชูในถังหมักตายลงอย่างรวดเร็วและไม่สามารถดำเนินการผลิตต่อไปได้ ซึ่งต้องปรับปรุงให้มีระบบไฟฟ้าสำรองซึ่งจะทำงานทันทีโดยอัตโนมัติเมื่อมีการขัดข้องทางกระแสไฟฟ้า

การเปรียบเทียบปัจจัยต่าง ๆ ในการผลิตน้ำส้มสายชูโดยเจนเนอเรเตอร์และอะซิเตเตอร์ พบว่าอะซิเตเตอร์มีอัตราการผลิตสูงกว่าถึง 10 เท่า ประสิทธิภาพการเปลี่ยนเอทธานอลเป็นกรดอะซิติกสูงถึง 94 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เจนเนอเรเตอร์มีประสิทธิภาพเพียง 85 เปอร์เซ็นต์ (Conner and

Allgeier. 1976) วิธีการใช้และควบคุมการหมักของอะซิเตเตอร์ง่ายและเหมาะสมต่อระบบ โรงงานเนื่องจากต้องการคนงานและพื้นที่น้อยกว่าเจนเนอเรเตอร์ครึ่งหนึ่ง แต่ข้อเสียเปรียบของอะซิเตเตอร์คือต้นทุนการผลิตสูงเนื่องจากต้องใช้พลังงานสูง เมื่อมีการขัดข้องเกี่ยวกับระบบควบคุมอัตโนมัติจะได้รับความเสียหายสูงมาก และน้ำส้มสายชูที่ผลิตโดยอะซิเตเตอร์ขุ่นมากจึงต้องมีขั้นตอนทำให้ใสที่ดี (Ebner *et. al.* 1967; Adams. 1985)

การผลิตน้ำส้มสายชูแบบ Submerged Fermentation วิธีอื่น ๆ มีดังนี้คือ

Yeoman's Cavitator ลักษณะส่วนมากคล้ายอะซิเตเตอร์ แตกต่างเพียงหลักการให้อากาศของเหลวและอากาศถูกส่งเข้าสู่ท่อที่มีการกวนแล้วปล่อยลงกลางถังหมักอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดแรงกดดันขึ้น ของเหลวและอากาศที่ผสมกันในท่อแล้วจะผสมกันดียิ่งขึ้นและกระจายไปทั่วถังหมัก ถังหมักชนิดนี้มีประสิทธิภาพการเปลี่ยนเอทธานอลเป็นกรดอะซิติกสูง 98 เปอร์เซ็นต์ และเป็นถังหมักระบบ ต่อเนื่อง (Nickol. 1979)

Bourgeois Process วิธีนี้ประกอบด้วยสองส่วนคือ ถังเตรียมกล้าเชื้อ และถังหมัก ทำให้มีปริมาณเชื้อสูง กระบวนการผลิตจะสิ้นสุดเมื่อเอทธานอลถูกใช้หมด แล้วทำการเติมเอทธานอลในน้ำส้มสายชูที่ได้เพื่อให้น้ำส้มสายชูนี้มีกลิ่นหอมของเอสเตอร์ซึ่งเกิดระหว่างการเก็บวิธีนี้ให้ปริมาณกรดต่ำและใช้เวลานาน (Nickol. 1979)

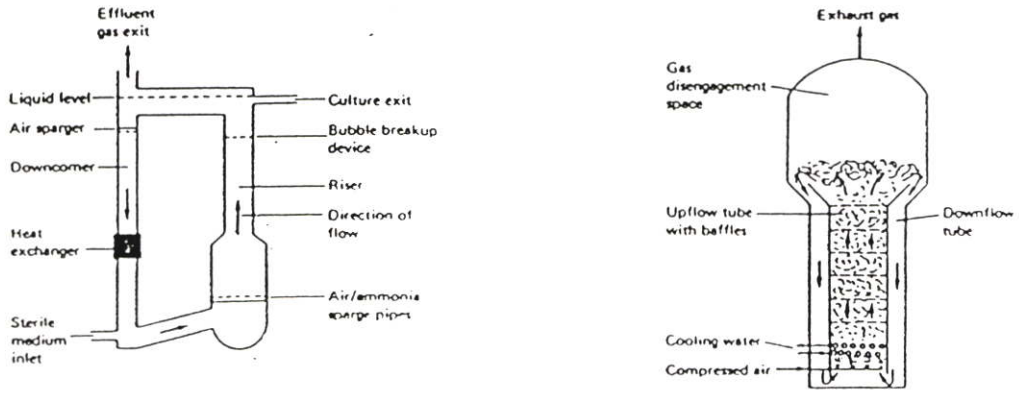
Fardon Process White (1970) ปรับปรุงระบบให้อากาศโดยอัดของเหลวผ่าน venturi nozzle ทำให้ของเหลวผสมกับอากาศแล้วลงสู่ถังหมักเป็นระบบไหลวน (circulation system) วิธีนี้ประสิทธิภาพต่ำ ใช้เวลาและพลังงานสูง (Nickol. 1979)

Tower Fermentor Greenshield and Smith (1974) เน้นปรับปรุงระบบให้อากาศเช่นกัน โดยลักษณะถังหมักเป็นท่อวางในแนวตั้ง พื้นที่หน้าตัดประกอบด้วยช่องขนาดเล็กมากมายเพื่อให้อากาศผ่านขึ้นมาและกระจายไปทั่วถังหมัก ถังหมักชนิดนี้ให้ผลผลิตเท่ากับอะซิเตเตอร์แต่ราคาถูกกว่าครึ่งหนึ่ง อย่างไรก็ตาม ในระดับอุตสาหกรรมยังนิยมใช้น้อย (Conner and Allgeier. 1976)

Vinegator Muller (1978) ปรับปรุงการให้อากาศโดยใช้ self-aspirating stirrer ควบคู่กันการอัดอากาศ ต่อมาปรับปรุงให้ควบคุมโดย polarographic oxygen electrode ระบบให้อากาศจะทำงานมากขึ้นเมื่อ dissolved oxygen ต่ำกว่าค่าที่ตั้งไว้ ถังหมักชนิดนี้สามารถเพิ่มผลผลิตคิดเป็นกรดบริสุทธิ์ 300 กิโลกรัมต่อวัน ทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำลง

2.10 ถังหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่อง (Airlift Fermenter)

การออกแบบถังหมักแบบ air-lift เกิดขึ้นจากการพัฒนากระบวนการผลิต Single Cell Protein จากเมทธานอล ซึ่งถ้าใช้ถังหมักแบบมีเครื่องกวนตามปกติ จะต้องใช้อัตราการให้อากาศและการกวนสูงมาก ทำให้สิ้นเปลืองพลังงานและมีปัญหาการระบายความร้อนออกจากระบบ ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหานี้ จึงได้มีการพัฒนาสร้างถังหมักแบบ air-lift ซึ่งไม่มีการใช้ระบบใบพัดกวนขึ้นมา โดยมีทั้งแบบ outer loop และ inner loop ดังแสดงในภาพที่ 2.2 แต่ในอุตสาหกรรมโดยทั่วไปนิยมใช้แบบ inner loop มากกว่า



(ก) (ข)

ภาพที่ 2.2 Air-lift fermenter (ก) แบบ outer loop (ข) แบบ inner loop
ที่มา : สมใจ ศิริโภค (2537)

หลักการทำงานของถังแบบนี้อาศัยความแตกต่างของความถ่วงจำเพาะของของเหลวเมื่อมีอากาศผสมอยู่ในปริมาณแตกต่างกัน โดยอัดอากาศเข้าทางด้านฐานของถังหมัก โดยจะเกิดมากที่สุดที่บริเวณฐานของถังหมักและจะน้อยลงตามลำดับความสูงที่เพิ่มขึ้น ฟองอากาศที่กระจายตัวอยู่ในของเหลวจะทำให้ของเหลวมีความถ่วงจำเพาะลดลงและลอยขึ้นสูงจนกระทั่งถึงด้านบนของคอลัมน์ซึ่งสูงประมาณ 45 เมตร อากาศที่ละลายและกระจายตัวอยู่ในของเหลวก็จะถูกปลดปล่อยออกมา ทำให้ของเหลวมีความหนาแน่นสูงขึ้นและตกลงสู่ด้านล่างของถังหมักโดยผ่านทาง downcomer อัตราการหมุนเวียนของของเหลวภายในถังหมักแบบนี้จะขึ้นอยู่กับความสูงของคอลัมน์และอัตราการให้อากาศ เส้นผ่าศูนย์กลางของ downcomer ควรมีขนาดเล็กเพื่อให้ใช้ระยะเวลาสั้น แต่ก็ไม่ควรมีขนาดเล็กเกินไป จนกระทั่งทำให้เกิดความเสียดทาน ซึ่งจะขัดขวางการไหลของของเหลว วงจรการหมุนเวียนของของเหลวในแต่ละรอบจะใช้เวลาประมาณ 120 วินาที การระบายความร้อนในกระบวนการหมักในระดับนำร่องสามารถทำได้โดยใช้แจคเกตหล่อเย็นล้อมรอบส่วนที่เป็น downcomer แต่ถ้า

เป็นระดับอุตสาหกรรมก็จำเป็นต้องใช้ขดลวดหล่อเย็นติดตั้งเข้าไปภายในที่บริเวณฐานของ riser ด้วย (สมใจ ศิริโภค. 2537)

2.11 การหมักโดยวิธีการใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง (Immobilized cells) หมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขต หรือสถานที่ทางฟิสิกส์ให้อยู่ในบริเวณซึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำมาใช้ได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์กำลังเจริญ เซลล์ระยะพัก หรือเซลล์ที่ตายแล้ว (บุษบา ยงสมิทธ์. 2540)

การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงได้มีการศึกษามานานแล้ว โดยในปี ค.ศ.1823 Schuetzenbach ได้ทำการผลิตน้ำส้มสายชูแบบรวดเร็ว (Quick vinegar) ด้วยฟิล์มเชื้อที่ติดบนเศษไม้เลื่อย

2.11.1 เปรียบเทียบข้อดีกับข้อเสียของวิธีการใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

บุษบา ยงสมิทธ์ (2540) กล่าวว่า เซลล์ที่ถูกตรึงจัดเป็นตัวเร่งทางชีวเคมีชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ และมีข้อได้เปรียบหลายอย่างเมื่อเทียบกับตัวเร่งวิธีอื่น ๆ คือ

2.11.1.1 ปฏิกิริยาภายใต้สภาวะปกติและใช้พลังงานต่อปฏิกิริยามีความจำเพาะและเกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราสูง ปัญหาการเกิดมลภาวะน้อย แต่เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ ต้องการโคแฟกเตอร์ต่าง ๆ ในการเกิดปฏิกิริยา

2.11.1.2 ปัจจุบันการหมักเป็นระบบของตัวเร่งทางชีวภาพ แต่การหมักมักใช้สารอาหารราคาแพงเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ ในระหว่างการหมักการควบคุมการผลิตอย่างต่อเนื่องทำได้ยาก และหลังจากการหมักสิ้นสุดยังแยกผลผลิตที่ต้องการออกได้ยาก การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อดีคือ สามารถควบคุมปฏิกิริยาได้ง่ายสะดวกไม่มีปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น สามารถแยกผลผลิตได้ง่าย เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงทนสูง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก นอกจากนั้นเซลล์ที่ถูกตรึงในสภาพของเซลล์ระยะพักต้องการพลังงานเพื่อความอยู่รอดเท่านั้น เป็นการเพิ่มผลผลิตได้สูงกว่าการหมัก

2.11.1.3 สามารถใช้เซลล์จำนวนมาก ๆ และทำการศึกษาถังปฏิกิริยาขนาดเล็กได้ ในการผลิตควบคุมปฏิกิริยาได้ง่าย และสามารถแยกผลผลิตออกได้สะดวก เซลล์ที่ถูกตรึงก็มีข้อเสีย คือ เสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์และอาจเสียความสามารถระหว่างการตรึงได้

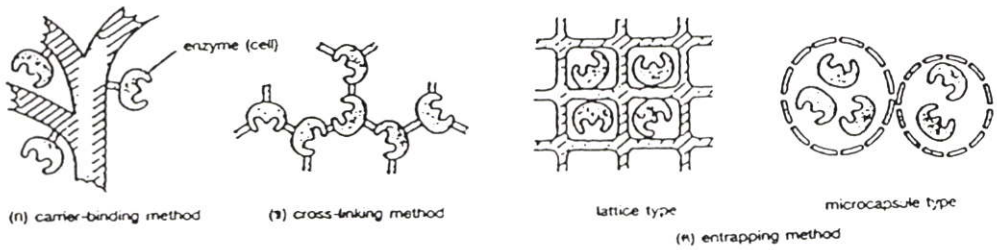
2.11.2 วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์มีวิธีคล้ายกับวิธีการตรึงเอนไซม์ (ดังแสดงในภาพที่ 2.3) แบ่งออกเป็น 3 วิธีใหญ่ ๆ คือ

2.11.2.1 การจับกับพาหะ (Carrier binding) เอนไซม์จะถูกตรึงอยู่กับพาหะโดยกระบวนการ physical adsorption, ionic binding หรือ covalent binding

2.11.2.2 การเชื่อมไขว้ (Cross linking) เอนไซม์จับกันเป็นร่างแหโดยมีโมเลกุลของสารอินทรีย์เป็นตัวเชื่อมโยง

2.11.2.3 การกัก (Entrapment) เอนไซม์จะถูกกักอยู่ในร่างแหของโพลิเมอร์ใน microcapsules หรือถูกกักโดย ultramembrane



ภาพที่ 2.3 รูปแบบการตรึงเซลล์
ที่มา : บุษบา ยงสมิทธ์ (2540)

2.11.3 วัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์ควรมีลักษณะดังนี้

2.11.3.1 พื้นที่ผิวมาก ขนาดและรูปร่างเหมาะสม
2.11.3.2 มีการซึมผ่านของสารได้
2.11.3.3 ไม่ละลายน้ำ
2.11.3.4 เสถียรต่อสารเคมี ความร้อนและแรงกระทบ
2.11.3.5 นำกลับมาใช้ใหม่ได้

2.12 การผลิตน้ำส้มสายชูโดยการตรึงเซลล์

Gist-Brocades (1978) ทดลองเติมออกไซด์ (oxide) ของโลหะ เช่น ติตาเนียม (titanium) เวเนเดียม (vanadium) เซอร์คอเนียม (zirconium) เหล็ก และดีบุก และ chelated polyhydroxy support ลงในถังหมักน้ำส้มสายชู พบว่า การผลิตกรดอะซิติกดีขึ้นเนื่องจากสารเหล่านี้ทำให้เซลล์ของเชื้อน้ำส้มสายชูเกาะกลุ่มกันดีขึ้น และ titanium chelated lactose, titanium citrate หรือ titanium urea ทำให้เชื้อน้ำส้มสายชูที่สร้างเซลลูโลส (*A. xylinum*) ผลิตกรดได้ดีขึ้น

Kennedy *et. al.* (1980) ทำการตรึงเชื้อ *A. xylinum* บน hydrous titanium IV oxide หรือ titanium (IV) cellulose chelate แล้วนำไปผลิตน้ำส้มสายชูอย่างต่อเนื่องใน tower fermenter เป็นเวลา 88 วัน พบว่า เชื้อน้ำส้มสายชูยึดเกาะได้ดี และสามารถผลิตกรดอะซิติกในอัตรา 5.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ได้ผลผลิตกรด 69 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าระบบสับเมอร์กที่ใช้กันอยู่ แต่อัตราการเจือจางที่ใช้ต่ำมาก คือ น้อยกว่า 0.08 h^{-1} ส่วนการเติม titanium (IV) cellulose chelate ทำให้เชื้อน้ำส้มสายชูที่ไม่สร้างเซลลูโลสผลิตกรดได้ดีขึ้น แต่ไม่พบการเกาะกลุ่มของเซลล์

ต่อมา Ghommidh *et. al.* (1981) ทดลองตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูบนวัสดุพวกเครื่องดินเผา (ceramic) และนำไปผลิตน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่องในถังหมักแบบ fixed bed pulsed flow reactor เป็นเวลา 9 เดือน พบว่า ปริมาณออกซิเจนที่เชื้อได้รับจะเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมการผลิต ในสภาวะที่มีออกซิเจนสูงถังหมักนี้สามารถผลิตกรดในอัตราสูงถึง 10.48 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ได้ผลผลิตกรด 35 กรัมต่อลิตร ซึ่งอัตราการผลิตจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณออกซิเจนที่เชื้อได้รับ กรณีนี้เมื่อระยะเวลาในถังปฏิกิริยานานมักจะพบการยับยั้งการเจริญ เนื่องจากผลิตภัณฑ์และการอุดตันของวัสดุยึดเกาะ

Osuga *et. al.* (1984) ตรึงเซลล์ของเชื้อน้ำส้มสายชูในเม็ด K-carragenan ซึ่งมีคุณสมบัติในการยอมให้สับสเตรทไหลผ่านได้ดี ตลอดจนยอมให้เซลล์เจริญได้ภายใน เมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ขึ้นเป็น 100 เท่า และทดลองหมักน้ำส้มสายชูในถังหมักแบบ fluidized bed reactor จะสามารถผลิตกรดในอัตรา 40.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเจลต่อชั่วโมง เป็นเวลานานถึง 120 วัน และพบว่าปัจจัยควบคุมอัตราการผลิตกรดและการเจริญได้แก่ ออกซิเจนจะมีอิทธิพลต่อเชื้อที่ถูกตรึงมาก โดยที่กรดอะซิติกจะมีผลต่อเชื้อที่ถูกตรึงแล้วน้อย การตรึงเซลล์แบบนี้สามารถใช้อัตราการเจือจางสูงกว่า wash out point ของเซลล์อิสระ และสามารถผลิตกรดในอัตรา 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำส้มสายชูต่อชั่วโมง (Mori, 1985)

Nanba *et. al.* (1985) ศึกษาการหมัก rice vinegar แบบต่อเนื่อง โดยการตรึงเซลล์ของ *A. rancens* บนผิวของ hollow polypropylene fibres พบว่า สามารถผลิตกรดได้คงที่เป็นเวลา 1 เดือน อัตราการผลิตกรด 0.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ได้ผลผลิตกรด 30 กรัมต่อลิตร วิธีนี้อัตราการผลิตต่ำเนื่องจากปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึงค่อนข้างน้อย

ต่อมา Okuhara (1985) ทดลองหมักน้ำส้มสายชูแบบ batch โดยตรึงเซลล์น้ำส้มสายชูบน cotton-like polypropylene fibres ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) ผ่านวัสดุหมักและอากาศจากด้านบนของถัง และควบคุมปริมาณออกซิเจนให้อยู่ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่า อัตราการผลิตกรด 2.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ได้ผลผลิตกรด 75 กรัมต่อลิตร การเพิ่มอัตราการไหลของแก๊สและวัสดุหมักสามารถจะผลิตกรดได้เร็วขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่าการยึดเกาะของเชื้อน้ำส้มสายชูบนวัสดุที่ไม่มีรูพรุน เนื่องมาจากส่วนของไขมันบริเวณผิวเซลล์มีความชอบต่อวัสดุพวก polypropylene

Ghommidh *et. al.* (1986) ได้ตรึงเซลล์เชื้อน้ำส้มสายชูบน bentonite แล้วนำไปศึกษาการหมักใน bubble column ที่มีการกวน 800 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.1 vvm พบว่าหลังจากที่เชื้อยึดเกาะแล้วบางเซลล์จะสูญเสียกิจกรรมไป เนื่องจากปัญหาการส่งผ่านของออกซิเจน เมื่อปรับปรุงระบบการให้อากาศและศึกษาการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้อัตราการการเจือจาง 0.055 h^{-1} พบว่าอัตราการผลิตกรดสูงถึง 2.9 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ได้ผลผลิตกรด 62 กรัมต่อลิตร

Bar *et. al.* (1986) ได้ตรึงเซลล์ของ *A. aceti* บน ion-exchange resin พบว่าเชื้อสามารถยึดเกาะได้ดีด้วยประจุไฟฟ้าบนผนังเซลล์ของแบคทีเรียกับ polyglyceryl chain ของ exchange group resin โดยประสิทธิภาพในการยึดเกาะสูงถึง 46-64 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมของเรซิน (resin)

Okuhara (1987) ได้ตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูบน lipophilic fibrous เช่น polypropylenes, polyethylenes, polystyrenes, polyethyleneterephthalate และ polyurethanes ในถังหมักแบบ tower พบว่าอัตราการผลิตกรด 0.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ได้ผลผลิตกรด 70 กรัมต่อลิตร

