วิทยานิพนธ์

การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรด

CONTINUOUS FERMENTATION FOR VINEGAR PRODUCTION FROM PINEAPPLE WINE

นางสาวศุภาวิชญ์ฐา สุวรรณแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ	เทคโนโลยีชีวภาพ
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรด

Continuous Fermentation for Vinegar Production from Pineapple Wine

นามผู้วิจัย นางสาวศุภาวิชญ์ฐา สุวรรณแพทย์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, Dr.rer.nat.)

กรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา, Ph.D.)

กรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข ภระกูลสุขสถิตย์, Ph.D.)

กรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์วิเชียร กิจปรีชาวนิช, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรด

Continuous Fermentation for Vinegar Production from Pineapple Wine

โดย

นางสาวศุภาวิชญ์ฐา สุวรรณแพทย์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2551

ศุภาวิชญ์ฐา สุวรรณแพทย์ 2551: การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรด ปริญญาวิทยศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, Dr.rer.nat. 141 หน้า

การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรด โดยทำการคัดเลือกเชื้อ *Acetobacter aceti* 5 สายพันธุ์ดังนี้ *A. aceti* TISTR 522, 086, 107, 102 และ IFRPD โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ Hoyer พบว่า *A. aceti* IFRPD และ TISTR 102 สามารถผลิตกรดแอซีติกได้สูงที่สุดเท่ากับ 21.04 และ 12.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดด้วยวิธีการทากุชิ โดยศึกษาแบบ 4 ปัจจัย 3 ระดับ พบว่า เมื่อพิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรในระดับฟลาสก์ จะได้สภาวะ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ผสมของ *A. aceti* TISTR 102 กับ *A. aceti* IFRPD ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด 5.5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดแอซีติกได้สูงสุดเท่ากับ 42.37 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรที่ได้คือ 0.80 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง และการผลิตกรดแอซีติกในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เมื่อพิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร สามารถผลิตกรดแอซีติกได้สูงสุดเท่ากับ 48.08 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรเท่ากับ 0.60 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง

การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยศึกษาผลของอัตราการเจือจางพบว่า อัตราการเจือจาง 0.05 ต่อชั่วโมง มีอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร 0.93 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง และได้ความเข้มข้นกรดแอซีติกเท่ากับ 18.63 กรัมต่อลิตร ณ สภาวะคงตัว และเมื่อทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์สับปะรด โดยมีสารให้ความหวาน 4 ชนิด คือ มอลทิทอล ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ไซลิทอล และน้ำผึ้ง เป็นวัตถุดิบกำหนดการเติมแต่ง 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักมีคะแนนอยู่ในช่วง 4-6 ส่วน ความชอบโดยรวม เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์มีคะแนนความชอบสูงสุด โดยไม่มีความแตกต่างกับเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมมอลทิทอล แต่มีความแตกต่างกับเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมไซลิทอลกับน้ำผึ้ง

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Supawitta Suwannapate 2008: Continuous Fermentation for Vinegar Production from Pineapple Wine. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotecnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Sarote Sirisansaneeyakul, Dr.rer.nat. 141 pages.

Continuous fermentation for vinegar (acetic acid) production from pineapple wine by the selected *Acetobacter aceti* 5 species including *A. aceti* TISTR 522, 086, 107, 102 and IFRPD were studied. From the experiment, it was found that *A. aceti* IFRPD and *A. aceti* 102 can produce the highest acetic acid at 21.04 g/l and 12.5 g/l, respectively.

Taguchi method at 4 factors and 3 levels was used to find the optimal conditions for acetic acid production. It was found that the optimal conditions were mixed microorganisms of *A. acetic* TISTR 102 and *A. aceti* IFRPD in the ratio of 1:1, inital alcohol concentration of 8%, initial pH of pineapple wine of 5.5 and incubated temperature of 30 ^{o}C. This condition produced the highest acetic acid of 42.37 g/l and acetic acid productivity of 0.80 g/l h. Acetic acid was produced in a fermentor under this optimized condition. The maximum acetic acid concentration was 48.08 g/l and acetic acid productivity was 0.60 g/l h.

Acetic acid was produced from pineapple wine by continuous fermentation. The study of dilution rate found that optimized dilution rate was 0.05 h^{-1} and the acetic acid productivity was 0.93 g/l h. Furthermore this fermentation can produce acetic acid at 18.63 g/l at steady state. From the sensory evaluation of vinegar beverage with 4 types of sweetener (maltitol, fructooligosaccharide, xylitol and honey) at 7% w/v, it was found that the average score was between 4 and 6. The beverage mixed with fructooligosaccharide gave the highest score and with no significant difference on beverage mixed with moltitol. It was, however had significant difference on fermented vinegar beverage mixed with xylitol and honey.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ และการศึกษาระดับปริญญาโทมาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประมุข ภระกูลสุขสถิตย์ กรรมการวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช กรรมการวิชารอง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาศอุบล ทองงาม ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้คำปรึกษาในการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี และอาจารย์ มาลัย บุญรัตนกรกิจ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่อนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียกรดแอซีติก

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์ยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ เพื่อนและน้องๆ ห้องวิจัย 1 และพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ น้อง นายจำรัส-นางสมบูรณ์ สุวรรณแพทย์ นางสาวปัทมาวดี สุวรรณแพทย์ และนายยอดมนู สุวรรณแพทย์ สำหรับความห่วงใย กำลังใจ และการสนับสนุนที่มีให้เสมอมาตลอดการศึกษา

ศุภาวิชญ์ฐา สุวรรณแพทย์

เมษายน 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	27
อุปกรณ์	27
วิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	41
สรุปและข้อเสนอแนะ	98
สรุป	98
ข้อเสนอแนะ	101
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	102
ภาคผนวก	107
ภาคผนวก ก ข้อมูลการทดลอง	108
ภาคผนวก ข การประมาณค่าพารามิเตอร์	127
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์	131
ภาคผนวก ง ตัวอย่างแบบทดสอบทางประสาทสัมผัส	138
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	141

