รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มประสิทธิภาพการทนความร้อนของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ด้วยประจุแคลเซียม

Increase of Thermo-tolerant Properties of *Acetobacter aceti* WK by calcium ion

นายวราวุฒิ ครูส่ง
นางอพัชชา จินดาประเสริฐ
นางสาวสร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา
นางโสรยา เกิดพิบูลย์
นางสาวจีรนันท์ ศรีสุธรรม
นายสุเมธ ตันตระเธียร

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2557
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การเพิ่มประสิทธิภาพการทนความร้อนของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ด้วยประจุแคลเซียม

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2557 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 526,800 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2556 ถึง กันยายน 2557

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผู้ร่วมโครงการวิจัย ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ
ดร.สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา
ดร.โสรยา เกิดพิบูลย์
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
นางสาวจีรนันท์ ศรีสุธรรม
นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การอาหารอาหาร
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ที่ปรึกษาโครงการ รศ.ดร.สุเมธ ตันตระเธียร
ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

อุณหภูมิมีผลต่อประสิทธิภาพการหมักเพื่อผลิตกรดอะซิติกของแบคทีเรียอะซิติก โดยปกตินิยมหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นประสิทธิภาพการหมักก็จะลดลง ในการศึกษานี้มุ่งเน้นการพัฒนาหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ให้มีความสามารถในการทนความร้อนและสามารถผลิตกรดได้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสได้ โดยอาศัยการเติมประจุแคลเซียมในรูปของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ผลการศึกษาพบว่า ที่ความเข้มข้นของ $CaCl_2$ เท่ากับ 0.15% ช่วยให้หัวเชื้อ *A. aceti* WK สามารถผลิตกรดอะซิติกที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส (26.0$\pm$0.82 กรัม/ลิตร) ได้ใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (29.7$\pm$1.25 กรัม/ลิตร) โดยมีอัตราการสร้างกรด (Acetification rate; ETA) เท่ากับ 8.67$\pm$0.49 และ 9.89$\pm$0.72 กรัม/ลิตร/วัน ($p\leq0.05$) ตามลำดับ เมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของไขมันโดยเฉพาะ Phospholipid และกรดไขมันที่ผนังเซลล์ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK สามารถยืนยันได้ว่า 0.15% $CaCl_2$ มีผลต่อการทนของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้นของหัวเชื้อ *A. aceti* WK โดยทำให้ Phosphatidylcholine, Phosphatidylglycerol และ Phosphatidylethanolamine ที่ผนังเซลล์ของหัวเชื้อ ณ อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อีกทั้ง $CaCl_2$ ทุกระดับความเข้มข้นมีผลทำให้กรดไขมันทั้ง cis-vaccenic acid, Palmitic acid และ Myristic acid ที่ผนังเซลล์ของหัวเชื้อณ อุณหภูมิ 35-37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส สูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เช่นกัน อนึ่งกรดไขมัน cis-vaccenic acid มีมากที่สุดในกลุ่มของกรดไขมันทั้งสาม นอกจากนี้เมื่อติดตามกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase (ADH) และ Aldehyde dehydrogenase (ALDH) ที่มีผลต่อปฏิกิริยาการเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติกของแบคทีเรียอะซิติก พบว่า 0.15% $CaCl_2$ ช่วยทำให้กิจกรรมของ ADH (11.96 Unit/mg) และ ALDH (16.35 Unit/mg) ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเท่ากับ 12.56 และ 17.03 Unit/mg ตามลำดับ การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของ**ขนาดของผนังเซลล์**จากภาพถ่ายแบบ Transmission Electron Microscope ของเซลล์ขนาด 500 nm ด้วยโปรแกรม Image J version 1.46r พบว่า $CaCl_2$ มีผลทำให้ผนังเซลล์ที่แน่นขึ้นซึ่งมีผลต่อการทนสภาพการหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ได้ทัดเทียมกับที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพที่ไม่เติม $CaCl_2$ สำหรับการติดตามความเสถียรของการผลิตกรดอะซิติกของหัวเชื้อ *A. aceti* WK ในสภาพที่เติม 0.15% $CaCl_2$ ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส จำนวน 9 รอบของการหมัก พบว่า หัวเชื้อมีความเสถียรอยู่ในเกณฑ์ที่ดีสามารถผลิตกรด (Acid produced) และ ETA ได้เท่ากับ 23-31กรัม/ลิตร และ 6.25-9.67 กรัม/ลิตร/วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า $CaCl_2$ มีผลโดยตรงต่อการทนความร้อนของหัวเชื้อ *A. aceti* WK

คำสำคัญ : สมบัติการทนความร้อน หัวเชื้อน้ำส้มสายชู ประจุแคลเซียม *Acetobacter aceti* WK ถังหมักต้นแบบระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Increase of Thermo-tolerant Properties of *Acetobacter aceti* WK by calcium ion
Researcher: Assoc.Prof.Dr.Warawut Krusong, Dr. Aphacha Jindaprasert, Dr.Soisuda Pornpukdeewatana, Dr.Soraya Kerdpiboon, Ms.Jiranan Srisuthum and Assoc.Prof.Dr.Sumate Tantratian
Faculty: Agro-Industry **Division:** Fermentation Technology

ABSTRACT

Temperature increment normally impacts to acetification rate (ETA) by acetic acid bacteria (AAB). Temperature which is higher than 30°C causes in ETA reduction. Therefore, the development of thermo-tolerant *Acetobacter aceti* WK at 35-37°C by addition of calcium chloride ($CaCl_2$) is an aim of this study. Results shows that 0.15% $CaCl_2$ provided acceptable acid produced (26.0±0.82 g/L) at 35-37°C which is closely to that obtained at 30°C (29.7±1.25 g/L) whilst the acetification rates (ETA) were 8.67±0.49 and 9.89±0.72 g/L/d at 35-37°C and 30°C ($p \leq 0.05$), respectively. Then, the changes of phospholipids and fatty acids of cell wall of *A. aceti* WK were determined for understanding the impact of $CaCl_2$ on its ETA activity. Results shows the confirmation of 0.15% $CaCl_2$ caused to increase cell wall phospholipids consisting of phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamine at 35-37°C which are higher than that at 30°C. Whilst $CaCl_2$ at every concentration caused to increase the level of cis-vaccenic acid, palmitic acid and myristic acid at 35-37°C which are also higher than that at 30°C. Additionally, level of cis-vaccenic acid was highest among three fatty acids studied. Moreover, two membrane-bound enzymes consisting of alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) which are necessary for oxidation of ethanol to acid by AAB were investigated. The 0.15% $CaCl_2$ caused to improve the activity of ADH (11.96 Unit/mg) and ALDH (16.35 Unit/mg) at 35-37°C which is closely obtained at 30°C, 12.56 Unit/mg of ADH and 17.03 Unit/mg of ALDH. Cell structure images were achieved from JEOL JSM-1400 (JEOL, Tokyo, Japan) scanning electron microscope with image size of 500 nm. Images of cell structure showed the dense cell wall with various concentration of $CaCl_2$ causing in acetification performance at 35-37°C Process consistency of nine acetification cycles by *A. aceti* WK at 35-37°C under 0.15% $CaCl_2$ addition were conducted. Results shows that the thermo-tolerant *A. aceti* WK could acceptably produce acid and ETA at 23-31 g/L and 6.25-9.67 g/L/d. It means that $CaCl_2$ cause directly to improve the thermo-tolerance property of *A. aceti* WK which positively impacts on acetification at higher temperature condition as usual.

Keywords: Thermo-tolerant property, *Acetobacter aceti* WK, calcium ion, mash-air mixing bioreactor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ บริษัท แอกโกรนิก้า จำกัด ที่ได้ร่วมพัฒนาจนเกิดเทคโนโลยีในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักที่มีความสามารถทัดเทียมกับเทคโนโลยีข้ามชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงขอขอบคุณ รศ.ดร.สุเมธ ตันตระเธียร จากภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัย "การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557"

รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง
ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ
ดร.สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา
ดร.โสรยา เกิดพิบูลย์
รศ.ดร.สุเมธ ตันตระเธียร
นางสาวจีรนันท์ ศรีสุธรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... จ
สารบัญภาพ ..... ฉ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย 3
1.5 คำสำคัญของการวิจัย 3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม 5
2.1 แนวคิด ทฤษฎีหลักตามประเด็นให้ครอบคลุมเรื่องที่วิจัย 5
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม 6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 9
3.1 การเตรียมหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK และไวน์น้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อน 9
3.2 การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส 10
3.3 การผลิตน้ำส้มสายชูด้วยหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีประจุแคลเซียมที่เหมาะสม 10
3.4 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส 10
3.5 การวางแผนการทดลอง 12
บทที่ 4 ผลการวิจัย 13
4.1 ผลการหมักไวน์น้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อน 13
4.2 การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส 14
4.3 ความเข้มข้นของประจุแคลเซียมที่เหมาะสมต่อการทนความร้อนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK 17
4.4 การผลิตน้ำส้มสายชูด้วยหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีประจุแคลเซียมที่เหมาะสม 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส 20

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 25

5.1 สรุปผลการวิจัย 25

5.2 ข้อเสนอแนะ 26

บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย 27

6.1 สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้และที่อยู่ระหว่างดำเนินการทั้งหมด 27

บรรณานุกรม 28

ภาคผนวก 31

ภาคผนวก ก สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย ให้แนบแบบรายงานการใช้จ่ายเงิน 32

ประวัตินักวิจัย 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 แสดงผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกของหัวเชื้อน้ำส้ม สายชู *A. aceti* WK ในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศต้นแบบขนาด 100 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 18

4.2 แสดงชนิดและปริมาณของ Phospholipid ที่เปลี่ยนแปลงของหัวเชื้อ *A. aceti* WK เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 21

4.3 แสดงชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เปลี่ยนแปลงของหัวเชื้อ *A. aceti* WK เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 22

4.4 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase (ADH) และ Aldehyde dehydrogenase (ALDH) ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 22

4.5 แสดงผลการวิเคราะห์ขนาดของผนังเซลล์ด้วย Image J version 1.46r จาก TEM Images ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

4.1 แสดงสภาพการหมักไวน์น้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อนเพื่อใช้ในการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู โดยใช้ถังพลาสติกสีน้ำเงิน (Food grade) ขนาด 120 ลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง (30-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลาประมาณ 12 วัน : (ก) ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30; (ข) ลักษณะผิวหน้าของน้ำหมักระหว่างการหมักไวน์ 13

2.2 แสดงผลของการหมักไวน์น้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อนด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (30-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลาประมาณ 12 วัน : ♦, sugar; ■, alcohol; ▲, yeast cells; x, pH 14

4.3 แสดงลักษณะการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้ทนร้อนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ใน Waterbath 14

4.4 แสดงผลของการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ในขวดขนาด 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส : ♦, acidity @ 30°C; ■, alcohol @ 30°C; ▲, acidity @ 35°C; x, acidity @ 35°C 15

4.5 ถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศพร้อมระบบควบคุมอุณหภูมิ เพื่อใช้ในการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้ทนร้อนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส 16

4.6 แสดงผลของการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศต้นแบบขนาด 100 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส : ♦, acidity @ 30°C; ■, alcohol @ 30°C; ▲, acidity @ 35°C; x, acidity @ 35°C 16

4.7 แสดงความเสถียร (Consistency) ของการผลิตกรดอะซิติกจากหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศต้นแบบขนาด 100 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.15% : ♦, acidity; ■, alcohol 19

4.8 แสดงปริมาณกรดที่ผลิตและ Acetification rate (ETA) ของการผลิตกรดอะซิติกจากหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศต้นแบบขนาด 100 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.15% : Left panel, Acid produced; Right panel, ETA 19

4.9 แสดงชนิดของ Phospholipid ที่พบในหัวเชื้อ *A. aceti* WK เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบดูดซับโดยใช้ซิลิกา (10x100 มิลลิเมตร) และทำการชะด้วย 50% (v/v) Methanol 20

4.10 แสดงลักษณะของเซลล์ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส : (A) 30°C, No $CaCl_2$; (B) 35°C, No $CaCl_2$; (C) 35°C, 0.1% $CaCl_2$; (D) 35°C, 0.15% $CaCl_2$; (E) 35°C, 0.2% $CaCl_2$; และ (F) 35°C, 0.25% $CaCl_2$ 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในระดับอุตสาหกรรม เป็นกระบวนการที่สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ที่ระดับความเข้มข้นอย่างต่ำเท่ากับ 8% จึงจะมีผลคุ้มค่าแก่การลงทุน แต่กระบวนการหมักดังกล่าวจะสัมฤทธิ์ผลได้ต้องอาศัยปัจจัยหลักสองประการ คือ 1) ถังหมักที่มีประสิทธิภาพการให้อากาศในลักษณะละอองเล็กๆได้อย่างทั่วถึงและมีประสิทธิภาพ และ 2) หัวเชื้อน้ำส้มสายชูที่มีความสามารถในการทนกรดในระดับความเข้มข้นสูงได้ ทั้งนี้ปัจจัยทั้งสองดังกล่าวนี้ทางห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังมีครบถ้วนจึงมีความเหมาะสมในการศึกษาในปัจจัยด้านอื่นๆ โดยเฉพาะเรื่องผลของอุณหภูมิต่อการสร้างกรดอะซิติกของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สืบเนื่องจากที่หัวหน้าคณะผู้วิจัย ได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักมาอย่างต่อเนื่องนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 เป็นต้นมาจนสามารถพัฒนาถังหมักที่ส่งเสริมระบบการหมักแบบให้อากาศได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยที่ถังหมักต้นแบบดังกล่าวได้พัฒนาขึ้นจากองค์ความรู้ทั้งหมดจนนำไปสู่การยื่นจดสิทธิบัตรในนาม “สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง” ในชื่อสิ่งประดิษฐ์เรื่อง “กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศภายในถังหมัก” เมื่อวันที่ 13 ตุลาคม พ.ศ. 2551 โดยถังหมักที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถสร้างสภาพการหมักให้มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ (Dissolved oxygen; DO) ในระดับที่สูงจนสามารถทำให้แบคทีเรียอะซิติกใช้อากาศเพื่อเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นน้ำส้มสายชูได้อย่างมีประสิทธิภาพ และ ได้ผลผลิตทัดเทียมกับเทคโนโลยีต่างชาติ ทั้งนี้สิ่งประดิษฐ์ดังกล่าวได้ผ่านการขอใช้สิทธิประโยชน์จากเอกชนแล้วถึงปัจจุบัน (กันยายน 2555) จำนวน 3 บริษัท ดังนั้นในการศึกษาที่เสนอนี้จึงได้ใช้ถังหมักต้นแบบขนาด 100 ลิตร เพื่อให้ผลการศึกษารองรับต่อกระบวนการผลิตที่ผ่านการพัฒนาขึ้นมา

อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในเชิงการค้าทั้งระบบ Frings acetator ของบริษัท Heinrich Frings GmbH&Co.KG และระบบที่พัฒนาขึ้นจาก สจล. ของหัวหน้าคณะวิจัยเป็นระบบที่สามารถผลิตกรดได้ในปริมาณสูงโดยความเข้มข้นอย่างน้อย 8% ในเวลาไม่เกิน 24-72 ชั่วโมง (ขึ้นกับความแข็งแรงของสภาพหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติก (Acetic acid bacteria) แต่ระบบการหมักต้องดำเนินการที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเท่านั้นซึ่งจัดเป็นข้อจำกัดข้อหนึ่ง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งมั่นที่จะพัฒนาระบบการหมักให้สามารถรองรับการหมักที่อุณหภูมิสูงขึ้นโดยเริ่มต้นจากระดับ 35-37 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพื่อให้สามารถก้าวถึงจุดดังกล่าวนั้นสิ่งที่สำคัญที่สุด คือ การพัฒนาหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ให้สามารถทนและดำเนินการหมักในช่วงอุณหภูมิดังกล่าวได้ก่อน