วรรณา มาลาพันธุ์ (2530) ได้ศึกษาการตรึงของเชื้อ *Acetobacter* sp. 249-1 ในระบบ ไบโอดิสค์โดยหมักน้ำส้มสายชูแบบ batch พบว่า การใช้น้ำมะพร้าวเติมเอทธานอล 4.7 เปอร์เซ็นต์ หรือไวน์น้ำมะพร้าวที่เจือจางจนมีเอทธานอล 4.9 เปอร์เซ็นต์ เป็นวัสดุหมัก จะสามารถหมักน้ำส้มสายชูที่มีกรด 4.5 และ 4.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ คิดเป็นผลผลิตกรด $Y_{P/S}$ = 0.96 โดยมีอัตราการผลิต 0.22 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อศึกษาการหมักโดยให้เชื้อเจริญที่ผิวหน้าในถังปฏิกิริยาแบบไบโอดิสค์ พบว่า ต้องใช้กล้าเชื้อถึง 20 เปอร์เซ็นต์ จึงจะสามารถผลิตกรดในอัตราซึ่งเท่ากับที่ผลิตได้จากระบบไบโอดิสค์ ซึ่งใช้กล้าเชื้อเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ การหมักน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่อง เมื่อใช้อัตราการเติมสับสเตรท 250 มิลลิลิตรต่อวัน ได้อัตราการผลิตและปริมาณกรดต่ำกว่าการหมักด้วยระบบ batch อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่า ประสิทธิภาพและถังปฏิกิริยาสามารถใช้หมักน้ำส้มสายชูแบบ batch ได้อย่างต่อเนื่อง โดยประสิทธิภาพคงที่ทุกรุ่นเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 10 เดือน นอกจากนี้ในแง่การหมักแบบต่อเนื่อง โดยใช้ระบบที่มีการตรึงเซลล์ไว้ ทำให้เซลล์ไม่ถูกชะล้างออกจากระบบได้ง่าย ทำให้สามารถใช้ dilution rate สูง ๆ เพื่อให้ได้ผลผลิตต่อหน่วยเวลาสูงขึ้น ซึ่งต่างจากการหมักแบบต่อเนื่องที่เซลล์แขวนลอยอยู่ในวัสดุหมัก กรณีนี้มักพบปัญหาเซลล์ถูกชะล้างออกไป ทำให้ต้องมีการกลับเข้าสู่ระบบ recycle cell

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 น้ำอ้อย

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

3.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* M30 ได้รับการอนุเคราะห์จาก ดร.จรูญ คำนวณตา และ รศ.ดร.สาวิตรี ลิ่มทอง จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2.2 *Acetobacter aceti* TISTR102 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.2.3 *Acetobacter* sp. WK ได้จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.3 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทหรือประเทศที่ผลิต
3.3.1 กรดอะซิติก (CH_3CO_2H)	Merck Co.,Ltd
3.3.2 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	Merck Co.,Ltd
3.3.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Merck Co.,Ltd
3.3.4 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	Fluka-Garantie
3.3.5 โพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท ($KHC_8H_4O_4$)	APA Ajax Finechem
3.3.6 โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์	Carlo Erba Reagenti
3.3.7 แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์	โรงงานสุรา องค์การสุรา กรมสรรพสามิต จังหวัดฉะเชิงเทรา
3.3.8 กรดซิตริก	Univar
3.3.9 Bromocresol purple	BDH
3.3.10 Phenolphthalein	Riedel-desaen
3.3.11 Diatomaceous earth	Eagle/Ticher minerals, inc.

3.4 สารอาหาร

ชื่อสารอาหาร	บริษัทหรือประเทศผู้ผลิต
3.4.1 กลูโคส	Merck Co.,Ltd
3.4.2 น้ำตาลทราย	มิตรผล
3.4.3 Yeast extract	DIFCO
3.4.4 Malt extract	DIFCO
3.4.5 Peptone	DIFCO
3.4.6 Agar	S.P. SCIENCE
3.4.7 รำข้าวจ้าว	

3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5.1 อาหาร Glucose Yeast Extract Broth (GYE Broth)

3.5.2 อาหาร Glucose Yeast Extract Agar (GYEA)

3.5.4 อาหาร MY Broth

3.5.5 อาหาร MY Agar

3.6 เครื่องมือและอุปกรณ์

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัทหรือประเทศผู้ผลิต
3.6.1 เครื่องชั่งชนิดละเอียด	Mettler, AE 3000	Switzerland
3.6.2 เครื่องชั่งชนิดหยาบ	OHAUS	America
3.6.3 เครื่องปั๊มอากาศ (Air pumb)	Big boy 7000	Malaysia
3.6.4 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	Suntex	Taiwan
3.6.5 ตู้บ่มเชื้อ	Hermotek	Japan
3.6.6 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	Memmert	Germany
3.6.7 ตู้ปลอดเชื้อ		Thailand
3.6.8 ตัวกรองอากาศ (Membrane filter)	Sartorius	Germany
3.6.9 ตัววัดอากาศ		Thailand
3.6.10 ปั๊ม	BB-7000	Thailand

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัทหรือประเทศผู้ผลิต
3.6.11 เตาไมโครเวฟ	2E900 PP10	France
3.6.12 ไมโครปิเปต 100-1000 ไมโครลิตร	Fransferpette	German
3.6.13 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	Tomy SS-245	Japan
3.6.14 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	Memmert	Germany
3.6.15 Shaker	Gerhardt Bonn	Germany
3.6.16 ตู้แช่เย็น	Thermotek	Thailand
3.6.17 ตู้แช่แข็ง	Sanyo	Japan
3.6.19 Ebuliometer	ARCUEUEIL, 94117	France
3.6.20 Hand refractometer	ATAGO, N-1E	Japan
3.6.21 ขวดน้ำพลาสติกพร้อมฝา		Thailand
3.6.22 ถังหมักน้ำส้มสายชู		Thailand
3.6.23 ใยกรองน้ำ		Thailand
3.6.24 ฝักบวบ		Thailand
3.6.25 ใยพลาสติก		Thailand
3.6.26 ผ้าฝ้าย		Thailand

3.7 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.8 วิธีการดำเนินงาน

3.8.1 การเตรียมไวน์อ้อย

3.8.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ (Starter) บรรจุอาหาร MY broth 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากอาหารเย็นแล้วถ่ายเชื้อ *S. cerevisiae* M30 ที่เลี้ยงบน MY Agar slant ที่บ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง มาใส่ในอาหาร MY Broth แล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ในศึกษาต่อไป

3.8.1.2 การเตรียมน้ำอ้อยสำหรับหมัก นำน้ำอ้อยมาปรับปริมาณน้ำตาลโดยเติมน้ำตาลทรายจนกระทั่งเมื่อวัดด้วยเครื่องรีแฟคโตมิเตอร์ (Refractometer) ได้ค่าประมาณ 20-22 องศาบริกซ์ เมื่อต้องการไวน์ที่มีปริมาณเอทธานอล 8 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นปรับพีเอชเป็น 4.0-4.5 นำไปใส่ในขวดหมัก แล้วเติมกล้าเชื้อยีสต์ที่เตรียมตามวิธีในข้อ 3.8.1.1 ในปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 วัน กรองผ่านไดอะตอมเมเชียส เอิร์ธ (diatomaceous earth) นำส่วนใสผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หรือใช้ KMS 150 ppm เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อสำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

3.8.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำส้มสายชูในขวดหมักทรงสูงที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง

3.8.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 เขี่ยเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ที่เลี้ยงบน slant อาหาร GYEA มาเชื้อละ 1 ลูป ใส่ลงในฟลาสก์ซึ่งบรรจุอาหาร GYE Broth 100 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 1 เชื้อ นำเข้าเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำไปใช้ศึกษาต่อไป

3.8.2.2 ปริมาณและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด นำไวน์อ้อยที่มีเอทธานอล 5 เปอร์เซ็นต์ มาเติมกรดอะซิติกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในขวดหมักน้ำส้มสายชูทรงสูงเป็นพลาสติกใสมีการให้อากาศอย่างต่อเนื่องบริเวณด้านล่างของขวด จากนั้นเติมแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ศึกษาได้แก่ ยีสต์สกัด น้ำมะพร้าว และรำข้าวจ้าว ในปริมาณ 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วถ่ายกล้าเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 แต่ละเชื้อลงในขวดหมักแต่ละขวดปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน โดยวิธีของ AOAC (1995)

3.8.2.3 ปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด นำไวน์อ้อยที่มีปริมาณเอทธานอล 5 เปอร์เซ็นต์ เติมแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.8.2.2 แล้วเติมกรดอะซิติกเข้มข้นปริมาณ 0 0.5 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในขวดหมักน้ำส้มสายชู จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 แต่ละเชื้อลงในขวดหมักแต่ละขวดปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน โดยวิธีของ AOAC (1995)

3.8.2.4 ปริมาณเอทธานอลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด นำไวน์อ้อยที่เอทธานอลความเข้มข้น 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มาเติมแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสม และกรดอะซิติกปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.8.2.2 และ 3.8.2.3 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อน้ำส้มสายชู

Acetobacter sp. WK และ TISTR102 แต่ละเชื้อลงในขวดหมักแต่ละขวดในปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน โดยวิธีของ AOAC (1995)

3.8.2.5 ปริมาณกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด นำไวน์อ้อยที่มีความเข้มข้นของเอทธานอลที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.8.2.4 มาเติมแหล่งไนโตรเจน และกรดอะซิติกในปริมาณที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาแล้ว จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 แต่ละเชื้อลงในขวดหมักแต่ละขวดปริมาณ 5 7.5 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน โดยวิธีของ AOAC (1995)

3.8.2.6 ปริมาณอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด นำไวน์อ้อยที่มีความเข้มข้นของเอทธานอลที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.8.2.5 มาเติมแหล่งไนโตรเจน และกรดอะซิติกในปริมาณที่เหมาะสม ถ่ายกล้าเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 แต่ละเชื้อลงในขวดหมักแต่ละขวดในปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.8.2.5 ให้อากาศในปริมาณ 0.5 0.75 1.0 และ 1.5 vvm ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน โดยวิธีของ AOAC (1995)

3.8.3 การผลิตน้ำส้มสายชูในถังหมักทรงสูงที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่องในระบบการตรึงเชื้อบนตัวกลาง

3.8.3.1 วัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูในลักษณะการหมักแบบ Batch วัสดุยึดเกาะที่ใช้ในการทดลองมี 4 ชนิด ได้แก่ (1) ผ้าฝ้าย ซึ่งจะเย็บติดกับโครงลวดสแตนเลสซึ่งมีลักษณะเป็นวงกลม (2) ฝักบวบ (3) ใยกรองน้ำ และ (4) พลาสติกสานกันเป็นตาข่าย ศึกษาการยึดเกาะของเชื้อบนวัสดุเหล่านี้โดยนำไวน์อ้อยที่มีปริมาณเอทธานอล แหล่งไนโตรเจน และกรดอะซิติกที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาไว้แล้วเบื้องต้น บรรจุลงในถังหมักทรงสูงที่มีวัสดุยึดเกาะดังกล่าว พร้อมทั้งเติมกล้าเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 แต่ละเชื้อลงในถังหมักแต่ละถังในปริมาณที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาไว้แล้วในปริมาตรสับสเตรททั้งหมด 1600 มิลลิลิตร ให้อากาศอย่างต่อเนื่องในปริมาณที่เหมาะสม ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์ปริมาณกรดโดยวิธี AOAC (1995) ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้ Ebuliometer ปริมาณน้ำตาลโดย Lane-Eynon Method และปริมาณเชื้อโดยวิธี Spread plate technique ทุกวัน

3.8.3.2 วัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch โดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.8.3.1 หลังจากหมักเป็นเวลา 7 วันแล้ว จากนั้นถ่ายน้ำหมักที่ได้ออก เปลี่ยนใส่ไวน์อ้อยที่มีความเข้มข้นเอทธานอลเท่าเดิมลงไปใหม่ และเติมปริมาณกรดอะซิติก แหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาไว้แล้ว ทำการเปลี่ยนสับสเตรททุก ๆ 7 วัน ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดโดยวิธี AOAC (1995) ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้ Ebuliometer ปริมาณน้ำตาลโดย Lane-Eynon Method และปริมาณเชื้อโดยวิธี Spread plate techniqueทุกวันโดยเปรียบเทียบเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ที่ถูกตรึงกับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

3.8.3.3 ประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อน้ำส้มสายชูในวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ โดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.8.3.2 โดยสังเกตปริมาณเชื้อและปริมาณกรดในระยะเวลาต่าง ๆ กัน เพื่อดูประสิทธิภาพของเชื้อน้ำส้มสายชูบนวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ ในถังหมักทรงสูงที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง

3.8.3.4 การตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch โดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.8.3.1 คือ หลังจากเติมกล้าเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ในปริมาณที่เหมาะสมแล้ว ทำการหมักและวิเคราะห์ปริมาณกรดโดยวิธี AOAC (1995) ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้ Ebuliometer ปริมาณน้ำตาลโดย Lane-Eynon Method และปริมาณเชื้อโดยวิธี Spread plate technique ทุกวัน และเติมไวน์อ้อยเพิ่มลงไปทุก ๆ 7 วัน โดยไวน์อ้อยที่ใส่ลงไปจะต้องทำให้มีความเข้มข้นของเอทธานอลเท่ากับการหมักครั้งแรกในปริมาตรสับสเตรททั้งหมด 1600 มิลลิลิตรและทำการวิเคราะห์ปริมาณกรด ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณน้ำตาล และปริมาณเชื้อ ทุกวัน โดยเปรียบเทียบเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ที่ถูกตรึงกับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำส้มสายชูในขวดหมักทรงสูงที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูโดยใช้เชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 สาเหตุที่ทำการศึกษาโดยเลือกใช้เชื้อ *Acetobacter* sp. WK เพราะเป็นเชื้อที่คัดเลือกได้ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมักโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งให้ผลการผลิตกรดอะซิติกได้สูง ในขณะที่ *Acetobacter* sp. TISTR102 (DMKU B-45, N. Lotong, Strong acid production) เป็นเชื้อเปรียบเทียบซึ่งให้ผลการผลิตกรดสูงจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จึงนำมาใช้ในการศึกษา

4.1.1 ผลของปริมาณและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

เมื่อได้ทำการศึกษาปริมาณกรดในขวดหมักทรงสูงที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า ยีสต์สกัด และรำข้าวเจ้าให้ปริมาณกรดที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และให้ปริมาณกรดที่สูงกว่าน้ำมะพร้าวซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องมาจากยีสต์สกัด และรำข้าวเจ้ามีสารอาหารที่เชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 สามารถนำมาใช้ในการเจริญเติบโตและสามารถสร้างกรดได้มากกว่าน้ำมะพร้าว โดยยีสต์สกัดจะประกอบไปด้วยโปรตีน และองค์ประกอบอื่น ๆ ที่แยกได้จากเซลล์ยีสต์ เช่น ไทอามีน นิโคตินิก แพนโตธีนิค และไบโอติน ซึ่งสารเหล่านี้จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู (Rose. 1982; De Ley and Frateor. 1974b) ส่วนรำข้าวเจ้ามีโปรตีนประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์ กรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด แร่ธาตุจำพวกแคลเซียม ฟอสฟอรัส รวมทั้งเป็นแหล่งวิตามินบี1 บี2 และไนอาซีน (ปกรณ์ วิสนานุศิษย์. 2541) ส่วนปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 พบว่า ปริมาณไนโตรเจนที่ 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องจากในการเตรียมไวน์อ้อยโดยใช้ยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทธานอล อาจมียีสต์หลงเหลืออยู่จากกระบวนการซึ่งผ่านการกรองด้วยไดอะตอมเมเชียสเอิร์ธ และนำไปผ่านความร้อน 70 องศาเซียลเซียส นาน 5 นาที ยีสต์ที่หลงเหลืออยู่เกิดการย่อยสลายตัวเอง (Autolysis) ซึ่งจะได้สารสกัดจากยีสต์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีอยู่แล้วในไวน์อ้อยได้ จึงทำให้การเติมปริมาณไนโตรเจนมากหรือน้อยไม่มีผลต่อการสร้างกรดของเชื้อ *Acetobacter* sp.

ตารางที่ 4.1 ผลของปริมาณและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณกรดที่ได้ (เปอร์เซ็นต์)	
		Acetobacter sp. WK	*Acetobacter* sp. TISTR102
ยีสต์สกัด	0	$2.3^{a}\pm0.2$	$2.1^{a}\pm0.2$
	0.1	$2.5^{a}\pm0.2$	$2.2^{a}\pm0.3$
	0.2	$2.5^{a}\pm0.0$	$2.4^{a}\pm0.2$
	0.3	$2.4^{a}\pm0.0$	$2.1^{a}\pm0.0$
	0.4	$2.3^{a}\pm0.1$	$2.0^{b}\pm0.1$
	0.5	$2.3^{a}\pm0.1$	$2.3^{a}\pm0.3$
รำข้าวเจ้า	0	$2.3^{a}\pm0.2$	$2.1^{a}\pm0.2$
	0.1	$\mathbf{2.2^{a}}\pm0.2$	$\mathbf{2.3^{a}}\pm0.1$
	0.2	$2.2^{a}\pm0.2$	$2.3^{a}\pm0.1$
	0.3	$2.4^{a}\pm0.1$	$2.3^{a}\pm0.3$
	0.4	$2.1^{b}\pm0.0$	$2.2^{a}\pm0.1$
	0.5	$2.5^{a}\pm0.0$	$2.3^{a}\pm0.3$
น้ำมะพร้าว	0	$2.3^{a}\pm0.2$	$2.1^{a}\pm0.2$
	0.1	$1.9^{b}\pm0.2$	$2.1^{a}\pm0.0$
	0.2	$2.3^{a}\pm0.0$	$1.8^{b}\pm0.1$
	0.3	$2.1^{b}\pm0.1$	$2.0^{b}\pm0.0$
	0.4	$2.1^{b}\pm0.0$	$2.0^{b}\pm0.0$
	0.5	$1.7^{b}\pm0.0$	$2.0^{b}\pm0.1$

อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$) เมื่อพิจารณาตาม DMRT

WK และ TISTR102 และในการศึกษาครั้งนี้ต้องการที่จะเติมแหล่งไนโตรเจนเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เพราะเชื้อน้ำส้มสายชูต้องการอากาศ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ และสารช่วยการเจริญเติบโต (วราวุฒิ ครูส่ง. 2538) และจะต้องทำการศึกษาการหมักในขั้นต่อไปโดยหมักในระยะเวลาที่นานขึ้น เพื่อดูประสิทธิภาพของเชื้อน้ำส้มสายชูในการยึดเกาะกับวัสดุตัวกลางและการสร้างกรดของเชื้อในระยะเวลาต่างๆ จึงจะต้องเติมแหล่งไนโตรเจนเพื่อให้เชื้อได้ใช้ในการหมักในขั้นต่อไปแม้ว่าผลที่ได้จากการเติมไนโตรเจนหรือไม่เติมไนโตรเจนจะให้ปริมาณกรดไม่

ต่างกันทางสถิติในขั้นตอนนี้ก็ตาม แต่แหล่งไนโตรเจนต่างกันให้ปริมาณกรดที่ต่างกัน กล่าวคือ ยีสต์สกัด และรำข้าวเจ้าให้ปริมาณกรดสูงกว่าน้ำมะพร้าว จึงเลือกใช้รำข้าวเจ้าเป็นแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากรำข้าวเจ้าเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สามารถหาได้ง่าย และราคาถูกกว่ายีสต์สกัด รวมทั้งให้ประสิทธิภาพในการผลิตกรดใกล้เคียงกับยีสต์สกัดทั้งเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณรำข้าวเจ้าที่ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 เนื่องจากปริมาณรำข้าวเจ้าที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดสูงที่สุด และไม่แตกต่างกับยีสต์สกัดที่ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทั้งเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102

4.1.2 ผลของปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

เมื่อได้ผลของปริมาณและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแล้ว จึงเติมรำข้าวเจ้าปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในไวน์อ้อยที่มีเอทธานอล 5 เปอร์เซ็นต์ และศึกษาผลของปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด ได้แก่ 0 0.5 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใส่กล้าเชื้อน้ำส้มสายชูปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ และทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้น 0 0.5 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อทั้งสองชนิดให้ปริมาณกรดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ ในการหมักด้วยเชื้อ *Acetobacter* sp. WK ปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดสูงที่สุด รองลงมาคือปริมาณกรดเริ่มต้น 1.0 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาณกรดที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้น 1.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในการหมักน้ำส้มสายชูต่อไป เนื่องจากใช้กรดอะซิติกเริ่มต้นน้อยกว่าแต่ให้ผลผลิตกรดได้ใกล้เคียงหรือไม่มีความแตกต่างกับปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