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบของน้ำส้มสายชูชนิดต่าง ๆ	6
2	แสดงคุณสมบัติที่จำแนกแบคทีเรียสกุล *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ต่าง ๆ	10
3	ผลของการทำลายเซลล์ *Acetobacter* sp. เนื่องจากการขาดออกซิเจนควบคู่กับปัจจัยต่าง ๆ ของการหมัก	13
4	L_4 (2^3) Orthogonal array	21
5	ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองการผลิตกรดแอซีติก	32
6	แสดง L_9 (3^4) OAs ของการผลิตกรดแอซีติก	33
7	ปัจจัยและระดับต่าง ๆ ในการทดลองการผลิตกรดแอซีติกระดับฟลาสก์	34
8	แสดงพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการเติบโตและการผลิตกรดแอซีติกของแบคทีเรียกรดแอซีติก *Acetobacter aceti*.	44
9	การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ โดยวิธีทากุชิ พิจารณาจากความเข้มข้นกรดแอซีติก	57
10	การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มข้นของกรดแอซีติก ในการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์	58
11	การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มข้นของกรดแอซีติก (C_P) โดยวิธี ANOVA	59
12	สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแอซีติกจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากุชิ เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นกรดแอซีติก	60
13	การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ โดยวิธีทากุชิ พิจารณาจากผลได้ของกรดแอซีติก	64
14	การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อผลได้ของกรดแอซีติกในการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์	65
15	การวิเคราะห์อิทธิผลของผลได้ที่มีผลต่อผลได้ของกรดแอซีติก ($Y_{P/S}$) โดยวิธี ANOVA	66

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแอซีติกจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากุชิ เมื่อพิจารณาจากผลได้ของกรดแอซีติก	67
17	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์โดยวิธีทากุชิ พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร	70
18	การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรในการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์	71
19	การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) โดยวิธี ANOVA	72
20	สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแอซีติกจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากุชิ เมื่อพิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร	73
21	จลนพลศาสตร์การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (พิจารณาจากความเข้มข้นกรดแอซีติก)	76
22	จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (พิจารณาจากความผลได้ของแอซีติก)	79
23	จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร)	81
24	ค่าประมาณของความเข้มข้นของกรดแอซีติก (C_p) ผลได้ของกรดแอซีติก ($Y_{P/S}$) และ อัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม	84
25	พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทากุชิ	87

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
26	พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ และถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทากุชิ (พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร)	89
27	พารามิเตอร์จลนศาสตร์ของการผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรด ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 20)	91
28	พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรด ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการแบบเบ็ดเสร็จและต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง 0.05 ต่อชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทากุชิ (พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร)	94
29	การประเมินคุณค่าทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักผสมสารให้ความหวาน	97

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก1	ค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตรของการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์	109
ก2	ความเข้มข้นเซลล์ของการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์	110
ก3	ความเข้นข้นแอลกอฮอล์ของการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์	111
ก4	ความเข้มข้นกรดแอซีติกของการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์	112
ก5	น้ำหนักเซลล์แห้งของชุดการทดลอง A-I ชุดที่ 1 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ	113
ก6	น้ำหนักเซลล์แห้งของชุดการทดลอง A-I ชุดที่ 2 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ	114
ก7	ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ของชุดการทดลอง A-I ชุดที่ 1 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ	115
ก8	ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ของชุดการทดลอง A-I ชุดที่ 2 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ	116
ก9	ความเข้มข้นกรดแอซีติกของชุดการทดลอง A-I ชุดที่ 1 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ	117
ก10	ความเข้มข้นกรดแอซีติกของชุดการทดลอง A-I ชุดที่ 2 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ	118
ก11	จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ	119
ก12	การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากความเข้มข้นกรดแอซีติก (C_P)	120
ก13	การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$)	121

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก14	การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_P)	122
ก15	การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_P)	123
ก16	การผลิตกรดแอซีติกแบบต่อเนื่องในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (อัตราการเจือจาง เท่ากับ 0.03 และ 0.05 ต่อชั่วโมง และความเข้มข้นแอลกอฮอล์ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ที่เติม เท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร)	124
ข1	สูตรการคำนวณพารามิเตอร์ในการทดลองการหมักกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จ	127
ข2	สูตรการคำนวณพารามิเตอร์ในการทดลองการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง ณ สภาวะคงตัว	128

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของกรดแอซีติก (acetic acid)	4
2	สัณฐานวิทยาของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevicsiae*	8
3	สัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti*	9
4	แผนภูมิขั้นตอนการผลิตไวน์สับปะรด	31
5	การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม	36
6	การผลิตกรดแอซีติกแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ	38
7	แสดงระบบควบคุมการผลิตกรดแอซีติกแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ	39
8	น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์ระหว่างการเพาะเลี้ยงระดับ ฟลาสก์ ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราเขย่า 250 รอบต่อนาที	42
9	ปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ของแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์ระหว่างการ เพาะเลี้ยงระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราเขย่า 250 รอบต่อนาที	42
10	ความเข้มข้นของกรดแอซีติกของเชื้อแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์ระหว่างการเพาะเลี้ยงระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราเขย่า 250 รอบต่อนาที	43
11	การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง A	49
12	การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง B	49
13	การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง C	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง D	50
15	การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง E	51
16	การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง F	51
17	การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง G	52
18	การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง H	52
19	การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง I	53
20	สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของกรดแอซีติกในการผลิตกรดแอซีติกระดับฟลาสก์	60
21	สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อผลได้ของกรดแอซีติกในการผลิตกรดแอซีติกระดับฟลาสก์	67
22	สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรในการผลิตกรดแอซีติกระดับฟลาสก์	73
23	การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมพิจารณาจากความเข้มข้นกรดแอซีติก	76
24	การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมพิจารณาจากผลได้ของกรดแอซีติก	78
25	การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมพิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร	81