อนึ่งจากประสบการณ์ตรงของหัวหน้าคณะผู้วิจัยพบว่าสามารถปรับสภาพเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้ทนกรดและผลิตกรดได้ตั้งแต่ 6% 8% 10% และ 12% ตามลำดับ โดยอาศัยการปรับสภาพในลักษณะ continuous adaptation ในระยะเวลาติดต่อกันมากกว่า 6 ปี และหัวเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพนี้ได้นำมาใช้ในอุตสาหกรรมทั้ง 3 บริษัท (ตามที่ระบุในการขอใช้สิทธิประโยชน์เบื้องต้น) แล้ว อย่างไรก็ตามในระหว่างขั้นตอนการปรับสภาพนั้นได้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัญหาเรื่องความร้อนในน้ำหมัก เนื่องจากเครื่องควบคุมความเย็นชำรุดจนทำให้อุณหภูมิของน้ำหมักสูงถึง 40-45 องศาเซลเซียส ซึ่งตามหลักการทางทฤษฎีระบุว่าสภาพเช่นนั้นจะก่อให้เกิดผลกระทบเชิงลบต่อหัวเชื้อน้ำส้มสายชูจนทำให้หัวเชื้อน้ำส้มสายชูตายได้ แต่หัวหน้าคณะผู้วิจัยยังคงดำเนินการปรับสภาพหัวเชื้อนั้นต่อไปจนสามารถกลับสู่สภาพเดิมได้ ดังนั้นจึงก่อให้เกิดความมั่นใจว่าการดำเนินการในการศึกษาครั้งนี้จึงน่าจะมีแนวโน้มที่จะประสบความสำเร็จได้เป็นอย่างดี โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้สามารถทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสได้เป็นเบื้องต้น และสามารถผลิตกรดในสภาพดังกล่าวได้ที่ระดับความเข้มข้นของกรด 7-8% ในระยะเวลาที่เหมาะสมในเชิงการค้าได้ ทั้งนี้ถ้าสามารถทำการหมักในช่วงอุณหภูมิที่ศึกษานี้ได้ จะช่วยลดค่าใช้จ่ายด้านไฟฟ้าในการควบคุมอุณหภูมิจากเดิมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสลงได้ซึ่งจะส่งผลให้ต้นทุนต่อหน่วยลดลง อนึ่งเมื่อสามารถดำเนินการปรับสภาพในการศึกษานี้ได้จะช่วยให้เป้าหมายหลัก คือ การปรับสภาพให้หัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK นี้สามารถทนอุณหภูมิที่ 40-42 องศาเซลเซียส ได้ในอนาคต

จากการศึกษาของนักวิจัยหลายท่านเกี่ยวกับผลของประจุแคลเซียมต่อการปรับสภาพเมมเบรนเพื่อทนต่อสภาพความเครียด (stress condition) ตัวอย่างเช่น Wang et al. (2009) ศึกษาผลเชิงบวกของแคลเซียมต่อการทนความร้อนของสาหร่าย *Laminaria japonica* ขณะที่ Zeng et al. (2010) ศึกษาผลของแคลเซียมต่อการเปลี่ยนแปลงที่เมมเบรนของแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์ ส่วน Hua et al. (2008) ได้ศึกษาผลของแคลเซียมที่ช่วยปรับปรุงการเจริญของพืชในสภาพที่ทนเกลือ ซึ่งแสดงว่าประจุแคลเซียมเป็นประจุที่ส่งผลเชิงบวกต่อการปรับปรุงเมมเบรนเพื่อทนต่อสภาพเครียดเหล่านั้นได้เป็นอย่างดี ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นถึงการใช้ประจุแคลเซียมเพื่อช่วยในการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้ทนอุณหภูมิสูงได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ประกอบด้วย

1.2.1 เพื่อพัฒนาความสามารถในการทนความร้อนของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ด้วยประจุแคลเซียม

1.2.2 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านการปรับสภาพให้สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศต้นแบบ ขนาด 100 ลิตร

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

มุ่งเน้นการพัฒนาหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้มีความสามารถในการทนความร้อนและสามารถผลิตกรดได้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสได้ โดยควบคุมความเข้มข้นของกรดอะซิติคและแอลกอฮอล์ซึ่งเรียกว่า “ความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration; TC)” สำหรับหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้เท่ากับ 8.0 ซึ่งเป็นความเข้มข้นปกติและเหมาะสมกับหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK เมื่อใช้ในการเริ่มต้นผลิตกรดในระดับอุตสาหกรรม ทั้งนี้ภายหลังจากที่หัวเชื้อเจริญที่อุณหภูมิปกติ (30 องศาเซลเซียส) ได้ประมาณอย่างน้อย 3 รอบของการผลิตจึงจะเริ่มทำการเพิ่มอุณหภูมิของการปรับสภาพขึ้นไปที่ 35-37 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเริ่มการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประจุแคลเซียมในการสภาพการทนอุณหภูมิสูง โดยอาศัยการติดตามประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกและการลดลงของปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักเป็นดัชนีชี้วัด

นอกจากนี้เมื่อเป้าหมายหลัก คือ การปรับสภาพให้หัวเชื้อ *A. aceti* WK สามารถทนสภาพอุณหภูมิสูงที่ 35-37 องศาเซลเซียส เนื่องจากผลเชิงบวกของประจุแคลเซียมได้แล้ว จะทำการศึกษาต่อไปเพื่อพิสูจน์ถึงสาเหตุของผลเชิงบวกดังกล่าวโดยจะมุ่งที่การศึกษาการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK ที่ช่วยในเกิดการปรับสภาพ โดยจะติดตามการเปลี่ยนแปลงของไขมัน เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรเจนเนส (alcohol dehydrogenase) และเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรเจนเนส (aldehyde dehydrogenase) และการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของขนาดของผนังเซลล์ของภาพถ่ายแบบ Transmission Electron Microscope (ด้วยเครื่อง JEOL JSM-1400 (JEOL, Tokyo, Japan) scanning electron microscope) ตามวิธีการของ Chen and Qin (2008) ซึ่งใช้ Image J version 1.46r ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความเข้าใจพื้นฐานเพื่อการศึกษาในระดับการปรับสภาพให้หัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK สามารถทนอุณหภูมิที่ 40-42 องศาเซลเซียส ได้ในอนาคต

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ทำการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งเป็นหัวข้อต่าง ๆ ดังนี้

1.4.1 การเตรียมหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK และไวน์น้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อน

1.4.2 การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK เบื้องต้น

1.4.3 การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

โดยทำการศึกษาการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK เบื้องต้นที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของประจุแคลเซียมที่เหมาะสมต่อการทนความร้อนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK

1.4.4 การผลิตน้ำส้มสายชูด้วยหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีประจุแคลเซียมที่เหมาะสม

1.4.5 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

โดยอาศัยการติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไขมัน (Jernejc et al., 1989) การติดตามเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรเจนเนส (ADH) และ อัลดีไฮด์ดีไฮโดรเจนเนส (ALDH) (Qi *et al.*, 2013). การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK จากภาพถ่ายแบบ Transmission Electron Microscope (ด้วยเครื่อง JEOL JSM-1400 (JEOL, Tokyo, Japan) scanning electron microscope) ด้วยวิธีการของ Chen and Qin (2008) ซึ่งใช้ Image J version 1.46r และการแปลงข้อมูลจากภาพเป็นตัวเลขเพื่อใช้ในการแสดงความสัมพันธ์กับลักษณะอื่น

1.5 คำสำคัญของการวิจัย

สมบัติการทนความร้อน หัวเชื้อน้ำส้มสายชู ประจุแคลเซียม *Acetobacter aceti* WK ถังหมักต้นแบบระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thermo-tolerant property, *Acetobacter aceti* WK, calcium ion, mash-air mixing bioreactor

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 บทความวิจัยอย่างน้อย 1 เรื่อง สำหรับนำเสนอในการประชุมระดับชาติหรือระดับนานาชาติ ทั้งนี้กำลังอยู่ในระหว่างดำเนินการ

1.6.2 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ประกอบด้วย บริษัทที่ได้ขอใช้สิทธิประโยชน์จากสิ่งประดิษฐ์เรื่อง "กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศภายในถังหมัก" จาก "สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง" จำนวน 3 บริษัท (นับถึงกันยายน พ.ศ. 2555) รวมถึงบริษัท แอกโกรนิก้า จำกัด ซึ่งเป็นบริษัทที่ได้ร่วมวิจัยกับหัวหน้าคณะวิจัยในด้านน้ำส้มสายชูมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544-ปัจจุบัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

2.1 แนวคิด ทฤษฎีหลักตามประเด็นให้ครอบคลุมเรื่องที่วิจัย

การผลิตน้ำส้มสายชูหมักในระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบัน ไม่ว่าจะเป็นระบบ Frings acetator ของบริษัท Heinrich Frings GmbH & Co.KG และระบบที่พัฒนาขึ้นจาก สจล. ของหัวหน้าคณะวิจัยยังคงเป็นระบบที่ต้องควบคุมอุณหภูมิการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส การควบคุมอุณหภูมิในช่วงดังกล่าวต้องใช้ระบบหล่อเย็นซึ่งขนาดต่ำสุดจะต้องเป็น Cooing tower จนถึง Chiller ซึ่งใช้ในระดับใหญ่ (ถังหมักขนาดอุตสาหกรรม) จึงจะสามารถช่วยรักษาระดับอุณหภูมิในช่วงดังกล่าวได้ เนื่องจากในระหว่างการหมักนั้นอุณหภูมิของน้ำหมักจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น การดำเนินการในลักษณะนี้ทำให้ต้นทุนเรื่องค่าใช้ไฟฟ้าในระบบหล่อเย็นเป็นหนึ่งในต้นทุนหลักของการผลิต นอกจากนี้ผลกระทบจากความล้มเหลวของการควบคุมอุณหภูมิ ยังอาจจะก่อให้เกิดปัญหาต่อประสิทธิภาพการผลิตเชิงลบของปริมาณกรดที่จะผลิตได้และอัตราในการสร้างกรด (Acetification rate; ETA) ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชูหมัก

การพัฒนาหัวเชื้อน้ำส้มสายชูหมักให้มีความสามารถในการทนอุณหภูมิในระหว่างการหมักให้สูงขึ้น จะสามารถช่วยลดผลกระทบดังกล่าวลงไปได้ อย่างไรก็ตามต้องตระหนักว่าหัวเชื้อน้ำส้มสายชูที่จะนำมาพัฒนาในมิติที่กล่าวถึงนี้จำเป็นต้องเป็นหัวเชื้อน้ำส้มสายชูที่มีคุณสมบัติในการทนกรดในระดับความเข้มข้นสูงหรือเรียกว่า “High acid torelant strain” ด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ยังคงสามารถที่จะผลิตกรดในระดับความเข้มข้นสูงเพื่อประโยชน์ในเชิงการค้าได้ โดยระดับความเข้มข้นกรดอย่างต่ำจะต้องเท่ากับ 8% ในกรณีที่กล่าวถึงนี้หัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นหนึ่งในหัวเชื้อน้ำส้มสายชูที่มีคุณสมบัติในการทนกรดในระดับความเข้มข้นสูงดังกล่าวได้ เนื่องจากหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ได้ผ่านการปรับสภาพในการทนกรดและผลิตกรดระดับความเข้มข้นสูงมาอย่างต่อเนื่องมากกว่า 5 ปี อีกทั้งยังเป็นหัวเชื้อน้ำส้มสายชูที่หัวหน้าคณะวิจัยได้ใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมสำหรับเอกชนที่ได้มาขอใช้สิทธิประโยชน์จากสิ่งประดิษฐ์ เรื่อง “กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศภายในถังหมัก” จาก “สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง” จำนวน 3 บริษัท (นับถึงกันยายน พ.ศ. 2555)

ในการพัฒนาให้หัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงนั้นจะเริ่มต้นที่ระดับเบื้องต้น คือ อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นเป้าหมายของงานวิจัยนี้ ทั้งนี้เนื่องจากสภาพเครียด (Stress condition) ที่หัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK จะได้รับ คือ สภาพเครียดที่เกิดจากระดับความเข้มข้นของกรดที่สูง (8% ตามเป้าหมายของโครงการวิจัย) และสภาพอุณหภูมิที่สูงขึ้น ดังนั้นระดับอุณหภูมิที่เลือกศึกษาจึงอยู่ในระดับที่ยังไม่รุนแรงกับหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK มากจนเกินไป อีกทั้งเพื่อเป็นการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK เบื้องต้นสำหรับรองรับการพัฒนาให้ทนอุณหภูมิที่สูงถึง 40-42 องศาเซลเซียส ในอนาคตต่อไป

ในการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้ทนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นี้จะอาศัยการเพิ่มความแข็งแรงของเมมเบรน (Membrane) ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ด้วยประจุแคลเซียม ทั้งนี้บนพื้นฐานของการศึกษาของนักวิจัยหลายท่านที่ศึกษาเกี่ยวกับผลของประจุแคลเซียมต่อการปรับสภาพเมมเบรนเพื่อทนต่อสภาพความเครียด (Stress condition) ดังตัวอย่าง เช่น การศึกษาผลเชิงบวกของแคลเซียมต่อการทนความร้อนของสาหร่าย *Laminaria japonica* โดย Wang et al. (2009) ขณะที่ Zeng et al. (2010) รายงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถึงผลของแคลเซียมต่อการเปลี่ยนแปลงที่เมมเบรนของแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์ รวมถึง Hua et al. (2008) ได้ศึกษาผลของแคลเซียมที่ช่วยปรับปรุงการเจริญของพืชในสภาพที่ทนเกลือ ซึ่งแสดงว่าประจุแคลเซียมเป็นประจุที่ส่งผลเชิงบวกต่อการปรับปรุงเมมเบรน เพื่อก่อให้เกิดความทนต่อสภาพเครียดเหล่านั้นได้เป็นอย่างดี

นอกจากนี้แล้วในการวิจัยนี้จะมุ่งเน้นการนำไปใช้กับ "กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศภายในถังหมัก" ที่ได้พัฒนาขึ้น (ดังที่กล่าวถึงข้างต้น) ดังนั้นในการศึกษาจึงจะใช้ถังหมักต้นแบบของระบบดังกล่าวขนาด 100 ลิตร เพื่อให้ได้สภาพการหมักที่มีลักษณะเดียวกับที่ใช้ในภาคเอกชนเพื่อประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นกับเอกชนที่ขอใช้สิทธิประโยชน์ของงานที่พัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องต่อไปในอนาคตอีกด้วย

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

แบคทีเรียอะซิติก (Acetic acid bacteria; AAB) เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศและอยู่ในกลุ่มของ Alphaproteobacteria โดยในกลุ่มนี้จะมีมากกว่า 10 สายพันธุ์ที่เป็นแบคทีเรียอะซิติก เช่น *Acetobacter, Gluconobacter* และ *Gluconacetobacter* (Yamada and Yukphan, 2008) แบคทีเรียอะซิติกหลายสายพันธุ์พบว่ามีระบบ Respiratory chain ที่สามารถออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ น้ำตาล รวมถึงน้ำตาลแอลกอฮอล์ได้หลายชนิด โดยสามารถที่จะรวบรวมผลผลิตที่สร้างขึ้นไว้ในน้ำหมักได้ (Matsushita et al., 2004) ทั้งนี้การหมักเพื่อผลิตกรดอะซิติกจากเอทานอล จะเรียกว่า การหมักน้ำส้มสายชู (Vinegar fermentation) การหมักน้ำส้มสายชูนี้จะอาศัยเอนไซม์ที่จับอยู่กับเมมเบรนที่เรียกว่า Membrane-bound enzymes โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องมี 2 ชนิด ประกอบด้วย แอลกอฮอล์ดีไฮโดรเจนเนส (Alcohol dehydrogenase; ADH) และอัลดีไฮด์ดีไฮโดรเจนเนส (Aldehyde dehydrogenase; ALDH) (Frebortova et al., 1997; Matsushita et al., 2004; Yakushi and Matsushita, 2010) จากการศึกษาของ Sintuprapa et al. (2008) ได้รายงานว่ามีการตรวจพบเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ในแบคทีเรียอะซิติกที่ผ่านการปรับสภาพ (Adapted strain) โดยพบในปริมาณที่สูงกว่าที่ตรวจพบในเซลล์สายพันธุ์ปกติ (Wild type strain) สำหรับแบคทีเรียอะซิติกที่เป็นสายพันธุ์ที่ทนความร้อน (Thermotolerant strain) นั้นก็ยังตรวจพบเอนไซม์ทั้งสองชนิดเช่นกัน ทั้งนี้ Kanchanarach et al. (2010) ได้รายงานถึงสายพันธุ์ที่ทนความร้อนที่คัดเลือกได้สามารถหมักได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเมื่อนำไปตรวจสอบหา ADH พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสม (Optimum temperature) และอุณหภูมิที่คงตัว (Heat stability) ที่สูงกว่า ADH ของสายพันธุ์ในกลุ่มชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic strain) นอกจากนี้แล้ว Ndoye et al. (2006) ได้รายงานว่าสายพันธุ์แบคทีเรียอะซิติกที่ทนความร้อนซึ่งคัดเลือกได้ในแถบภูมิภาคแอฟริกาสามารถผลิตกรดได้ดีที่อุณหภูมิ 35 และ 38 องศาเซลเซียส ในขณะที่สายพันธุ์ปกติไม่สามารถผลิตกรดได้ในช่วงอุณหภูมิดังกล่าว อีกทั้งยังรายงานเพิ่มเติมว่าเอนไซม์ ADH และ ALDH ของสายพันธุ์แบคทีเรียอะซิติกที่ทนความร้อนนั้นจะสูญเสียกิจกรรมลงไปน้อยกว่าสายพันธุ์ปกติในระหว่างช่วงอุณหภูมิ 25 ถึง 40 องศาเซลเซียส จากข้อมูลของเอนไซม์ทั้งสองดังกล่าวจึงจะทำการติดตามเอนไซม์ ADH และ ALDH ภายหลังจากที่ได้ปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสแล้ว