ส่วนในการหมักด้วยเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดสูดที่สุด รองลงมาคือ ปริมาณกรดเริ่มต้น 1.0 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้น 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงเลือกปริมาณกรดเริ่มต้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในการหมักน้ำส้มสายชูต่อไป เนื่องจากใช้ปริมาณกรดเริ่มต้นน้อยกว่า แต่ให้ผลผลิตกรดไม่แตกต่างจากปริมาณกรดเริ่มต้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Nanba *et. al.* (1984) พบว่า การเลี้ยงเชื้อในสภาพเขย่า การเติมกรดอะซิติกปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ จะเพิ่มอัตราการเจริญและทำให้ lag phase สั้นลง และวรรณา มาลาพันธุ์ (2530) ได้ศึกษาผลร่วมของปริมาณเอทธานอลและกรดอะซิติกต่อการเจริญของเชื้อ พบว่า ได้เลือกเอาสภาวะที่มีเอทธานอล 0.8 เปอร์เซ็นต์ และกรด 1 เปอร์เซ็นต์ ในการตรึงเซลล์ในระบบไบโอดิสค์ ซึ่งปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นที่เติมลงไปในสับเสตรทจะมีผลช่วยยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น (รสสุคนธ์ เหล่าไพบูลย์. 2528; วรรณา มาลาพันธุ์. 2530)

ตารางที่ 4.2 ผลของปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

ปริมาณกรดเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณกรดที่ได้ (เปอร์เซ็นต์)	
	Acetobacter sp. WK	*Acetobacter* sp. TISTR102
0	$1.8^{ab} \pm 0.2$	$1.2^{b} \pm 0.0$
0.5	$1.5^{b} \pm 0.2$	$0.8^{c} \pm 0.1$
1.0	$\mathbf{1.9^{a}} \pm 0.2$	$\mathbf{1.7^{a}} \pm 0.1$
1.5	$2.0^{a} \pm 0.0$	$1.8^{a} \pm 0.0$

อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาตาม DMRT

4.1.3 ผลของปริมาณเอทธานอลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

ในการหมักน้ำส้มสายชูที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ผลของปริมาณเอทธานอลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด พบว่า ปริมาณเอทธานอลเริ่มต้น 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ให้ปริมาณกรดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า ในการหมักด้วยเชื้อ *Acetobacter* sp. WK โดยปริมาณเอทธานอลเริ่มต้น 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดที่ได้อยู่ในช่วง 2.1-2.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการหมักด้วยเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 โดยปริมาณเอทธานอลเริ่มต้น 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดที่ได้อยู่ในช่วง 1.3-1.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณเอทธานอลเริ่มต้นต่างกัน แต่ให้ปริมาณกรดไม่แตกต่างกัน เนื่องจากผลการทดลองได้วิเคราะห์ปริมาณกรดในวันที่ 7 ของการหมัก ซึ่งปริมาณเอทธานอลเริ่มต้นสูงจะใช้เวลาในการหมักนานเพื่อให้ได้ปริมาณกรดที่สูง แม้ว่าเชื้อน้ำส้มสายชูจะใช้เอทธานอลเป็นสับสเตรทก็ตาม แต่เมื่อความเข้มข้นของเอทธานอลสูง การผลิตกรดจะเกิดได้ช้า เนื่องจาก เอทธานอลมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะที่มีกรดอะซิติกอยู่ด้วย (Adams. 1985)

ดังนั้นในการหมักด้วยเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 จึงเลือกปริมาณเอทธานอลเริ่มต้นที่ 6 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากให้ปริมาณกรดไม่แตกต่างจากเอทธานอลเริ่มต้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และในการหมักไวน์เพื่อให้ได้เอทธานอล 6 เปอร์เซ็นต์ นั้นใช้เวลาในการหมักน้อยกว่าไวน์ที่มีเอทธานอล 8 หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นการประหยัดทั้งเวลา และสารอาหารมากกว่าที่จะใช้ไวน์ที่มีเอทธานอลเริ่มต้นสูง

ตารางที่ 4.3 ผลของปริมาณเอทธานอลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

ปริมาณเอทธานอลเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณกรดที่ได้ (เปอร์เซ็นต์)	
	Acetobacter sp. WK	*Acetobacter* sp. TISTR102
6	**2.2**[a] ±0.1	**1.3**[a] ±0.1
8	2.2[a] ±0.1	1.4[a] ±0.1
10	2.1[a] ±0.0	1.4[a] ±0.1

อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาตาม DMRT

4.1.4 ผลของปริมาณกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

จากการหมักน้ำส้มสายชูในไวน์อ้อยที่มีเอทธานอล 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจนได้แก่ รำข้าวเจ้าปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ศึกษาไว้แล้วในเชื้อทั้ง 2 ชนิด ทำการหมักเพื่อศึกษาผลของปริมาณกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. WK ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด พบว่า ปริมาณกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. WK 5.0 7.5 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ปริมาณกรดที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ ได้ปริมาณกรดอยู่ในช่วง 2.2-2.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลปริมาณกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด พบว่า ปริมาณกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ให้ปริมาณกรดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน โดยปริมาณกรดที่ได้อยู่ในช่วง 1.3-1.4 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

จากการทดลองปริมาณกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 เริ่มต้นไม่มีผลต่อปริมาณกรดที่ผลิตได้ อาจเนื่องมาจากปริมาณแอลกอฮอล์และสารอาหารที่อยู่ในสับสเตรทมีจำนวนจำกัด การเติมปริมาณกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. ลงไปจำนวนมาก ทำให้ได้ปริมาณกรดสูงในระยะเวลาสั้น ซึ่งกล้าเชื้อปริมาณต่าง ๆ กันจะไม่มีผลต่อปริมาณกรดที่ได้ แต่จะมีผลต่ออัตราการผลิตกรด ซึ่งส่วนใหญ่เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณน้อย การผลิตกรดจะช้าและให้ผลผลิตต่ำ แต่เมื่อใช้กล้าเชื้อปริมาณสูง จะสามารถผลิตกรดได้สูงในเวลาที่รวดเร็ว (รสสุคนธ์ เหล่าไพบูลย์. 2528) ซึ่งการหมักน้ำส้มสายชูในระดับอุตสาหกรรมไม่สามารถจัดให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อได้ จึงควรใช้กล้าเชื้อในปริมาณสูง เพื่อทำให้เชื้อสามารถเจริญ และผลิตกรดในระยะเวลาสั้น และยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู (รสสุคนธ์ เหล่าไพบูลย์. 2528) แต่ในการ

ศึกษานี้ไวน์อ้อยได้ผ่านการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยการผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีแล้ว สามารถที่จะใช้กล้าเชื้อปริมาณน้อยในการผลิตได้ และในการศึกษาขั้นต่อไปจะเป็นการตรึงเชื้อกับวัสดุตัวกลาง ซึ่งต้องการจะลดต้นทุนในการเตรียมกล้าเชื้อในปริมาณสูงอยู่แล้ว จึงเลือกใช้กล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ในปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ในการผลิตน้ำส้มสายชูต่อไป

ตารางที่ 4.4 ผลของปริมาณกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

ปริมาณกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณกรดที่ได้ (เปอร์เซ็นต์)	
	Acetobacter sp. WK	*Acetobacter* sp. TISTR102
5.0	**2.2**^{a} ±0.2	**1.4**^{a} ±0.2
7.5	2.3^{a} ±0.1	1.3^{a} ±0.2
10	2.3^{a} ±0.1	1.4^{a} ±0.1
20	2.2^{a} ±0.0	1.4^{a} ±0.1

อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาตาม DMRT

4.1.5 ผลของปริมาณอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

จากการหมักน้ำส้มสายชูในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ไว้ศึกษาแล้ว ได้แก่ ไวน์อ้อยที่มีปริมาณเอทธานอลเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ รำข้าวเจ้าปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติกเริ่มต้นปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ และกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยให้อากาศอย่างต่อเนื่องที่ปริมาณ 0.5 0.75 1.0 และ 1.5 vvm เป็นเวลา 7 วันที่อุณหภูมิห้อง ผลของปริมาณอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK พบว่า ปริมาณอากาศที่ปริมาณ 0.5 0.75 1.0 และ 1.5 vvm ให้ปริมาณกรดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ ปริมาณอากาศเริ่มต้น 0.5 0.75 1.0 และ 1.5 vvm ให้ปริมาณกรดอยู่ในช่วง 1.5-1.6 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ส่วนผลปริมาณอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 พบว่า ปริมาณอากาศ 0.5 0.75 1.0 และ 1.5 vvm ให้ปริมาณกรดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน กล่าวคือ ปริมาณอากาศ 0.5 0.75 1.0 และ 1.5 vvm ให้ปริมาณกรดเท่ากันคือ 1.3 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าปริมาณอากาศไม่มีผลต่อการผลิตกรดในสภาวะการหมักชนิดนี้ อาจเนื่องมาจากเมื่อเพิ่มปริมาณอากาศจะทำให้เกิดฟองอากาศขนาดใหญ่ และลอยขึ้นสู่ผิวน้ำอย่างรวดเร็ว ทำให้เชื้อ *Acetobacter* sp.

นำออกซิเจนไปใช้ได้ยากกว่าการเกิดฟองอากาศขนาดเล็ก ซึ่งออกซิเจนจะกระจายทั่วถังหมักได้ดีกว่า Hromatka and Ebner (1959) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณออกซิเจน พบว่า การลดขนาดฟองอากาศจะให้ผลดีกว่าการเพิ่มปริมาณอากาศ เนื่องจากการเพิ่มปริมาณอากาศมีผลทำให้มีการสูญเสียแอลกอฮอล์ และกรดน้ำส้มมากขึ้น

ดังนั้นในสภาวะการหมักในถังหมักชนิดนี้ จึงเลือกให้อากาศเริ่มต้นที่ปริมาณ 0.5 vvm เป็นปริมาณอากาศเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำส้มสายชูของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ต่อไป เพราะการเพิ่มปริมาณอากาศให้สูงขึ้นนอกจากจะไม่ช่วยให้ปริมาณกรดสูงขึ้นแล้วยังเป็นการสูญเสียพลังงานที่ใช้ในการให้อากาศในปริมาณสูงขึ้น ดังนั้นแสดงได้ว่าถังหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่องทางด้านล่างของถังชนิดนี้ นอกจากจะไม่ใช้ใบพัดกวนในการให้อากาศซึ่งทำให้เกิดความร้อนแล้ว ยังเป็นการช่วยประหยัดพลังงานที่จะใช้ในการให้อากาศ และในการทำระบบหล่อเย็นได้อีกด้วย

ตารางที่ 4.5 ผลของปริมาณอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

ปริมาณอากาศ (vvm)	ปริมาณกรดที่ได้ (เปอร์เซ็นต์)	
	Acetobacter sp. WK	*Acetobacter* sp. TISTR102
0.5	**1.5**^{a} ±0.0	**1.3**^{a} ±0.0
0.75	1.5^{a} ±0.0	1.3^{a} ±0.1
1.0	1.6^{a} ±0.2	1.3^{a} ±0.1
1.5	1.6^{a} ±0.0	1.3^{a} ±0.0

อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาตาม DMRT

4.2 ผลวัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูในถังหมักทรงสูงที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง

4.2.1 วัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูในลักษณะการหมักแบบ Batch

การหมักน้ำส้มสายชูในลักษณะการหมักแบบ Batch โดยการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูกับวัสดุยึดเกาะ 4 ชนิดได้แก่ (1) ผ้าฝ้ายซึ่งจะเย็บติดกับโครงลวดสแตนเลสซึ่งมีลักษณะเป็นวงกลม 3 ชั้น ชั้นล่างเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว ชั้นที่สองเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 นิ้ว และชั้นบนสุดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 นิ้ว

แต่ละชั้นห่างกัน 2 นิ้ว (2) ใยบวบ มีลักษณะเป็นทรงกระบอกด้านในกลวงสานกันเป็นเส้นใย มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 นิ้ว สูง 4 นิ้ว (3) ใยกรองน้ำสีขาว หรือใยแก้วมีลักษณะเป็นแท่งสี่เหลี่ยมผืนผ้า กว้าง 2.5 นิ้ว ยาว 5 นิ้ว และหนา 2 นิ้ว และ (4) ใยพลาสติก หรือใยแก้วลักษณะเป็นสีเขียวสานกันเป็นตาข่าย มีโพรงและรูภายในมีลักษณะเป็นแท่งสี่เหลี่ยมผืนผ้า กว้าง 2.5 นิ้ว ยาว 5 นิ้ว และหนา 2 นิ้ว นำวัสดุยึดเกาะทั้ง 4 ชนิด บรรจุลงในถังหมักทรงสูงขนาดบรรจุ 1.6 ลิตร ทำการหมักน้ำส้มสายชูในสภาวะที่เหมาะสมซึ่งได้ทำการศึกษาแล้วในเบื้องต้น คือ เติมไวน์อ้อยที่มีปริมาณเอทธานอล 6 เปอร์เซ็นต์ รำข้าวเจ้า 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ กล้าเชื้อน้ำส้มสายชูปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ และให้อากาศในปริมาณ 0.5 vvm และทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

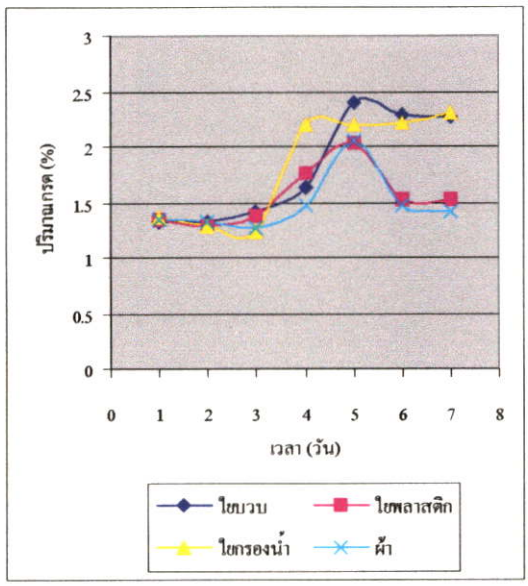
การหมักน้ำส้มสายชูในลักษณะการหมักแบบ Batch โดยการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK กับวัสดุยึดเกาะ 4 ชนิด ในภาพที่ 4.1 (ก) พบว่า ใยบวบ ใยพลาสติก ใยกรองน้ำ และผ้าฝ้ายได้ปริมาณกรด 1.2-1.4 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 1-3 ของการหมัก ในขณะที่วันที่ 4 ของการหมักใยกรองน้ำมีปริมาณกรดสูงสุดคือ 2.2 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ใยพลาสติก, ใยบวบ และผ้าฝ้ายมีปริมาณกรด 1.8 1.6 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในวันที่ 5 ใยบวบมีปริมาณกรดสูงสุดคือ 2.4 เปอร์เซ็นต์ และเป็นปริมาณกรดที่สูงสุดใน 7 วันของการหมัก รองลงมาคือ ใยกรองน้ำ ผ้าฝ้าย และใยพลาสติกมีปริมาณกรด 2.2 2.1 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในวันที่ 6 และ 7 ของการหมัก ใยบวบและใยกรองน้ำมีปริมาณกรดลดลงมาเล็กน้อย คือ 2.3 2.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนใยพลาสติก และผ้าฝ้ายมีปริมาณกรดลดลงเหลือเพียง 1.5 1.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่าใยบวบให้ปริมาณกรดสูงสุดในวันที่ 5 ของการหมักคือ 2.4 เปอร์เซ็นต์ และลดลงมาเล็กน้อยในวันถัดมา ซึ่งใกล้เคียงกับใยกรองน้ำให้ปริมาณกรดสูงสุด 2.3 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 ของการหมัก ส่วนผ้าฝ้ายและใยพลาสติกจะให้ปริมาณกรดสูงสุด 2.1 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการหมัก

จากภาพที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าปริมาณกรด ปริมาณเชื้อ และปริมาณแอลกอฮอล์สัมพันธ์กัน กล่าวคือ ปริมาณกรดเพิ่มขึ้นเนื่องจากเชื้อเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นในถังหมัก และใช้แอลกอฮอล์ในสับสเตรทเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติก ดังนั้น ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นจึงทำให้ปริมาณกรดเพิ่มขึ้น และปริมาณแอลกอฮอล์ลดลง ในวันที่ 5 ของการหมักวัสดุตัวกลางทั้ง 4 ชนิดมีปริมาณเชื้อสูงสุด ส่งผลให้มีปริมาณกรดสูงสุด และปริมาณเชื้อเริ่มลดลงในวันที่ 6 และ 7 เนื่องมาจากปริมาณแอลกอฮอล์ในสับสเตรลดน้อยลง ส่งผลให้ปริมาณเชื้อและปริมาณกรดลดน้อยลงด้วย ส่วนปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต พบว่า ในการหมัก 7 วัน ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ตลดลง 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์ ในวัสดุตัวกลางทั้ง 4 ชนิด

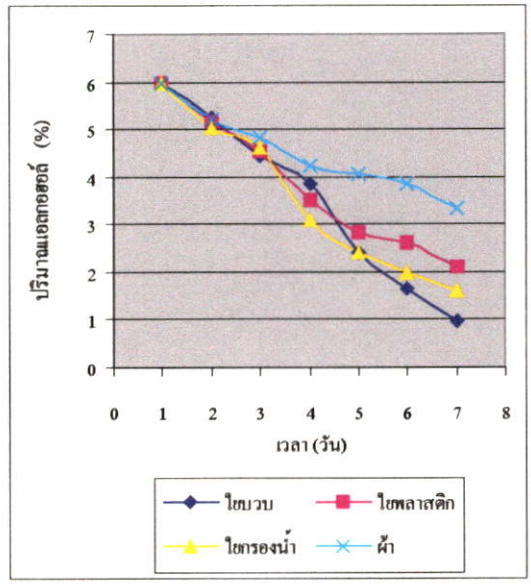
จากภาพที่ 4.2 (ก) การน้ำส้มสายชูในลักษณะการหมักแบบ Batch โดยตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 กับวัสดุยึดเกาะทั้ง 4 ชนิด โดยสภาวะการหมักเดียวกันคือ ไวน์อ้อยที่มีปริมาณเอทธานอล 6 เปอร์เซ็นต์ รำข้าวเจ้า 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ กล้าเชื้อน้ำส้มสายชูปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ และให้อากาศในปริมาณ 0.5 vvm และทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน ที่

อุณหภูมิห้อง พบว่า ปริมาณกรดในวัสดุยึดเกาะทั้ง 4 ชนิด มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในการหมัก 6 วันแรก โดยเฉพาะใยพลาสติกจะให้ปริมาณกรดสูงที่สุดในวัสดุยึดเกาะทั้ง 4 ชนิด คือ ให้ปริมาณกรด 1.8 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 ของการหมัก ส่วนในวันที่ 7 ของการหมักปริมาณกรดลดลง อาจเนื่องมาจาก แอลกอฮอล์ในสับสเตรทไม่เพียงพอที่จะใช้ในการสร้างกรดในวันที่ 7 หรือแอลกอฮอล์ถูกนำไปใช้ในการออกซิไดซ์เป็นกรดอะซิติกหมดแล้วจึงใช้กรดอะซิติกเป็นสับสเตรทในการออกซิไดซ์เป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ต่อไป ปริมาณกรดในวันที่ 7 ของการหมักจึงลดลง ส่วนใยกรองน้ำจะให้ปริมาณกรดรองลงมา คือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 และ 7 ของการหมัก ส่วนผ้าฝ้ายในวันที่ 6 จะให้ปริมาณกรด 1.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าใยบวบให้ปริมาณกรด 0.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในวันที่ 7 ของการหมัก ผ้าฝ้ายจะให้ปริมาณ 1.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าใยบวบให้ปริมาณกรด 1.3 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าใยพลาสติกให้ปริมาณกรดสูงสุด คือ 1.8 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 ของการหมัก รองลงมาคือใยกรองน้ำ ใยบวบ และผ้าฝ้ายให้ปริมาณกรด 1.5 1.3 และ 1.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าใยบวบจะให้ปริมาณกรดต่ำกว่าวัสดุตัวกลางชนิดอื่นๆ ใน 6 วันแรกของการหมัก แอลกอฮอล์ในสับสเตรทจึงถูกนำไปใช้ในการเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกน้อยกว่าวัสดุตัวกลางชนิดอื่น ๆ ดังนั้นในวันที่ 7 ของการหมัก ใยบวบจึงยังมีคงมีแอลกอฮอล์เหลือเพียงพอที่จะเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก ซึ่งปริมาณกรดในใยบวบจึงเพิ่มขึ้นในวันที่ 7 แตกต่างจากวัสดุตัวกลางชนิดอื่น ๆ ปริมาณแอลกอฮอล์ของใยบวบในสับสเตรทจึงสูงที่สุด และมีปริมาณเชื้อต่ำที่สุด ส่วนใยพลาสติกมีปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำที่สุด และมีปริมาณเชื้อสูงที่สุด ส่วนปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ตค่อนข้างคงที่ในวัสดุตัวกลางทั้ง 4 ชนิด