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
26	การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร	87
27	การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทากุชิ โดยควบคุมที่อัตราการเจือจาง 0.03 และ 0.05 ต่อชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ที่เติม (S_0) 80 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด 5.5, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	92
28	ผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักที่ผสมสารให้ความหวาน 4 ชนิด คือ (A) มอลทอทอล (B) ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (C) ไซลิทอล และ (D) น้ำผึ้ง	96
29	ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์สับปะรด	97

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์

C_P	ความเข้มข้นกรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร)
D	อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)
F	อัตราการไหล (ลิตรต่อชั่วโมง)
F1	อัตราการไหลเข้าของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ (ลิตรต่อชั่วโมง)
F2	อัตราการไหลออกของน้ำหมักของถังหมักแบบกวน (ลิตรต่อชั่วโมง)
k	ระดับของปัจจัย
L	จำนวนระดับของปัจจัย
N	จำนวนการทดลอง
q_P	อัตราจำเพาะการผลิตกรดแอซีติก (กรัมต่อกรัม ชั่วโมง)
Q_P	อัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)
q_S	อัตราจำเพาะการใช้แอลกอฮอล์ (กรัมต่อกรัม ชั่วโมง)
r	จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง
S	ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ (กรัมต่อลิตร)
V	ปริมาตรทำงานของถังหมัก (ลิตร)
X	ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
$Y_{P/S}$	ผลได้กรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร)
$Y_{X/S}$	ผลได้เซลล์ (กรัมต่อลิตร)

ตัวอักษรกรีก

μ	อัตราจำเพาะการเจริญเติบโต (ต่อชั่วโมง)

การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรด

Continuous Fermentation for Vinegar Production from Pineapple Wine

คำนำ

น้ำส้มสายชูในประเทศไทยแต่ดั้งเดิมนั้นเป็นน้ำส้มสายชูจากน้ำตาลเมาและกระแช่ ซึ่งผลิตขายกันในระดับครัวเรือนโดยใช้วิธีการผลิตแบบช้า เป็นการปล่อยให้เชื้อแบคทีเรียกรดแอซีติกออกซิไดส์เอทานอลเป็นกรดแอซีติกเองอย่างช้า ๆ (เพ็ญพรรณ, 2505) จนเมื่อประมาณสามสิบปีมานี้จึงได้เริ่มมีการผลิตกรดแอซีติกจากสับปะรดด้วยวิธีการหมักแบบอาหารเหลว โดยใช้ถังหมักแอซีเตเตอร์ (acetator) โดยวิธีนี้จะมีการกวนตลอดเวลาเพื่อให้จุลินทรีย์ ออกซิเจน และวัตถุดิบผสมกันได้ดี ทำให้ได้ผลผลิตที่สูง แต่ในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องมีระบบหล่อเย็น และระบบให้อากาศ จึงทำให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532) ในอดีตมีการผลิตน้ำส้มสายชูเทียมที่ได้จากการนำกรดแอซีติกมาเจือจางเพื่อจำหน่าย ซึ่งเป็นที่แพร่หลายเนื่องจากราคาถูก ทำให้น้ำส้มสายชูหมักและน้ำส้มสายชูกลั่นไม่แพร่หลายมากนัก (นันทพร, 2517) ปัจจุบันได้มีการส่งเสริมให้ผลิตน้ำส้มสายชูจากแบคทีเรียมากขึ้น เนื่องจากน้ำส้มสายชูหมัก มีกลิ่นรสที่ดีสะอาดและปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ดังนั้นเพื่อการส่งเสริมให้มีการพัฒนาและปรับปรุงการผลิตน้ำส้มสายชูในระดับอุตสาหกรรม จึงต้องมีการควบคุมคุณภาพของน้ำส้มสายชู และพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตน้ำส้มสายชู ด้วยการหมักแบบต่อเนื่องเนื่องจากเป็นกระบวนการหมักที่สามารถควบคุมคุณภาพของการผลิต ลดการปนเปื้อน และสามารถควบคุมการเติมสารอาหาร การแยกและการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้อย่างสะดวก

จากการศึกษาการนำผลไม้ชนิดต่าง ๆ มาทำไวน์ผลไม้เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำส้มสายชู พบว่าให้ผลเป็นที่น่าพอใจ และยังเป็นการลดต้นทุนการผลิตน้ำส้มสายชูเนื่องจากไวน์เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบ จึงมีความคิดที่จะแปรรูปผลิตภัณฑ์ไวน์ผลไม้ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบมาเป็นสารตั้งต้นของการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก นอกจากการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์ผลไม้จะช่วยให้น้ำส้มสายชูมีสีสัน, กลิ่นหอม และรสชาติที่ดีแล้วยังเป็นการนำเอาผลิตภัณฑ์ไวน์ที่ไม่มีศักยภาพเชิงพานิชย์และที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์แล้วกลับมาใช้ประโยชน์ใหม่ และยังใช้น้ำส้มสายชูหมักเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพได้อีกด้วย ประเทศไทยมี

ศักยภาพในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์ผลไม้ในระดับอุตสาหกรรมขนาดย่อมและขนาดกลางได้ เนื่องจากประเทศไทยมีแหล่งวัตถุดิบหลากหลายอย่างเพียงพอและน้ำส้มสายชูหมักที่ผลิตจากไวน์ผลไม้ชนิดต่าง ๆ นั้น จะมีรสชาติดี กลิ่นหอม มีเอกลักษณ์จำเพาะและสามารถผลิตเป็นสินค้าส่งออกได้เป็นอย่างดี

วัตถุประสงค์

1. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแอซีติกที่เหมาะสมในการผลิตกรดแอซีติก