การปรับตัวเข้ากับสภาพเครียดของแบคทีเรียอะซิติกนั้นนอกจากจะขึ้นกับเอนไซม์ ADH และ ALDH ดังที่กล่าวถึงแล้ว Trcek et al. (2007) ยังระบุว่าการเปลี่ยนแปลงของไขมันของเซลล์โดยเฉพาะการเพิ่มความเข้มข้นของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) ช่วยในการปรับตัวของเซลล์แบคทีเรียอะซิติกต่อสภาพเครียด เช่น ความเข้มข้นของกรดที่สูงเป็นต้น นอกจากนี้ Trcek et al. (2007) ยังรายงานเพิ่มเติมถึงการเปลี่ยนแปลงที่ขนาดของเซลล์ของแบคทีเรียอะซิติกจากรูปร่างท่อนสั้น (Short rod) เป็นท่อนยาว (Long rod) เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้จึงจะติดตามการเปลี่ยนแปลงไขมันและขนาดเซลล์ *A. aceti* WK ภายหลังจากที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิที่ 35-37 องศาเซลเซียสแล้ว

อนึ่งสำหรับการติดตามเรื่องขนาดของเซลล์นั้นจะอาศัยเทคนิคการถ่ายภาพและการวิเคราะห์ภาพที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมาประยุกต์ใช้ เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวได้มีการใช้กันอย่างต่อเนื่อง ดังเช่น Kerdpiboon et al. (2007) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการเปลี่ยนแปลงเชิงกายภาพของแครอท ที่ผ่านการอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้ง 3 ชนิด ได้แก่ เครื่องอบแห้งแบบอากาศร้อน เครื่องอบแห้งแบบระเหิด และเครื่องอบแห้งแบบใช้ไอน้ำร้อนยวดยิ่งที่อุณหภูมิต่ำ โดยนำตัวอย่างที่อบแห้งและผ่านการถ่ายภาพโดยใช้กล้อง Light microscope ทำการวิเคราะห์ภาพโดยใช้โปรแกรม Matlab และแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและสมบัติเชิงกายภาพโดยใช้ค่ามิติแฟรคทัล (Fractal dimension, เป็นค่าที่ไม่มีหน่วย) พบว่า ค่ามิติแฟรคทัลเป็นดัชนีที่สามารถใช้ในการอธิบายการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในตัวอย่างและมีความสัมพันธ์กับค่าร้อยละของการหดตัวและความสามารถในการดูดกลืนน้ำกลับของตัวอย่างที่ระดับความเชื่อมั่นสูง ($R^2 > 0.95$) ในขณะที่ Niamnuy et al. (2008; 2012) ได้รายงานผลการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกุ้งที่ผ่านกระบวนการต้มและการอบแห้ง โดยนำตัวอย่างที่อบแห้งมาถ่ายภาพโดยใช้กล้อง Scanning Electron Microscope ทำการวิเคราะห์ภาพโดยใช้โปรแกรม Matlab และแสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างในรูปของ Numerical data ผลการวิเคราะห์พบว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ภาพและการเปลี่ยนแปลงการหดตัวของกุ้งนั้นมีความสัมพันธ์กันที่ระดับความเชื่อมั่นสูง ($R^2 > 0.89$)

ในการศึกษาเกี่ยวกับการปรับสภาพของเมมเบรนเพื่อต้านทานต่อสภาพเครียดที่เกิดขึ้นแก่เซลล์ได้พบว่า สารประจุบวกโดยเฉพาะประจุแคลเซียม (Ca^{2+}) ให้ผลเชิงบวกที่ทำให้เซลล์ทนต่อสภาพเครียดได้ ทั้งนี้จากการศึกษาของนักวิจัยหลายท่านดังตัวอย่างของ Wang et al. (2009) ซึ่งศึกษาผลของแคลเซียมต่อการทนความร้อนของสาหร่าย *Laminaria japonica* โดยรายงานว่าปกติแล้วประจุแคลเซียมจะจับเข้ากับผนังเซลล์ของสาหร่ายในสภาพปกติ แต่จะซึมเข้าไปในไซโตพลาสซึมเมื่ออยู่ในสภาพที่ร้อนขึ้น ในสภาพที่ร้อนหรืออุณหภูมิสูงขึ้นนั้นจะก่อให้เกิดการทำลายเซลล์ของสาหร่ายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น แต่ประจุแคลเซียมจะช่วยลดผลกระทบดังกล่าวลงและยังสรุปเพิ่มเติมว่า ประจุแคลเซียมนั้นสามารถปรับปรุงสมบัติในการต้านทานความร้อนของสาหร่าย *L. japonica* ให้เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้แล้วประจุแคลเซียมยังมีผลต่อแบคทีเรีย *Z. mobilis* ในการผลิตแอลกอฮอล์ โดยที่ Zeng et al. (2010) ได้รายงานผลของแคลเซียมในรูปของแคลเซียมคลอไรด์ต่อความคงสภาพ (Stability) ของเมมเบรนของแบคทีเรีย *Z. mobilis* ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์ในสภาพเครียดของแรงดันออสโมซิสจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูง (High sugar osmotic stress) ได้ ขณะที่ Hua et al. (2008) ได้ศึกษาผลของแคลเซียมที่ช่วยปรับปรุงการเจริญของพืชในสภาพที่ทนเกลือ (Salt stress) โดยที่ประจุแคลเซียมจะช่วยปรับปรุงการเจริญของพืชในดินเค็มอีกทั้งยังมีผลต่อโครงสร้างของเมมเบรนของพืชนั้นด้วย จากที่กล่าวถึงนี้แสดงว่าประจุแคลเซียมเป็นประจุที่ส่งผลเชิงบวกต่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับปรุงเมมเบรนเพื่อทนต่อสภาพเครียดต่าง ๆ ที่มีต่อเซลล์ได้เป็นอย่างดี ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นถึงการใช้ประจุแคลเซียมเพื่อช่วยในการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้ทนอุณหภูมิสูงที่ 35-37 องศาเซลเซียสต่อไป

ถังหมัก (Fermenter หรือ Bioreactor) เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ ถังหมักจะได้รับการออกแบบตามชนิดของการหมัก สำหรับการหมักเพื่อผลิตน้ำส้มสายชูเป็นกระบวนการที่ต้องการออกซิเจนหรืออากาศ จึงจำเป็นต้องคำนึงถึง "การกระจายของอากาศเข้าสู่น้ำหมักอย่างมีประสิทธิภาพ" ดังนั้นในการออกแบบระบบจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved oxygen) เป็นสำคัญ ทั้งนี้ วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ (2553) ได้รายงานถึงการพัฒนาองค์ความรู้ที่ได้รับจากการดูงานที่ Heinrich Frings GmbH&Co KG รวมถึงความรู้ที่ได้จากการปฏิบัติงานในโครงการวิจัยต่าง ๆ ที่ร่วมกับภาคเอกชนในการพัฒนาถังหมักที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจึงทำให้สามารถทราบถึงปัจจัยที่สำคัญในการออกแบบถังหมักโดยเฉพาะอย่างยิ่งเรื่องของระบบการให้อากาศซึ่งต่อมาได้ร่วมกับคุณประภาส ปิ่นวิเศษ และคุณพนิต เพ็ชรน่วม จากบริษัท แอกโกรนิก้า จำกัด ประดิษฐ์กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูขึ้นมาใหม่และได้โอนสิทธิแห่งการประดิษฐ์ให้สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังเพื่อยื่นจดทรัพย์สินทางปัญญาในชื่อสิ่งประดิษฐ์เรื่อง "กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ" ตามเลขที่คำขอ 0801005225 วันยื่นคำขอ 13 ตุลาคม พ.ศ. 2551 (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ, 2550; วราวุฒิ ครูส่ง, 2551ก; 2551ข; 2552; กรุงเทพธุรกิจ, 2553) ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้ถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศต้นแบบขนาด 100 ลิตร เพื่อให้สภาพการหมักมีลักษณะเช่นเดียวกับระบบดังกล่าวข้างต้นซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์โดยตรงเมื่อนำผลการศึกษาไปประยุกต์ใช้หรือเผยแพร่ในอนาคตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก (D312) อาคารเจ้าคุณทหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยมีขั้นตอนการดำเนินการดังนี้

3.1 การเตรียมหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK และไวน์น้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อน

3.1.1 หัวเชื้อ

หัวเชื้อที่ใช้ในการศึกษา ประกอบด้วย หัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 ซึ่งในการหมักไวน์และหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK เพื่อใช้ในการหมักน้ำส้มสายชู

หัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ได้รับมาจากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของยีสต์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หัวเชื้อยีสต์จะเก็บรักษาในอาหาร YM agar slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมาเลี้ยงในอาหาร YM medium ซึ่งประกอบด้วย (ต่อลิตร) ยีสต์สกัด 10 กรัม มอลท์สกัด 10 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปใช้เป็นหัวเชื้อ (Starter) ในการหมักแอกอฮอล์ต่อไป

หัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ได้รับจากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งอยู่ภายใต้การดูแลของหัวหน้าคณะวิจัย ในการเตรียมหัวเชื้อน้ำส้มสายชูเพื่อใช้ในการหมักอาศัยการเลี้ยงในสภาพให้อากาศที่ 4.5 ลิตร/นาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium ที่ประกอบด้วย กลูโคส 50 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม $Mg_2SO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม และ $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 กรัม (Krusong *et al.*, 2007, 2010)

3.1.2 การเตรียมไวน์น้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อน

ทำการเตรียมไวน์น้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อน โดยใช้น้ำลวกที่ได้รับจากบริษัท แอกโกรนิก้า จำกัด (ซึ่งได้ทำการวิจัยร่วมกับหัวหน้าคณะวิจัยในด้านน้ำส้มสายชูหมักตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544-ปัจจุบัน) ในสภาพแช่แข็ง

ทำการหมักน้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อนที่ผ่านการปรับสภาพให้มีความหวานประมาณ 18% และเติมสารอาหารที่ประกอบด้วย (ต่อลิตร) $Mg_2SO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 กรัม ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.5 และถ่ายหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในปริมาณ 5% (Krusong and Vichitraka, 2010) ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในถังหมักแบบมีใบพัดกวนขนาด 50 ลิตร โดยทำการเปิดใบพัดเป็นเวลา 5 นาทีในช่วงเริ่มต้นหลังจากการถ่ายหัวเชื้อยีสต์เท่านั้น

น้ำไวน์ที่ได้จะนำไปผ่านการกรองก่อนนำไปใช้เตรียมส่วนผสมเพื่อใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูด้วยหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

3.2.1 การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK เบื้องต้นที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

3.2.1.1 การปรับสภาพหัวเชื้อในระดับขวดแก้ว

ทำการเตรียมน้ำหมักโดยปรับสภาพน้ำหมัก (ที่ใช้ในการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK) โดยนำไวน์น้ำลวกข้าวโพดจากข้อ 3.1.2 มาปรับสภาพให้มีความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration; TC) เท่ากับ 80 กรัม/ลิตร ซึ่งประกอบด้วย กรดอะซิติกความเข้มข้น 45 กรัม/ลิตร และแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 35 กรัม/ลิตร ถ่ายลงในขวดขนาด 1 ลิตร ปริมาตร 800 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอ่างน้ำ (Water bath) ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 35-37 องศาเซลเซียส ทำการปรับสภาพอย่างน้อย 3 รอบของการหมัก

3.2.1.2 การปรับสภาพหัวเชื้อในระดับถังหมัก

ทำการปรับสภาพน้ำหมักที่ใช้ในการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK จากไวน์น้ำลวกข้าวโพดจากข้อ 3.1.2 ให้มีความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration; TC) เท่ากับ 80 กรัม/ลิตร จากนั้นถ่ายลงไปในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศต้นแบบขนาด 100 ลิตร โดยปรับให้มีปริมาตรเริ่มต้น 30 ลิตร ทำการถ่ายหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK (ซึ่งเตรียมไว้ตามข้อ 3.1.1) ควบคุมอุณหภูมิที่ 35-37 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ดำเนินการการปรับสภาพอย่างน้อย 3 รอบของการหมัก โดยทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดด้วยการไตเตรชั่นและปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่องอีบูลิโอมิเตอร์

3.3.2 ความเข้มข้นของประจุแคลเซียมที่เหมาะสมต่อการทนความร้อนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK

สารเคมีที่ใช้เป็นแหล่งของประจุแคลเซียม คือ แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride; $CaCl_2$)

ทำการศึกษาปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมที่ความเข้มข้นร้อยละ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) 0.1 0.15 0.20 และ 0.25

ในทุกความเข้มข้นให้ดำเนินการหมักเช่นเดียวกับข้อ 3.2 โดยทำการทดลองความเข้มข้นอย่างน้อย 3 รอบการหมัก

3.3 การผลิตน้ำส้มสายชูด้วยหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีประจุแคลเซียมที่เหมาะสม

ทำการผลิตเช่นเดียวกับข้อ 3.2 และเลือกใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแคลเซียมคลอไรด์จากข้อ 3.3.2 ทำการหมัก 9 รอบของการหมัก

3.4 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.1 การติดตามเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรเจนเนส (ADH) และ อัลดีไฮด์ดีไฮโดรเจนเนส (ALDH)

นำเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของ ADH และ ALDH ตามวิธีการที่ระบุใน Qi *et al.* (2013). โดยนำเซลล์จากน้ำหมักมาปั่น (Centrifuge) ที่ 8000 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงล้างด้วย 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) ก่อนที่นำมาละลายในบัฟเฟอร์เดิม

นำเซลล์ที่ผ่านการล้างมาทำให้แตกด้วยเครื่อง Ultrasonic (750 W 20 kHz) เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นจึงทำการแยกเศษเซลล์ที่เหลืออยู่ (Remaining cell debris) ด้วยการปั่นที่ 10000 g เป็นเวลา 30 นาที ขณะที่ส่วนใส (Supernatant) นำมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ ADH และ ALDH โดยวิธี Colorimetric measurement โดยใช้ Potassium ferricyanide เป็น Electron acceptor (Adachi *et al.*, 1978). กำหนดให้ หนึ่งหน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ 1 μmol ของ Ethanol ภายใน 1 นาที สำหรับการตรวจวัดปริมาณโปรตีน (Protein content measurement) อาศัยวิธีดัดแปลงจาก Lowry's method โดยใช้ Bovine serum albumin เป็น โปรตีนมาตรฐาน (Standard protein) (Dulley and Grieve, 1975)

3.4.2 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไขมัน

นำเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 ปริมาณ 40 มิลลิกรัม มาสกัดด้วยสารละลายของ Chloroform : Methanol (2:1, v/v) เขย่าเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำชั้น Chloroform ที่ได้ไประเหยออก และละลายไขมันที่ได้ด้วย Hexane (ดัดแปลงจาก Folch et al., 1957)

การสกัด phospholipid จากไขมันทั้งหมดของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK โดยนำไขมันที่สกัดได้นำมาแยกกรดไขมันชนิด phospholipid ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ โดยใช้ซิลิกา (10x100 มิลลิเมตร) และทำการชะด้วย 50% (v/v) Methanol (Jernejc et al., 1989) ตรวจสอบชนิดของ phospholipid ที่ได้ด้วยวิธี TLC แบบสองมิติโดยใช้สารละลาย Chloroform : Methanol : 25% Ammonia (65:35:5, v/v) และ Chloroform : Acetone : Methanol : Acetic acid : Water (50:20:10:10:5, v/v) เป็น Mobile phase ที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ติดตาม phospholipid ที่ได้ด้วยไอของไอโอดีน (Broekhuyse, 1968)

สำหรับการตรวจหา**องค์ประกอบและปริมาณของกรดไขมันด้วยวิธี Gas chromatography** โดยเตรียม Fatty acid methyl ester โดยการนำเซลล์น้ำหนัก 40 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง 10 มิลลิลิตร สำหรับทำ Methylation โดยใช้ของ 4% H_2SO_4 ใน Methanol 25 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นผสมน้ำ 1 มิลลิลิตรและ Hexane 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันอีกครั้งด้วยเครื่อง Vortex mixer เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดน้ำออกด้วย Na_2SO_4 จะได้กรดไขมันที่ได้จะอยู่ในสภาพเป็น Fatty acid methyl esters (FAMEs) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำ Fatty acid ฉีดเข้าไปในเครื่อง Gas-Liquid chromatograph วิเคราะห์กับ Hewlett Packard HP-6890 GC Detector ระบบการทำงานของไฟฟ้าเป็นละอองพ่นออกมา HP-Innowax Column มีขนาด 30 nx250 μm ใช้แก๊สไนโตรเจนในการวิเคราะห์ ระบบการไหลของสาร 2 ml/นาที ปริมาตรที่ฉีด 5 μl ทำให้สารแตกตัวเป็นระบบไอน้ำที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที ปริมาตรพื้นที่ของ peak ของกรดไขมันต้องเทียบเคียงกับพื้นที่ของ peak ของ internal มาตรฐาน

การคำนวนปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fatty acid (%) = (พื้นที่ใต้กราฟของไขมันที่ต้องการ/ พื้นที่ใต้กราฟของไขมันทั้งหมด) X 100

3.4.3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK

นำเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ไปถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ระบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM) โดยอาศัยตัวอย่างของเซลล์ที่ผ่านการทำแห้งภายใต้สุญญากาศ (Vacuum dried) และเคลือบด้วยทองก่อนนำไปถ่ายภาพด้วยเครื่อง JEOL JSM-1400 (JEOL, Tokyo, Japan) scanning electron microscope

จากนั้นนำภาพถ่ายได้มาทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ด้วยวิธีการของ Chen and Qin (2008) ซึ่งใช้ Image J version 1.46r

3.5 การวางแผนการทดลอง

ทำการวางแผนการทดลองในแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยใช้รอบของการหมักเป็นจำนวนซ้ำ ผลการทดลองนำมาวิเคราะห์หา ANOVA และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Turkey's test ที่ระดับ $p \leq 0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

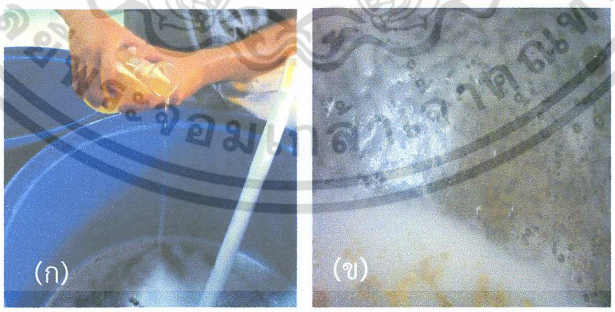
บทที่ 4
ผลการวิจัย

มุ่งเน้นการพัฒนาหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ให้มีความสามารถในการทนความร้อนและสามารถผลิตกรดได้ที่**อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส**ได้ จากนั้นเริ่มการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ**ประจุแคลเซียม**ในการสภาพการทนอุณหภูมิสูงของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK โดยอาศัยการติดตามประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกและการลดลงของปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักเป็นดัชนีชี้วัด นอกจากนี้ยังติดตาม**การเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์**ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK ที่ช่วยในเกิดการปรับสภาพโดยจะติดตาม**การเปลี่ยนแปลงของไขมัน เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรเจนเนส (Alcohol dehydrogenase; ADH) และเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรเจนเนส (Aldehyde dehydrogenase; ALDH)** และการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของ**ขนาดของผนังเซลล์**ของภาพถ่ายแบบ Transmission Electron Microscope ด้วยวิธีการของ Chen and Qin (2008) ซึ่งใช้ Image J version 1.46r

4.1 ผลการหมักไวน์น้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อน

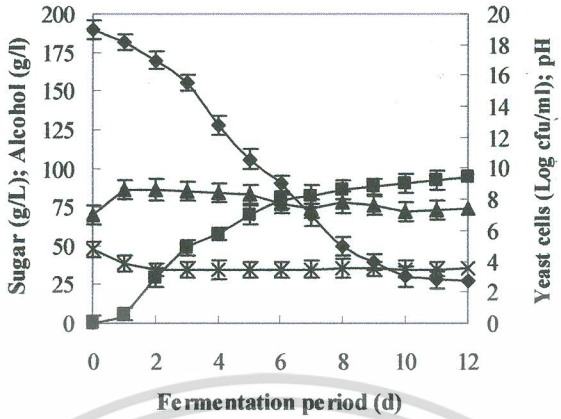
เนื่องจากวัตถุดิบหลักในการศึกษานี้ คือ ไวน์น้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องดำเนินการหมักให้มีปริมาณประมาณ 1,000 ลิตร เพื่อลดความเบี่ยงเบนจากคุณภาพของน้ำไวน์ที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูด้วยเชื้อ *A. aceti* WK ต่อไป

สำหรับภาพที่ 4.1 เป็นค่าเฉลี่ยของผลการหมักจำนวน 10 รอบๆละ 100 ลิตร ด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ในถังพลาสติก Food Grade (ปริมาตร 120 ลิตร) สำหรับผลการหมักแสดงในภาพที่ 4.2 ซึ่งพบว่าสามารถทำการหมักไวน์ได้แอลกอฮอล์ในระดับความเข้มข้น 9.0-9.4% ภายในระยะเวลา 10-12 วัน ทั้งนี้น้ำไวน์ที่ได้นี้จะนำไปใช้ในการศึกษาในการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ต่อไป



ภาพที่ 4.1 แสดงสภาพการหมักไวน์น้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อนเพื่อใช้ในการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู โดยใช้ถังพลาสติกสีน้ำเงิน (Food grade) ขนาด 120 ลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง (30-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลาประมาณ 12 วัน : (ก) ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30; (ข) ลักษณะผิวหน้าของน้ำหมักระหว่างการหมักไวน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 แสดงผลของการหมักไวน์น้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อนด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (30-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลาประมาณ 12 วัน :
♦, sugar; ■, alcohol; ▲, yeast cells; x, pH

4.2 การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

4.2.1 การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ในระดับขวดแก้ว

ทำการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK โดยนำไวน์น้ำลวกข้าวโพดที่ปรับสภาพให้มีความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration; TC) เท่ากับ 8 ซึ่งประกอบด้วย กรดอะซิติกความเข้มข้น 4.5% (หรือ 45 กรัม/ลิตร) และแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 3.5% (หรือ 35 กรัม/ลิตร) ในขวดขนาด 1 ลิตร ปริมาตร 800 มิลลิลิตร บ่มไว้ในอ่างน้ำ (Water bath) ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 35-37 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 4.3

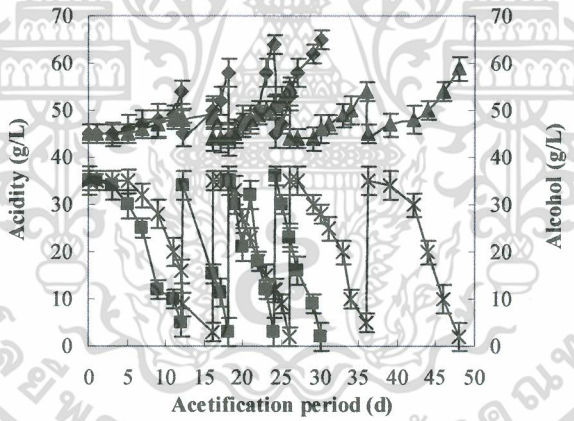
ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้ทนร้อนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ใน Waterbath

ตามปกติแล้วในการเลี้ยงหัวเชื้อน้ำส้มสายชูเพื่อผลิตกรดอะซิติกประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ (1) **"ช่วงปรับสภาพ (Adaptation phase)"** ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกเมื่อหัวเชื้อน้ำส้มสายชูถูกถ่ายลงสารอาหาร (ซึ่งคือไวน์ที่เติมสารอาหารและปรับ TC เริ่มต้นที่ต้องการ โดยในกรณีนี้จะใช้ TC = 80 กรัม/ลิตร ประกอบด้วย กรดอะซิติกความเข้มข้น 45 กรัม/ลิตร และแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 35 กรัม/ลิตร) หัวเชื้อน้ำส้มสายชูทำการปรับตัวโดยสังเกตได้จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การลดลงของปริมาณแอลกอฮอล์จนถึงน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 กรัม/ลิตร จากนั้นจึงทำการดึงน้ำหมักออกมา (Discharging) 40% (Krusong et al., 2007; 2010; 2011; 2014) แล้วจึงเติม (Charging) สารอาหารใหม่ในปริมาณเท่าเดิมซึ่งถือเป็นการเริ่มต้น **"ช่วงการสร้างกรดอะซิติก (Acetification phase)"** ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์จนถึงน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 กรัม/ลิตร เช่นกันก็ถือว่าการหมักสิ้นสุดสมบูรณ์ในรอบการหมักนั้น จากนั้นจึงดำเนินการดึงน้ำหมักและเติมสารอาหารใหม่เช่นเดิมซึ่งถือเป็นการเริ่มต้นรอบการหมักถัดไป

ผลของการปรับสภาพหัวเชื้อ *A. aceti* WK ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ที่นิยมใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูในระดับอุตสาหกรรม) แสดงอยู่ในภาพที่ 4.4 พบว่า ในการปรับสภาพในขวดแก้วที่มีการให้อากาศในอัตรา 4.5 ลิตร/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้ในช่วง adaptation phase เท่ากับ 12 วัน และ 16 วัน ที่อุณหภูมิ 30 และ 35-37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แสดงว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นส่งผลกระทบต่อความสามารถในการปรับสภาพของหัวเชื้อ *A. aceti* WK นอกจากนี้แล้วเมื่อพิจารณาถึง "ระยะการสร้างกรดอะซิติก" พบว่า ที่อุณหภูมิสูงขึ้นทำให้หัวเชื้อ *A. aceti* WK ใช้เวลาในการสร้างกรดอะซิติกนานขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 6 วันต่อรอบการผลิต ในขณะที่ 35-37 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 10-12 วันต่อรอบการผลิต อย่างไรก็ตามปริมาณกรดที่ผลิตได้อยู่ในช่วง 50-60 กรัม/ลิตร ซึ่งถือว่าเป็นที่น่ายอมรับได้ เนื่องจากสภาพการเลี้ยงในขวดนี้มีอากาศที่จำกัด อีกทั้งลักษณะฟองอากาศที่เกิดขึ้นก็ไม่ละเอียดเพียงพอที่จะสนันสนุนกิจกรรมปฏิกริยาออกซิเดชั่นในการเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดได้



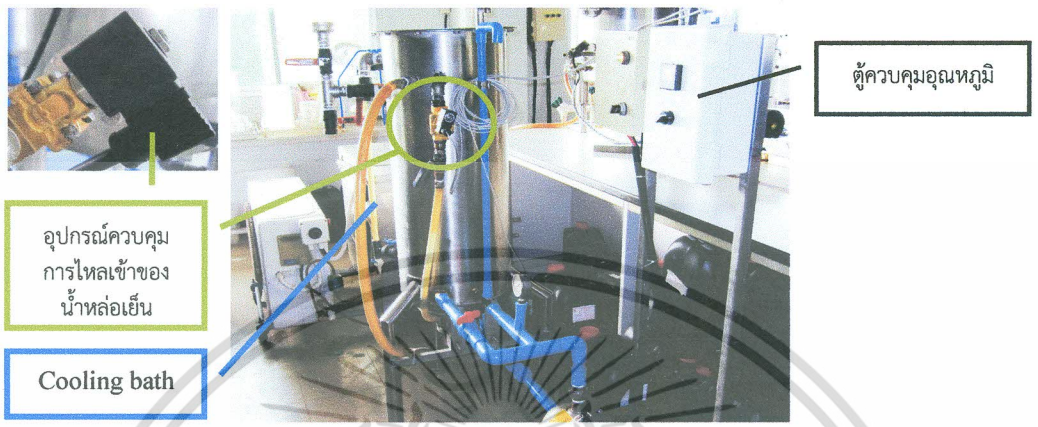
ภาพที่ 4.4 แสดงผลของการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ในขวดขนาด 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส : ♦, acidity @ 30°C; ■, alcohol @ 30°C; ▲, acidity @ 35°C; x, acidity @ 35°C

4.2.2 การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ในระดับถังหมัก

ก่อนที่จะดำเนินการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศต้นแบบขนาด 100 ลิตร จำเป็นต้องปรับปรุงถังหมักก่อนโดยการติดตั้งระบบควบคุมอุณหภูมิให้มีความเที่ยงตรง เนื่องจากการศึกษานี้มุ่งเน้นต่อผลกระทบของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการหมัก โดยทำการติดตั้งอุปกรณ์ควบคุมการ

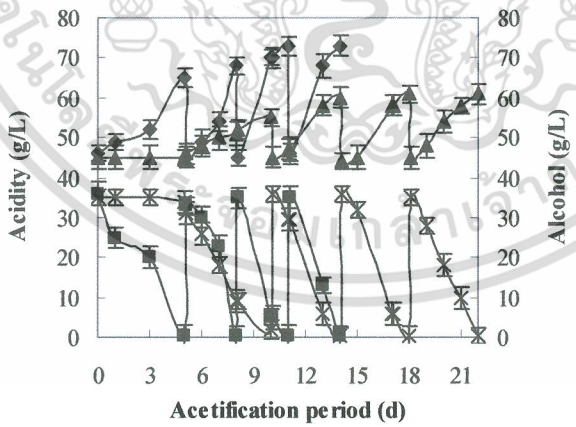
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไหลเข้าของน้ำหล่อเย็น (ซึ่งควบคุมการปิด-เปิดวาว์ลเพื่อให้น้ำหล่อเย็นจาก Cooling bath ไหลเข้าไปตามท่อหล่อเย็นที่ติดตั้งอยู่ภายในถังหมัก) รวมถึงตู้ควบคุมเพื่อตั้งค่าควบคุมอุณหภูมิที่กำหนดในการศึกษา (ภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.5 ถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศพร้อมระบบควบคุมอุณหภูมิ เพื่อใช้ในการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ให้ทนร้อนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

สำหรับการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ในถังหมักต้นแบบขนาด 100 ลิตร นี้ดำเนินการโดยใช้หัวเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพจากระดับขวดมาพัฒนาต่อในสภาพน้ำหมักที่มีค่า TC เท่ากับ 80 กรัม/ลิตร ในปริมาตรเริ่มต้น 30 ลิตรใน“ช่วงปรับสภาพ” และเพิ่มปริมาตรเป็น 60 ลิตรใน“ช่วงการสร้างกรดอะซิติก” ทั้งนี้ผลของการศึกษาแสดงในภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 แสดงผลของการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศต้นแบบขนาด 100 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ ที่
อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส : ♦, acidity @ 30°C; ■, alcohol @ 30°C;
▲, acidity @ 35°C; x, acidity @ 35°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.6 พบว่า ในสภาพที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างกรดอะซิติกของเชื้อ *A. aceti* WK ทำให้หัวเชื้อสามารถปรับตัวได้ภายในระยะเวลา 5 วัน และสามารถสร้างกรดได้ในปริมาณ 68-73 กรัม/ลิตร ภายในระยะเวลา 3 วัน/รอบการผลิต ขณะที่ในสภาพอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ทำให้เชื้อต้องใช้ระยะเวลาในการปรับตัวที่นานขึ้น โดยใช้เวลาถึง 10 วัน อีกทั้งทำให้ประสิทธิภาพการผลิตกรดลดลง กล่าวคือ สามารถผลิตกรดได้ประมาณ 60-61 กรัม/ลิตร ภายในระยะเวลา 4 วัน/รอบการผลิต อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงระดับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นถึง 5-7 องศาเซลเซียส ทำให้มั่นใจได้ว่า การปรับสภาพนี้สามารถก่อให้เกิด High temperature tolerant strain ได้

4.3 ความเข้มข้นของประจุแคลเซียมที่เหมาะสมต่อการทนความร้อนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK

ในการศึกษานี้เลือกใช้ แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride; $CaCl_2$) เป็นแหล่งของประจุแคลเซียม โดยทำศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของ $CaCl_2$ (0.1 0.15 0.20 และ 0.25%) ที่มีต่อการทนอุณหภูมิที่สูงขึ้นของหัวเชื้อ *A. aceti* WK ทั้งนี้ผลการศึกษาใน 3 รอบการหมักของแต่ละระดับความเข้มข้นของ $CaCl_2$ แสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งพบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดอะซิติกในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู (Acetification process) นั้นหัวเชื้อ *A. aceti* WK สามารถผลิตกรดได้สูงสุด (29.7$\pm$1.25 กรัม/ลิตร) โดยที่มีอัตราการสร้างกรด (หรือที่เรียกว่า "Acetification rate" ซึ่งนิยมใช้ตัวย่อว่า "ETA") สูงสุด (9.89$\pm$0.72 กรัม/ลิตร/วัน)