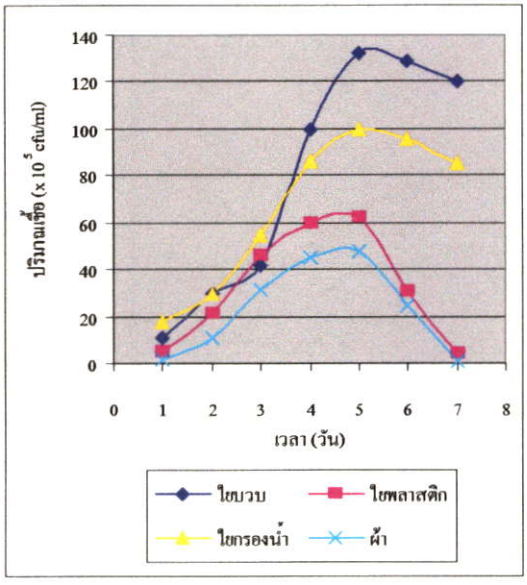
จากภาพที่ 4.1 และ 4.2 พบว่า เชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 มีความสามารถในการยึดเกาะกับวัสดุตัวกลางและให้ปริมาณกรดแตกต่างกันไป กล่าวคือเชื้อ *Acetobacter* sp. WK จะยึดเกาะกับใยบวบและให้ปริมาณกรดสูงที่สุดในระยะเวลาที่เร็วที่สุด ส่วนเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 จะยึดเกาะกับใยพลาสติกและให้ปริมาณกรดสูงที่สุดในระยะเวลาที่เร็วที่สุด แต่เชื้อ *Acetobacter* sp. WK จะให้ปริมาณกรดสูงที่สุดในระยะเวลาที่เร็วที่สุดมากกว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 กล่าวคือ เชื้อ *Acetobacter* sp. WK ให้ปริมาณกรดสูงสุดในวันที่ 5 ของการหมัก ให้ปริมาณกรดอยู่ในช่วง 2.0-2.4 เปอร์เซ็นต์ในวัสดุตัวกลางทั้ง 4 ชนิด ส่วนเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ให้ปริมาณกรดสูงสุดอยู่ในวันที่ 6 ของการหมักให้ปริมาณกรดอยู่ในช่วง 0.9-1.8 เปอร์เซ็นต์ ในวัสดุยึดเกาะทั้ง 4 ชนิด ซึ่งเป็นปริมาณกรดที่ต่ำกว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. WK ดังนั้นถ้าจะเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 ในการตรึงเชื้อบนวัสดุตัวกลางในลักษณะการหมักแบบ Batch เชื้อ *Acetobacter* sp. WK จะให้ปริมาณกรดที่สูงกว่าและระยะเวลาที่เร็วกว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102



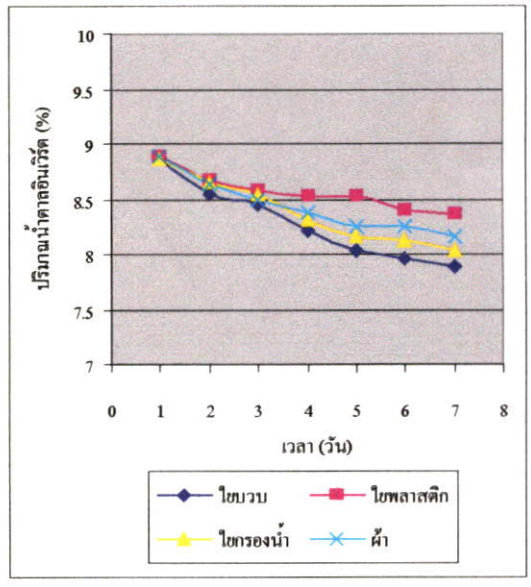
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

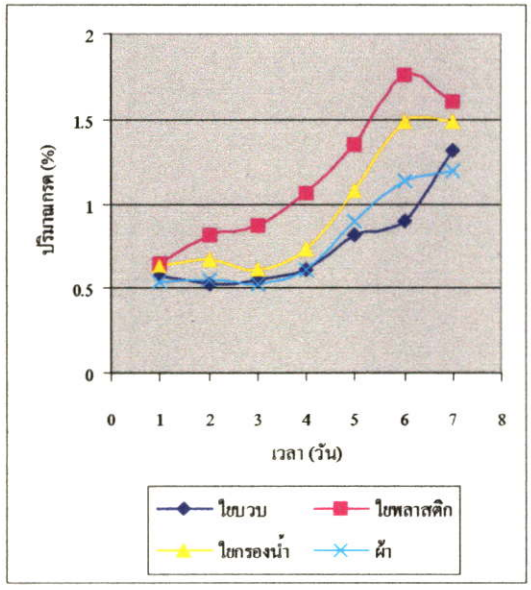
ภาพที่ 4.1 การตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Batch

(ก) ปริมาณกรดกับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

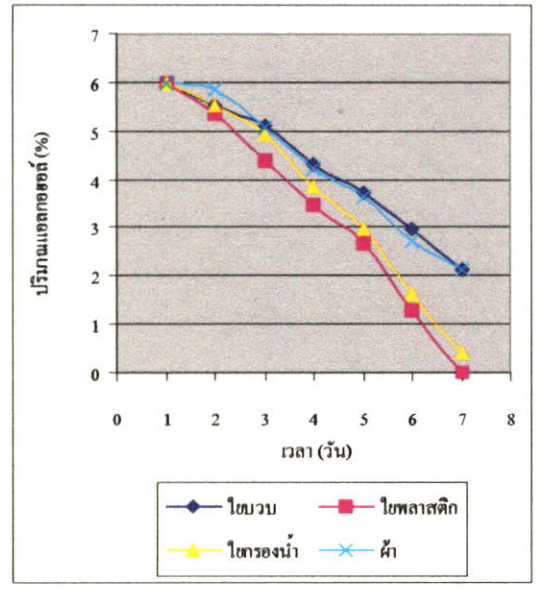
(ข) ปริมาณแอลกอฮอล์กับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

(ค) ปริมาณเชื้อ *Acetobacter* sp. WK กับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

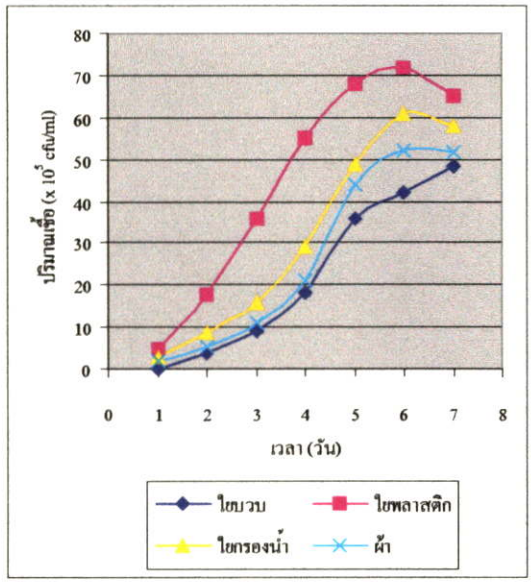
(ง) ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ตกับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ



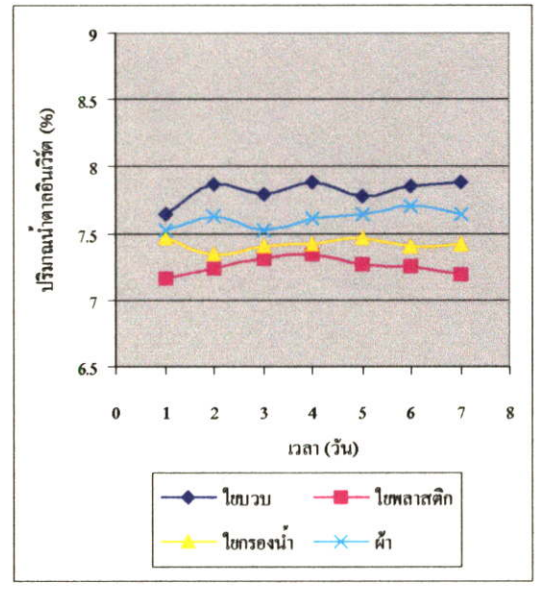
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 4.2 การตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Batch

(ก) ปริมาณกรดกับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

(ข) ปริมาณแอลกอฮอล์กับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

(ค) ปริมาณเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 กับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

(ง) ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ตกับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

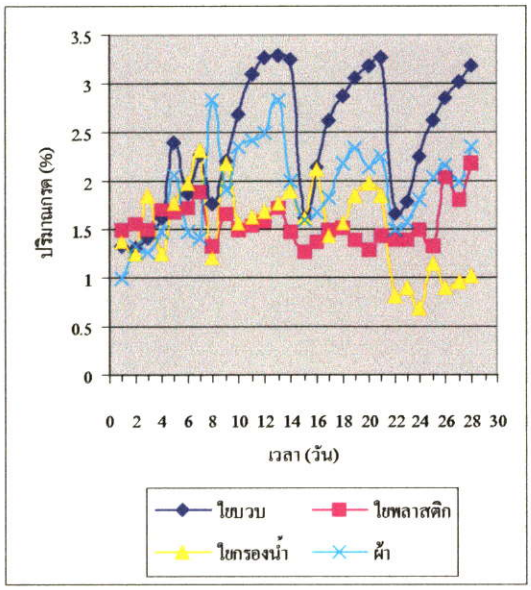
4.2.2 วัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch

การหมักแบบ Repeated batch ใช้ระยะเวลาในการหมัก 28 วัน ทำการเปลี่ยนสับสเตรททั้งสิ้น 3 ครั้ง ผลของวัสดุตัวกลางที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch คือ ใยบวบ จากภาพที่ 4.3 จะเห็นได้ว่า ใยบวบให้ปริมาณกรดสูงว่าวัสดุตัวกลางชนิดอื่น ๆ และในแต่ละครั้งของการเปลี่ยนสับสเตรทใยบวบจะให้ปริมาณกรดสูงสุดค่อนข้างคงที่ คือ 3.2-3.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3 ครั้งของการเปลี่ยนสับสเตรทติดต่อกัน วัสดุตัวกลางที่ให้ปริมาณกรดรองลงมา คือ ผ้าฝ้าย ให้ปริมาณกรดสูงสุดในช่วงรอบที่ 1 ของการเปลี่ยนสับสเตรท คือ ให้ปริมาณกรดสูงสุด 2.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนรอบที่ 2 และรอบที่ 3 จะให้ปริมาณกรดสูงสุด 2.6 และ 2.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ วัสดุตัวกลางที่ให้ปริมาณกรดรองลงมาจากผ้าฝ้าย คือ ใยกรองน้ำ ซึ่งจะให้ปริมาณกรดสูงใน 6 วันแรกก่อนการเปลี่ยนสับสเตรท ปริมาณกรดสูงสุดคือ 2.3 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรดสูงสุดในแต่ละรอบของการเปลี่ยนสับสเตรทจะลดลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งรอบที่ 3 ของการเปลี่ยนสับสเตรทปริมาณกรดที่ได้ต่ำมาก ซึ่งต่ำกว่าตอนเริ่มต้นหมักเสียอีก ส่วนใยพลาสติกให้ปริมาณกรดสูงสุดต่ำกว่าวัสดุตัวกลางชนิดอื่น ๆ คือ ให้ปริมาณกรดสูงสุดอยู่ในช่วง 1.5- 1.9 เปอร์เซ็นต์ และในรอบที่ 3 ของการเปลี่ยนสับสเตรทปริมาณกรดจะค่อย ๆ สูงขึ้น คือให้ปริมาณกรดสูงสุดในรอบที่ 3 ของการเปลี่ยนสับสเตรท คือ 2.2 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น วัสดุตัวกลางที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch คือ ใยบวบ เนื่องจากให้ปริมาณกรดสูงกว่าวัสดุตัวกลางชนิดอื่น ๆ และให้ปริมาณกรดค่อนข้างคงที่เป็นระยะเวลาติดต่อกัน ปริมาณกรดไม่ลดลงเมื่อเวลาในการหมักมากขึ้น หรือหลังจากการเปลี่ยนสับสเตรทหลาย ๆ ครั้งเหมือนวัสดุตัวกลางชนิดอื่น ๆ

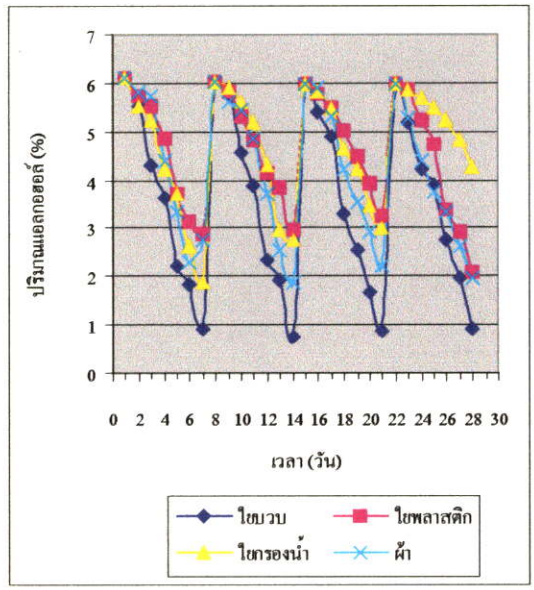
จากภาพที่ 4.3 เมื่อทำการเปลี่ยนสับสเตรทในแต่ละครั้งปริมาณกรดจะลดลง เนื่องจากทำการถ่ายสับสเตรทเดิมที่มีกรดอะซิติกออก และเปลี่ยนสับสเตรทใหม่ซึ่งมีปริมาณแอลกอฮอล์ 6 เปอร์เซ็นต์เข้าไปแทนที่ ดังนั้นจึงเหมือนเป็นการเริ่มต้นหมักใหม่โดยมีปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ในสับสเตรทเป็นปริมาณกรดเริ่มต้น ปริมาณกรดจึงลดลงในแต่ละครั้งของการเปลี่ยนสับสเตรทเช่นเดียวกับปริมาณเชื้อ เมื่อเปลี่ยนสับสเตรทใหม่ปริมาณเชื้อในสับสเตรทจะลดลงเช่นเดียวกัน แต่ยังคงมีเชื้อที่ยังยึดเกาะกับวัสดุตัวกลางเป็นปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยไม่มีการใส่เชื้อใหม่ลงไปเพิ่ม เชื้อจะเจริญเติบโตในสับสเตรทใหม่เพิ่มขึ้น และปริมาณเชื้อจะลดลงเมื่อเปลี่ยนสับสเตรทใหม่ทุกครั้ง ปริมาณแอลกอฮอล์จะลดลงเมื่อเปลี่ยนสับสเตรทที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ 6 เปอร์เซ็นต์เข้าไปใหม่ ปริมาณแอลกอฮอล์จะเพิ่มเป็น 6 เปอร์เซ็นต์ทันทีในแต่ละรอบของการเปลี่ยนสับสเตรท และปริมาณแอลกอฮอล์จะค่อย ๆ ลดลงตามปริมาณเชื้อและปริมาณกรดที่สร้างขึ้น ส่วนปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ตจะค่อนข้างคงที่ในแต่ละรอบของการเปลี่ยนสับสเตรท เพราะไวน์อ้อยที่ใช้ในแต่ละครั้ง

ของการเปลี่ยนสับสเตรทมาจากแหล่งเดียวกัน หรือหมักในครั้งเดียวกัน จึงมีปริมาณน้ำตาลค่อนข้างเท่ากัน

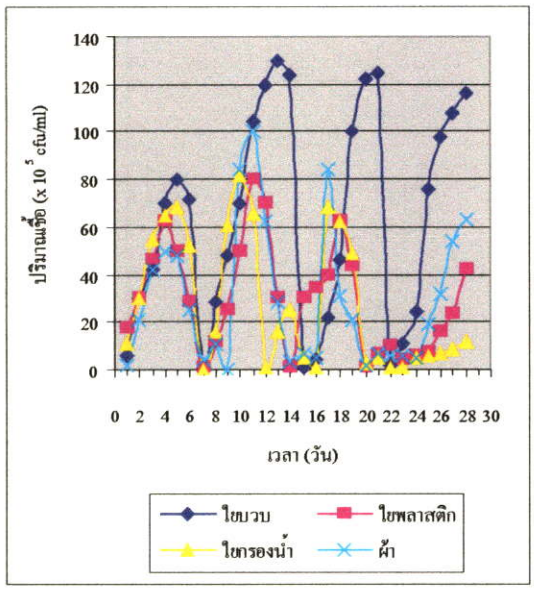
ส่วนการหมักโดยเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch จากภาพที่ 4.4 จะเห็นได้ว่า แนวโน้มปริมาณกรดจะลดลงในวัสดุตัวกลางทั้ง 4 ชนิด เมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น ซึ่งใยพลาสติกจะให้ปริมาณกรดสูงสุดในวันที่ 7 ของการหมัก สูงกว่าวัสดุตัวกลางชนิดอื่น ๆ ให้ปริมาณกรด 3.3 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรดสูงสุดจะลดลงในแต่ละรอบของการเปลี่ยนสับสเตรททั้ง 3 ครั้ง คือ 2.8 2.5 และ 2.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนใยกรองน้ำจะให้ปริมาณกรดสูงสุดรองลงมาจากใยพลาสติก กล่าวคือ ใยกรองน้ำให้ปริมาณกรดสูงสุดในรอบที่ 2 ของการเปลี่ยนสับสเตรท คือ 2.8 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรดสูงสุดลดลงในรอบที่ 3 ของการเปลี่ยนสับสเตรทเหลือ 1.7 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ใยบวบจะให้ปริมาณกรดสูงที่สุดใน 7 วันแรกของการหมัก คือ 2.6 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรดสูงสุดจะลดลงในแต่ละรอบของการเปลี่ยนสับสเตรททั้ง 3 ครั้ง คือ 2.0 2.5 และ 1.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนผ้าฝ้ายจะให้ปริมาณกรดต่ำที่สุดในวัสดุตัวกลางทั้ง 4 ชนิด กล่าวคือ จะให้ปริมาณกรดสูงสุดในรอบแรกของการเปลี่ยนสับสเตรท คือ 2.5 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรดจะลดลงเป็น 2.4 และ 1.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ผลของวัสดุตัวกลางที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโดยเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch คือ ใยพลาสติกซึ่งจะให้ปริมาณกรดสูงสุดเกือบทุกรอบของการเปลี่ยนสับส เตรทอยู่ในช่วง 2.3 - 2.8 เปอร์เซ็นต์ แต่จะให้ปริมาณกรดลดลงในแต่ละรอบของการเปลี่ยนสับสเตรทไม่เหมือนกับเชื้อ *Acetobacter* sp. WK ซึ่งให้ปริมาณกรดค่อนข้างคงที่ในแต่ละรอบของการเปลี่ยนสับสเตรท ส่วนปริมาณเชื้อและปริมาณแอลกอฮอล์จะสัมพันธ์กับปริมาณกรด กล่าวคือ ใยพลาสติกมีปริมาณเชื้อสูง ปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำ จึงมีปริมาณกรดสูง เป็นต้น ส่วนปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต พบว่า ใยบวบมีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ตสูงที่สุด และปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ตในวัสดุตัวกลางทั้ง 4 ชนิด ค่อนข้างคงที่ ดังนั้นแสดงว่าน้ำตาลอินเวิร์ตที่มีอยู่ในสับสเตรทไม่ได้ถูกนำไปใช้ในการสร้างกรดอะซิติกและการเจริญเติบโตของเชื้อ *Acetobacter* sp. มากนัก เนื่องจากในน้ำอ้อยมีปริมาณซูโครสสูงถึง 70-92 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกลูโคส และฟรุกโตสเพียง 2-4 เปอร์เซ็นต์ (Jame and Chung, 1993) และในการหมักไวน์อ้อยมีการเติมน้ำตาลทรายซึ่งเป็นน้ำตาลซูโครสลงไปเป็นสับสเตรทให้กับเชื้อยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทธานอล ดังนั้นปริมาณน้ำตาลส่วนใหญ่ที่หลงเหลือในไวน์อ้อยจึงเป็นซูโครสเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นน้ำตาลซึ่งไม่สามารถรีดิวส์ได้ (Non-reducing sugar) เชื้อ *Acetobacter* sp. จึงอาจนำซูโครสไปใช้ได้ยากกว่ากลูโคส หรือเดร็กโตส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่สามารถรีดิวส์ได้ (Reducing sugar) และมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า