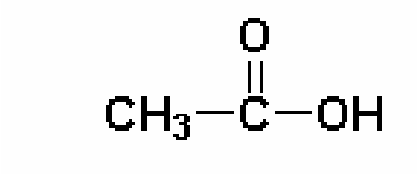
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดแบบเบ็ดเสร็จ โดยวิธีการออกแบบทากุชิ

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์สับปะรด ด้วยการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

การตรวจเอกสาร

คำว่า น้ำส้มสายชู (vinegar) มาจากภาษาฝรั่งเศส 2 คำคือ “vin+aigre” ซึ่งเท่ากับ ไวน์เปรี้ยว (sour wine) (ศิวาพร, 2520) น้ำส้มสายชู (vinegar) หรือกรดแอซีติก (acetic acid) เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่ผลิตขึ้นมาจากกระบวนการหมัก ซึ่งรู้จักกันมาตั้งแต่สมัยโบราณเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ประเภทไวน์ พบว่าน้ำส้มสายชูเกิดจากการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ไวน์นั่นเอง โดยเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Acetobacter sp.* ทำปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงแอลกอฮอล์ที่มีอยู่ในไวน์ให้เป็นกรดแอซีติก ในสภาพที่มีออกซิเจน ทำให้ไวน์มีรสเปรี้ยว จึงเรียกผลิตภัณฑ์นี้ว่า “น้ำส้มสายชู” (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532)

กรดแอซีติก มีสูตรเคมี คือ CH_3COOH ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลว ไม่มีสี มีสถานะเป็นของแข็ง ที่อุณหภูมิ 16.67 องศาเซลเซียส สามารถรวมตัวกับน้ำ แอลกอฮอล์ และกลีเซอรีนได้ดี (Furia, 1975) กรดแอซีติกหรือน้ำส้มสายชูเป็นสารให้กลิ่นรสและเป็นวัตถุกันเสียที่นิยมใช้กันมาตั้งแต่สมัยโบราณ คุณสมบัติของน้ำส้มสายชูที่เป็นเครื่องปรุงรสอาหารต้องเป็นของเหลวที่ใส ปราศจากสีและสิ่งเจือปน ในกรณีที่มีสีต้องเป็นสีของวัตถุดิบที่ใช้เท่านั้น (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532) ซึ่งน้ำสายชูจะต้องประกอบด้วยกรดแอซีติกไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร หรือ 4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอทานอลไม่ควรมากกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ และค่าพีเอชควรอยู่ระหว่าง 2.0-3.5 (นภา, 2537)



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดแอซีติก (acetic acid)
ที่มา : Anam (1995)

ชนิดของน้ำส้มสายชู

การผลิตน้ำส้มสายชูแต่ละประเภทจะทำจากวัตถุดิบที่เหมาะสมเช่น ธัญพืช ผลไม้ หรือน้ำตาล ทำให้น้ำส้มสายชูมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันด้วย ซึ่งรสเปรี้ยวในน้ำส้มสายชูเกิดจากกรดแอซีติกเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมี 2 ชนิดหลัก คือ (สำนักมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2527)

1. น้ำส้มสายชูหมัก (fermented vinegar) หมายถึง น้ำส้มสายชูที่ได้จากการนำวัตถุดิบมาหมักกับส่าเหล้า แล้วนำมาหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีการผลิต

2. น้ำส้มสายชูกลั่น (distilled vinegar or spirit vinegar) มี 2 ประเภทคือ น้ำส้มสายชูกลั่นแบบ distilled vinegar หมายถึง น้ำส้มสายชูที่ได้จากการกลั่นน้ำส้มสายชูหมัก ส่วนน้ำส้มสายชูแบบ spirit vinegar หมายถึง น้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักเอทานอลเจือจางกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีการผลิต แล้วนำไปกลั่นหรือกรอง

พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหาร พ.ศ. 2507 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 10 เรื่องกำหนดคุณภาพ มาตรฐาน การเจือสี และการแสดงฉลากของน้ำส้มสายชู (ราชกิจจานุเบกษา, 2523) ได้แบ่งเป็น 3 ชนิดดังนี้

1. น้ำส้มสายชูหมัก หมายถึง น้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักธัญพืช ผลไม้ หรือน้ำตาลด้วยส่าหรือยีสต์เพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ แล้วหมักต่อด้วยเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีธรรมชาติ

2. น้ำส้มสายชูกลั่น หมายถึง น้ำส้มสายชูที่ได้จากการนำน้ำสุราขาวเจือจางหรือแอลกอฮอล์เจือจางมาหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูโดยมีการเติมอาหารเสริมที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู ได้แก่ กลูโคส ออโตไลส์ยีสต์ (autolysed yeast) เป็นต้น (Conner and Allgeier, 1976)

3. น้ำส้มสายชูเทียม หมายถึง สารละลายที่ได้จากการผสมกรดแอซีติก ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นทางเคมีในน้ำบริสุทธิ์ ให้มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 4 กรัมแต่ไม่เกิน 7 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ทำให้เป็นน้ำส้มสายชูที่มีราคาถูก มีความบริสุทธิ์สูงแต่ขาดกลิ่นรสที่ดี (นภา, 2537)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของน้ำส้มสายชูชนิดต่าง ๆ

	Rice vinegar	Alcohol slop vinegar	Apple vinegar	Malt vinegar	Grape vinegar	Alcohol vinegar	Lemon vinegar
Specific gravity	1.018	1.016	1.021	1.024	1.020	1.012	1.033
Total acidity	4.51	4.52	5.04	5.06	5.03	4.21	5.83
Volatile acid	4.290	4.374	4.914	4.938	4.866	4.170	1.096
Non volatile acid	0.330	0.204	0.141	0.183	0.205	0.060	5.050
Total nitrogen	0.025	0.020	0.010	0.021	0.014	0.009	-
Amino nitrogen	0.016	0.013	0.005	0.006	0.011	0.005	-
Total sugar	1.808	1.269	2.888	3.369	3.231	0.295	2.909
Reducing sugar	1.770	1.265	2.865	2.812	3.124	0.278	2.847