เมื่ออุณหภูมิในการหมักเพิ่มขึ้นเป็น 35-37 องศาเซลเซียส พบว่า **ประสิทธิภาพการหมักลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่งผลกระทบเชิงลบอย่างชัดเจนต่อ ETA โดยระยะเวลาในการหมักต่อรอบเพิ่มขึ้นจาก 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น 6 วัน ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส** ขณะที่ปริมาณกรดที่สร้างขึ้นก็ได้เพียง 16.3$\pm$0.39 กรัม/ลิตร เท่านั้น นอกจากนี้แล้วยังสังเกตได้ว่าปริมาณเซลล์ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK ลดลงอย่างเด่นชัดเมื่ออุณหภูมิการหมักเพิ่มขึ้นเป็น 35-37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัยที่ทำให้ ETA ลดลง ดังนั้นในการศึกษาจึงมุ่งเน้นการเพิ่มประสิทธิภาพความคงทนของเซลล์ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK โดยอาศัยการเติมประจุแคลเซียมหรือ $CaCl_2$ ลงในน้ำหมัก จากผลการศึกษาที่แสดงในตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าประจุแคลเซียมหรือ $CaCl_2$ มีผลในการเพิ่มปริมาณเซลล์ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK ให้กลับมาสูงขึ้น โดย $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% ก่อให้เกิดความคงทนของเซลล์สูงสุดจึงทำให้มีปริมาณหัวเชื้อสูงสุด ซึ่งส่งผลให้เกิดการสร้างกรดอะซิติกได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญในสภาพการหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการหมักก็ยังน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เช่นกัน เมื่อพิจารณาเฉพาะในสภาพการหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส พบว่า $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.15% ก่อให้เกิด ETA สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่น ๆ ซึ่งรวมถึงสภาพที่ไม่เติม $CaCl_2$ ด้วย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า**ความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.15%**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศต้นแบบขนาด 100 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

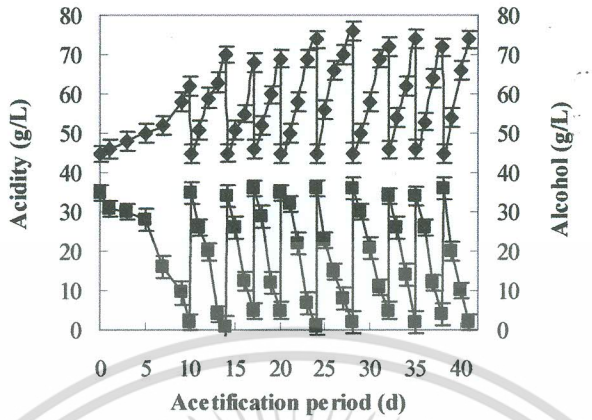
	No $CaCl_2$ at 30°C as control	$CaCl_2$ concentration (%) at 35-37°C				
		0	0.1	0.15	0.2	0.25
Average acetification period (d)	3	6	4	3	5	5
Acid produced (g/L):						
1st cycle	29	14	23	27	24	23
2nd cycle	32	17	25	25	25	24
3rd cycle	28	18	23	26	25	26
Average*	29.7^{a} ±1.25	16.3^{e} ±0.39	23.7^{d} ±0.95	26.0^{b} ±0.82	24.7^{c} ±0.65	24.3^{cd} ±1.05
Cells (g/L):						
1st cycle	0.0612	0.0299	0.0446	0.0549	0.0489	0.0405
2nd cycle	0.0581	0.0287	0.0438	0.0571	0.0451	0.0414
3rd cycle	0.0604	0.0301	0.0465	0.0552	0.0501	0.0427
Average*	0.0599	0.0296	0.0450	0.0557	0.0480	0.0415
ETA (g/L/d):						
1st cycle	9.67	2.33	5.75	9.0	4.8	4.6
2nd cycle	10.67	2.83	6.25	8.33	5.0	4.8
3rd cycle	9.33	3.00	5.75	8.67	5.0	5.2
Average*	9.89^{a} ±0.72	2.72^{e} ±0.51	5.92^{c} ±0.47	8.67^{b} ±0.49	4.93^{d} ±0.3	4.87^{d} ±0.47

Initial acidity was adjusted to 45±1 g/L. Calculation of average acid produced and acetification rate are based on three acetification cycles. *Mean ± one standard deviation. Means with different letters within the same row are significantly different ($p \leq 0.05$) according to Tukey's test.

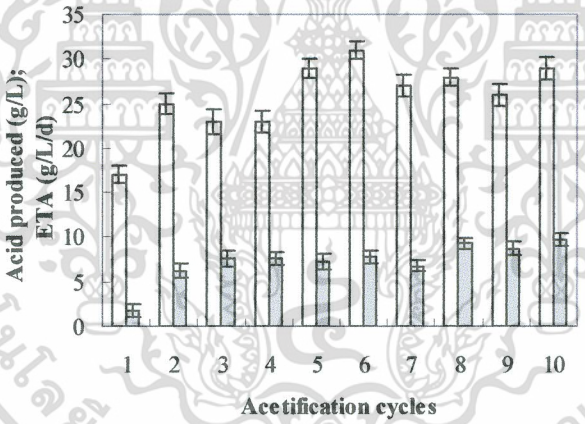
4.4 การผลิตน้ำส้มสายชูด้วยหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีประจุแคลเซียมที่เหมาะสม

ทำการผลิตน้ำส้มสายชูด้วยหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส โดยเลือกใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0.15% เพื่อติดตามความเสถียรของระบบการหมักดังกล่าวด้วยการหมักจำนวน 9 รอบ ทั้งนี้ผลแสดงในภาพที่ 4.7 และ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 แสดงความเสถียร (Consistency) ของการผลิตกรดอะซิติกจากหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศต้นแบบขนาด 100 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.15% : ♦, acidity; ■, alcohol



ภาพที่ 4.8 แสดงปริมาณกรดที่ผลิตและ Acetification rate (ETA) ของการผลิตกรดอะซิติกจากหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศต้นแบบขนาด 100 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.15% : Left panel, Acid produced; Right panel, ETA

จากภาพที่ 4.7 พบว่า หัวเชื้อ *A. aceti* WK สามารถปรับตัวในสภาพการหมักที่ TC เท่ากับ 80 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 10 วัน จากนั้นเมื่อเข้าสู่ "ช่วงการสร้างกรดอะซิติก" หัวเชื้อสามารถสร้างกรดได้ในระดับ 68-74 กรัม/ลิตร ภายในเวลา 3-4 วัน แสดงถึงความเสถียรของหัวเชื้อที่สามารถปรับตัวได้อย่างคงที่ในสภาพการหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ได้แล้ว อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณกรดและอัตราการ

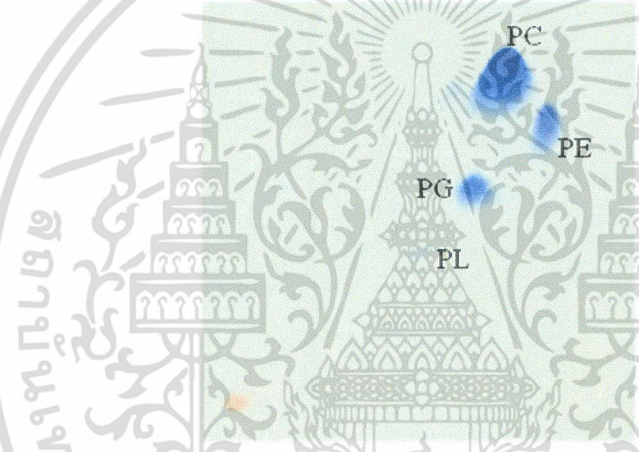
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้างกรด (ETA) ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK ในทั้ง 9 รอบการหมัก (ภาพที่ 4.8) พบว่า ปริมาณกรดที่สร้างขึ้นอยู่ระหว่าง 23-31 กรัม/ลิตร โดยมี ETA เท่ากับ 6.25-9.67 กรัม/ลิตร/วัน

4.5 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

4.5.1 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไขมัน

เมื่อนำเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK มาตรวจหากรดไขมันชนิด phospholipid พบว่าประกอบด้วย Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamine (PE) และไม่ทราบชนิด (PL). ดังภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.9 แสดงชนิดของ Phospholipid ที่พบในหัวเชื้อ *A. aceti* WK เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบดูดซับโดยใช้ซิลิกา (10x100 มิลลิเมตร) และทำการชะด้วย 50% (v/v) Methanol

จากผลการทดลองการวิเคราะห์หา**ชนิดและปริมาณของ Phospholipid** ที่มีผลมากในการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ลงในน้ำหมักในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า Phospho –lipid ที่พบมากในเซลล์ในสภาพที่หมักเพื่อผลิตกรดอะซิติกในสภาพปกติ (ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) คือ Phosphatidylcholine รองลงมา คือ phosphatidylethanolamine และ phosphatidylglycerol ตามลำดับ ใน ขณะที่**เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการหมักเป็น 35-37 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ Phospholipid ทั้งสามชนิดมีปริมาณที่ลดลง** อย่างไรก็ตามเมื่อทำการลดผลกระทบของอุณหภูมิที่สูงขึ้นด้วยการเติม $CaCl_2$ ลงในน้ำหมัก พบว่า **เมื่อความเข้มข้นของ $CaCl_2$ เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้ Phosphatidylcholine และ Phosphatidylglycerol เพิ่มปริมาณสูงขึ้น** แต่ Phosphatidylethanolamine เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อ $CaCl_2$ เท่ากับ 0.15% และกลับมีค่าที่ลดลงแต่ก็ยังมีค่าสูงกว่าสภาพที่ไม่ได้เติม $CaCl_2$ จากผลการทดลองที่ได้นี้ชี้ชัดให้เห็นว่า $CaCl_2$ ช่วยก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ Phospholipid ที่เพิ่มสูงขึ้นจนทำให้เซลล์มีความแข็งแรงทนต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้สามารถทำให้ประสิทธิภาพการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักกลับมาใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิมาตรฐานในการหมักน้ำส้มสายชูในระดับอุตสาหกรรม

ตารางที่ 4.2 แสดงชนิดและปริมาณของ Phospholipid ที่เปลี่ยนแปลงของหัวเชื้อ *A. aceti* WK เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

$CaCl_2$ (%)	Phospholipid (%)		
	Phosphatidylcholine	Phosphatidylglycerol	Phosphatidylethanolamine
0 @ 30°C	38.8	14.7	16.3
0 @ 35°C	37.6	14.0	15.9
0.05 @ 35°C	38.1	14.1	16.0
0.1 @ 35°C	38.7	14.2	16.3
0.15 @ 35°C	39	15	16.5
0.2 @ 35°C	40	15.4	15.6
0.25 @ 35°C	40.2	15.4	15.7

ต่อมาทำการวิเคราะห์หา**ปริมาณของกรดไขมัน** (ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี) ที่มีผลมากในการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ลงในน้ำหมักในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าในกลุ่มของกรดไขมันที่ประกอบด้วย cis-vaccenic (C18:1), Palmitic (C16:0) และ Myristic acid (C14:0) โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า **กรดไขมันที่มีผลต่อเชื้อที่มีมากที่สุดในเซลล์ของ *A. aceti* WK คือ cis-vaccenic** รองลงมาคือ Palmitic acid และ Myristic acid ตามลำดับ นอกจากนี้**ในสภาพที่ทำการหมักที่อุณหภูมิสูงขึ้นจาก 30 องศาเซลเซียส เป็น 35-37 องศาเซลเซียส นั้น พบว่า สภาพที่ไม่เติม $CaCl_2$ กรดไขมันทั้งสามชนิดลดลงเพียงเล็กน้อย แต่กลับมีปริมาณเพิ่มขึ้นในสภาพที่มีปริมาณ $CaCl_2$ สูงขึ้น**

4.5.2 การติดตามเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรเจนเนส (ADH) และ อัลดีไฮด์ดีไฮโดรเจนเนส (ALDH)

เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในการเปลี่ยนแอลกอฮอล์หรือเอธานอลเป็นกรดอะซิติกอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ ADH และ ALDH ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการติดตามเอนไซม์ทั้งสองในการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิควบคุมเพื่อใช้เปรียบเทียบ) และ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีการเติม $CaCl_2$ ในระดับความเข้มข้นต่างๆ และไม่เติม $CaCl_2$ (0% $CaCl_2$ สำหรับใช้เป็นปัจจัยควบคุมเพื่อเปรียบเทียบ) ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของ ADH และ ALDH ในระดับสูงเท่ากับ 12.56 และ 17.03 unit/mg ตามลำดับ ในขณะที่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (35-37 องศาเซลเซียส) ส่งผลกระทบโดยตรงต่อเอนไซม์ทั้งสองโดยตรงทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองลดลงอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม**การเติม $CaCl_2$ ก่อให้เกิดผลเชิงบวกต่อ**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสอง โดยระดับความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ที่ให้กิจกรรมของ ADH และ ALDH สูงสุดเท่ากับ 0.15%

ตารางที่ 4.3 แสดงชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เปลี่ยนแปลงของหัวเชื้อ *A. aceti* WK เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

$CaCl_2$ (%)	Fatty acid (%)		
	cis-vaccenic acid	Palmitic acid	Myristic acid
0 @ 30°C	70.2	7.9	3.0
0 @ 35°C	66.8	7.6	2.7
0.05 @ 35°C	68.2	7.6	2.7
0.1 @ 35°C	70.0	7.8	2.9
0.15 @ 35°C	70.2	8.0	3.0
0.2 @ 35°C	70.6	8.2	3.2
0.25 @ 35°C	70.6	8.2	3.2

ตารางที่ 4.4 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase (ADH) และ Aldehyde dehydrogenase (ALDH) ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

$CaCl_2$ (%)	Alcohol dehydrogenase (Unit/mg)	Aldehyde dehydrogenase (Unit/mg)
0 @ 30°C	12.56	17.03
0 @ 35°C	6.73	7.02
0.05	6.90	7.08
0.1	8.09	8.72
0.15	11.96	16.35
0.2	9.12	12.21
0.25	9.02	12.14

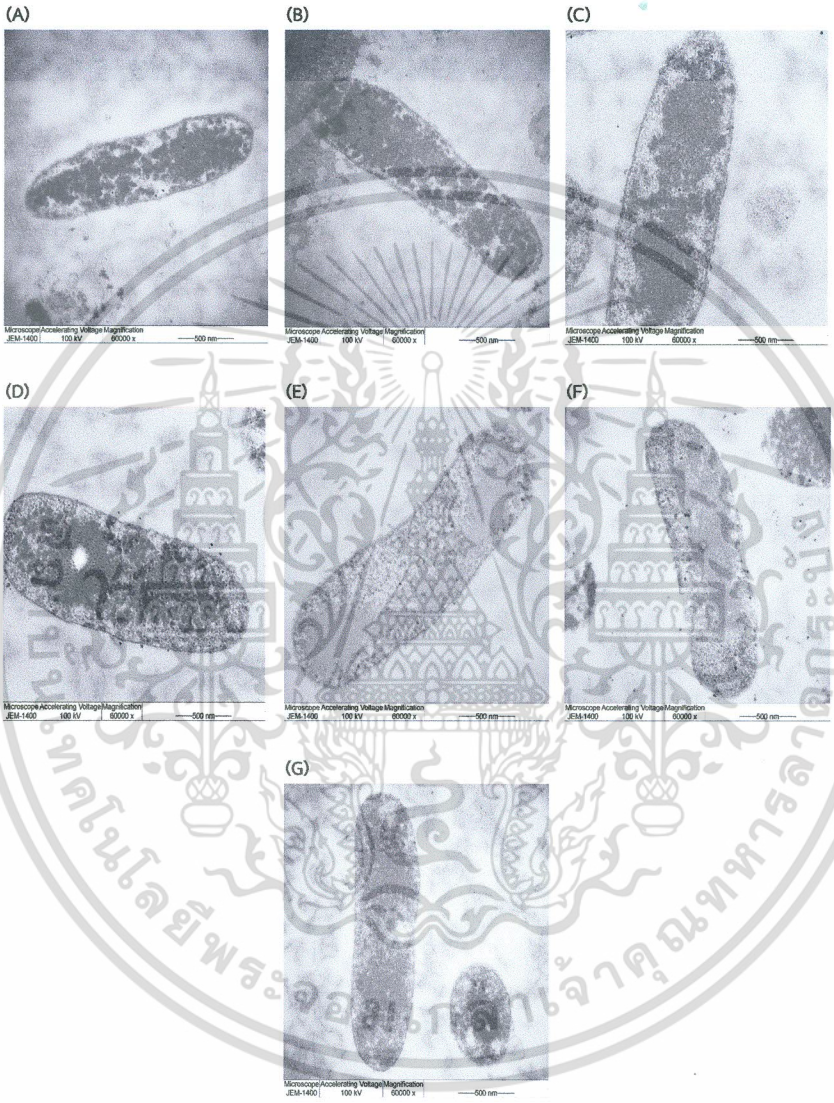
One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme catalyzing the oxidation of 1 μmol of ethanol in 1 min

4.5.3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK

ในการนำเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

35-37 องศาเซลเซียส ไปถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ระบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM ด้วยเครื่อง JEOL JSM-1400 (JEOL, Tokyo, Japan) scanning electron microscope จากนั้นนำภาพถ่ายมาทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ด้วยวิธีการของ Chen and Qin (2008) ซึ่งใช้โปรแกรม Image J version 1.46r ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.10 และตารางที่ 4.5