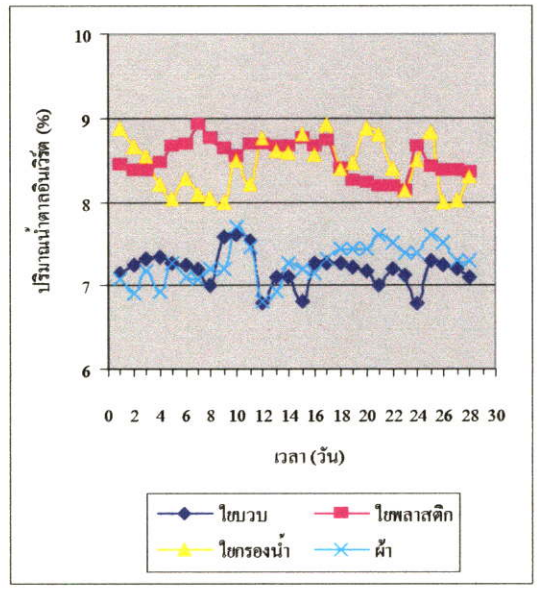
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

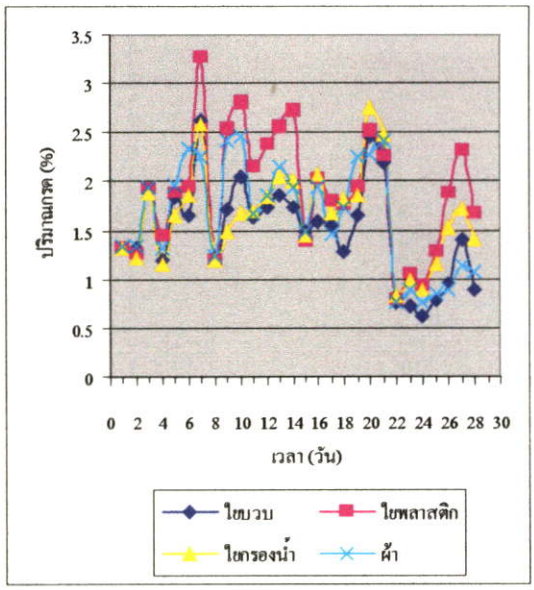
ภาพที่ 4.3 การตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch

(ก) ปริมาณกรดกับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

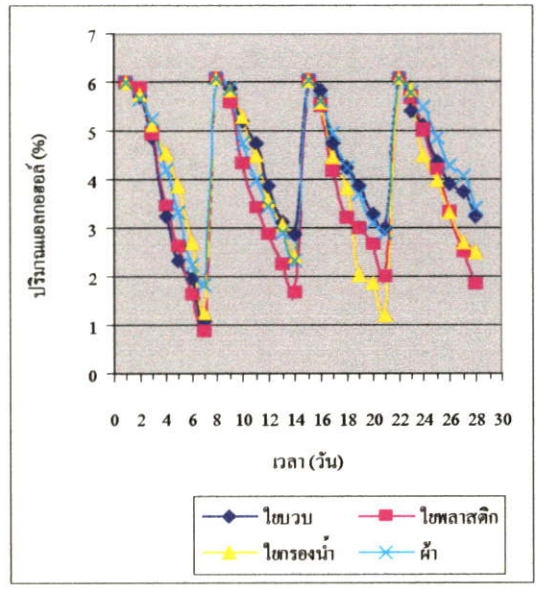
(ข) ปริมาณแอลกอฮอล์กับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

(ค) ปริมาณเชื้อ *Acetobacter* sp. WK กับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

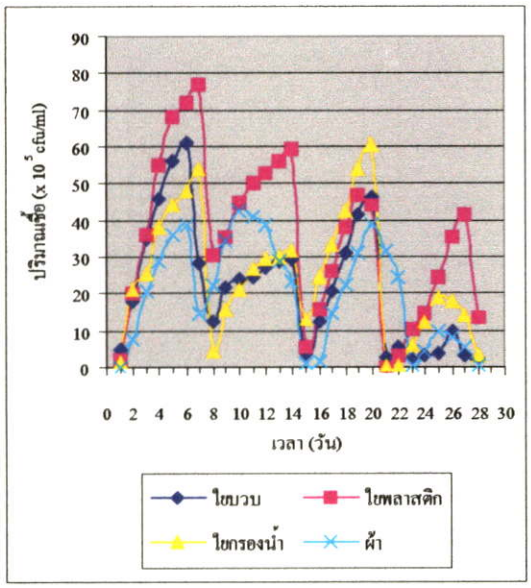
(ง) ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ตกับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ



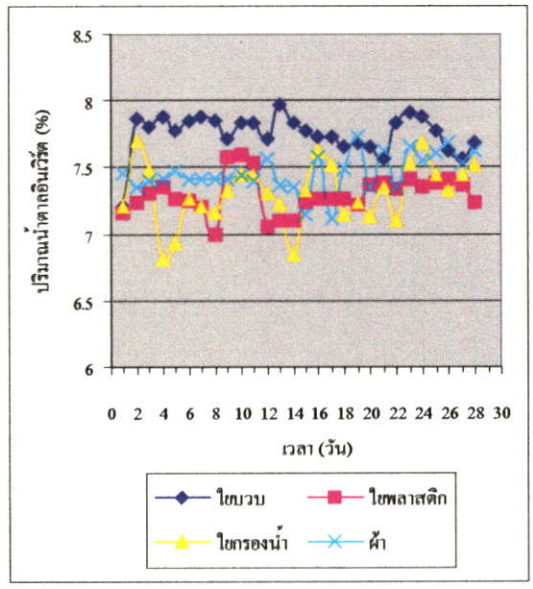
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 4.4 การตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch

(ก) ปริมาณกรดกับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

(ข) ปริมาณแอลกอฮอล์กับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

(ค) ปริมาณเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 กับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

(ง) ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ตกับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

4.2.3 ประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อน้ำส้มสายชูในวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

จากการหมักแบบ Repeated batch ปริมาณกรดที่ได้จากการหมักในระยะเวลาต่าง ๆ สามารถบอกประสิทธิภาพของเชื้อน้ำส้มสายชูบนวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ ได้ เมื่อเปรียบเทียบจากภาพที่ 4.3 และ 4.4 พบว่า ปริมาณกรดที่ได้จากเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 มีปริมาณกรดลดลงเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น แสดงว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ไม่มีความสามารถในการยึดเกาะกับวัสดุตัวกลางได้ดีเท่ากับเชื้อ *Acetobacter* sp. WK จึงไม่สามารถดำรงชีวิตและสร้างกรดได้ในสภาพการหมักแบบ Repeated batch เนื่องจากการหมักแบบ Repeated batch ต้องถ่ายน้ำหมักเดิมออกหมด และใส่สับสเตรทใหม่เข้าไปโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูใหม่เข้าไป ดังนั้น เชื้อที่จะเจริญและสร้างกรดได้จะต้องเป็นเชื้อที่ยึดเกาะกับวัสดุตัวกลางเท่านั้น การหมักแบบ Repeated batch แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *Acetobacter* sp. WK มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะกับวัสดุตัวกลางดีกว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 จึงให้ปริมาณกรดสูงกว่าและปริมาณกรดค่อนข้างคงที่มากกว่า แสดงว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. WK สามารถใช้หมักน้ำส้มสายชูแบบ Repeated batch ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีอายุการใช้งานยาวนานกว่า

ผลของประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ พบว่า ใยบวบ ใยพลาสติก และผ้ามีประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK มากกว่า 28 วัน เนื่องจากปริมาณกรดที่ได้ไม่ลดลงและมีแนวโน้มผลิตกรดได้อีกเมื่อระยะเวลาในการหมักนานกว่า 28 วัน ส่วนใยกรองน้ำมีประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK ประมาณ 21 วัน เนื่องจากหลังจากวันที่ 21 ของการหมักปริมาณกรดที่ได้ลดน้อยลง แสดงว่าประสิทธิภาพของเชื้อน้ำส้มสายชูลดลง แม้ว่าจะทำการเปลี่ยนสับสเตรทให้ใหม่ซึ่งมีปริมาณแอลกอฮอล์เพียงพอที่จะเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกก็ตาม

ส่วนผลของประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ พบว่า ใยพลาสติกมีประสิทธิการยึดเกาะของเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ประมาณ 28 วัน ส่วนใยบวบ ใยกรองน้ำ และผ้าฝ้าย มีประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ประมาณ 21 วัน ซึ่งหลังจากการหมัก 21 วัน ปริมาณกรดที่ได้จะลดลง

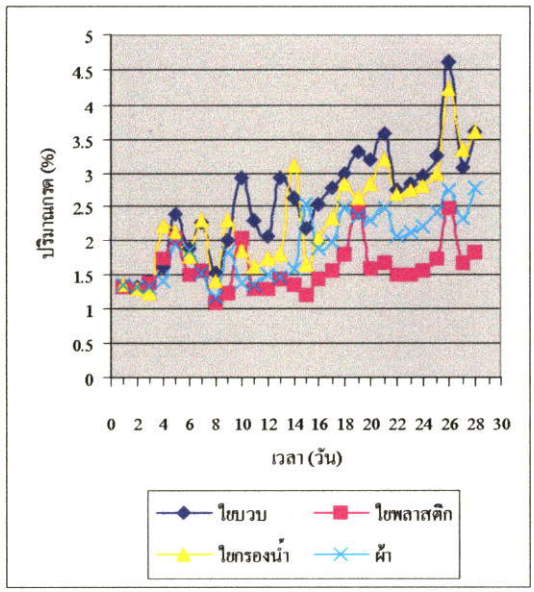
ดังนั้นประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK ในใยบวบจะดีที่สุด ทำให้มีอายุในการใช้งานยาวนานที่สุด และประสิทธิภาพในการยึดเกาะของเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ในใยพลาสติกจะดีที่สุด และมีอายุการใช้งานยาวนานที่สุด

4.2.4 วัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch

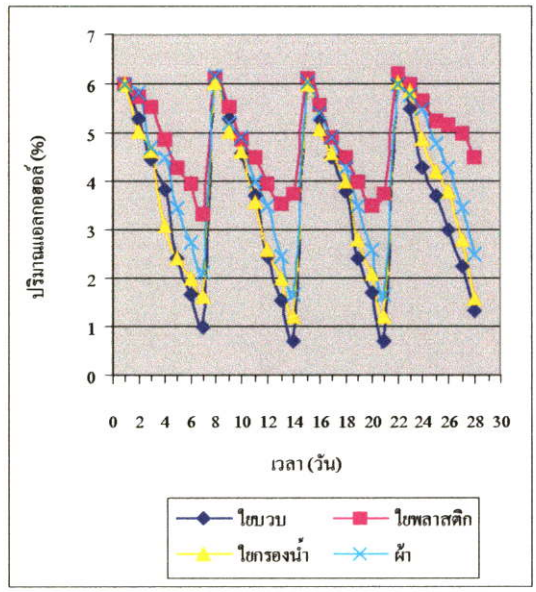
การหมักแบบ Fed-batch จะใช้ระยะเวลาในการหมัก 28 วัน ทำการให้สับสเตรทที่มีแอลกอฮอล์เพิ่มลงไปเป็นจำนวนทั้งสิ้น 3 ครั้ง ผลของวัสดุตัวกลางที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch คือ ใยบวบ จากภาพที่ 4.5 วัสดุตัวกลางแต่ละชนิดจะให้ปริมาณกรดสูงขึ้นในแต่ละครั้งของการให้สับสเตรทเพิ่มเข้าไป ดังนั้นในการให้สับสเตรทครั้งที่ 3 วัสดุตัวกลางแต่ละชนิดจะให้ปริมาณกรดสูงที่สุด ซึ่งใยบวบให้ปริมาณกรดสูงที่สุด คือ 4.6 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ ใยกรองน้ำ ผ้า และใยพลาสติก จะให้ปริมาณกรดสูงสุด คือ 4.2 2.8 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาณกรดที่ได้จะสัมพันธ์กับปริมาณแอลกอฮอล์ที่อยู่ในสับสเตรท กล่าวคือ ปริมาณกรดที่ผลิตได้ต่ำจะมีปริมาณแอลกอฮอล์ในสับสเตรทเหลืออยู่สูง ในทางตรงกันข้ามถ้าปริมาณกรดที่ผลิตได้สูงจะมีปริมาณแอลกอฮอล์เหลืออยู่ในสับสเตรทต่ำ เนื่องจาก *Acetobacter* sp. ออกซิไดซ์เอทธานอลไปเป็นกรดอะซิติก ดังนั้นในการหมักแบบ Fed-batch ซึ่งมีการเติมสับสเตรทลงไปเรื่อย ๆ เพื่อเป็นการเพิ่มเอทธานอลให้แก่เชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการออกซิไดซ์เอทธานอลไปเป็นกรดอะซิติกในถังหมัก ดังนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณแอลกอฮอล์ให้มีปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ค่อย ๆ ลดลงจากการที่เชื้อใช้จึงมีปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเป็น 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดจึงเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีแอลกอฮอล์เป็นสับสเตรทที่คอยเติมอยู่เรื่อย ๆ ปริมาณกรดที่ได้ในการเติมสับสเตรทครั้งที่ 3 จึงมีปริมาณกรดสูงสุดเช่นเดียวกับปริมาณเชื้อ ในแต่ละรอบของการหมักจะได้ปริมาณเชื้อสูงที่สุดและจะลดลงเมื่อปริมาณแอลกอฮอล์น้อยลง แต่เมื่อมีการเติมสับสเตรทใหม่ปริมาณเชื้อจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณเชื้อสูงที่สุด ปริมาณเชื้อจะลดลง ส่วนปริมาณกรดจะลดลงเล็กน้อย เมื่อเพิ่มสับสเตรทเข้าไปปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นเป็นผลให้ปริมาณกรดเพิ่มขึ้น แต่ถ้าปริมาณแอลกอฮอล์ลดลง และยังไม่มีการเติมสับสเตรทใหม่เข้าไปปริมาณเชื้อจะลดลง ปริมาณกรดที่ได้ก็จะลดลงเช่นเดียวกัน เนื่องจากปริมาณแอลกอฮอล์และเชื้อน้อย กรดอะซิติกที่สร้างได้อาจถูกออกซิไดซ์ต่อไป ดังนั้นการเติมสับสเตรทเพิ่มเข้าไปเรื่อย ๆ ในการหมักแบบ Fed-batch นี้ ปริมาณกรดที่ได้จึงสูงกว่าการหมักแบบ Batch และ Repeated batch

ส่วนปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ตจะมีปริมาณสูงขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากมีการเติมสับสเตรทเพิ่มเข้าไปเรื่อย ๆ ซึ่งปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ตที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการเจริญและการสร้างกรดของเชื้อ เนื่องจากปริมาณกรดและปริมาณเชื้อเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ จากการเติมไวน์อ้อยที่มีเอทธานอลเพิ่ม ดังนั้นในการหมักด้วยเชื้อ *Acetobacter* sp. WK ใยบวบจะให้ปริมาณกรดสูงสุดทั้งการหมักแบบ Batch Repeated batch และ Fed-batch

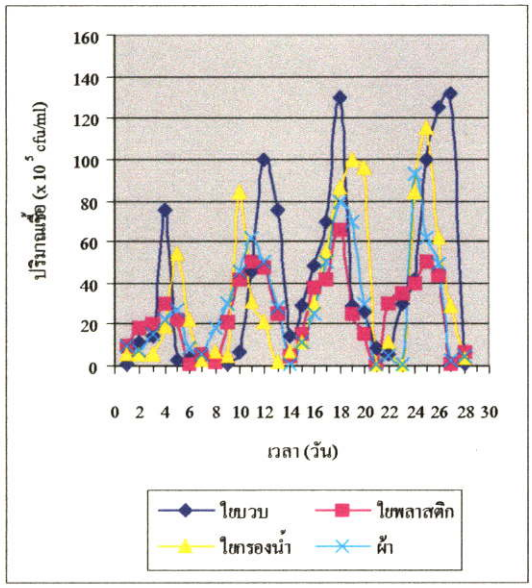
จากภาพที่ 4.6 ผลของวัสดุตัวกลางที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch คือ ใยพลาสติกจะให้ปริมาณกรดสูงสุดของแต่ละรอบของการเพิ่มสับสเตรท คือ 1.8 2.3 3.4 และ 2.9 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ใยกรองน้ำให้ปริมาณ



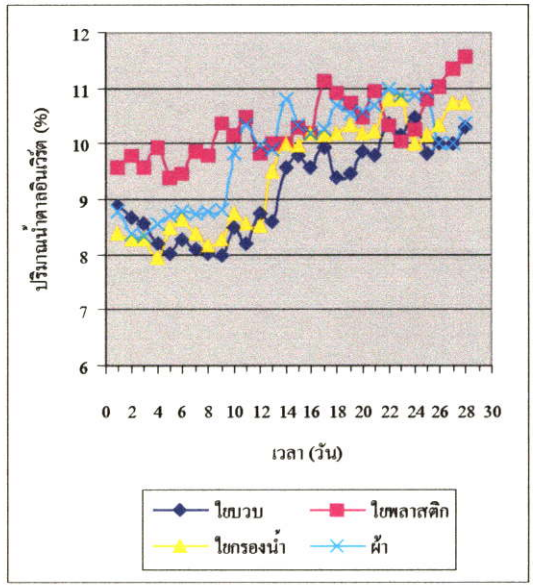
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

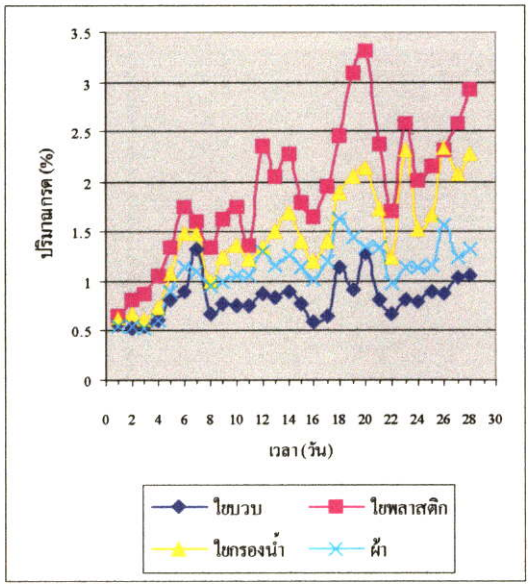
ภาพที่ 4.5 การตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch

(ก) ปริมาณกรดกับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

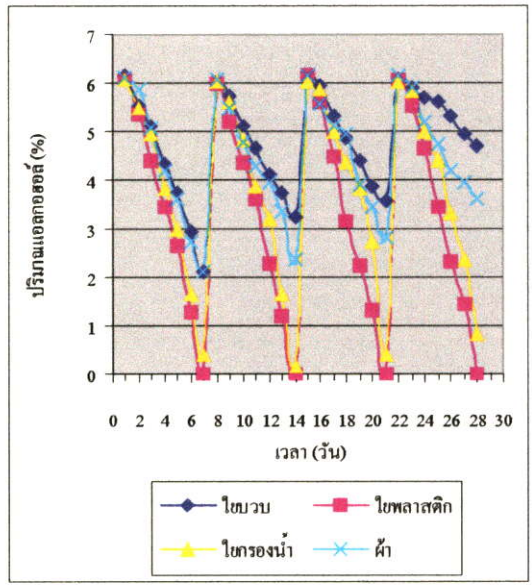
(ข) ปริมาณแอลกอฮอล์กับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

(ค) ปริมาณเชื้อ *Acetobacter* sp. WK กับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