ที่มา : Brian (1998)

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู

วัตถุดิบที่นำมาผลิตน้ำส้มสายชูส่วนใหญ่จะประกอบด้วยน้ำผลไม้ หรือสารละลายน้ำตาลที่หมักได้ จึงทำให้น้ำส้มสายชูแตกต่างจากน้ำเจือจางกรดแอซีติก วัตถุดิบที่นิยมนำมาใช้ในการผลิต เช่น แอปเปิ้ล กล้วย น้ำมะพร้าว เอทานอล องุ่น เมล็ดธัญพืช น้ำผึ้ง ข้าวมอลต์ กากน้ำตาล สับปะรด น้ำอ้อย มะขาม ชา แตงโม และไวน์ต่าง ๆ โดยสามารถแยกน้ำส้มสายชูตามวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตได้ดังนี้

1. น้ำส้มสายชูที่หมักจากน้ำผลไม้ เช่น แอปเปิ้ล องุ่น สับปะรด น้ำมะพร้าว เป็นต้น จัดเป็นน้ำส้มสายชูคุณภาพเยี่ยม มีกลิ่นหอม รสชาติกลมกล่อม มีขั้นตอนในการเตรียมมาก จึงทำให้มีราคาแพง

2. น้ำส้มสายชูที่หมักจากพืชประเภทแป้ง เช่น มันฝรั่ง มันเทศ มันสำปะหลัง เป็นต้น ต้องมีการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อนการหมัก

3. น้ำส้มสายชูที่หมักได้จากเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวมอลต์ ซึ่งต้องทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในข้าวมอลต์ก่อน จากนั้นจึงหมักน้ำตาลด้วยยีสต์ เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ผลิตมีราคาถูก จึงเป็นน้ำส้มสายชูที่ผลิตได้มีราคาถูก

4. น้ำส้มสายชูที่หมักจากน้ำตาล กากน้ำตาล น้ำผึ้ง เป็นน้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพค่อนข้างต่ำ

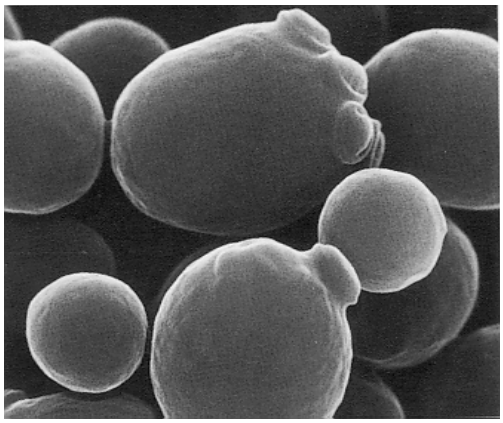
5. น้ำส้มสายชูที่หมักได้จากเหล้าหรือแอลกอฮอล์ (ศิวาพร, 2520)

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตน้ำส้มสายชู

ในการผลิตน้ำส้มสายชู ถ้าใช้วัตถุดิบประเภทต่าง ๆ ที่ไม่ใช้แอลกอฮอล์จะต้องมีการนำวัตถุดิบมาหมักให้ได้แอลกอฮอล์ก่อนด้วยเชื้อยีสต์ จากนั้นจึงจะนำเอาแอลกอฮอล์ที่ได้มาใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดแอซีติกอีกต่อหนึ่ง โดยอาศัยเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ผลิตกรดแอซีติกได้ ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตกรดแอซีติก จึงแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1. ยีสต์

ยีสต์ที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดแอซีติก เป็นเชื้อชนิดเดียวกับที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักด้วยแบคทีเรียอีกต่อหนึ่ง ในปัจจุบันได้มีการคัดเลือกยีสต์สำหรับผลิตแอลกอฮอล์เพื่อนำไปผลิตกรดแอซีติกโดยตรง เช่น การผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ (wine vinegar) ยีสต์ที่ใช้คือ *Saccharomyces ellipsoideus* มาหมักที่อุณหภูมิ 25–30 องศาเซลเซียส จะได้น้ำส้มสายชูที่มีกลิ่น และรสดี นอกจากนี้ ยังมียีสต์ในสกุล *Saccharomyces* อีกหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *S. diastaticus* และ *S. carlsbergensis* เป็นต้น ส่วน *S. cerevisiae* เป็น eukaryotic cell เส้นผ่านศูนย์กลาง 1–5 ไมโครเมตร ยาว 5–30 ไมโครเมตร เซลล์มีรูปร่างกลม หรือ รี อาจมีรูปร่างเป็นรูปถั่ว รูปเลมอน ลักษณะเด่น เป็นเซลล์เดียว และมีการแตกหน่อ (budding) นิยมใช้ยีสต์ชนิดนี้ในการหมักน้ำตาลให้กลายเป็นแอลกอฮอล์ (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532)



ภาพที่ 2 สัณฐานวิทยาของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevicsiae*
ที่มา: Nancy Touchette (2003)

