

วิธีการทดลอง



เชื้อยีสต์

เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30

เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์ คือ เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ซึ่งต่อไปในรายงานจะเรียกว่า “เชื้อยีสต์ M30” เป็นเชื้อยีสต์ในกลุ่มเชื้อยีสต์ตกตะกอน (Flocculate yeast) ซึ่งได้รับอนุเคราะห์จาก ดร.จรูญ คำนวนตา อดีตผู้อำนวยการ สกว. ฝ่ายอุตสาหกรรม และ ศ.ดร. สาวิตรี ลิ้มทอง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในการเตรียมหัวเชื้อยีสต์ทำโดยการเจีย “เชื้อยีสต์ M30” ที่เลี้ยงในอาหาร MY agar slant นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ลงในอาหารเหลว MY 100 มล. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm นาน 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักไวน์ต่อไป

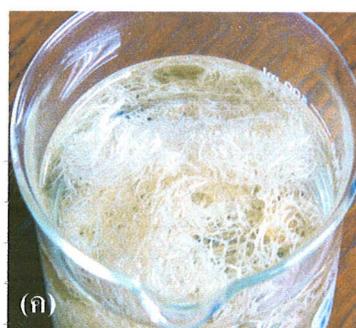
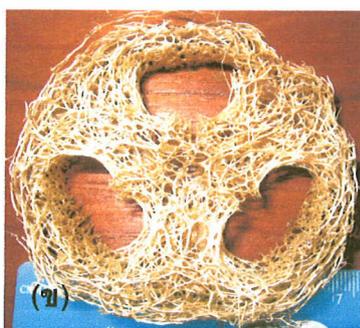
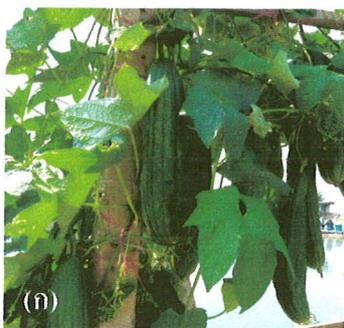
แบคทีเรีย *Acetobacter aceti* WK

หัวเชื้อที่ใช้ คือ *A. aceti* WK (ซึ่งต่อไปจะเรียกว่า “หัวเชื่อน้ำส้ม WK”) เป็นหัวเชื่อน้ำส้มสายชูที่คัดเลือกและปรับปรุง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-ปัจจุบัน ที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนึ่ง “หัวเชื่อน้ำส้ม WK” ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้ผ่านการพัฒนาปรับปรุงให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกจากไวน์ข้าวโพด (Corn vinegar) แล้วดังรายงานวิจัยของ Krusong *et al.* (2007; 2010) ดังนั้นจึงสามารถใช้ “หัวเชื่อน้ำส้ม WK” ในการศึกษาได้

การเตรียมใยบวบ

ใยบวบที่ใช้ในการทดลองมาจากบวบหอม (*Luffa cylindrica* Roem.; ภาพที่ 1ก) มีลักษณะเป็นใยแห้ง ใยบวบแห้งที่ใช้เป็นวัสดุตั้ง (Supporting material) ของเซลล์ “หัวเชื่อน้ำส้ม WK” จะถูกตัดให้มีขนาดความหนา 2.5 ซม. (Krusong *et al.*, 2007; ภาพที่ 1ข) ก่อนที่จะนำไปล้างและฆ่าเชื้อด้วยการแช่ในน้ำส้มสายชูความเข้มข้นกรด 4% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วรารุณี ครุส่ง, 2551)



ภาพที่ 1 ลักษณะของใยบวบที่ใช้เป็นวัสดุตั้งเซลล์ “หัวเชื่อน้ำส้ม *A. aceti* WK” : (ก) ลักษณะต้นและผลของบวบหอม; (ข) ใยบวบที่ตัดพร้อมใช้งาน; (ค) ใยบวบที่แช่ในน้ำส้มสายชูความเข้มข้นกรด 4% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การผลิตไวน์จากข้าวโพด

ทำการหมักไวน์ข้าวโพดตามวิธีการของ วรารุณี ครุส่ง (2545) โดยใช้ข้าวโพด 5% ปรับสภาพความหวานในน้ำหมักเท่ากับ 20% pH เท่ากับ 5.5 และเติมแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05% และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.2% (ตัดแปลงจาก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่..... 20 มิ.ย. 2551
เลขทะเบียน..... 235895

Kumnuanta and Vongsuvanlert, 1982) ทำการฆ่าเชื้อด้วยการต้มเคี่ยวเป็นเวลา 30 นาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปหมักด้วย “เชื้อยีสต์ M30” เป็นเวลา 5-7 วัน ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส

เมื่อการหมักสิ้นสุดให้นำน้ำไวน์ที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการพาสเจอร์ไรส์ก่อนที่จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักน้ำส้มสายชูต่อไป

การหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโพด

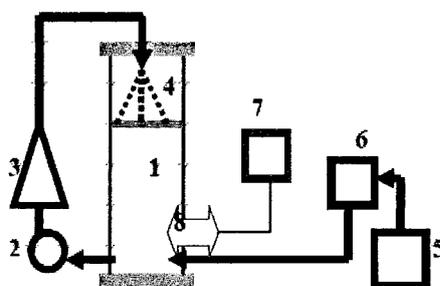
ทำการปรับสภาพน้ำไวน์ข้าวโพดด้วยน้ำส้มสายชูหมักให้มีความเข้มข้นของกรดอะซิติก 4.5% ปริมาณแอลกอฮอล์ 3.5% และเติมยีสต์สกัด 0.5% (วรารุณี ครุส่ง, Unpublished data) ก่อนที่จะถ่าย “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ที่ผ่านการปรับสภาพให้เหมาะสมกับไวน์ข้าวโพดแล้ว ทำการหมักในถังหมัก “ระบบการหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมัก” ขนาด 10 ลิตร ทำการหมักแบบ Semi-continuous fermentation ตามวิธีการของ Krusong *et al.* (2007) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Ebullimeter พร้อมทั้งวัดค่าความเป็นกรด (ในรูปของกรดอะซิติก) ด้วยการไตเตรชันตามวิธีการของ AOAC (1995) ตลอดระยะเวลาการหมัก

การออกแบบและปรับปรุงระบบการหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมักเพื่อใช้ในการตรึงเซลล์ด้วยยิบบวม

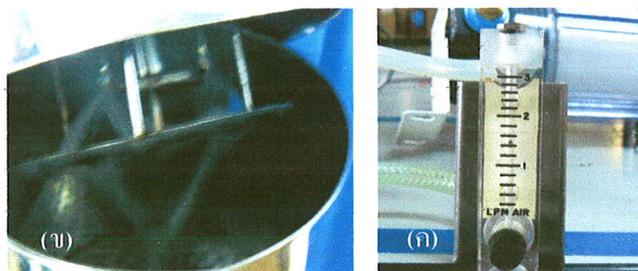
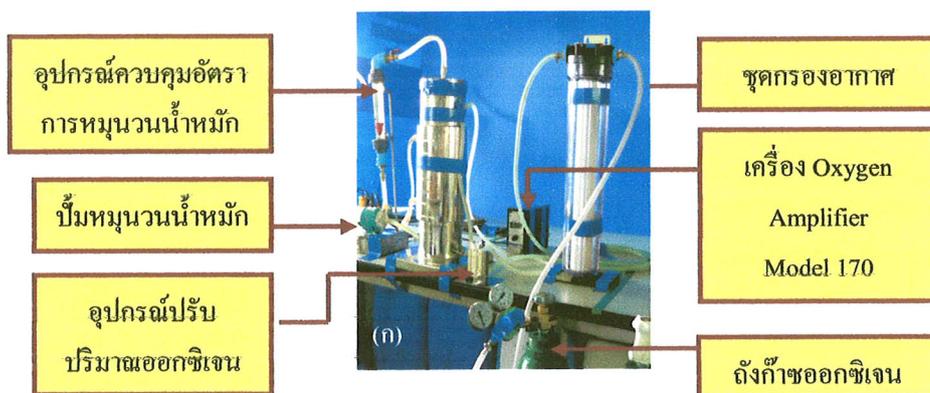
สืบเนื่องจากการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยซึ่งแสดงใน Krusong *et al.* (2007) ได้ออกแบบระบบการหมักในถังหมัก Tower fermenter ขนาด 10 ลิตร ที่ทำจากพลาสติกแต่ให้ปริมาณกรดที่ไม่สูงนัก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องออกแบบและปรับปรุงถังหมักแบบยกอากาศ (Airlift fermenter) ที่มีการหมุนวนของน้ำหมักและเหมาะสมกับระบบการให้ออกซิเจนและการให้สารอาหารเข้าไปในระบบการหมัก ถังหมักที่ใช้ทำจากสแตนเลส 304 ขนาด 10 ลิตร

สำหรับภาพที่ 2 แสดงให้เห็นรูปแบบของระบบการหมักที่ได้รับการออกแบบ



- ภาพที่ 2 รูปแบบของระบบการหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนน้ำหมัก : (1) ถังหมักขนาด 10 ลิตร; (2) บั๊ม; (3) อุปกรณ์ควบคุมอัตราการหมุนวนน้ำหมัก; (4) อุปกรณ์กระจายน้ำหมัก; (5) ถังกักออกซิเจน; (6) ชุดกรองอากาศ; (7) เครื่อง Oxygen Amplifier Model 170; (8) DO Probe