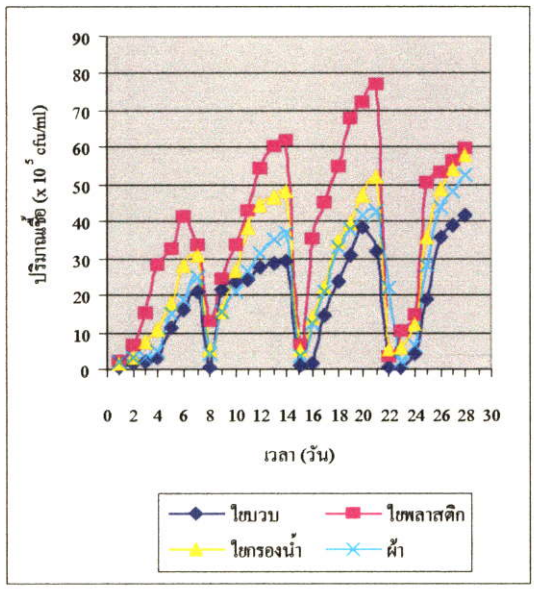
(ง) ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ตกับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ



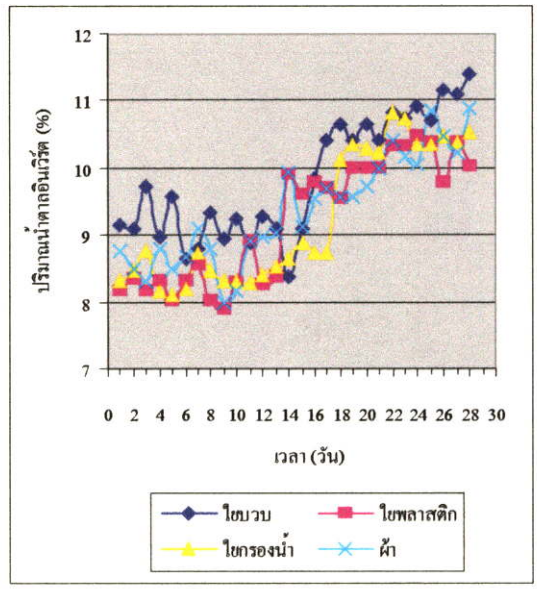
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 4.6 การตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch

(ก) ปริมาณกรดกับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

(ข) ปริมาณแอลกอฮอล์กับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

(ค) ปริมาณเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 กับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

(ง) ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ตกับวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

กรดสูงสุดแต่ละรอบของการเพิ่มสับสเตรท คือ 1.5 1.7 2.1 และ 2.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ ผ้าฝ้ายให้ปริมาณกรดสูงสุดในแต่ละรอบของการเพิ่มสับสเตรท คือ 1.1 1.3 1.6 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสุดท้ายคือ ใยบวบให้ปริมาณกรดสูงสุดในแต่ละรอบของการเพิ่มสับสเตรทเข้าไป คือ 1.3 0.9 1.3 และ 1.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าใยพลาสติกจะให้ปริมาณกรดสูงที่สุดในรอบ 2 ของการเพิ่มสับสเตรท คือ ให้ปริมาณกรดสูงสุด 3.4 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ใยกรองน้ำ ผ้าฝ้าย และใยบวบ ให้ปริมาณกรดสูงสุด 2.3 1.6 และ 1.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากภาพที่ 4.6 (ข) จะเห็นได้ว่าใยบวบมีปริมาณแอลกอฮอล์เหลืออยู่ในสับสเตรทมากที่สุด ซึ่งจะสัมพันธ์กับภาพที่ 4.6 (ก) เพราะปริมาณกรดที่ผลิตได้ในใยบวบต่ำที่สุดแสดงว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ใช้แอลกอฮอล์เปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกได้น้อย เมื่อมีการเพิ่มสับสเตรทเข้าไปในแต่ละครั้งปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหลืออยู่ในสับสเตรทจึงสูงขึ้นเรื่อย ๆ เช่นเดียวกับผ้าฝ้ายและใยกรองน้ำซึ่งมีปริมาณแอลกอฮอล์รองลงมาตามลำดับ สุดท้ายคือ ใยพลาสติกมีปริมาณแอลกอฮอล์ในสับสเตรทน้อยที่สุดคือ 0 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 เปลี่ยนแอลกอฮอล์ในสับสเตรทไปเป็นกรดอะซิติกจนหมด แม้จะมีการเพิ่มแอลกอฮอล์ในสับสเตรทเข้าไปหลายครั้งก็ไม่มีปริมาณแอลกอฮอล์หลงเหลืออยู่ เนื่องจาก *Acetobacter* sp. TISTR102 สามารถใช้แอลกอฮอล์ในการผลิตกรดอะซิติกได้สูงในใยพลาสติก จึงทำให้มีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุด และมีปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำที่สุดในสับสเตรท ส่วนปริมาณเชื้อในแต่ละรอบ 7 วัน ของการหมัก ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น และจะลดลงเมื่อปริมาณเชื้อถึงจุดสูงสุดและปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำลง และเมื่อเพิ่มสับสเตรทปริมาณเชื้อจะสูงขึ้น ปริมาณกรดที่ได้จึงสูงขึ้นด้วย ส่วนปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ตมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการเติมสับสเตรทในวัสดุตัวกลางทั้ง 4 ชนิด

ดังนั้นในการหมักด้วย *Acetobacter* sp. TISTR102 ใยพลาสติกจะให้ปริมาณกรดสูงสุดทั้งในการหมักแบบ Batch Repeated batch และ Fed-batch และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูด้วยเชื้อ *Acetobacter* sp. WK และ TISTR102 พบว่า *Acetobacter* sp. WK บนใยบวบจะให้ปริมาณกรดสูงกว่า *Acetobacter* sp. TISTR102 บนใยพลาสติก ในทุกสภาวะการหมักทั้งแบบ Batch Repeated batch และ Fed-batch

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำส้มสายชูในขวดหมักทรงสูงที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำส้มสายชูของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK พบว่า ปริมาณและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด คือ ปริมาณรำข้าวเจ้า 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด คือ ปริมาณกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเอทธานอลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด คือ ปริมาณเอทธานอล 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. WK ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด คือ กล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. WK ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด คือ ปริมาณอากาศ 0.5 vvm ในขณะที่สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำส้มสายชูของเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 ประกอบด้วย ปริมาณรำข้าวเจ้า 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเอทธานอลเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 5 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณอากาศที่ให้ 0.5 vvm

5.2 การผลิตน้ำส้มสายชูในถังหมักทรงสูงที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่องในระบบการตรึงเชื้อบนตัวกลาง

5.2.1 วัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูในลักษณะการหมักแบบ batch

วัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ batch คือ ใยบวบ ในระยะเวลาการหมัก 7 วัน ให้ปริมาณกรดสูงสุด 2.4 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 5 ของการหมัก ส่วนวัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ batch คือ ใยพลาสติกให้ปริมาณกรดสูงสุด 1.8 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 ของการหมัก

5.2.2 วัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch

วัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch คือ ใยบวบให้ปริมาณกรดอยู่ในช่วง 3.2-3.3 เปอร์เซ็นต์ ในรอบที่ 1-3 ของการเปลี่ยนสับสเตรท ส่วนวัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch คือ ใยพลาสติกให้ปริมาณกรดสูงสุด 3.3

เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 ของการหมัก และในการเปลี่ยนสับสเตรทครั้งต่อมาปริมาณกรดที่ได้ลดลง แต่สูงกว่าวัสดุตัวกลางชนิดอื่น ๆ

5.2.3 ประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อน้ำส้มสายชูในวัสดุยึดเกาะชนิดต่าง ๆ

ประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK บนใยบวบ ใยพลาสติก และผ้าฝ้ายมีประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK มากกว่า 28 วัน ใยกรองน้ำมีประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อ *Acetobacter* sp. WK เป็นเวลาประมาณ 21 วัน ส่วนประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 บนใยพลาสติกมีประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 เป็นเวลาประมาณ 28 วัน ใยบวบ ใยกรองน้ำ และผ้าฝ้ายมีประสิทธิภาพการยึดเกาะของเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 เป็นเวลาประมาณ 21 วัน

5.2.4 วัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch

วัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch คือ ใยบวบให้ปริมาณกรดสูงสุด 4.6 เปอร์เซ็นต์ ในการเติมสับสเตรทครั้งที่ 3 หรือในวันที่ 26 ของการหมัก ส่วนวัสดุยึดเกาะที่เหมาะสมกับการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch คือ ใยพลาสติกให้ปริมาณกรดสูงสุด 3.4 เปอร์เซ็นต์ ในการเติมสับสเตรทครั้งที่ 2 หรือในวันที่ 20 ของการหมัก

ข้อเสนอแนะ

1. ในการหมักแบบ Repeated batch จะได้ผลผลิตออกมาในแต่ละรอบของการเปลี่ยนสับสเตรท ดังนั้นผลผลิตที่ได้ในแต่ละครั้งจึงควรมีปริมาณกรดใกล้เคียงกัน หรือไม่ลดน้อยลงกว่าเดิม จึงเหมาะแก่การใช้ใยบวบเป็นวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อ *Acetobacter* sp. WK ส่วนเชื้อ *Acetobacter* sp. TISTR102 และวัสดุยึดเกาะชนิดอื่น ๆ ไม่เหมาะสมในการหมักแบบ Repeated batch เพราะผลผลิตที่ได้มีปริมาณกรดลดลง ส่วนการตรึงเชื้อ *Acetobacter* sp. WK บนใยพลาสติกอาจหมักแบบ Repeated batch ได้ผลดีเช่นเดียวกัน แต่ต้องใช้ระยะเวลาในการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู และการสร้างกรดมากกว่า 28 วัน ซึ่งจะใช้เวลาหมักนานกว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. WK บนใยบวบ

2. ถ้าต้องการผลผลิตที่ได้มีปริมาณกรดสูง ควรทำการหมักแบบ Fed-batch โดยเติมสับสเตรทลงไปเรื่อย ๆ จะได้ปริมาณกรดที่สูงขึ้น แต่จะต้องใช้ระยะเวลาในการหมักเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อและปริมาณกรดให้สูงขึ้น ผลผลิตที่ได้อาจจะมีปริมาณน้อยกว่าการหมักแบบ Repeated batch และใช้ระยะเวลาในการหมักยาวนานกว่า แต่จะได้ปริมาณกรดที่สูงกว่า

3. งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูในถังหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่อง โดยจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ปริมาณกรดที่ได้จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชูค่อนข้างต่ำ คืออยู่ในช่วง 1.9-2.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชูบนวัสดุตัวกลางประเภทต่าง ๆ ในลักษณะการหมัก แบบ Batch Repeated batch และ Fed-batch ปริมาณกรดที่ได้ยังคงต่ำ จะได้ปริมาณกรดสูงสุดจากการตรึงเชื้อ *Acetobacter* sp. WK บนใยบวบในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch ได้ปริมาณกรด 4.6 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้น ถ้าต้องการผลผลิตในปริมาณสูง และมีปริมาณกรดสูงในระยะเวลาที่สั้น ควรจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในการหมักแบบ Semi-continuous และ Continuous ต่อไป เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตน้ำส้มสายชูโดยการตรึงเซลล์ในถังหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่อง โดยช่วยลดต้นทุนในการผลิตในด้านเครื่องมือราคาแพง ถังหมัก ปริมาณเชื้อ และการให้อากาศ โดยให้ผลผลิตและปริมาณกรดสูงไม่แพ้การผลิตน้ำส้มสายชูโดยใช้เครื่องมือราคาแพงในปัจจุบัน

บรรณานุกรม

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2527. ฝ้าย. เอกสารวิชาการเล่มที่ 9. กรุงเทพฯ : ประดิษฐ์การพิมพ์.

ธรณิศวร์ พิรุณละออง. 2545. ทรัพย์ชุมชน : แปรใยบวบสู่สายใยชุมชน. [Internet]. Available : http://www.bangkokbiznews.com/2002/03/12/jud/index.php?news=jud3.html.

นภา โล่ทอง. 2520. น้ำส้มสายชู. ข่าวสารเกษตรศาสตร์. 21(4) : 70-75.

นภา เหลืองพิริยะชาติ และเปรมหทัย ขำเกษม. 2537. การผลิตพลาสติกเสริมแรงด้วยใยแก้วแบบโปร่งใส. โครงงานพิเศษหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาเคมี. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

นวลแข ปาลิวนิช. 2534. ความรู้เรื่องผ้าสำหรับวัยรุ่น. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการ กระทรวงศึกษาธิการ.

นันทพร วรวุฒิพงษ์. 2517. การคัดสายพันธุ์บักเตรีเพื่อใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

บรรเลง ศรนิล. 2525. เทคโนโลยีพลาสติก. กรุงเทพฯ : ห้างหุ้นส่วนจำกัดการพิมพ์.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2540. จุลชีววิทยาการหมัก : วิตามินและสารสี. กรุงเทพฯ : เท็กซ์ แอนด์ พลับบลิเคชั่น.

ปกรณ์ วิสนานุศิษย์. 2541. ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของรำสกัดน้ำมัน. สิงห์บุรี : บริษัทไชโยเกษตรอุตสาหกรรม.

พิชิต เลี่ยมพิพัฒน์. 2530. ไฟเบอร์กล๊าส. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ : มิตรนราการพิมพ์.

รสสุคนธ์ เหล่าไพบูลย์. 2528. การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อน้ำส้มสายชูที่เหมาะสมต่อวิธีการผลิตแบบต่างๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลลิดา บุญโฉม และวราภรณ์ พุทธัสสะ. 2542. การผลิตวัสดุจากพอลิเมอร์ผสมระหว่างพอลิโอลิฟินส์และสาหร่ายสีแดง (Gracilaria). โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาคเคมี. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

วรรณา มาลาพันธุ์. 2530. การศึกษาศักยภาพของถังปฏิกิริยาแบบไบโอดิสค์ในการผลิตน้ำส้มสายชู. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

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

อรษา แสงอุทัย. 2527. พืชผัก. กรุงเทพฯ : คุณพันอักษรกิจ.

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

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

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

Allgeier, R. J., R.T. Wisthoff and F.M. Hildebrandt. 1954. Packing for Vinegar Generators. Ind. Eng. Chem. 46(10) : 2023-2026.

Bar, R., J. L. Gainer and D. J. Kirwan. 1986. Immobilization of *Acetobacter aceti* on Cellulose Ion Exchangers : Adsorption Isotherms. Biotech. Bioeng. 28(8) : 1166-1171.

Brown, G. D. and C. Rainbow. 1956. Nutritional Patterns in Acetic Acid Bacteria. J. Gen. Microbiol. 15 : 61-69.

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

Cruess, W. V. 1958. Commercial Fruit and Vegetable Products : A Texbook for Student, Investigators and Manufacturer. 4th ed., New York : McGraw-Hill. 844 p.

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

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

Ebner, H., K. Pohl and A. Enenkel. 1976. Self-Preming Aerator and Mechanical Defoamer for Microbiological Process. Biotech. Bioeng. 9 : 357-364.

James, C. P. C. and C. C. Chung. 1993. Chen-Chou Cane Sugar Handbook : A Manual for Cane Sugar Manufactures and Their Chemists. 12th ed. NewYork, Chichester, Brisbane, Toronto and Singapore : John Wiley & Sons pp 21-39.

Ghommidh, C., J. M. Navarro and G. Durand. 1981. Acetic Acid Production by Immobilized Acetobacter Cells. Biotechnol. Lett. 3(2) : 93-98.

Ghommidh, C., J.M. Cutayar and J. M. Navarro. 1986. Continuous Production of Vinegar.I. Research Strategy. Biotechnol. Lett. 8(1) : 13-18.

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

Gist-Brocades. 1978. British patent no. 1,514,425.

Greenshield, R. N. 1978. Acetic Acid : Vinegar. Primary Products of Metabolism. London : Academic Press.

Greenshield, R. N. and E. L. Smith. 1974. The Tubular Reactor in Fermentation. Proc. Biochem. 9 : 11-13, 15-18.

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

Kennedy, J. F., J. D. Humphreys, S. A. Barker and R. N. Greenshield. 1980. Application of Living Immobilized Cells to the Acceleration of the Continuous Conversions of Ethanol (Wort) to Acetic Acid (Vinegar)-Hydrous Titanium (IV) Oxide Immobilized Acetobacter Species. Enzyme. Microb. Technol. 2(3) : 209-216.

Mori, A. 1985. Production of Vinegar by Immobilized Cells. Proc. Biochem. 20(3) : 67-74.

Muller, F. 1978. A Modern Bioreactor for Vinegar Production. Proc. Biochem. 13 : 10-11.

Nanba, A., A. Tumura and S. Nagai. 1984. Synergistic Effects of Acetic Acid and Ethanol on the Growth of *Acetobacter* sp. J. Ferment. Technol. 62(6) : 501-505.

Nanba, A., K. Kimura and S. Nagai. 1985. Vinegar Production by *Acetobacter rancens* Cells Fixed on a Hollow Fiber module. J. Ferment. Technol. 63(1) : 57-60.

Nickol, G. B. 1979. Vinegar. Microbial Technology. New York : Academic Press.

Ohmori, S., T. Uozumi and T. Beppu. 1982. Loss of Acetic Acid Resistance and Ethanol Oxidising Ability in an *Acetobacter* strain. Agr. Biol. Chem. 46(2) : 381-389.

Okuhara, A. 1985. Vinegar Production with *Acetobacter* Grown on a Fibrous Support. J. Ferment. Technol. 63(1) : 57-60.

Okuhara, A. 1987. Production of Vinegar with Bacteria on a Support. U.S. patent no. 4,661,356.

Osuga, J., A. Mori and J. Kato. 1984. Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter aceti* Cells Entrapped in a K-Carragenan Gel. J. Ferment. Technol. 62(2) : 139-149.

Rainbow, C. 1966. Nutrition and Metabolism of Acetic and Bacteria (Brewery Spoilage Organism). Wallerstein Lab. Commun. 29(98/99) : 5-15.

Rainbow, C. and G. W. Mitson. 1953. Nutritional Requirements of Acetic Acid Bacteria. J. Gen. Microbiol. 9 : 371-375.

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

Rice R.P., L.W. Rice and H.D. Tindall. 1990. Fruit and Vegetable Production in Warm Climates. Hong Kong : Macmillan Publishers.

Rose, A.H. 1982. Fermented Food. London : Academic press. 293-305.

White, J. 1970. Malt Vinegar Manufacture. Proc. Biochem. 5(10) : 54-56.