2. แบคทีเรียในกลุ่มที่ผลิตกรดแอซีติก

แบคทีเรีย *Acetobacter* พบในน้ำตาลสด น้ำตาลปี๊บ น้ำตาลเมา กระแช่ ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้า (นภา, 2537) *Acetobacter* sp. มีลักษณะดังนี้ มีรูปร่างเป็นรูปไข่ (ellipsoidal-shaped) หรือรูปแท่ง (rod-shaped) การเรียงตัวของเซลล์มีหลายลักษณะ อาจพบเซลล์เดี่ยว หรืออยู่เป็นคู่ หรืออยู่เป็นเส้นสายยาว หรือสายสั้น แตกต่างกันตามชนิด ไม่พบเอนโดสปอร์ เซลล์ติดสี แกรมลบ (gram negative) มีขนาด 0.6-0.8x1.0-3.0 ไมโครเมตร (De Ley and Frateur, 1974) และสามารถเจริญในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีกรดแอซีติกตั้งแต่ 2-11 เปอร์เซ็นต์ (Stanier *et al*., 1976) ซึ่งในการผลิตน้ำส้มสายชูควรจะเลือกใช้สายพันธุ์ที่สามารถให้กรดแอซีติกสูงกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เท่านั้น (รสสุคนธ์, 2528) *Acetobacter* sp. ต้องการออกซิเจนในการออกซิไดส์เอทานอลให้เป็นกรดแอซีติก เนื่องจากไม่สามารถใช้สารอื่นนอกจากออกซิเจนเป็นตัวรับไฮโดรเจนตัวสุดท้ายในกระบวนการเปลี่ยนอาหารเป็นพลังงาน (De Ley and Frateur, 1974)

ภาพที่ 3 สัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti*

ที่มา: Vinegar Connoisseurs International (2003)

ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติที่จำแนกแบคทีเรียสกุล *Acetobacter* sp. สายพันธุ์ต่าง ๆ

	Bacteria				
	A. aceti	*A. xylinum*	*A. mesoxydans*	*A. lovaniense*	*A. rancens*
Overoxidation of ethanol	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Growth in Hoyer's medium	+	-	-	+	-
Acid from glucose	+	+	+	+	+
Dihydroxyacetone from glycerol	+	+	+	-	-
Production of cellulose	-	+	-	-	-
Brown pigment	-	-	-	-	-

ที่มา : Gibb and Shapton (1968)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำส้มสายชู

1. อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ โดยทั่วไปจะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง แต่จะสูญเสียกิจกรรมในการผลิตกรดแอซีติกไปอย่างสมบูรณ์ จากการแยกเชื้อ *Acetobacter aceti* สายพันธุ์ 1023 พบว่าสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแอซีติกได้ดี และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 38 องศาเซลเซียส จะสูญเสียกิจกรรมไป 55 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *Acetobacter aceti* สายพันธุ์เดิมจะสูญเสียกิจกรรมอย่างสมบูรณ์ที่ 35 องศาเซลเซียส (Ohmori *et al*., 1982) นอกจากนั้น มีการคัดเลือกเชื้อน้ำส้มสายชู 10 สายพันธุ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแอซีติกได้ดี และนำมาทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่า เชื้อส่วนมากสามารถเจริญและผลิตกรดแอซีติกได้ดีที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส แต่มีบางสายพันธุ์ที่ยังคงผลิตกรดแอซีติกได้ที่อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส (รสสุคนธ์, 2528)

2. ความเป็นกรดด่าง

แบคทีเรีย *Acetobacter* sp. เจริญเติบโตได้ดีที่พีเอชค่อนข้างต่ำ พบว่าเจริญเติบโตได้ที่ระดับพีเอช 4.0-4.5 และเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับพีเอช 5.4-6.3 ส่วนที่ระดับพีเอช 7-8 จะเจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (จิราภรณ์, 2529; De Ley and Frateur, 1974)

3. แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของเชื้อ *Acetobacter* sp. คือ เอทานอล, กลีเซอรอล (glycerol) และ โซเดียมแลกเทต (Na-DL-Lactate) ตามลำดับ แต่ในสภาวะที่มีเอทานอลเพิ่มขึ้น 1, 2, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การเจริญของเชื้อ *Acetobacter* sp. เป็น 87, 82, 58 และ 13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (De Ley *et al*., 1974) และจากการศึกษา พบว่าเอทานอลมีผลยับยั้งการออกซิไดส์แอซีเทตให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำโดยเซลล์ (resting cells) ของ *Acetobacter aceti* แต่ไม่สามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ (Shimizu *et al*., 1977) และพบว่า *Acetobacter aceti* ใช้กลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ โดย 80 เปอร์เซ็นต์ของกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคเนต (gluconate) และเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานตามวิถีเฮกโซไคเนส (hexokinase pathway)

ในวัฏจักรเฮกโซสมอนอฟอสเฟต ส่วนน้ำตาลอื่น ๆ เช่น กาแลกโทส ไซโลส อะราบิโนส และไร-โบส จะถูกออกซิไดส์เป็นกรดที่เกี่ยวข้องได้ แต่น้ำตาลเหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Conner and Allgeier, 1976)

4. ผลของออกซิเจน

การหมักน้ำส้มสายชูนี้เป็นการหมักในสภาพที่ต้องการอากาศ ดังนั้นจำเป็นต้องมีการให้อากาศอย่างต่อเนื่อง ถ้าการให้อากาศเกิดขัดข้องในระหว่างการหมักจะเกิดผลกระทบต่อเชื้อ *Acetobacter* sp. โดยผลของการทำลายเซลล์ *Acetobacter* sp. ในระหว่างการขาดออกซิเจนยังเกี่ยวข้องกับปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ ความเข้มข้นทั้งหมดของกรดแอซีติกและแอลกอฮอล์ในน้ำหมัก และอัตราเร็วของการหมัก (fermentation rate) เป็นต้น (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532) นอกจากนี้รวมถึงระยะเวลาที่ขาดออกซิเจนด้วย ดังตารางที่ 3 แสดงผลของเซลล์ *Acetobacter* sp. ที่ถูกทำลายลงไป 10-100 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ในน้ำหมักที่มีความเข้มข้นรวมของกรดแอซีติกและแอลกอฮอล์เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ และการให้อากาศหยุดชะงักไป 2–8 นาที จะส่งผลทำให้เซลล์ *Acetobacter* sp. ถูกทำลายมาก เช่นเดียวกับน้ำหมักที่มีความเข้มข้นรวมของกรดแอซีติกและแอลกอฮอล์เท่ากับ 11-12 เปอร์เซ็นต์ และการให้อากาศหยุดชะงักไป 15 - 60 วินาที (Ebner, 1982)