ภาพที่ 4.10 แสดงลักษณะของเซลล์ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส: (A) 30°C, No $CaCl_2$; (B) 35°C, No $CaCl_2$; (C) 35°C, 0.05% $CaCl_2$; (D) 35°C, 0.1% $CaCl_2$; (E) 35°C, 0.15% $CaCl_2$; (F) 35°C, 0.2% $CaCl_2$ และ(G) 35°C, 0.25% $CaCl_2$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการวิเคราะห์ขนาดของผนังเซลล์ด้วย Image J version 1.46r จาก TEM Images ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

$CaCl_2$ (%)	Size of cell wall of *A.aceti* WK (nm)*
0 @ 30°C	48.61±11.0[a]
0 @ 35°C	50.46±10.6[a]
0.05	42.59±9.4[b]
0.1	35.23±9.6[c]
0.15	33.49±11.3[c]
0.2	31.69±4.7[cd]
0.25	28.29±5.2[e]

*ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเรียบเทียบด้วย Tukey's Test

จากภาพ TEM ของเซลล์ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK (ภาพที่ 4.10) พบว่า ผนังเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส แทน 30 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามผนังเซลล์มีโครงสร้างที่แข็งแรงขึ้น (Densed cell wall) โดยมีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนในสภาพที่เติม $CaCl_2$ ซึ่งแสดงให้ถึงผลเชิงบวกของ $CaCl_2$ ต่อการเปลี่ยนแปลงเชิงกายภาพของเซลล์ *A. aceti* WK โดยขนาดของผนังเซลล์ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ มีขนาดที่แน่นขึ้นกว่าในสภาพที่ไม่เติมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 การหมักไวน์น้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อนที่ใช้ในการศึกษา มีระดับแอลกอฮอล์ 9.0-9.4% ใช้ระยะเวลาการหมักประมาณ 10-12 วัน ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส

5.1.2 การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK เพื่อให้สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ได้ดำเนินการเป็นสองช่วง ช่วงแรกเป็นระดับขวดขนาด 1 ลิตร และช่วงที่สองเป็นระดับถังหมัก (ระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศต้นแบบขนาด 100 ลิตร) โดยเลือกใช้ระดับความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration; TC) ของน้ำหมักเท่ากับ 80 กรัม/ลิตร ประกอบด้วย กรดอะซิติก 45 กรัม/ลิตร และ แอลกอฮอล์ 35 กรัม/ลิตร ผลในการปรับในช่วงนี้สามารถทำให้หัวเชื้อ *A. aceti* WK สามารถหมักได้กรดเท่ากับ 60-61 กรัม/ลิตร ภายในระยะเวลา 4 วันต่อรอบการหมัก ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ซึ่งถือว่า หัวเชื้อ *A. aceti* WK สามารถปรับตัวได้เป็นอย่างดีและเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

5.1.3 ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการทนความร้อนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK พบว่า $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 0.15% สามารถช่วยให้หัวเชื้อ *A. aceti* WK สามารถดำเนินการหมักได้ใกล้เคียงกับที่หมักได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้แล้วเมื่อติดตามความเสถียรของการหมักเพื่อผลิตกรดอะซิติกของหัวเชื้อ *A. aceti* WK ในสภาพที่เติม 0.15% $CaCl_2$ ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส จำนวน 9 รอบของการหมัก พบว่า หัวเชื้อ *A. aceti* WK มีความเสถียรอยู่ในเกณฑ์ที่ดีสามารถผลิตกรด (Acid produced) และ ETA ได้เท่ากับ 23-31กรัม/ลิตร และ 6.25-9.67 กรัม/ลิตร/วัน ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า $CaCl_2$ มีผลโดยตรงต่อการทนความร้อนของหัวเชื้อ *A. aceti* WK และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดอะซิติกที่อุณหภูมิที่สูงขึ้นกว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ซึ่งนิยมใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดอะซิติกทั้งในนระดับห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรม) ได้เป็นอย่างดี

5.1.4 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส โดยติดตามปริมาณ Phospholipids (ประกอบด้วย Phosphatidylcholine, Phosphatidylglycerol และ Phosphatidylethanolamine) และกรดไขมัน (ประกอบด้วย cis-vaccenic acid, Palmitic acid และ Myristic acid) พบว่า $CaCl_2$ มีผลต่อ Phospholipiads และกรดไขมันที่ผนังเซลล์ของหัวเชื้อ *A. aceti* WK จนทำให้สามารถดำเนินการหมักได้มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังดำเนินการติดตามกิจกรรมของเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase และ Aldehyde dehydrogenase ซึ่งมีความสำคัญต่อการสร้างกรดอะซิติกจากแอลกอฮอล์ จากการศึกษาพบว่า ในสภาพที่มีการเติม 0.15% $CaCl_2$ สามารถทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งช่วยยืนยันได้ชัดเจนถึงความสามารถของการหมักเพื่อผลิตกรดอะซิติกในสภาพดังกล่าวได้ นอกจากนี้เมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของขนาดของผนังเซลล์ของหัวเชื้อในสภาพการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส และที่ 35-37 องศาเซลเซียส เมื่อมีการเติม $CaCl_2$ (0-0.25%) โดยการถ่ายภาพเซลล์ด้วย Transmission electron microscope แล้วนำภาพมาวิเคราะห์ขนาดด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรแกรม Image J version 1.46r พบผลเชิงบวกของ $CaCl_2$ ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงเชิงกายภาพของเซลล์ *A. aceti* WK โดยทำให้ขนาดของผนังเซลล์ในสภาพที่เติม $CaCl_2$ มีสภาพที่แน่นขึ้นกว่าในสภาพที่ไม่เติมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งสนับสนุนผลของ $CaCl_2$ต่อความคงทนของเซลล์ของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK จนทำให้สามารถหมักในสภาพอุณหภูมิสูงที่ 35-37 องศาเซลเซียส ได้ใกล้เคียงกับที่ 30 องศาเซลเซียส

5.2 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาเกี่ยวกับการปรับสภาพหัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อประโยชน์ในด้านใดด้านหนึ่งที่กำหนดไว้ในวัตถุประสงค์จำเป็นต้องดำเนินการอย่างต่อเนื่อง ดังในกรณีนี้ถึงแม้จะเสร็จสิ้นระยะเวลาในการศึกษาก็ยังจำเป็นต้องดำเนินการศึกษาต่อไปเพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในตัวเซลล์อย่างถาวร

สิ่งกล่าวถึงข้างต้นนี้สามารถยืนยันได้จากกรณีของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ซึ่งใช้ในการศึกษานี้ หัวเชื้อนี้สามารถจัดเป็น High acid tolerant strain โดยได้ผ่านการปรับสภาพให้สามารถทนกรดได้มาเป็นระยะเวลาถึงมากกว่า 10 ปี ทำให้หัวเชื้อสามารถดำเนินการศึกษาได้ที่ระดับความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 80 กรัม/ลิตร หรือเท่ากับ 8% อย่างไรก็ตามหัวเชื้อนี้ในปัจจุบันสามารถผลิตกรดได้ถึง 11-12% ซึ่งหมายความว่าสามารถทนกรดได้ถึง 110-120 กรัม/ลิตร โดยหัวเชื้อดังกล่าวนี้ได้ถูกนำใช้แล้วในการผลิตน้ำส้มสายชูในโรงงานที่ขอใช้สิทธิประโยชน์จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

6.1 สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้และที่อยู่ระหว่างดำเนินการ ประกอบด้วย

6.1.1 กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

จะดำเนินการเผยแพร่กับบริษัทที่ได้ขอใช้สิทธิประโยชน์จากกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

6.1.2 บทความวิจัย

กำลังอยู่ในขั้นตอนการเตรียมต้นฉบับซึ่งคาดว่าจะดำเนินการจัดส่งไปตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรุงเทพธุรกิจ. 2553. เทคโนโลยีการผลิตน้ำส้มสายชูหมักเชิงการค้า ฝีมือคนไทย ต่อยอดงานวิจัยจากศูนย์จนสำเร็จ เป็นที่ยอมรับของเอกชน. สืบค้นที่ http://www.newswit. com/gen/2010-09-03/af79f452f78dcb7b 8f693a8938910dc7/. สืบค้นเมื่อ 10 ธันวาคม 2553.

วราวุฒิ ครูส่ง สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา และอัสนี วิจิตระกะ. 2550. การพัฒนาหัวเชื้อน้ำส้มสายชูหมักเพื่อรองรับเทคโนโลยีผลิตน้ำส้มสายชูจากต่างชาติ. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนวิจัยโครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ปี พ.ศ.2548-50. 53 หน้า.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2551ก. การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในถังหมัก High Speed Agitation ขนาด 600 ลิตร. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนวิจัยโครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ปี พ.ศ. 2548-50. 23 หน้า.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2551ข. การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเกษตรอินทรีย์. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนวิจัยโครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ปี พ.ศ. 2550-51. 26 หน้า.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2552. การเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในถังหมักขนาด 600 ลิตร. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนวิจัยโครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี นักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ปี พ.ศ. 2548-50. 16 หน้า.

วราวุฒิ ครูส่ง พนิต เพ็ชรน่วม และ ประภาส ปิ่นวิเศษ. 2553. การผลิตน้ำส้มสายชูหมัก: การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อทดแทนการนำเข้า...สู่การยอมรับของภาคเอกชนไทย. วารสารวิจัยและนวัตกรรมเพื่ออุตสาหกรรมไทย. 1: 14-21.

Adachi, O., E. Miyagawa, E. Shinagawa, K. Matsushita and M. Ameyama. 1978. Purification and properties of particulate alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti.* Agricultural and Biological Chemistry. 42: 2331-2340.

Broekhuyse, R.M. 1968. Phospholipids in tissues of the eye. Isolation, characterization and quantitative analysis by two-dimensional thin-layer chromatography of diacyl and vinyl-ether phospholipids. Biochimica et Biophysica Acta. 152: 307-315.

Chen, K. and C. Qin. 2008. Segmentation of beef marbling based on vision threshold. Computers and Electronics in Agriculture. 62: 223-230.

Conner, D.E. and J.S. Kotrola. 1995. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. Applied and Environmental Microbiology. 61: 382-385.

Dulley, J.R. and P.A. Griev. 1975. A simple technique for eliminating interference by detergents in Lowry method of protein determination. Analytical Biochemistry. 64: 136-141.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Folch, J., M. Lees and S.G.H. Stanley. 1957. Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry. 226: 497-509

Frebortova, J., K. Matsushita and O. Adachi. 1997. Effect of growth substrates on formation of alcohol dehydrogenase in *Acetobacter methanolicus* and *Acetobacter aceti.* Journal of Fermentation and Biotechnology. 83: 21-25.

Jernejc, K., M. Vendramin and A. Cimerman. 1989. Lipid composition of *Aspergillus niger* in citric acid accumulating and nonaccumulating conditions. Enzyme and Microbial Technology. 11: 452-456.

Kanchanarach, W., G. Theeragool, T. Yakushi, H. Toyama, O. Adachi and K. Matsushita. 2010. Characterization of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains and their quinoprotein alcohol dehydrogenase. Applied Microbiology and Biotechnology. 85: 741-751.

Kerdpiboon, S., S. Devahastin and W.L. Kerr. 2007. Comparative fractal characterization of physical changes of different food products during drying. Journal of Food Engineering. 83: 570-580.

Krusong, W., A. Vichitraka and S. Pornpakdeewattana. 2007. Luffa sponge as supporting material of *Acetobacter aceti* WK for corn vinegar production in semi-continuous process. KMITL Science Journal. 7: 63-68.

Krusong, W., P. Petch-nom and P. Pinviset. 2010. Semi-continuous production process of corn vinegar in stirred tank reactor using fixation of *Acetobacter aceti* WK on surface of loffa sponge. Kasetsart Journal (Natural Science). 44: 201-207.

Krusong, W. and A. Vichitraka. 2010. An investigation of simultaneous pineapple vinegar fermentation interaction between acetic acid bacteria and yeast. Asian Journal of Food and Agro-industry. 3: 192-203.

Krusong, W. and A. Vichitraka. 2011. An air-lift acetifier with mash recycling system for corn vinegar production by adsorbed cells of *Acetobacter aceti* WK on surface of loofa sponge. 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science IPCBEE, vol.7, 86-90.

Matsushita, K., H. Toyama and O. Adachi. 2004. Respiratory chains in acetic acid bacteria: Membrane-bound periplasmic sugar and alcohol respirations. In: Zonnoni, D. (ed) Respiratory in Archaea and Bacteria. Springer, Dordrecht, pp. 81-99.

Ndoye, B., S. Lebecque, R. Dubois-Dauphin, L. Tounkara, A.T. Guiro, C. Kere, B. Diawara and P. Thonart. 2006. Thermoresistant properties of acetic acid bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. Enzyme and Microbial Technology. 39: 916-923.

Ndoye, B., S. Lebecque, J. Destain, A.T. Guiro and P. Thonart. 2007. A new pilot scale acetifier designed for vinegar production in Sub-Saharan Africa. Process Biochemistry 42: 1561-1565.

Niamnuy, C., S. Devahastin, S. Soponronnarit and G.S.V. Raghavan. 2008. Modeling coupled transport

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

phenomena and mechanical deformation of shrimp during drying in a jet spouted bed dryer. Chemical Engineering Science. 62: 5503-5512.

Niamnuy. C., S. Kerdpiboon and S. Devahastin. 2012. Artificial neural network modeling of physicochemical changes of shrimp during boiling. LWT-Food Science and Technology. 45: 110-116.

Hua, J.M., X.L. Wang, F.Q. Zhai, F. Yan and K. Feng. 2008. Effect of NaCl and Ca^{2+} on membrane potential of epidermal cells of maize roots. Agricultural Sciences in China. 7: 291-296.

Qi, Z., H. Yang, X. Xia, Y. Xin, L. Zhang, W. Wang and X. Yu. 2013. A protocol for optimization vinegar fermentation according to the ratio of oxygen consumption versus acid yield. Journal of Food Engineering. 116: 304-309.

Russell, J.B. and F. Diez-Gonzalez. 1998. The effect of fermentation acids on bacterial growth. Advances in Microbial Physiology. 39:205-234

Sintuprapa, W., G. Theeregool, W. Yongmanitchai, P. Srifah-Huehne and K. Matsushita. 2008. Molecular taxonomy of *Acetobacter syzygii* SKU19 and characterization of its acetic acid adapted strains. Kasetsart Journol (Natural Science). 42: 701-714.

Trcek, J., H. Toyama, J. Czuba, A. Misiewcz and K. Matsushita. 2006. Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 70: 366-373.

Trcek, J., K. Jernejc and K. Matsushita. 2007. The highly tolerant acetic acid Bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. Extremophiles. 11: 627-635.

Wang, Y., Q. Yu, X. Tang and L. Wang. 2009. Calcium pretreatment increases thermotolerance of *Laminaria japonica* sporophytes. Progress in Natural Science. 19: 435-442.

Yakushi, T. and K. Matsushita. 2010. Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology. 86: 1257-1265.

Yamada, Y. and P. Yukphan. 2008. Genera and species in acetic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology. 125: 15-24.

Zeng, Y., N. Wei, M. Lou, L. Fu, P. Xiong and H. Wang. 2010. Calcium chloride improve ethanol production in recombinant *Zymomonas mobilis.* African Journal of Biotechnology. 9: 7687-7691.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย

รหัสโครงการ/รหัสสัญญา 2557-A118-02299

แบบรายงานการใช้จ่ายเงินโครงการวิจัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

☑ แหล่งงบประมาณแผนดิน (แบบปกติ) ☐ แหล่งเงินรายได้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การเพิ่มประสิทธิภาพการทนความร้อนของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ด้วยประจุแคลเซียม

(ภาษาอังกฤษ) Increase of Thermo-tolerant Properties of *Acetobacter aceti* WK by calcium ion

ชื่อ-สกุลหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน/ผู้วิจัย (อ./ดร./ผศ./รศ./ศ.) รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี - เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2556 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2557

ข้อมูลการรายงานค่าใช้จ่ายงบประมาณโครงการวิจัย

1. การเบิกจ่ายงบประมาณ (กรณีการจ่ายเงินถ้าจ่ายงวดเดียวให้ลบข้อที่ไม่เกี่ยวข้องออก)

งวดที่ 1 526,800 บาท 100 % วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน (ว/ด/ป) 6 ต.ค. 56

2. สรุปงบประมาณค่าใช้จ่ายที่ใช้นับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยถึงปัจจุบัน (จำแนกตามหมวดค่าใช้จ่าย)

หมวดค่าใช้จ่าย	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่าย (บาท)	คงเหลือ (หรือเกิน)
งบบุคลากร : ค่าจ้างชั่วคราว	116,800	116,800	-
งบดำเนินงาน			
ค่าตอบแทน	-	-	-
ค่าใช้สอย	95,000	86,475	8,525
ค่าวัสดุ	315,000	322,757.87	(7,757.87)
ค่าสาธารณูปโภค	-	-	-
งบลงทุน: ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
รวม	526,800	526,032.87	767.13

(รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง)
ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน
30 / ก.ย. / 57

(นางสาวรัตนสุดา ชาติไทย)
ลงนามเจ้าหน้าที่การเงิน/เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง
30 / ก.ย. / 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว : หัวหน้าโครงการ

ชื่อ-สกุล ดร.วราวุฒิ ครูส่ง.....

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา

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

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

(1) การพัฒนากระบวนการหมักน้ำส้มสายชู

(2) จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร

(3) การยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้
2557	รางวัลเชิดชูเกียรตินักวิจัยที่ได้รับเงินทุนวิจัยจากแหล่งเงินทุนภายนอกสูงสุด (พ.ศ. 2553-55)	คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2555	รางวัลบุคคลที่ทำคุณประโยชน์และชื่อเสียงให้แก่สถาบัน	สภาคณาจารย์และพนักงาน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2555	รางวัลอาจารย์ดีเด่นประจำปี 2555	คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2555	รางวัลเทคโนโลยีเครื่องจักรกลยอดเยี่ยม รางวัลที่ 1 สาขาเครื่องจักรกลการผลิต ในการประกวดรางวัลเทคโนโลยีเครื่องจักรกลยอดเยี่ยม ประจำปี 2554	กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
2551	Professional Award ชนะเลิศอันดับสาม โครงการ IRPUS ประจำปี 2551	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
2550	Best iTAP Partnership Award	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

		อุตสาหกรรมไทย (iTAP) ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี (TMC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2556-59	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูจากข้าวไร่และการใช้ประโยชน์	กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2556	การพัฒนาและการให้คำปรึกษากระบวนการผลิตวุ้นเซลลูโลสจากน้ำสับปะรดที่เป็นผลพลอยได้	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2555-56	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากมะม่วง	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2555	การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผักกาดเขียวปลีที่เหลือใช้	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2554-55	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากสับปะรดนางแล-ภูแลในระบบถึงต่อเนื่อง	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2554-55	การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* สป๕ เพื่อผลิตกรดได้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2553-54	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำต้มแห้วที่เป็นผลพลอยได้	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2553-54	การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ให้ทนความเข้มข้นกรดสูงด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2553-54	การคงเสถียรภาพของหัวเชื้อ *Acetobacter aceti* สป5 เพื่อผลิตกรดและทนกรด 10-12% และการใช้น้ำแครอทเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชู	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2552-53	การเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกของ *Acetobacter aceti* WK ที่ตรึงเซลล์ด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศ	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2552-53	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเศษเหลือใช้จากกระบวนการผลิตมะเขือเทศเข้มข้น	บริษัท โรซ่าเกษตรอุตสาหกรรม จำกัด
2552-53	การพัฒนาหัวเชื้อ *Acetobacter aceti* สป5 ให้มีประสิทธิภาพการสร้างกรด 10-12% ในถังหมักน้ำส้มสายชู High Speed Agitation ขนาด 600 ลิตร	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2551-52	การเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยข้าวด้วยโคจิข้าวของเชื้อรา *Amylomyces* spp. DK	โครงงาน IRPUS สกว.
2551-52	การผลิตวุ้นเซลลูโลสสีแดงโดยอาศัยการหมักด้วยเชื้อรา *Monascus purpureus* ในน้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อน	โครงงาน IRPUS สกว.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2551-52	น้ำส้มสายชูหมักจากผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตน้ำผักและผลไม้: กากแครอท	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2551-52	การเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในถังหมักขนาด 600 ลิตร	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2551-52	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis cinerea* บนผิวของสตรอเบอร์รี่สดด้วยน้ำส้มสายชูหมัก	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2551	การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* เพื่อใช้ในการผลิตเทมเป้จากถั่วเหลืองอินทรีย์สำหรับเป็นวัตถุดิบอาหารสุขภาพ	โครงการ IRPUS สกว.
2551	ผลของออกซิเจนต่อการเพิ่มอัตราการสร้างกรดอะซิติกจากแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* WK ในระบบหมุนวนน้ำหมัก	โครงการ IRPUS สกว.
2550-51	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเกษตรอินทรีย์	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2550-51	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในถังหมัก High Speed Agitation ขนาด 600 ลิตร	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2550-51	การสร้างฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรียอะซิติกบนชังข้าวโพดในระดับห้องปฏิบัติการ	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2550	การหมักไซเลทจากเศษข้าวโพดฝักอ่อน เศษข้าวโพดหวานผสมกับยีสต์ที่เหลือจากการผลิตไวน์	โครงงาน IRPUS สกว.
2550	การใช้ประโยชน์จากยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์เพื่อทดแทนยีสต์สกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักไวน์และน้ำส้มสายชูจากน้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อน	โครงงาน IRPUS สกว.
2549-50	การลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* Anatum บนเนื้อสุกรสดด้วยกรดอะซิติก	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2549-50	น้ำส้มสายชูจากเปลือกและเนื้อมะม่วงเพื่อเอกลักษณ์ไทย	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2550	การปรับปรุงหัวเชื้อสำหรับหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว	งบประมาณเงินรายได้ โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2548-50	การพัฒนาหัวเชื้อน้ำส้มสายชูหมักเพื่อรองรับเทคโนโลยีผลิตน้ำส้มสายชูจากต่างชาติ	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2548-49	ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูระบบ Single Stage	งบประมาณเงินรายได้ โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2547-48	การปรับสภาพเชื้อ *Acetobacter sp.* สป5 ให้ปราศจากเจลสำหรับกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจาก น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อน	บริษัท แอกโกร – ออน (ประเทศไทย) จำกัด
2547-48	การออกแบบและสร้างเตาอบปลาด้วยอินฟราเรดแบบสายการผลิตต่อเนื่อง (ผู้ร่วมวิจัย)	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2547-48	การออกแบบและสร้างสายการผลิตแบบต่อเนื่องใน	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	ภาคอุตสาหกรรม (ผู้ร่วมวิจัย)	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2547-48	การยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ขนมไทย	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2547	การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลตติกจากกากถั่วเหลืองที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองและสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในการหมักกากถั่วเหลืองเพื่อเป็นอาหารสัตว์	โครงงาน IRPUS สกว.
2547	โยเกิร์ตน้ำนมถั่วเหลืองจากเมล็ดถั่วเหลืองสกัดไขมัน	โครงงาน IRPUS สกว.
2546	การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาข้างเหลืองกึ่งแห้งที่ใช้น้ำส้มสายชูในการยืดอายุการเก็บรักษา	โครงงาน IRPUS สกว.
2546	การผลิตจุลินทรีย์โปรตีนจากน้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนโดย *Saccharomyces cerevisiae* M30	โครงงาน IRPUS สกว.
2546	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อน	บริษัท แอกโกร – ออน (ประเทศไทย) จำกัด
2546	การพัฒนาผลิตภัณฑ์ประเภทสุราแช่ชนิดสุราผลไม้	บริษัท ไทยสพิริทอินดัสตรี จำกัด
2544-45	การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำอ้อย	สกว.
2543-45	การพัฒนากระบวนการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*	สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ โครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ (ไทย-ญี่ปุ่น)
2539-42	Experimental and Threoretical Investigation of Packed Bed Solid-State Fermentation (ผู้ร่วมวิจัย)	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
2539-42	High Vitamin B12 Vegetarian Diets by Mixed Fermentation (ผู้ร่วมวิจัย)	CDR USAID – ISRAEL Project
2541	การผลิตนมเปรี้ยวเสริมสุขภาพจากถั่วเหลืองในระดับกึ่งโรงงาน	สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ประเภทพัฒนาสังคม
2540	การศึกษาสมบัติทางกายภาพของวุ้นเซลลูโลสของแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*	งบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.
2539-40	การผลิตคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสจากวุ้นเซลลูโลสที่ได้จาก *Acetobacter xylinum*	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2538	การผลิตเซลลูโลสเสริมสุขภาพจากน้ำกากส่า	งบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.
2537	Lactic Drink from High Vitamin B12 – Tempeh	UNU (United Nation University)
2536	เซลลูโลสเสริมสุขภาพจากน้ำหางนม	งบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.
2535	การผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าว	งบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.
2530	ผลของการสารสกัดไม้เคี่ยมต่อการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล	งบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.
2529	Fermented Mungbean Residues by Laru, Traditional Inoculum	UNU (United Nation University)
2543	Research Activity at International Center for Biotechnology (ICBiotech), Osaka University, Osaka, Japan.	Japan under the JSPS-NRCT/DOST/LIPI/VCC Large Scale Cooperative Program in the Field of Biotechnology. Subgroup 4 :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

การขอใช้สิทธิในเทคโนโลยี (Licensing Agreement) สิ่งประดิษฐ์ เรื่อง "กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ejector System)"
เลขที่ LA 53/01 ลงวันที่ 4 มกราคม พ.ศ. 2553
ระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ บริษัท ไฮคิวผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด

การขอใช้สิทธิในเทคโนโลยี (Licensing Agreement) สิ่งประดิษฐ์ เรื่อง "กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi Ejector System)"
เลขที่ LA 54/01 ลงวันที่ 23 กันยายน พ.ศ. 2554
ระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ บริษัท วีนีก้าไทย จำกัด

การขอใช้สิทธิในเทคโนโลยี (Licensing Agreement) สิ่งประดิษฐ์ เรื่อง "กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi Ejector System)"
เลขที่ LA 55/01 ลงวันที่ 21 สิงหาคม พ.ศ. 2555
ระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ บริษัท ปริ๊นเซส ฟู้ดส์ จำกัด

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Krusong, W., P. Dansai and A. Itharat. 2012. Combination impact of turmeric extract and fermented vinegar on reduction of inoculated *Salmonella* Typhimurium on fresh lettuce. KMITL Science and Technology Journal. 12(1): 77-84.

Krusong, W., P. Petch-nom and P. Pinviset. 2010. Semi-continuous production process of corn vinegar in stirred tank reactor using fixation of *Acetobacter aceti* WK on surface of loofa sponge. Kasetsart Journal: Natural Science. 44(3): 454-461.

Krusong, W., P. Pech-noum and P. Pinvises. 2010. Research route of fermented vinegar production process: Technology development replacing imported technology to the acceptance from private sector. Journal of Research and Innovation for Thai Industries. 1(1): 13-20. (in Thai).

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Krusong, W., Jindaprasert, A., Laosinwattana, C, and Teerarak, M. 2015. Baby-corn fermented vinegar and its vapour, control postharvest decay in strawberries. New Zealand Journal of Crop & Horticultural Science. (In Press).

Krusong, W., Yaiyen, S., and Pornpukdeewatana, S. 2015. Impact of high initial concentrations of acetic acid and ethanol on acetification rate in an internal Venturi injector bioreactor. Journal of Applied Microbiology. 118: 629-640.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Krusong, W., M. Teerarak, and C. Laosinwattana. 2014. Liquid and vapor-phase vinegar reduces *Klebsiella pneumoniae* on fresh coriander. Food Control. 50: 502-508.

Krusong, W. and S. Tantratian. 2014. Acetification of rice wine by *Acetobacter aceti* using loofa sponge in a low-cost reciprocating shaker. Journal of Applied Microbiology. 117: 1348-1357.

Krusong, W., S. Pornpukdeewatana, S. Kerdpiboon and S. Tantratian. 2014. Prediction of influence of stepwise increment of initial acetic acid concentration in charging medium on acetification rate of semi-continuous process by artificial neural network. LWT-Food Science and Technology. 56: 383-389.

Krusong, W. and A. Vichitraka. 2010. An investigation of simultaneous pineapple Vinegar fermentation interaction between acetic acid bacteria and yeast. Asian Journal of Food and Agro-Industry. 3(01): 192-203.

ผลงานวิชาการนำเสนอในที่ประชุมระดับชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Sompuen, T. and **W. Krusong.** 2011. The efficiency of sodium hypochlorite and peracetic acid on reducing of *Vibrio parahaemolyticus* on shrimp during washing step. Proceedings of the 23rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "Systems Biotechnology: Quality & Success". Imperial Queen's Park Hotel , Bangkok, 1-2 February 2012. pp.153-154.

ผลงานวิชาการนำเสนอในที่ประชุมระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Atipong, T. and **W. Krusong.** 2012. Impact of lactic acid bacteria contamination during pineapple wine fermentation for ready to drink alcoholic beverages. Proceedings of the International Conference on Food Science and Nutrition 2012. The Pacific Sutera Hotel, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia, 2-4 April 2012. pp.844-852.

Janjumnean, N. and **W. Krusong.** 2012. Efficacy of electrolyzed oxidizing water on reducing *Escherichia coli* inoculated on surface of stainless steel used in poultry processing plant. Proceedings of the International Conference on Food Science and Nutrition 2012. The Pacific Sutera Hotel, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia, 2-4 April 2012. pp. 811-818.

Chayawatcharakul, T. and **W. Krusong.** 2011. *In vitro* impact of fermented vinegar and its vapour on *Klebsiella pneumoniae.* Proceedings of the 1st International Symposium on Technology for stainability. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 26-27 January 2012. pp. 415-418.

Krusong, W. and A. Vichitraka. 2011. An air-lift acetifier with mash recycling system for corn vinegar production by adsorbed cells of *Acetobacter aceti* WK on surface of loofa sponge. 2011 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science (ICBFS 2011). 1-3 April 2011. Bali Island. Indonesia. pp.86-90.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dansai, P. and **W. Krusong.** 2011. Effect of turmeric extract, fermented vinegar and their mixture on *Salmonella* Typhimurium reduction *in vitro.* 2011 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science (ICBFS 2011). 1-3 April 2011. Bali Island. Indonesia: pp.81-85.

ผลงานสิทธิบัตร/สิ่งประดิษฐ์/งานสร้างสรรค์ (ศิลปะ หรือ อื่นๆ)

กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi Ejector System)
คำขอรับสิทธิบัตรเลขที่ 0801005225 ยื่นเมื่อวันที่ 13 ตุลาคม 2551

กรรมวิธีการทำให้วุ้นเซลลูโลสใส
คำขอรับสิทธิบัตรเลขที่ 0901005777 ยื่นเมื่อวันที่ 22 ธันวาคม 2552

ประวัติส่วนตัว : ผู้ร่วมโครงการ

ชื่อ-สกุล ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.ด.	เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2551
วท.ม.	เทคโนโลยีทางชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2537
วท.บ.	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2534

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

(1) เทคโนโลยีชีวภาพผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
(2) จุลชีววิทยาและความปลอดภัยทางอาหาร
(3) การประยุกต์ใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร

งานวิจัย

เริ่มปีพ.ศ.	เสร็จปีพ.ศ.	ชื่อผลงาน/โครงการ (สถานภาพในการทำการวิจัย)	แหล่งทุน
2555	ปัจจุบัน	การคัดเลือกแบคทีเรียจากถั่วเน่าที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการย่อยแป้ง (หัวหน้าโครงการวิจัย) งานวิจัยลุล่วงแล้ว ร้อยละ 50	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
2555	ปัจจุบัน	การตรวจและการจำแนกเชื้อ *Salmonella* Enteritidis, *S.* Anatum, *S.* Derby และ *S.* Ratchaburi ในระดับซีโรวาร์ที่พบในอาหาร โดยใช้วิธีพีซีอาร์ (หัวหน้าโครงการวิจัย) งานวิจัยลุล่วงแล้ว ร้อยละ 85	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2554	ปัจจุบัน	ผลของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการควบคุมการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลา ในระหว่างการหมักหม้ำ (หัวหน้าโครงการวิจัย) งานวิจัยลุล่วงแล้ว ร้อยละ 70	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
2554	2555	ประสิทธิภาพของน้ำส้มสายชูกลั่นในการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* Ratchaburi ในโหระพา (หัวหน้าโครงการ) อยู่ในระหว่างการเขียนรายงานวิจัย	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
2554	2555	การสำรวจคุณภาพและความปลอดภัยของหม่ำในจังหวัดชัยภูมิ (ผู้ร่วมวิจัย)	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
2553	2554	การผลิตสบู่เหลวและสบู่ก้อนผสมสารสกัดจากแห้วจีน (หัวหน้าโครงการ)	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
2552	2553	การวิเคราะห์แบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักและเก็บรักษาไส้กรอกอีสานโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (หัวหน้าโครงการ)	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
2552	2553	การพัฒนาระบบการจัดการและควบคุมสุขลักษณะที่ดีในโรงอาหารของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (ผู้ร่วมวิจัย)	งบประมาณ สจล.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Jindaprasert, A., S. Tomanit, A. Swetwiwathana and S. Chuen-Im Ahmed. 2011. Effect of probiotic and temperature on survival of *Escherichia coli* 0157:H7 during storage of probiotic set yoghurt. King Mongkuts Agricultural Journal. 29 (3-1): 67-75. (in Thai)

Jindaprasert, A., S. Samappito, K. Springob, J. Schmidt, T. Gulder, W. De-Eknamkul, G. Bringman and T.M. Kutchan. 2010. *In vitro* plants, callus and root cultures of *Plumbago indica* and their biosynthetic potential for plumbagin. King Mongkut's Agro-Industry Journal. 2 (1): 53-65.

Rinthong, P., **A. Jindaprasert,** and W. De-Eknamkul. 2009. Simple densitometric TLC analysis of plaunotol for Screening of High-Plaunotol-Containing Plants of *Croton stellatopilosus* Ohba. Journal of Planar Chromatography 22 (1): 55-58.

ผลงานที่ได้รับการนำเสนอผลงานในที่ประชุม (ย้อนหลัง 3 ปี)

Jindaprasert, A., K. Jirajaroenrat and A. Swetwiwathana. 2012. Microbial community during Thai traditional fermented sausage (Isan sausage) fermentation. The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, November 29-30th, 2012, Sunee Grand Hotel and Convention Center, Ubon Ratchatani, Thailand. pp. 549-551.

Morklang, M. and **A. Jindaprasert.** 2012. Effects of distilled vinegar, potassium permanganate and sodium bicarbonate on reduction of *Salmonella* Typhimurium *in vitro*. Proceedings of 1st KMITL Agro-Industry Conference, September 7th, 2012. The Emerald Hotel, Bangkok, Thailand. pp. 89-93 (in Thai).

Inwimol, T., A. **Jindaprasert** and A. Swetwiwathana. 2012. The study of growth, lactic acid and bacteriocin production of *Pediococcus pentosaceus* M13 in MRS broth. Proceedings of 1st KMITL Agro-Industry Conference, September 7th, 2012. The Emerald Hotel, Bangkok, Thailand. pp. 467-473 (in Thai).

Limsombun, T., C. Nakrin, K. Banjong, and **A. Jindaprasert** and A. Swetwiwathana. 2012. Hygienic situation of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

mum processing plants in Chaiyaphum province under Thai GMP. Proceedings of 50th Kasetsart University Annual Conference: Agro-Industry. January 31st -February 2nd, 2012, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. pp 287-294 (in Thai).

Jindaprasert, A., K. Jirajaroenrat and A. Swetwiwathana. 2011. Characterization of lactic acid bacteria in Thai traditional fermented sausage during fermentation and storage. The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 29th -31st, 2011, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. Fer1 P9, 7 pages.

Booppata, M., **A. Jindaprasert,** K. Jirajaroenrat, K. and K. Srikijkasemwat. 2011. Selection of cellulose and xylanase producing bacteria from buffalo rumen. The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 29th -31st, 2011, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. Fer4 P34, 7 pages.

Thaenkudrun, P., **A. Jindaprasert** and K. Jirajaroenrat. 2011. Cloning of a cellulase gene from *Bacillus* sp. and expression in *Escherichia coli*. The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 29th -31st, 2011, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. Fer4 P15, 6 pages.

Siraprapapat, P., **A. Jindaprasert** and K. Jirajaroenrat. 2011. Expression and secretion of heterologous alpha-amylase in yeast *Kluyveromyces lactis*. The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 29th -31st, 2011, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. Fer4 P33, 6 pages.

Srichareon, D., **A. Jindaprasert,** A Swetwiwathana and K. Banjong. 2011. Study on mold contamination in a pasteurized milk filling process. Burapha University National Conference 2011, July 6-7th, 2011. Burapha University, Chonburi, Thailand. 10 pages (in Thai).

Chantanayingyong, K., **A. Jindaprasert,** K. Banjong, A. Swetwiwathana and **Krusong, W.** 2011. Effects of distilled vinegar on *Salmonella* Bangkok, *Salmonella* Ratchaburi and *Salmonella*Lamphun reduction *in vitro*. STDC 2011, June 30th – July 1st, 2011, Faculty of Science and Technology, Thammasart University (Rangsit Campus). pp 248-255 (in Thai).

ประวัติส่วนตัว : ผู้ร่วมโครงการ

ชื่อ-สกุล ดร.สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
Ph.D	Food Science	University of Nottingham	2555
วท.ม.	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2546
วท.บ.	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2542

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

(1) การผลิตเอทานอลชีวภาพ

(2) การปรับยีสต์ให้ทนต่อสภาวะเครียดที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2556	การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดเจือจางและมีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SC90	เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2549	การผลิตโยเกิร์ตน้ำนมข้าวโพด	เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2548	การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและแอนโธไซยานินในไวน์ผลไม้	เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Krusong, W., S. Pornpukdeewatana, S. Kerdpiboon and S. Tantratian. 2014. Prediction of influence of stepwise increment of initial acetic acid concentration in charging medium on acetification rate of semi-continuous process by artificial neural network. LWT-Food Science and Technology. 56: 383-389.

ผลงานวิชาการนำเสนอในที่ประชุมระดับชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Krusong, W., A. Sawetwiwat, **S. Pornpukdeewattana,** A. Vijittraka and S. Tantratian. 2006. Prolonged shelf life of fresh chicken meat by using Vinegar. The 8th Agro-Industrial Conference 15th -16th June 2006, BITEC, Bangkok

ผลงานวิชาการนำเสนอในที่ประชุมระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Pornpukdeewattana, S., C.A. Boulton and K.A. Smart. 2011. Optimization of temperature for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. BBSRC Workshop 30th-31st March 2011, Downing College, University of Cambridge, Cambridge, UK. (Poster Presentation)

Pornpukdeewattana, S., C.A. Boulton and K.A. Smart. 2010. Optimization of bioethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*. Lace Conference 9th -10th September 2010, U. of Nottingham, Nottingham, UK. (Oral presentation)

Pornpukdeewattana, S., C.A. Boulton and K.A. Smart. 2010. Understanding the stresses encountered during bioethanol fermentations. Second International Symposium for Young Scientists and Technologists in Malting, Brewing and Distilling 19th -21st May 2010, Freising – Weihenstephan, Germany (Oral presentation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติส่วนตัว : ผู้ร่วมโครงการ

ชื่อ-สกุล ดร.โสรยา เกิดพิบูลย์

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
D.Eng	Food Engineering	มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี	2549
วท.ม.	วิทยาศาสตร์การอาหาร	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	2545
วท.บ.	ผลิตภัณฑ์ประมง	มหาวทยาลัยเกษตรศาสตร์	2543

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

(1) Thermal processing,
(2) Drying
(3) Structural and physical properties of foods during thermal process
(4) Image processing,
(5) Simulation,
(6) Artificial neural network to food prediction
(7) Optimization and correlation
(8) Meat and poultry processing
(9) Fishery processing

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2555-56	สัณฐานวิทยาและสมบัติเชิงกายภาพของข้าวฮางในระหว่างการหุง	มูลนิธิโทเรเพื่อการส่งเสริมทางวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย
2554-55	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหุงข้าวฮาง	คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2553-55	ผลของสมบัติเชิงวิทยากระแสของโจ๊กข้าวฮางที่มีต่อโครงสร้างและสมบัติเชิงกายภาพของผลิตภัณฑ์อบแห้ง	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
2552-54	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโจ๊กผสมฟักทอง	สวพ. มก.
2553	ผลของวิธีการและสภาวะการอบแห้งที่มีต่อสมบัติเชิงกลและเชิงกายภาพของเนื้อจีจากเนื้อโคโพนยางคำ	สวพ. ฉกส.
2552-53	การปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของทามาโกะแช่เยือกแข็ง	โครงการ IRPUS ประจำปี 2552 (สกว.)
2551-52	การพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์สลัดผักปรุงรส (สไตล์	โครงการ IRPUS ประจำปี 2551 (สกว.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	ญี่ปุ่น)	
2551-52	การศึกษากระบวนการผลิตเนยฟักทอง	คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร
2550-51	การปรับปรุงคุณภาพด้านสี (ความขาว) ของซูริมิที่ผลิตจากปลาแช่เยือกแข็ง	โครงการ IRPUS ประจำปี 2550 (สกว.)

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

โสรยา เกิดพิบูลย์. 2554. การพัฒนาการผลิตสลัดผักปรุงรส. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 42(2) (พิเศษ): 281-284.

โสรยา เกิดพิบูลย์ ธงชัย พุฒทองศิริ และ สักกมน เทพหัสดิน ณ อยุธยา. 2554. ผลของอุณหภูมิอบแห้งที่มีต่อสมบัติเชิงกายภาพและลักษณะการไหลของโจ๊กผสมฟักทองกึ่งสำเร็จรูป. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 42(2)(พิเศษ): 445-448.

โสรยา เกิดพิบูลย์ ชาติสยาม ผลวิลัย และสิรินาฎ เนติศรี. 2553. สมบัติเชิงกายภาพบางประการและการยอมรับทางประสาทสัมผัสของโจ๊กผสมฟักทอง. วารสารอุตสาหกรรมเกษตรพระจอมเกล้า. ได้รับพิจารณาตีพิมพ์.

โสรยา เกิดพิบูลย์ จักรพงษ์ โสวะพันธ์ ประกาย ผิวทอง และ อรอนงค์ ฐาปนพันธ์นิติกุล. 2554. ผลของอิมัลซิไฟเออร์และเวลาที่ใช้ในการผสมต่อสมบัติเชิงกายภาพของฟักทองสเปรด. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น. 16(1). 32-40.

โสรยา เกิดพิบูลย์ และ วัชรวิทย์ มีหนองใหญ่. 2553. แนวทางการใช้ประโยชน์จากกระบือเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร. วารสารอุตสาหกรรมเกษตรพระจอมเกล้า. 2(2): 23-30.

โสรยา เกิดพิบูลย์ กรรณิกา ชวลิตปฏิญญา และ สุดารัตน์ พรมดวง. 2552. ผลของกระบวนการล้างเนื้อปลาบดด้วยสารละลายด่างต่อคุณภาพด้านสีและลักษณะเนื้อสัมผัสของซูริมิที่ผลิตจากปลาแช่เยือกแข็ง. วารสารอุตสาหกรรมเกษตรพระจอมเกล้า. 1(1): 34-41.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Krusong, W., S. Pornpukdeewatana, **S. Kerdpiboon** and S. Tantratian. 2014. Prediction of influence of stepwise increment of initial acetic acid concentration in charging medium on acetification rate of semi-continuous process by artificial neural network. LWT-Food Science and Technology. 56: 383-389.

Niamnuy, C., **S. Kerdpiboon** and S. Devahastin. 2012. Artificial neural network modeling of physicochemical changes of shrimp during boiling. LWT- Food Science and Technology. 45: 110-116.

Klaypradit, W., **S. Kerdpiboon** and R.K. Singh. 2011. Application of artificial neural networks to predict the oxidation of menhaden fish oil obtained from Fourier transform infrared spectroscopy method. Food and Bioprocess Technology. 4: 475-480.

Kerdpiboon, S. and S. Devahastin. 2007. Fractal characterization of some physical properties of a food product under various drying conditions. Drying Technology. 25: 135-146.

Kerdpiboon, S, S. Devahastin and W.L. Kerr. 2007. Comparative fractal characterization of physical changes of different food products during drying. Journal of Food Engineering. 83: 570-580.

Kerdpiboon, S., W.L. Kerr, S. Devahastin. 2006. Neural network prediction of physical property changes of dried carrot as a function of fractal dimension and moisture content. Food Research International. 39: 1110-1118.

ผลงานวิชาการนำเสนอในที่ประชุมระดับชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Kerdpiboon, S., W. Pilachun, T. Tuksima. 2011. "Selected physical properties of jerky produced from Pon

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ang Kham G-Beef," Thailand Research Symposium 2011, Thailand. (In English).

โสรยา เกิดพิบูลย์. 2554. การพัฒนาการผลิตสลัดผักปรุงรส. นำเสนอผลงาน งานประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยพืชเขตร้อนและกึ่งร้อนครั้งที่ 5. วันที่ 21-22 กรกฎาคม 2554. มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย ดินแดง กรุงเทพมหานคร.

โสรยา เกิดพิบูลย์ ธงชัย พุฒทองศิริ และ สักกมน เทพหัสดิน ณ อยุธยา. 2554. ผลของอุณหภูมิอบแห้งที่มีต่อสมบัติเชิงกายภาพและลักษณะการไหลของโจ๊กผสมฟักทองกึ่งสำเร็จรูป. นำเสนอผลงาน งานประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยพืชเขตร้อนและกึ่งร้อนครั้งที่ 5. วันที่ 21-22 กรกฎาคม 2554. มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย ดินแดง กรุงเทพมหานคร.

ผลงานวิชาการนำเสนอในที่ประชุมระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Kerdpiboon, S. and D. Charoendee. 2012. "Comparative physical characterization of water ratio changes of Hang rice during cooking," *Oral Presentation In* Proceedings of 2012 International Conference on Nutrition and Food Sciences (ICNFS 2012), 23-24 July, 2012, Singapore.

Kerdpiboon, S., T. Puttongsiri, and S. Devahastin. 2012. "Physical property and sensory acceptance of Hange rice porridge," International Conference on Food and Applied Bioscience: The 3rd Agro-Industry Conference, Kantary Hill Resort, Chiang Mai, Thailand. 6-7 February, 2012.

Puttongsiri, T., **S. Kerdpiboon** and A. Vichitraka. 2012. "Shelf life extension of semi dried Sepat-Siam (*Trichogaster pectoralis*) using of Chitosan," *International Conference on Food and Applied Bioscience: The 3rd Agro-Industry Conference, Kantary Hill Resort, Chiang Mai, Thailand.* 6-7 February, 2012.

Kerdpiboon, S. and S. Devahastin. 2010. "Flow characteristics and selected physical properties of porridge mixed with pumpkin," International Conference on Agriculture and Agro-Industry (ICAAI2010) Food, Health and Trade, Chiangrai, Thailand. 19-20 November, 2010].

Klaypradit, W., **S. Kerdpiboon**, and R.K. Singh. 2009. "Application of artificial neural networks to predict the oxidation of menhaden fish oil obtained from fourier transform infrared spectroscopy method." IFT Annual Meeting & Food Expo, Anaheim, CA, USA.

ประวัติส่วนตัว : ผู้ร่วมโครงการ

ชื่อ-สกุล นางสาวจีรนันท์ ศรีสุธรรม

ตำแหน่งปัจจุบัน นักศึกษาปริญญาโท

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	เทคโนโลยีการหมัก	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติส่วนตัว : ที่ปรึกษาโครงการ

ชื่อ-สกุล ดร.สุเมธ ตันตระเธียร

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
Ph.D	Food Science & Technology	U. of Missouri – Columbia	2532
MS	Food Science & Technology	Mississippi State U	2527
วท.บ	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2525

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

(1) สุขาภิบาลอาหาร

(2) การหมักอาหาร

(3) การเปลี่ยนแปลงของอาหารเนื่องจากการแช่เยือกแข็ง

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Kerdsup, P., **S. Tantratian,** R. Sanguandeekul and C. Imjongjirak. 2011. Xanthan production by mutant strain of *Xanthomonas campestris* TISTR 840 in raw cassava starch medium, Food Bioprocess Technol. 4(8):1459-1462.

Ohkuma, C., K. Kawai, C. Viriyarattanasak, T. Mahawanich, **S. Tantratian,** R. Takai and T. Suzuki. 2007. Glass transition properties of frozen and freeze-dried surimi products: Effects of sugar and moisture on the glass transition temperature. Food Hydrocolloids. 22(2): 255-262

Pornrat, S., **S Tantratian**, Romanee, S., Sumolaya, K. and Kerr, W.L. 2007. Changes in the ultrastructure and texture of prawn muscle (*Macrobrachium rosenbergii*) during cold storage. LWT Food Science and Technology. 40(10): 1747-1754.

Borompichaicartkul, C., L. Wiset, V. Tulayatun, **S. Tantratian,** Thetsupamorn, R. Impaprasert and I. Waedalor. 2007. Comparative study of effects of drying methods and storage conditions on aroma and quality attributes of Thai jasmine rice. Drying Tech. 25: 1185-1192.

Boonsumrej. S., S. Chaiwanichsiri, S. Tantratian, T. Suzuki and R. Takai. 2007. Effect of freezing and thawing on the quality of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) frozen by air-blast and cryogenic freezing. J. Food Eng 80(1): 292-299.

ผลงานวิชาการนำเสนอในที่ประชุมระดับชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Tantratian, S., T. Suzuki and R. Takai. 2008. Changes in ice-crystal formations in shrimps (*Penaeus japonicas*) during freezing and subsequence frozen storage. J. Sci. Research, Chulalongkorn University. 33(2): 74-80.

ผลงานวิชาการนำเสนอในที่ประชุมระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Pradeamchai, M., C. Prakitchaiwattana and **S. Tantratian**. 2012. Glass transition temperature of protective agent that affecting the survival of *Lactobacillus plantarum* FT35 during spray dried. Pure and Applied

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chemistry International Conference 2012; 809-812.

Tantratian, S., J. Setjintanin and R. Sanguandeekul. 2011. Improving the quality of cold storage black tiger prawn (*Penaeus monodon*) using ozonated water. 2011 2nd Intertnational Conference on Biotechnology and Food Science;105-09.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้