การติดตั้งอุปกรณ์ของถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมักแสดงอยู่ในภาพที่ 3ก ทั้งนี้อากาศ / ออกซิเจนที่ส่งเข้าถังหมักจะผ่านการกรองก่อนที่จะผ่านการปรับด้วยอุปกรณ์ปรับปริมาณอากาศ / ออกซิเจน (ภาพที่ 3ค) อากาศจะถูกนำเข้าทางด้านล่างของถังเพื่อให้อากาศในระบบยกอากาศ (Airlift) ขณะเดียวกันน้ำหมักภายในถังจะถูกดูดออกจากถังหมักด้วยปั๊มก่อนที่จะผ่านอุปกรณ์ควบคุมอัตราการหมุนวนน้ำหมักเพื่อปรับอัตราการหมุนวนน้ำหมักกลับเข้าไปสู่ด้านบนของถังหมัก เมื่อน้ำหมักถูกปั๊มขึ้นด้านบนแล้วจะถูกพ่นผ่านอุปกรณ์กระจายน้ำหมัก (ภาพที่ 3ข) ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นตะแกรงเจาะรู เพื่อกระจายน้ำหมักให้สัมผัสกับอากาศบริเวณด้านบนของถัง อนึ่งปริมาณอากาศ / ออกซิเจนในระบบจะวัดด้วยค่าปริมาณอากาศที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen; DO) ด้วยเครื่อง Oxygen Amplifier Model 170 โดยมีหัววัด (DO probe) ติดตั้งอยู่ที่ถังหมัก



ภาพที่ 3 ลักษณะและอุปกรณ์ประกอบถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมัก : (ก) ถังหมักที่ติดตั้งอุปกรณ์พร้อมใช้งาน; (ข) อุปกรณ์กระจายน้ำหมักบริเวณส่วนบนของถังหมัก; (ค) อุปกรณ์ปรับปริมาณอากาศ / ออกซิเจน

ผลของการให้ออกซิเจนต่อการลดระยะแลค (Lag phase) ของการปรับสภาพเซลล์เมื่อเริ่มต้นระบบการหมักในระบบการตรึงเซลล์ด้วยไยบวบ

ทำการศึกษาระยะเวลาในการให้ออกซิเจนต่อการปรับสภาพของเซลล์ของ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดอะซิติกและผ่านการคัดเลือกและปรับสภาพจากผู้วิจัยเป็นเวลานานมากกว่า 7 ปี อย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้ระยะเวลาในการให้ออกซิเจนจะเป็นช่วงๆ โดยมุ่งเน้นที่การควบคุมค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO) ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการปรับตัวของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู

อนึ่งทำการหมักโดยอาศัยการตรึงหัวเชื้อน้ำส้มสายชูบนไยบวบตามวิธีการของ Krusong *et al.* (2007)

ผลของการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในระบบการตรึงเซลล์ด้วยไยบวบ

นำผลของการศึกษาผลของการให้ออกซิเจนต่อการลดระยะแลค (Lag phase) ของการปรับสภาพเซลล์เมื่อเริ่มต้นระบบการหมักในระบบที่มีและไม่มีกรตรึงเซลล์ด้วยไยบวบเพื่อพิจารณาถึงความจำเป็นที่ต้องเติมอากาศเข้าไปในระบบ

จากนั้นทำการหมักน้ำส้มสายชูในสภาพการศึกษาที่พิจารณาแล้ว โดยมุ่งเน้นประสิทธิภาพการเพิ่มผลผลิตกรดอะซิติกในระบบการตรึงเซลล์ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ด้วยไยบวบในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมัก

ผลของการเติมสารอาหารต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในระบบการตรึงเซลล์ด้วยไยบวบ

ทำการศึกษาผลของการให้สารอาหารเพิ่มเติมในระหว่างขั้นตอนการหมักน้ำส้มสายชู โดยสารอาหารที่เลือกใช้ คือ แอลกอฮอล์ โดยในช่วงเริ่มต้นการหมักน้ำส้มสายชูจะทำการปรับความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration; TC) เท่ากับ 8 ซึ่งประกอบด้วย กรดอะซิติก 4.5% และ แอลกอฮอล์ 3.5% เมื่อทำการหมักไปจนถึงช่วงแอลกอฮอล์เหลือประมาณ 2% จึงทำการปรับแอลกอฮอล์ให้กลับมีความเข้มข้นเท่ากับ 3.5% อีกครั้ง

การศึกษาในลักษณะนี้จะทำให้ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” สามารถใช้แอลกอฮอล์ (ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักสำหรับเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก) ที่มีความเข้มข้นที่สูงขึ้นได้

ผลของใยบวบต่อปริมาณของน้ำหมักที่ดึงออกด้วยระบบ *Semi-continuous fermentation* ในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมัก

นำผลการศึกษาในเรื่องการให้ออกซิเจนและการเพิ่มสารอาหารมาพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในถังหมักแบบยกอากาศที่มีการหมุนวนของน้ำหมักของ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ในสภาพที่มีการตรึงเซลล์หัวเชื้อน้ำส้มสายชูด้วยใยบวบ จากนั้นทำการศึกษากระบวนการหมักในลักษณะ *Semi-continuous fermentation* ซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่นิยมใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในระดับอุตสาหกรรม

ต้นแบบกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบการตรึงเซลล์เชื้อ *A. aceti* WK เพื่อการขยายขนาดการผลิตเป็นระดับกึ่งโรงงาน

นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาออกแบบต้นแบบกระบวนการที่จำเป็นต้องคำนึงถึงเพื่อขยายขนาดการผลิตเป็นระดับกึ่งโรงงาน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) โดยวิธีวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS (Statistical Package for Social Science)