5. ผลของแอลกอฮอล์

แบคทีเรีย *Acetobacter* sp. จะถูกทำลายลงเมื่อการหมักเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จนกระทั่งปริมาณแอลกอฮอล์ ในน้ำหมักถูกเปลี่ยนไปจนหมดและในขณะเดียวกันมีการเติมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบลงไปในน้ำหมักนั้นช้าเกินไป จะมีผลทำลายเซลล์ของ *Acetobacter* sp. โดยเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของกรดแอซีติกและแอลกอฮอล์ทั้งหมดที่มีในน้ำหมัก และระยะเวลาที่ขาดแอลกอฮอล์โดยมีผลเหมือนกับการขาดออกซิเจน (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532)

ตารางที่ 3 ผลของการทำลายเซลล์ *Acetobacter* sp. จากการขาดออกซิเจนควบคู่กับปัจจัยต่าง ๆ ของการหมัก

Experiment No.	Acetic acid ($g/100\ cm^3$)	Alcohol (%)	Total concentration (%)	Efficiency at Beginnin of Interruption (g/100 ml /24 h.)	Duration of Interruption (Sec)	Degree of Damage of *Acetobacter* (%)
1	2.51	2.29	4.80	1.10	120	34.0
2	2.42	2.29	4.71	1.38	300	42.5
3	3.16	1.71	4.87	6.03	480	99.5
4	7.90	3.80	11.70	2.63	15	10.8
5	8.05	3.70	11.75	5.25	30	74.8
6	8.05	3.30	11.35	4.47	60	99.9

ที่มา : Ebner (1982)

ขั้นตอนการหมักน้ำส้มสายชู

การหมักน้ำส้มสายชูจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล มี 2 ขั้นตอนคือ

1. การหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอล

ซึ่งเป็นกระบวนการหมักแบบไม่ใช้อากาศ และอาศัยเชื้อยีสต์ในสกุล *Saccharomyces cerevisiae* (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532) โดยเชื้อยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นเอทานอล

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

กลูโคส เอทานอล

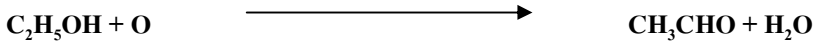
วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชู สามารถใช้ได้หลายชนิด เช่น น้ำสกัดจากผลไม้ต่าง ๆ ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลน้อยอาจจะต้องมีการเติมหรือทำให้เข้มข้นขึ้น หรือ โมลาส (molasses) ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลสูง จะต้องทำการเจือจางก่อน แต่ถ้าเป็นพวกแป้ง ต้องเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของน้ำตาลก่อนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ หรือไฮโดรไลซ์ด้วยกรด โดยทั่วไปมักจะปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นให้อยู่ประมาณ 10–15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และปรับพีเอชให้ค่อนข้างเป็นกรด คือ ประมาณ 4.5 แล้วปล่อยให้การหมักเกิดขึ้นโดยยีสต์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 48–72 ชั่วโมงก็จะหมักได้สมบูรณ์ ขั้นตอนการหมักแอลกอฮอล์และน้ำส้มสายชูควรแยกออกจากกันเพราะการสร้างกรดแอซีติกสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ และทำให้การหมักแอลกอฮอล์ไม่สมบูรณ์ แม้ว่าจะยังมีน้ำตาลเหลืออยู่ (Adams, 1985)

อย่างไรก็ตาม การหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์จากน้ำตาลจะต้องอาศัยปฏิกิริยาหลายขั้นตอนประกอบกันอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งเกิดผลพลอยได้หลายชนิด เช่น กลีเซอรอล รวมทั้งกรดแอซีติกแต่มีในปริมาณน้อย (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532)

2. การเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดแอซีติก

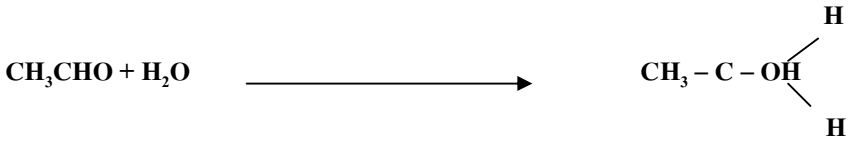
โดยอาศัยเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอซีติกแบคทีเรีย ทำการหมักในสภาพมีอากาศ สำหรับปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้น แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้ (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532)

<u>ขั้นตอนแรก</u> การเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นแอซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) โดยอาศัยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังนี้



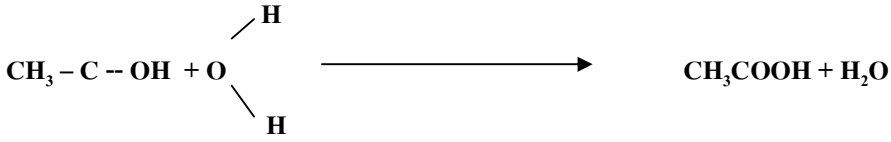
เอทานอล เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส แอซีทัลดีไฮด์

<u>ขั้นตอนที่สอง</u> การเปลี่ยนแอซีทัลดีไฮด์ให้เป็นไฮเดรตแอซีทัลดีไฮด์ (hydrate acetaldehyde) โดยอาศัยเอนไซม์ แอซีทัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส (acetaldehyde dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังนี้



แอซีทัลดีไฮด์ เอนไซม์ แอซีทัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส ไฮเดรตแอซีทัลดีไฮด์

<u>ขั้นตอนที่สาม</u> เป็นขั้นตอนการสร้างกรดแอซีติก โดยเกิดปฏิกิริยาการส่งโปรตอน 2 ตัวของ ไฮเดรต แอซีทัลดีไฮด์ไปยังอะตอมของออกซิเจนจนเกิดกรดแอซีติกออกมา โดยอาศัยเอนไซม์แอลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dedehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังนี้