Yasui, Y., Y. Suneya and A. Mori. 1978. Behavior of Acetic Acid Bacteria Grown in Surface Culture Toward Oxygen. J. Ferment. Technol. 56 : 266-272.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Glucose Yeast Extract Broth (GYE broth)

มีองค์ประกอบดังนี้	Glucose	100.0	กรัม
	Yeast extract	10.0	กรัม
	Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร Glucose Yeast extract Agar (GYEA)

มีองค์ประกอบดังนี้	Glucose	100.0	กรัม
	Yeast extract	10.0	กรัม
	Calcium carbonate	20.0	กรัม
	Agar	2.0	กรัม
	Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

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

3. อาหาร MY Broth

มีองค์ประกอบดังนี้	Glucose	10.0	กรัม
	Peptone	5.0	กรัม
	Yeast extract	3.0	กรัม
	Malt extract	3.0	กรัม
	Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วนำมาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4. อาหาร MY Agar

มีองค์ประกอบดังนี้	Glucose	10.0	กรัม
	Peptone	5.0	กรัม
	Yeast extract	3.0	กรัม
	Malt extract	3.0	กรัม
	Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นด้วยการให้ความร้อนจน Agar ละลาย แล้วนำมาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้ Ebuliometer

1.1 การหาจุดเดือดของน้ำ

ล้าง Ebuliometer ให้สะอาดแล้วเติมน้ำให้ได้ปริมาตรที่ขีดไว้ตอนล่างของกระบอกตวง (25 มิลลิลิตร) โดยเติมลงในช่องใส่เทอร์โมมิเตอร์ ใส่เทอร์โมมิเตอร์ไว้ตามเดิม จุดไฟตะเกียงแอลกอฮอล์ใส่ไว้ใต้เครื่อง รอประมาณ 8-9 นาที น้ำจะร้อนขึ้น จะเห็นปรอทของเทอร์โมมิเตอร์ขึ้นเมื่อน้ำเดือดและปรอทอยู่คงที่ อ่านค่าอุณหภูมิที่ได้จะเป็นจุดเดือดของน้ำ (ควรจะได้ใกล้เคียงกับ 100) ข้อสังเกต ไม่ต้องเติมน้ำในส่วนคอนเดนเซอร์ข้างบนในขณะที่หาจุดเดือดของน้ำ

2.2 การหาจุดเดือดของตัวอย่าง

เทน้ำออกแล้วใช้ตัวอย่างล้างและเททิ้งให้หมด ตวงตัวอย่างด้วยกระบอกตวงโดยใช้ปริมาตรของขีดบน (50 มิลลิลิตร) เติมน้ำลงในคอนเดนเซอร์ จุดตะเกียงแอลกอฮอล์สังเกตปรอทที่เริ่มขึ้นสูงจนกระทั่งปรอทหยุดคงที่อ่านค่าอุณหภูมิที่ได้

ข้อสังเกต จุดเดือดที่ถูกต้องจะคงที่อยู่ระยะหนึ่ง ถ้าปล่อยไว้นานขึ้นจุดเดือดจะสูงขึ้นไปเรื่อย ๆ เพราะน้ำในคอนเดนเซอร์ร้อน ค่าที่อ่านได้จะผิดไป จำเป็นต้องเฝ้าสังเกตให้ดี เครื่องมือนี้เหมาะสำหรับหาตัวอย่างที่มีแอลกอฮอล์ไม่เกิน 20% ถ้าสูงกว่านั้นจำเป็นต้องทำให้เจือจางลงตามอัตราส่วน

3.3 การอ่านค่าแอลกอฮอล์

อ่านค่าได้โดยใช้แป้นกลม หมุนปุ่มวงกลมให้จุดเดือดของน้ำตรงกับค่าแอลกอฮอล์ที่ 0 ดีกรี จากนั้นอ่านค่าจุดเดือดของตัวอย่างและด้านตรงข้ามจะเป็นค่าแอลกอฮอล์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยวิธีนี้ก็อ่านค่าได้โดยตรงไม่ต้องปรับค่าของอุณหภูมิทำให้สะดวกและรวดเร็วขึ้น

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

Ebuliometer ควรจะต้องไม่มีคราบตะกอน โดยปกติเมื่อใช้หาตัวอย่างไปแล้วทุก ๆ 50 ครั้ง ทำความสะอาดโดยต้มกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2% สัก 5-10 นาที แล้วล้างน้ำให้สะอาดและต้มด้วยน้ำเปล่าสองสามครั้ง

2. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (AOAC. 1995)

2.1 สารเคมี

2.1.1 น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เตรียมโดยนำน้ำกลั่นมาต้มเดือดเป็นเวลา 20 นาที

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

การหาความเข้มข้นมาตรฐานของ 0.1 N NaOH ทำได้โดยชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท (อบ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นในโถดูดความชื้น) อย่างละเอียดประมาณ 0.3 กรัม เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จึงเติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 90-100 มิลลิลิตร เมื่อโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท (มีสูตรเป็น $KHC_8H_4O_4$) ละลาย จึงเติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลาย 0.1 N NaOH ความเข้มข้นมาตรฐาน คำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (N)} = \frac{\text{กรัม } KHC_8H_4O_4 \times 1{,}000}{\text{มิลลิลิตร NaOH} \times 204.229} \qquad (6.1)$$

2.13 สารละลายฟีนอฟธาลีน (Phenolphthalein) ชั่ง 1 กรัม ฟีนอฟธาลีนละลายในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร

2.2 วิธีวิเคราะห์

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

$$\text{กรดทั้งหมด (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)} = \frac{N \times V \times 60 \times 100}{1{,}000 \times 1} \qquad (6.2)$$

กำหนดให้

N คือ ความเข้มข้นมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V คือ จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ตโดยวิธี Lane-Eynon Method

วิธีนี้อาศัยปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวส์กับสารละลาย $CuSO_4$ โดยจะรีดิวส์ $CuSO_4$ ในสารละลาย Fehling-Soxhlet solution ให้เป็น Cu_2O โดยใช้ methylene blue เป็นอินดิเคเตอร์

3.1 การเตรียม Reagent

3.1.1 สารละลายคอบเปอร์ซัลเฟต (Fehling A)

ละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 34.659 กรัมในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดตวงปริมาตร กรองผ่านใยแก้ว

3.1.2 สารละลาย Fehling B

ละลาย $KNaC_4H_4O_6.4H_2O$ 173 กรัม และ NaOH 50 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดวัดปริมาตร ถ้าเกิดตะกอนขุ่นให้กรองผ่านใยแก้ว

3.1.3 สารละลายมาตรฐาน 0.5% กลูโคส

ชั่งกลูโคสประมาณ 5 กรัม โดยชั่งให้ได้น้ำหนักแน่นอนทศนิยม 4 ตำแหน่ง แล้วละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ในขวดวัดปริมาตร (เตรียมสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้นพอเหมาะที่จะไตเตรทถึงจุดยุติในปริมาตรมากกว่า 15 มิลลิลิตร และน้อยกว่า 50 มิลลิลิตร

3.1.4 สารละลายมาตรฐานน้ำตาลอินเวิร์ต (Invert sugar standard solution 0.5%)

อบ pure sucrose (saccharose) ที่ 100 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ชั่งละเอียด 0.475 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ใส่ HCL 1 : 1 ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร แล้วนำเข้าไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส 15 นาที ทำให้เย็น แล้วปรับให้เป็นกลางหรือเป็นกรดเล็กน้อยด้วย 20% NaOH 4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.15 สารละลายเมทิลีนบลูอินดิเคเตอร์ (Methylene blue indicator)

ละลายเมทิลีนบลู 1 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดตวงปริมาตร

3.2 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างมาโดยประมาณดังนี้

ถ้า > 15 องศาบริกซ์ ใช้ปริมาตรตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร

10-15 องศาบริกซ์ ใช้ปริมาตรตัวอย่าง 4 มิลลิลิตร

< 10 องศาบริกซ์ ใช้ปริมาตรตัวอย่าง 6 มิลลิลิตร

เติม 1: 1 HCL จำนวน 2 มิลลิลิตร นำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส 15 นาที ทำให้เย็นแล้วปรับให้เป็นกลางหรือกรดเล็กน้อยด้วย 20% NaOH (ประมาณ 2.5 มิลลิลิตร) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

หมายเหตุ ถ้าปริมาตรน้ำตาลในตัวอย่างมีน้อยมาก (น้อยกว่า 1%) ให้นำตัวอย่างมาจำนวนมากและไม่ควรปรับปริมาตรแล้ว

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 วิธีไตเตรทหาช่วงจุดยุติ (Incremental method)

เป็นการหาปริมาตรคร่าว ๆ ของสารละลายที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับสารละลาย Soxhlet

(1) บรรจุสารละลายที่ใช้ไตเตรทในบิวเรต

(2) เตรียมสารละลาย Fehling-Soxhlet solution โดยปิเปตสารละลาย Fehling A 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วปิเปต Fehling B 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายสีน้ำเงิน

(3) เติมสารละลายที่ใช้ไตเตรท 15 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย Soxhlet แล้วต้มให้เดือดปานกลางภายในเวลา 2 นาที

(4) ถ้าสารละลายในขวดรูปกรวยยังคงมีสีฟ้าให้ไตเตรทโดยเติมสารละลายที่ใช้ไตเตรทครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร จนสีฟ้าหายไปแล้วเติมเมทิลีนบลูอินดิเคเตอร์ 3-4 หยด ไตเตรทเช่นเดิมต่อไปจนเกือบถึงจุดยุติให้ไตเตรททีละหยดจนถึงจุดยุติซึ่งสีฟ้าของสารละลายในขวดรูปกรวยหายไปและได้ตะกอนสีแดงอิฐ

(5) ถ้าสีของเมทิลีนบลูจางหายไปกลายเป็นไม่มีสีแสดงว่าเกินจุดยุติ ให้เจือจางสารละลายที่ใช้ไตเตรทลงไปอีก แต่ถ้าสีของเมทิลีนบลูยังคงอยู่ให้ไตเตรทต่อไปให้ถึงจุดยุติภายใน 1 นาที รวมเวลาที่ใช้ในการไตเตรทไม่ควรเกิน 3 นาที

(6) ถ้าถึงจุดยุติที่ปริมาตรมากกว่า 50 มิลลิลิตร ให้ใช้สารละลายที่ใช้ไตเตรทเข้มข้นมากขึ้น ถ้าไตเตรทได้จุดยุติมีปริมาตรมากกว่า 15 และน้อยกว่า 50 มิลลิลิตร ภายในเวลา 3 นาที ให้ทำซ้ำอีกจนได้ค่าที่เที่ยงตรง

3.3.2 วิธีไตเตรทมาตรฐาน (Standard method)

เป็นการหาปริมาตรที่แม่นยำของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลหรือสารละลายตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับสารละลาย Soxhlet ทำโดย

(1) เติมสารละลายที่ใช้ไตเตรทปริมาตรน้อยกว่าปริมาตรที่ไตเตรทได้คร่าว ๆ จากการไตเตรทหาช่วงจุดยุติประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย Soxhlet

(2) ไตเตรทเช่นเดียวกับ ข้อ 3.3.1 โดยค่อย ๆ หยดทีละหยดจนถึงจุดยุติ

3.4 การคำนวณ

$$\text{Fector} = \frac{360.312 \times \text{ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน} \times \text{น้ำหนัก pure sucrose}}{342.296 \times \text{ปริมาตรที่ปรับ}} \qquad (6.3)$$

$$\%\ \text{invert sugar} = \frac{\text{Factor} \times \text{ปริมาตรที่ปรับ} \times 100\%}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้} \times \text{ปริมาตรตัวอย่างที่ไตเตรท}} \qquad (6.4)$$

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์ทางชีววิทยา

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (Spread plate/ surface plate)

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้มีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถนับจำนวนโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขุ่นได้ สังเกตลักษณะโคโลนีได้ชัดเจน เชื้อไม่มีโอกาสสัมผัสกับความร้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถเตรียมจานอาหารไว้ได้ล่วงหน้า และในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีการปนเปื้อนจะสังเกตเห็นได้ แต่อย่างไรก็ตามการใช้วิธีนี้จะต้องระมัดระวังในข้อผิดพลาดซึ่งอาจเกิดวิธีนี้กับอาหารแข็งที่มีจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่า 3000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรได้

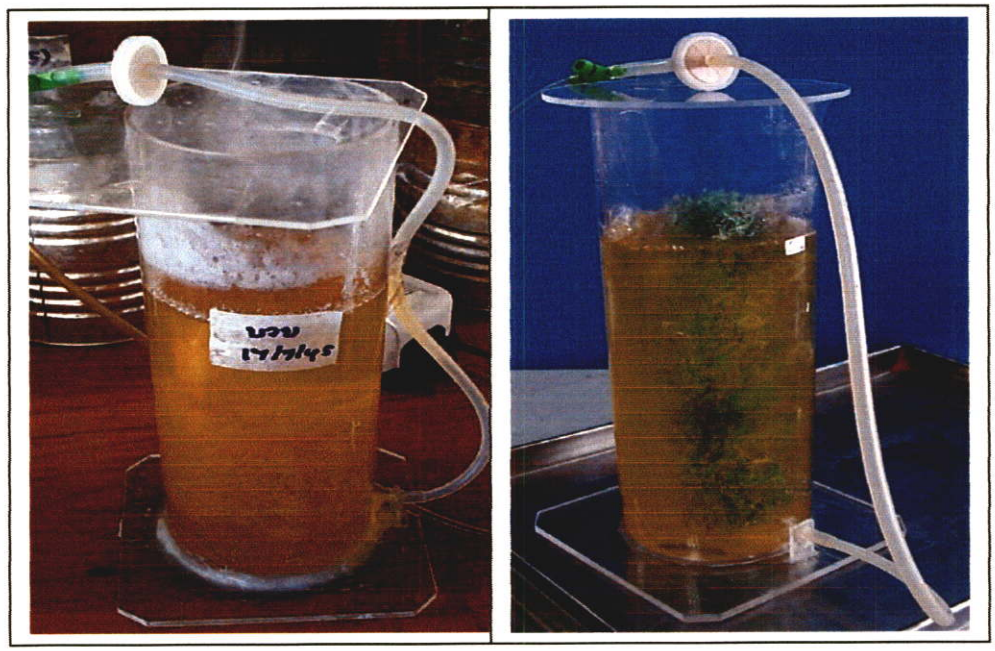
การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ มีขั้นตอนดังนี้

1. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานอาหาร ทิ้งไว้อย่างน้อย 6 ชั่วโมง เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแข็ง
2. เตรียมตัวอย่างโดยใช้ระดับเจือจางต่ำกว่าที่ตรวจนับได้โดยวิธีเขย่าจาน (shake plate) 10 เท่า
3. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารตามระดับความเจือจางที่ต้องการลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ จานละ 0.1 หรือ 0.2 มิลลิลิตร โดยใช้ 2-4 จานในแต่ละความเจือจาง
4. ใช้แท่งแก้วที่ปลายหนึ่งงอเป็นรูปสามเหลี่ยมจุ่มแอลกอฮอล์ ลนไฟ แกว่งเบา ๆ ให้เย็น เกลี่ย (spread) ให้ตัวอย่างอาหารกระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทำได้โดยใช้มือหนึ่งช่วยหมุนจาน หรือวางจานบนแป้นหมุน (turn table) โดยแตะแท่งแก้วไว้บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมทั้งผลักแป้นหมุนไปรอบ ๆ
5. นำจานอาหารไปบ่มเพาะเชื้อและนับจำนวนโคโลนีที่ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ

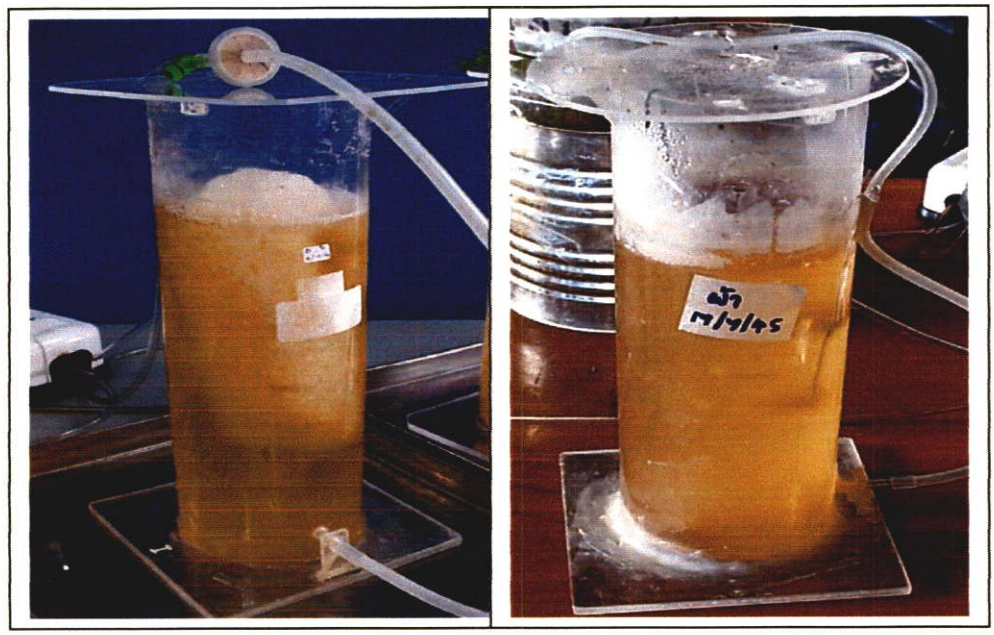
ภาคผนวก ง

รูปภาพ

ภาพที่ 6.1 การหมักน้ำส้มสายชูในขวดหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่อง



(ก) (ข)



(ค) (ง)

ภาพที่ 6.2 การหมักน้ำส้มสายชูโดยการตรึงเซลล์บนวัสดุตัวกลาง (ก) ใยบวบ (ข) ใยพลาสติก (ค) ใยกรองน้ำ และ (ง) ผ้าฝ้าย ในถังหมักทรงสูงที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่อง

ภาคผนวก จ

ข้อมูล

ตารางที่ 6.1 ผลปริมาณกรด pH ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต และปริมาณเชื้อกับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Batch

วันที่ / วัสดุตัวกลาง	ปริมาณกรด (%)							pH						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
ใยบวบ	1.3	1.3	1.4	1.6	2.4	2.3	2.3	3.50	3.46	3.47	3.31	3.47	3.45	3.28
ใยพลาสติก	1.4	1.3	1.4	1.8	2.0	1.5	1.5	3.61	3.46	3.50	3.42	3.50	3.47	3.36
ใยกรองน้ำ	1.4	1.3	1.2	2.2	2.2	2.2	2.3	3.50	3.47	3.50	3.42	3.50	3.45	3.32
ผ้าฝ้าย	1.4	1.3	1.3	1.5	2.1	1.5	1.4	3.52	3.46	3.50	3.43	3.46	3.50	3.35

วัสดุ / วันที่ตัวกลาง	ปริมาณแอลกอฮอล์ (%)							ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต (%)						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
ใยบวบ	6.0	5.28	4.46	2.84	2.42	1.66	0.98	8.9	8.6	8.5	8.2	8.0	8.0	7.9
ใยพลาสติก	6.0	5.16	4.56	3.52	2.86	2.64	2.11	8.9	8.7	8.6	8.5	8.5	8.4	8.4
ใยกรองน้ำ	6.0	5.03	4.64	3.08	2.42	1.98	1.62	8.9	8.7	8.6	8.3	8.2	8.1	8.0
ผ้าฝ้าย	6.0	5.20	4.84	4.26	4.06	3.88	3.35	8.9	8.7	8.5	8.4	8.3	8.3	8.2

วัสดุ / วันที่ตัวกลาง	ปริมาณเชื้อ ($x10^5$ cfu/ml)						
	1	2	3	4	5	6	7
ใยบวบ	11.3	30	42	100	132	129	120
ใยพลาสติก	5.5	21	46	60	62	30.5	4.4
ใยกรองน้ำ	18	30	55	86	100	96	8.5
ผ้าฝ้าย	1.8	11.2	32	45.5	48	25	0.6

ตารางที่ 6.2 ผลปริมาณกรด pH ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต และปริมาณเชื้อกับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Batch

วันที่ / วัสดุตัวกลาง	ปริมาณกรด (%)							pH						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
ใยบวบ	0.6	0.5	0.6	0.6	0.8	0.9	1.3	3.42	3.53	3.50	3.52	3.33	3.33	3.32
ใยพลาสติก	0.7	0.8	0.9	1.1	1.4	1.8	1.6	3.37	3.37	3.26	3.27	3.10	3.05	3.01
ใยกรองน้ำ	0.6	0.7	0.6	0.7	1.1	1.5	1.5	3.40	3.48	3.35	3.42	3.20	3.13	3.03
ผ้าฝ้าย	0.5	0.6	0.5	0.6	0.9	1.1	1.2	3.43	3.55	3.43	3.45	3.27	3.23	3.18

วัสดุ / วันที่ตัวกลาง	ปริมาณแอลกอฮอล์ (%)							ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต (%)						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
ใยบวบ	6.0	5.55	5.12	4.33	3.75	2.96	2.13	7.7	7.9	7.8	7.9	7.8	7.9	7.9
ใยพลาสติก	6.0	5.37	4.42	3.47	2.67	1.29	0	7.2	7.2	7.3	7.4	7.3	7.3	7.2
ใยกรองน้ำ	6.0	5.52	4.96	3.85	2.99	1.65	0.4	7.5	7.4	7.4	7.4	7.5	7.4	7.4
ผ้าฝ้าย	6.0	5.86	5.07	4.22	3.63	2.75	2.13	7.5	7.6	7.5	7.6	7.6	7.7	7.7

วัสดุ / วันที่ตัวกลาง	ปริมาณเชื้อ ($x10^5$ cfu/ml)						
	1	2	3	4	5	6	7
ใยบวบ	0.23	3.6	9	18	36	42.1	48.4
ใยพลาสติก	5	17.6	36	55	68	72	65
ใยกรองน้ำ	30.3	8.5	16	29	49	61	58
ผ้าฝ้าย	1.8	5.3	11	21	44	52.4	51.7

ตารางที่ 6.3 ผลปริมาณกรด และปริมาณแอลกอฮอล์กับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch

วัสดุตัวกลาง	วันที่ / รอบที่	ปริมาณกรด (%)							ปริมาณแอลกอฮอล์ (%)						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
ใยบวบ	1	1.3	1.3	1.4	1.6	2.4	1.9	2.3	6.10	5.53	4.32	3.64	2.24	1.85	0.92
	2	1.8	2.2	2.7	3.1	3.3	3.3	3.3	6.05	5.78	4.55	3.89	2.33	1.92	0.75
	3	1.6	2.2	2.6	2.9	3.1	3.2	3.3	6.00	5.41	4.89	3.33	2.54	1.66	0.86
	4	1.7	1.8	2.2	2.6	2.9	3.0	3.2	6.00	5.19	4.22	3.88	2.76	1.95	0.93
ใยพลาสติก	1	1.5	1.6	1.5	1.7	1.7	1.7	1.9	6.10	5.73	5.55	4.87	3.72	3.16	2.88
	2	1.3	1.7	1.5	1.5	1.6	1.7	1.5	6.05	5.82	5.31	4.82	4.14	3.85	2.99
	3	1.3	1.4	1.5	1.5	1.4	1.3	1.4	6.00	5.79	5.48	5.02	4.47	3.95	3.28
	4	1.4	1.4	1.5	1.3	2.0	1.8	2.2	6.00	5.88	5.23	4.73	3.38	2.93	2.11
ใยกรองน้ำ	1	1.4	1.3	1.9	1.3	1.8	2.0	2.3	6.10	5.53	5.22	4.25	3.74	2.63	1.88
	2	1.2	2.2	1.6	1.6	1.7	1.8	1.9	6.05	5.89	5.62	5.21	4.33	2.96	2.76
	3	1.6	2.1	1.4	1.6	1.9	2.0	1.9	6.00	5.84	5.51	4.67	4.22	3.48	3.00
	4	0.8	0.9	0.7	1.1	0.9	1.0	1.0	6.00	5.88	5.71	5.49	5.23	4.84	4.26
ผ้าฝ้าย	1	1.0	1.3	1.3	1.5	2.1	1.5	1.4	6.10	5.83	5.74	4.40	3.34	2.31	1.76
	2	2.8	1.9	2.4	2.4	2.5	2.8	2.0	6.05	5.63	5.43	4.86	3.74	2.54	1.88
	3	1.6	1.7	1.8	2.2	2.3	2.1	2.3	6.00	5.91	5.31	4.22	3.56	2.94	2.23
	4	1.5	1.6	1.8	2.0	2.2	2.0	2.4	6.00	5.30	4.42	3.76	3.35	2.64	1.95

ตารางที่ 6.4 ผลปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต และปริมาณเชื้อกับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch

วัสดุตัวกลาง	วันที่ / รอบที่	ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต (%)							ปริมาณเชื้อ ($x10^5$ cfu/ml)						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
ใยบวบ	1	8.5	8.4	8.4	8.5	8.7	8.7	9.0	5.5	30	42	70	80	72	0.6
	2	8.8	8.6	8.5	8.7	8.7	8.7	8.7	28.7	48.3	70	105	120	130	124
	3	8.8	8.7	8.7	8.4	8.3	8.2	8.2	0.75	4.17	21.8	46	100	122	125
	4	8.2	8.1	8.7	8.4	8.4	8.4	8.3	1.33	11.3	24.2	76	98	108	116
ใยพลาสติก	1	7.2	7.2	7.3	7.4	7.3	7.3	7.2	18	30	46	62	50	28.5	0.6
	2	7.0	7.6	7.6	7.5	6.8	7.1	7.1	12	25	50	80	70	30	0.7
	3	6.8	7.3	7.3	7.3	7.2	7.2	7.0	30	35	40	62	44	0.6	6.8
	4	7.2	7.1	6.8	7.3	7.3	7.2	7.1	10	4.23	6.17	7.4	16	23.5	42.3
ใยกรองน้ำ	1	8.9	8.7	8.6	8.2	8.0	8.30	8.1	11.3	30	55	65	68	52	0.3
	2	8.0	8.0	8.5	8.2	8.8	8.6	8.6	16	61	81.7	66	0.43	16	25
	3	8.8	8.6	8.9	8.4	8.5	8.9	8.8	5	0.5	68.3	62	49.3	2.46	5.1
	4	8.4	8.1	8.5	8.8	8.0	8.0	8.3	0.6	0.8	5.4	6.2	6.6	8.1	12
ผ้าฝ้าย	1	7.1	6.9	7.2	6.9	7.3	7.1	7.1	1.8	21.2	42	50	48	25	4.4
	2	7.2	7.2	7.7	7.5	6.8	6.9	7.3	11.3	0.3	84	100	62	29	3.45
	3	7.2	7.2	7.3	7.4	7.4	7.4	7.6	6.8	5.1	84	31	21	2	7.1
	4	7.5	7.4	7.4	7.6	7.5	7.3	7.3	6.17	6	5.4	19	32	54	63

ตารางที่ 6.5 ผลปริมาณกรด และปริมาณแอลกอฮอล์กับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch

วัสดุตัวกลาง	วันที่ / รอบที่	ปริมาณกรด (%)							ปริมาณแอลกอฮอล์ (%)						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
ใยบวบ	1	1.3	1.3	1.9	1.2	1.9	1.7	2.6	6.0	5.69	4.87	3.23	2.35	1.96	1.1
	2	1.2	1.7	2.0	1.6	1.7	1.9	1.7	6.1	5.86	5.22	4.73	3.86	3.11	2.86
	3	1.5	1.6	1.6	1.3	1.7	2.5	2.2	6.05	5.83	4.73	4.25	3.86	3.3	3.0
	4	0.8	0.7	0.6	0.8	1.0	1.4	0.9	6.1	5.41	5.12	4.38	3.92	3.75	3.26
ใยพลาสติก	1	1.3	1.3	1.9	1.4	1.9	2.0	3.3	6.0	5.88	4.94	3.45	2.64	1.63	0.86
	2	1.2	2.6	2.8	2.2	2.4	2.6	2.7	6.1	5.62	4.34	3.41	2.87	2.23	1.65
	3	1.4	2.0	1.8	1.8	2.0	2.5	2.3	6.05	5.53	4.15	3.22	3.02	2.65	2.0
	4	0.8	1.1	0.9	1.3	1.9	2.3	1.7	6.1	5.72	5.05	4.19	3.32	2.50	1.85
ใยกรองน้ำ	1	1.3	1.2	1.9	1.2	1.7	1.9	2.6	6.0	5.75	5.13	4.53	3.86	2.72	1.23
	2	1.2	1.5	1.7	1.7	1.9	2.0	2.0	6.1	5.85	5.31	4.51	3.57	3.08	2.41
	3	1.4	2.1	1.7	1.8	1.9	2.8	2.5	6.05	5.58	4.46	3.85	2.04	1.88	1.20
	4	0.8	1.0	0.9	1.2	1.5	1.7	1.4	6.1	5.83	4.50	3.98	3.32	2.70	2.49
ผ้าฝ้าย	1	1.4	1.3	1.9	1.3	2.0	2.3	2.3	6.0	5.67	5.23	4.22	3.35	2.24	1.85
	2	1.3	2.4	2.5	1.7	1.9	2.2	2.0	6.1	5.88	4.75	3.98	3.46	2.90	2.33
	3	1.5	1.9	1.5	1.7	2.3	2.3	2.4	6.05	5.61	4.95	4.26	3.72	3.11	2.90
	4	0.8	0.9	0.8	0.8	0.9	1.1	1.1	6.1	5.79	5.52	4.87	4.31	4.07	3.40

ตารางที่ 6.6 ผลปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต และปริมาณเชื้อกับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Repeated batch

วัสดุตัวกลาง	วันที่ / รอบที่	ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต (%)							ปริมาณเชื้อ ($x10^5$ cfu/ml)						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
ใยบวบ	1	7.2	7.7	7.8	7.9	7.8	7.9	7.9	5.0	18	35	46	56	61	28.5
	2	7.9	7.7	7.8	7.8	7.7	8.0	7.8	12.3	21.9	23.8	24.4	27.4	28.8	29.4
	3	7.8	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.6	4.0	12.3	21	31.1	41.5	46.6	2.46
	4	7.8	7.9	7.9	7.8	7.6	7.6	7.7	5.4	2.0	3.45	3.6	9.8	3.33	2.13
ใยพลาสติก	1	7.2	7.7	7.5	6.8	6.9	7.3	7.2	2.03	20	36	55	68	72	77
	2	7.0	7.6	7.6	7.5	7.1	7.1	7.1	30.4	35.5	44.8	50.3	53.1	56.3	59.4
	3	7.2	7.3	7.3	7.3	7.2	7.4	7.4	5.4	15.7	26.4	38.4	46.7	44.3	0.1
	4	7.3	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.2	3.2	10.3	14.6	24.8	35.5	41.3	13.8
ใยกรองน้ำ	1	7.2	7.2	7.3	7.4	7.3	7.3	7.2	1.8	21.2	25.5	38	44	48.1	54
	2	7.2	7.3	7.4	7.4	7.3	7.2	6.9	4.6	15.6	21.2	26.7	29.3	30	31.7
	3	7.3	7.6	7.5	7.2	7.2	7.1	7.4	13.2	24.3	33.5	42.6	54.2	60.3	0.57
	4	7.1	7.5	7.7	7.5	7.3	7.4	7.5	0.76	5.8	12.7	19.2	17.8	14.4	3.3
ผ้าฝ้าย	1	7.5	7.4	7.4	7.4	7.5	7.4	7.4	0.23	7.6	21	29	36	39	14.6
	2	7.2	7.3	7.4	7.4	7.3	7.2	6.9	26.3	34.2	42.5	40.8	38.7	28.9	23.6
	3	7.2	7.6	7.1	7.5	7.7	7.4	7.6	0.84	1.37	14.8	22.2	31	38.6	31.8
	4	7.4	7.7	7.6	7.6	7.7	7.5	7.6	24.4	0.53	4.33	9.86	8.43	5.7	0.3

ตารางที่ 6.7 ผลปริมาณกรด และปริมาณแอลกอฮอล์กับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch

วัสดุตัวกลาง	วันที่ / รอบที่	ปริมาณกรด (%)							ปริมาณแอลกอฮอล์ (%)						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
ใยบวบ	1	1.3	1.3	1.4	1.6	2.4	1.9	2.3	6.00	5.28	4.46	3.84	2.42	1.66	0.98
	2	1.5	2.0	3.0	2.3	2.1	3.0	2.6	6.08	5.30	4.60	3.70	2.44	1.55	0.72
	3	2.2	2.6	2.8	3.0	3.3	3.2	3.6	6.10	5.30	4.50	3.80	2.40	1.70	0.72
	4	2.7	2.9	3.0	3.3	4.6	3.1	3.6	6.10	5.50	4.30	3.70	3.00	2.23	1.35
ใยพลาสติก	1	1.3	1.2	1.4	1.8	2.0	1.5	1.6	6.00	5.75	5.56	4.86	4.30	3.97	3.35
	2	1.1	1.2	2.0	1.3	1.3	1.5	1.4	6.11	5.56	4.86	4.48	3.97	3.54	3.73
	3	1.2	1.5	1.6	1.8	2.4	1.6	1.7	6.12	5.60	4.90	4.50	4.00	3.50	3.73
	4	1.5	1.5	1.6	1.8	2.5	1.7	2.8	6.20	6.02	5.68	5.25	5.17	4.99	4.49
ใยกรองน้ำ	1	1.4	1.3	1.2	2.2	2.1	1.8	2.3	6.00	5.03	4.64	3.08	2.42	1.98	1.62
	2	1.4	2.3	1.9	1.6	1.8	1.8	3.1	6.05	5.03	4.64	3.59	2.60	1.98	1.22
	3	1.7	2.0	2.3	2.9	2.6	2.9	3.2	6.00	5.10	4.60	4.00	2.80	2.10	1.22
	4	2.7	2.7	2.8	3.0	4.2	3.3	3.6	6.05	5.88	4.89	4.20	3.80	2.80	1.58
ผ้าฝ้าย	1	2.0	1.3	1.3	1.4	1.9	1.9	1.5	6.00	5.82	4.71	4.51	3.47	2.76	2.11
	2	1.2	1.8	1.4	1.4	1.5	1.5	1.6	6.15	5.20	4.90	4.00	3.50	2.45	1.68
	3	2.5	1.9	2.0	2.5	2.4	2.3	2.5	6.05	5.40	4.90	4.30	3.50	2.60	1.68
	4	2.1	2.1	2.2	2.4	2.7	2.3	2.8	6.00	5.80	5.50	4.80	4.30	3.45	2.50

ตารางที่ 6.8 ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต และปริมาณเชื้อกับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. WK ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch

วัสดุตัวกลาง	วันที่ / รอบที่	ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต (%)							ปริมาณเชื้อ ($x10^5$ cfu/ml)						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
ใยบวบ	1	8.9	8.7	8.6	8.2	8.0	8.3	8.1	1.33	11.3	14.3	76	3.23	4.17	5.4
	2	8.0	8.0	8.5	8.2	8.8	8.6	9.6	4.17	0.75	6.8	46	100	76	14.3
	3	9.8	9.6	9.9	9.4	9.5	9.9	9.8	28.7	48.3	70	130	29.3	26	8.67
	4	10.4	10.1	10.5	9.8	10	10	10.3	5.5	30	42	100	125	132	0.6
ใยพลาสติก	1	9.6	9.8	9.6	9.9	9.4	9.5	9.9	10	18	20	30	32	0.6	5.4
	2	9.8	10.4	10.1	10.5	9.8	10	10	1.8	21.2	42	50	48	25	4.4
	3	10.3	10.2	11.1	11.0	10.7	10.5	11	16	38	42	66	25	16	0.42
	4	10.3	10	10.3	10.8	11	11.4	11.6	30	35	40	50	44	0.6	6.8
ใยกรองน้ำ	1	8.4	8.3	8.3	8.0	8.5	8.6	8.4	6.17	6	5.4	19	54	22	3
	2	8.2	8.3	8.8	8.6	8.5	9.5	10	6.8	5.1	84	31	21	2	7.1
	3	10	10.2	10.1	10.2	10.3	10.2	10.2	11.3	30	55	86	100	96	0.3
	4	10.8	10.8	10	10.2	10.4	10.7	10.7	11.3	0.3	84	115	62	29	3.45
ผ้าฝ้าย	1	8.8	8.4	8.4	8.6	8.7	8.8	8.7	10	7.4	16	22.17	26.72	8.3	5.4
	2	8.8	8.8	9.8	10.3	10	9.9	10.8	18	30	46	62	50	28.5	0.6
	3	10.3	10.2	10.3	10.7	10.5	10.6	10.7	12	25	50	80	70	30	0.7
	4	11	10.9	10.9	11	10	10	10	5	0.5	93	62	49.3	2.46	5.1

ตารางที่ 6.9 ผลปริมาณกรด และปริมาณแอลกอฮอล์กับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch

วัสดุตัวกลาง	วันที่ / รอบที่	ปริมาณกรด (%)							ปริมาณแอลกอฮอล์ (%)						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
ใยบวบ	1	0.6	0.5	0.6	0.6	0.8	0.9	1.3	6.15	5.55	5.12	4.33	3.75	2.96	2.13
	2	0.7	0.8	0.8	0.8	0.9	0.8	0.9	6.05	5.74	5.13	4.65	4.14	3.76	3.26
	3	0.8	0.6	0.7	1.1	0.9	1.3	0.8	6.12	5.95	5.33	4.86	4.43	3.87	3.60
	4	0.7	0.8	0.8	0.9	0.9	1.0	1.1	6.08	5.91	5.72	5.63	5.32	4.95	4.72
ใยพลาสติก	1	0.7	0.8	0.9	1.1	1.4	1.8	1.6	6.10	5.37	4.42	3.47	2.67	1.29	0
	2	1.3	1.6	1.8	1.4	2.4	2.1	2.3	6.00	5.21	4.36	3.62	2.31	1.22	0
	3	1.8	1.6	2.0	2.5	3.1	3.3	2.4	6.15	5.63	4.52	3.15	2.27	1.35	0
	4	1.7	2.6	2.0	2.2	2.3	2.6	2.9	6.10	5.54	4.68	3.45	2.32	1.44	0
ใยกรองน้ำ	1	0.6	0.7	0.6	0.7	1.1	1.5	1.5	6.08	5.52	4.96	2.85	2.99	1.65	1.40
	2	1.0	1.2	1.4	1.2	1.4	1.5	1.7	6.05	5.64	4.82	3.86	3.22	1.65	0.18
	3	1.4	1.2	1.4	1.9	2.1	2.1	1.7	6.04	5.88	5.02	4.36	3.83	2.77	0.40
	4	1.3	2.3	1.5	1.7	2.3	2.1	2.3	6.05	5.83	5.02	4.43	3.32	2.36	0.83
ผ้าฝ้าย	1	0.5	0.6	0.5	0.6	0.9	1.1	1.1	6.14	5.86	5.07	4.22	3.63	2.74	2.13
	2	1.0	1.0	1.1	1.1	1.3	1.3	1.3	6.10	5.49	4.68	4.31	3.96	3.37	2.36
	3	1.1	1.0	1.2	1.6	1.4	1.3	1.3	6.15	5.58	5.11	4.97	3.93	3.46	2.82
	4	1.0	1.1	1.1	1.2	1.6	1.3	1.3	6.15	5.93	5.22	4.77	4.21	3.96	3.62

ตารางที่ 6.10 ผลปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต และปริมาณเชื้อกับวัสดุยึดเกาะในการตรึงเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter* sp. TISTR102 ในลักษณะการหมักแบบ Fed-batch

วัสดุตัวกลาง	วันที่ / รอบที่	ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ต (%)							ปริมาณเชื้อ ($x10^5$ cfu/ml)						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
ใยบวบ	1	9.2	9.1	9.7	9.0	9.6	8.7	8.8	0.8	1.6	2.1	3.2	11.3	16.5	21.0
	2	9.3	9.0	9.3	8.9	9.3	9.1	8.4	0.57	21.9	23.8	24.4	27.4	28.8	29.4
	3	9.1	9.9	10.4	10.7	10.4	10.7	10.4	0.84	1.37	14.8	24.0	31.0	38.6	31.8
	4	10.9	10.7	10.9	10.7	11.2	11.1	11.4	0.53	0.76	4.33	19.0	36.0	39.0	41.6
ใยพลาสติก	1	8.2	8.4	8.2	8.3	8.0	8.3	8.6	2.03	6.50	15.2	28.4	32.5	41.3	33.8
	2	8.0	7.9	8.3	8.8	8.3	8.4	9.9	13.2	24.3	33.5	42.6	54.2	60.3	62.0
	3	9.6	9.8	9.7	9.6	10	10	10	6.3	35.5	44.8	55.0	68.0	72.0	77.0
	4	10.3	10.3	10.5	10.4	9.8	11.4	10	3.2	10.3	14.6	19.0	36.0	39.0	41.6
ใยกรองน้ำ	1	8.3	8.5	8.8	8.2	8.1	8.2	8.7	1.8	3.3	7.6	11.0	18.0	28.0	31.0
	2	8.5	8.3	8.3	8.3	8.4	8.5	8.7	5.4	15.7	26.4	38.4	41.3	46.7	48.0
	3	9.9	8.7	8.7	10.1	10.2	10.3	10.2	5.5	14.2	12.5	34.6	39.7	47.1	52.2
	4	10.9	10.7	10.3	10.3	10.5	10.4	10.5	5.4	5.8	12.7	36.0	49.0	54.0	58.0
ผ้าฝ้าย	1	8.8	8.5	8.3	8.8	8.5	8.7	9.1	2.13	3.33	3.36	5.0	15.4	19.2	25.0
	2	8.8	8.0	8.2	8.9	9.0	9.0	9.9	4.60	15.6	21.2	26.7	31.3	35.2	36.7
	3	9.1	9.5	9.7	9.6	9.6	9.7	10	4.0	12.3	21.0	33.1	38.1	41.5	43.0
	4	10.4	10.2	10	10.9	10.5	10.2	10.9	22.4	2.0	6.4	28.0	44.0	48.1	52.4

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวนภษร บุญเพ็ชรแก้ว
วัน เดือน ปี เกิด	25 มิถุนายน 2516
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	35/6 หมู่ที่ 8 ตำบลราชาเทวะ อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ
ประวัติการทำงาน	2539-2543 ทำงานบริษัทไทยดิวพี จำกัด อำเภอบ้างโป่ง จังหวัดราชบุรี ตำแหน่ง ผู้ช่วยหัวหน้าหน่วย แผนกผลิต ฝ่ายโรงงาน
ประวัติการศึกษา	ปีการศึกษา 2539 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ปีการศึกษา 2545 สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง