บทนำ

สืบเนื่องจากผู้วิจัยได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 เป็นต้นมา ทำให้เกิดองค์ความรู้ตั้งแต่การคัดเลือก พัฒนา และเก็บรักษาหัวเชื้อน้ำส้มสายชู ซึ่งหัวเชื้อที่ได้พัฒนาขึ้นประกอบด้วยเชื้อ *Acetobacter aceti* สป5 และ *A. aceti* WK (ที่สามารถใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมได้แล้ว) รวมถึงองค์ความรู้เกี่ยวกับกระบวนการผลิตในถังหมักประเภทต่างๆ เช่น ถังหมักแบบให้อากาศ (Airlift fermenter) ถังหมักแบบมีใบพัดกวน (Stirred tank reactor) ถังหมักแบบหมุนวนน้ำหมัก (Recycled mash reactor) และ ถังหมักที่มีการกวนในอัตราสูง (High speed agitation) โดยมีเป้าหมายในการพัฒนาองค์ความรู้ของกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูเพื่อเชิงพาณิชย์ในระดับวิสาหกิจชุมชน ระดับกึ่งโรงงาน (Pilot scale) และระดับโรงงาน (Commercial scale) เป็นสำคัญ อย่างไรก็ตามเพื่อเพิ่มแนวทางเลือกที่เหมาะสมต่อขนาดการผลิตของแต่ละระดับรวมถึงการเลือกใช้วัสดุธรรมชาติมาใช้ในกระบวนการผลิต ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการพัฒนากระบวนการผลิตโดยเลือกใช้การตรึงเซลล์แบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติก (Acetic Acid Bacteria) บนใยบวบ (Luffa sponge) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาของผู้วิจัยพบว่า ใยบวบเป็นพืชที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์ดังกล่าว (Krusong *et al.*, 2007; 2010) แต่ประสิทธิภาพในการผลิตกรดอยู่ในเกณฑ์ 4-5% ภายในระยะเวลา 9-10 วัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกจากเชื้อ *A. aceti* WK ที่ตรึงอยู่บนใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศขนาด 10 ลิตร และสามารถดำเนินการผลิตในลักษณะ Semi-continuous fermentation ได้อย่างดี รวมถึงเป็นต้นแบบในการขยายขนาดการผลิตเป็นระดับกึ่งโรงงานต่อไป

ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกของเชื้อ *A. aceti* WK ในระบบการตรึงเซลล์บนใยบวบด้วย 2 วิธี วิธีแรก คือการให้ออกซิเจนโดยจะมุ่งเน้นผลของการให้อากาศในช่วงของการปรับสภาพเซลล์ในช่วงเริ่มต้นการหมักและผลของการให้อากาศในช่วงการหมักน้ำส้มสายชู ส่วนวิธีที่สองจะอาศัยการเติมสารอาหารในช่วงของการหมักในลักษณะของการหมักแบบ Fed batch fermentation

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ประกอบด้วย

1. ศึกษาผลของการให้ออกซิเจนต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกจากเชื้อ *A. aceti* WK ที่ตรึงอยู่บนใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศขนาด 10 ลิตร
2. ศึกษาผลของการให้สารอาหารต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกจากเชื้อ *A. aceti* WK ที่ตรึงอยู่บนใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศ
3. ผลของใยบวบต่อปริมาณของน้ำหมักที่ดึงออกด้วยระบบ Semi-continuous fermentation ในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมัก
4. กำหนดต้นแบบกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบการตรึงเซลล์เชื้อ *A. aceti* WK เพื่อการขยายขนาดการผลิตเป็นระดับกึ่งโรงงาน

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ดำเนินการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกของ "หัวเชื้อ *A. aceti* WK" ที่ตรึงเซลล์บนใยบวบในถังหมักยกอากาศ (Airlift fermenter) ที่มีระบบการหมุนวนของน้ำหมักต้นแบบขนาด 10 ลิตร (ทำจากสแตนเลส 304) โดยอาศัยการให้ออกซิเจน และการให้สารอาหาร รวมถึงการหมักในระบบ Semi-continuous fermentation และการกำหนดปัจจัยในการขยายขนาดการผลิตเป็นระดับกึ่งโรงงาน

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

น้ำส้มสายชูหมักเกิดจากขั้นตอนการหมัก 2 ขั้นตอน ประกอบด้วย การหมักวัตถุดิบที่มีแป้งหรือน้ำตาลเป็นองค์ประกอบให้เป็นไวน์ด้วยเชื้อยีสต์ในสภาพที่ไม่มีอากาศ และขั้นตอนการหมักไวน์ที่ได้ในขั้นตอนแรกด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* ในสภาพที่ให้อากาศ (Adams, 1998)

ตามปกติแล้วการตรึงเซลล์ (Cell immobilization) เป็นเทคนิคในการเซลล์จุลินทรีย์ไว้กับตัวกลาง (Support) การตรึงเซลล์นิยมใช้ในการปรับปรุงกระบวนการหมักเนื่องจากช่วยในการเพิ่มชีวมวล (Biomass) ความสามารถในการใช้ซ้ำ (Reusability) รวมถึงการป้องกันเซลล์จากผลกระทบเชิงลบจากปัจจัยต่างๆซึ่งประกอบด้วยค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำ หรือ อุณหภูมิ หรือ สารยับยั้ง (Inhibitors) (Brodelius and Vndamme, 1987) นอกจากนี้การตรึงเซลล์ยังเป็นขั้นตอนเบื้องต้นที่ช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์ใส สำหรับตัวอย่างของตัวกลางที่ได้มีการนำมาใช้ เช่น Monolithic support (European Patent EP0121981, 1981), Porous cellulose carrier (Sakurai *et al.*, 2000), Chitosan-treated polypropylene (Krishnan *et al.*, 2001), Fibrous inert support (WO/2002/068578, 2002) และ Polyurethane-based material (Romaskevic *et al.*, 2006) ขณะเดียวกันตัวกลางที่มีราคาถูกซึ่งสามารถช่วยลดต้นทุนของกระบวนการผลิต และเป็นสารธรรมชาติที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายภายหลังจากการใช้ก็ได้รับความสนใจมากเช่นกัน ตัวอย่างของตัวกลางในประเภทหลังนี้ อาทิ เช่น เศษไม้ (de Ory, 2003) ชานอ้อย (Kocher *et al.*, 2006) และใยบวบ (Ogbonna *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999; Hamdy, 2001; Akhtar *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Pekdemir *et al.*, 2003; Vignoli *et al.*, 2006; Ganguly *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2007; Krusong *et al.*, 2007, 2010)

บวบเป็นพืชตระกูลแตง จัดอยู่ใน Order: Cucurbitales, Family: Cucurbitaceae มีชื่อจีนัสว่า *Luffa* spp. (http://encyclopedia.thefreedictionary.com/dishcloth_gourd) สำหรับในประเทศไทยนั้นแต่เดิมส่วนใหญ่จะปล่อยให้บวบเลื้อยตามรั้วหรือปล่อยให้เลื้อยพันไปตามต้นไม้ แล้วคอยเก็บผลอ่อนมารับประทานเป็นผัก ส่วนบวบที่ไม่ได้เก็บจะปล่อยจนแก่แห้งเหลือแต่เป็นเส้นใยที่เรียกว่า "รังบวบ" หรือ "ใยบวบ" บวบที่สามารถปลูกในประเทศไทยประกอบด้วย บวบเหลี่ยม บวบงู และบวบหอม ทั้งนี้บวบเหลี่ยม (*Luffa acutangular* Roxb.) มีชื่อสามัญว่า Angeld loofah เป็นไม้เถาอายุปีเดียว ผลของบวบมีรูปทรงกระบอกมีเหลี่ยมตามความยาวของผล ขณะที่บวบงู (*Trichosanthes anguina* Linn.) มีชื่อสามัญว่า Snake gourd ผลลักษณะกลมยาวปลายผลแหลม ผิวเรียบ มีแถบสีขาวสลับเขียวทั้งผล เมื่อสุกมีสีส้มแดง ส่วนบวบหอม (*L. cylindrica* Roem.) มีชื่อสามัญว่า Smooth loofah หรือ Sponge gourd vegetable sponge ผลอ่อนสีเขียวมีลายเขียวเข้ม ผลแก่สีเขียวออกเหลืองจนถึงสีน้ำตาล มีเส้นใยเหนียวลักษณะเป็นร่างแห (สิริกุล, 2548; http://www.geocities.com/ dordek1/ Thailand_d5htm) ในต่างประเทศอาจเรียกบวบในลักษณะต่างๆ เช่น Dishcloth gourd (http://www.thefreedictionary.com/ dishcloth+gourd; http://ecobites.com/component/content/839? task =view), Chinese okra (http://plantanswers.tamu.edu/ vegetables/Chineseo.html) หรือ "Luffa sponge" ใยบวบนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ตั้งแต่ใช้ผลอ่อนมาประกอบอาหารโดยนิยมบริโภคในประเทศแถบเอเชียซึ่งรวมถึงประเทศไทย ขณะที่เส้นใยในผลแก่จะถูกนำมาใช้แทนฟองน้ำในนการขัดตัวขณะอาบน้ำ หรือ ใช้เป็นอุปกรณ์ล้างจาน (Washing items) หรือ สบู่ใยบวบ (Luffa soap) นอกจากนี้แล้วยังมีการทำใยบวบให้เป็นผงและใช้เป็นยาจีน (Chinese herbal medicine) ด้วย (http://www.luffa.info/)

ใยบวบได้ถูกเลือกให้เป็นตัวกลางเพื่อใช้ในการตรึงเซลล์ โดยเรียกว่าเป็น "Fibrous support" เนื่องจากโครงร่างที่เป็นเส้นใย ใยบวบที่นิยมใช้ในงานนี้ คือ ใยบวบหอม (*L. cylindrica*) และมักนิยมเรียกชื่อสามัญว่า "Loofa sponge" ทั้งนี้การประยุกต์ใช้ใยบวบมีหลากหลาย เริ่มตั้งแต่การผลิตผลิตภัณฑ์และการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในกระบวนการหมัก ดังเช่น การหมักแอลกอฮอล์โดยการตรึงเชื้อยีสต์ *Candida brassicae* (Ogbonna *et al.*, 1997) การตรึงสปอร์ของเชื้อรา *Penicillium cyclopium* NRRL 6233 เพื่อผลิต Compactin ซึ่งเป็นสาร Hypocholesteremic agent (Hamdy, 2001; US Patent 6261811) การตรึงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อผลิตไวน์และเบียร์ที่ใส (WO/2002/068578) การตรึงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* RBU2-10 เพื่อผลิตกรดแลคติก (Ganguly, 2006) การตรึงเซลล์ยีสต์ *Zymomonas mobilis* เพื่อผลิตซอบิทอล (Vignoli *et al.*,

2006) และการตรึงเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* WK เพื่อผลิตน้ำส้มสายชูจากข้าวโพด (Krusong *et al.*, 2007; 2010) นอกจากนี้ยังมีการนำใยบวบ (Loofa sponge) ไปใช้ในทางการแพทย์ เช่น การเคลือบสารฆ่าเชื้อ (Germicide) บนใยบวบ (WO/2000/006210) การใช้ใยบวบเพื่อเป็นอุปกรณ์ในการรักษาความสะอาดในช่องปาก เพื่อช่วยลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เคลือบอยู่ที่ผิวฟันโดยใช้แทนแปรงสีฟัน (Schwartz *et al.*, 2007) ใยบวบยังมีการนำมาใช้ในงานที่เกี่ยวกับสิ่งแวดล้อมดังเช่น การเพิ่มประสิทธิภาพสารฆ่าสาหร่าย (Algicidal agent) ด้วยการตรึงแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* HYK0210-SK09 ที่มีฤทธิ์ในการสร้างสารฆ่าสาหร่าย *Stephanodiscus hantzschii* (Kang *et al.*, 2007) การใช้ใยบวบในการดึงโลหะหนักจากน้ำเสีย เช่น แคดเมียม (Akhtar *et al.*, 2003) และประจุเฟอรัส (Ferrous ion) (Pekdemir *et al.*, 2003) รวมถึงการใช้ใยบวบเป็นตัวกลางที่ใช้ในระบบการหมักมีเธน (Yang *et al.*, 2004) เป็นต้น

สำหรับกระบวนการตรึงเซลล์ได้มีการนำใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกโดยเรียกว่า "กระบวนการ Quick process" ซึ่งอาศัยหลักการในการเลือกใช้วัสดุประเภท Inert material เพื่อช่วยยึดเซลล์ของแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติก (Acetic acid bacteria) วัสดุต่างๆที่เลือกใช้ประกอบด้วย Ceramic support (Ghommidh *et al.*, 1982a, 1982b), เศษไม้ (de Ory *et al.*, 2003), ชานอ้อย (Kocher *et al.*, 2006) และใยบวบ (Krusong *et al.*, 2007; 2010) เป็นต้น อย่างไรก็ตามประเด็นปัญหาของกระบวนผลิตด้วยการตรึงแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติกด้วยตัวกลางนี้ คือ ประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกที่ยังไม่สูงมาก ดังนั้น ในการวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกจากเชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* WK โดยอาศัยการตรึงบนใยบวบซึ่งผู้วิจัยได้พิสูจน์แล้วว่าสามารถใช้เป็นตัวกลางในการยึดเซลล์แบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ ในการศึกษาจะมุ่งเน้นที่การให้ออกซิเจนเข้าสู่ระบบ และการให้สารอาหารในลักษณะของ Fed batch fermentation ในถังหมักระบบยกอากาศและมีระบบหมุนวนน้ำหมักเป็นสำคัญ