ไฮเดรต แอซีทัลดีไฮด์ เอนไซม์แอลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส กรดแอซีติก

นอกจากนี้ อาจเกิดโดยอาศัยปฏิกิริยาการรวมตัวของแอซีทัลดีไฮด์ 2 โมเลกุล เรียกว่า cannizzaro reaction ดังนี้

แอซีทัลดีไฮด์ กรดแอซีติก แอลกอฮอล์

การผลิตน้ำส้มสายชูจากผักและผลไม้

การทดลองนำน้ำสับปะรดมาหมักเพื่อผลิตน้ำส้มสายชูหมัก โดยนำน้ำสับปะรด ปริมาตร 5 ลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 21 องศาบริกซ์, พีเอช เท่ากับ 4.2 และ ค่าความเป็นกรด เท่ากับ 0.198 เปอร์เซ็นต์ มาหมักโดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ใส่ถาดปากกว้าง ปิดด้วยผ้าขาวบาง ทิ้งไว้ 7 วัน เมื่อได้ไวน์สับปะรดแล้ว ทำการหมักน้ำส้มสายชูต่อด้วยการเติมเชื้อ *Acetobacter aceti* ลงไปในไวน์ วัด ค่าความเป็นกรด เท่ากับ 0.198 เปอร์เซ็นต์ ทำการหาปริมาณกรดแอซีติกที่เกิดขึ้น ผลที่ได้คือ จะได้ไวน์ที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เท่ากันคือ 12 เปอร์เซ็นต์ แต่ในวันที่ 24 ของการทดลอง จะให้ปริมาณกรดแอซีติก 4.0 เปอร์เซ็นต์ และการนำน้ำสับปะรดมาปั่นวัตถุดิบ พบว่าให้เปอร์เซ็นต์กรดน้ำส้มสูง และให้กลิ่นดีกว่า (เพ็ญพรรณ, 2505)

การทดลองนำแกนสับปะรด มาเติมน้ำ 1 เท่า และเปลือกสับปะรดเติมน้ำ 2 เท่า ปรับความหวานให้ได้ 20 องศาบริกซ์, พีเอช 3.5–4.0 ทำการหมักให้เป็นไวน์ด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* burgundy ทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้อง นาน 3–4 อาทิตย์ เมื่อหมักไวน์ได้แล้ว นำไวน์แกนสับปะรดหรือไวน์เปลือกสับปะรด 50 มิลลิลิตร มาผสมกับเชื้อ *Acetobacter aceti* 50 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรรวม เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่า ในอัตราเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ไวน์แกนสับปะรดและไวน์เปลือกสับปะรด มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ เท่ากับ 11.09 และ 10.52 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำไวน์แกนสับปะรดและไวน์เปลือกสับปะรดไปเป็นสารตั้งต้นในการทำน้ำส้มสายชู ให้ปริมาณกรดแอซีติก 6.2 และ 6.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในวันที่ 4 ของการทดลอง (ประดิษฐ์ และคณะ, 2522)

การปรับปรุงกรรมวิธีในการผลิตให้คุ้มกับต้นทุนการผลิต พบว่า เมื่อทำการทดลองใช้หัวหอมใหญ่เป็นวัตถุดิบในการทดลอง ซึ่งหัวหอมใหญ่จะถูกคั้นด้วยเครื่องทำน้ำผลไม้ และสกัดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นำมากรอง 2 ครั้ง ด้วย กระดาษกรองขนาดรู 6.0 ไมโครเมตร เพื่อกำจัดอนุภาคหยาบ และกระดาษกรองขนาดรู 0.4 ไมโครเมตร เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ หมักให้เป็นแอลกอฮอล์ด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* AHU 3532 ทำในฟลาสก์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แบบไม่ให้อากาศ ส่วนการหมักกรดแอซีติกใช้เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* TUA 549 B บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส แบบให้อากาศ พบว่า เมื่อทำการหมักแบบเบ็ดเสร็จ จะใช้เวลา 40 และ 200 ชั่วโมงสำหรับการหมักแอลกอฮอล์และกรดแอซีติกตามลำดับ จึงจะสมบูรณ์ โดยในน้ำหัวหอมใหญ่จะมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 64 กรัมต่อลิตร เมื่อหมักเป็นแอลกอฮอล์ จะได้ปริมาณเอทานอล 27.1 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 2.8

กรัมต่อลิตร และเมื่อหมักเป็นกรดแอซีติก จะได้ปริมาณกรดแอซีติก 29.4 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณเอทานอล 2.0 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือเพียงเล็กน้อย แต่ถ้าเติมกลูโคสในน้ำหัวหอมใหญ่ ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดแอซีติก จะเพิ่มขึ้นเป็น 50 กรัมต่อลิตร (Jun-Ichi *et al*., 1999)

แต่เมื่อทำการตรึงเชื้อ *Acetobacter xylinum* บน hydrous titanium IV oxide หรือ titanium (IV) cellulose chelate แล้วนำไปผลิตน้ำส้มสายชูอย่างต่อเนื่องในถังหมักแบบ tower fermenter เป็นเวลา 88 วัน พบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแอซีติกยึดเกาะได้ดี และสามารถผลิตกรดแอซีติกในอัตรา 5.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ได้ผลผลิตกรด 69 กรัมต่อลิตร ซึ่งดีกว่าระบบการหมักด้วยเซลล์แขวนลอย แต่อัตราการเจือจางที่ใช้ต่ำกว่า คือ น้อยกว่า 0.08 ต่อชั่วโมง (Ennedy *et al*. อ้างโดย วรรณา, 2530)

วิธีการผลิตน้ำส้มสายชู

การหมักน้ำส้มสายชูสามารถแบ่งเป็น 3 วิธี ดังนี้

1. กรรมวิธีการหมักแบบพื้นผิวหน้า (surface culture)

เป็นการหมักแบบช้า (slow process) ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยการตั้งไวน์ทิ้งไว้ในภาชนะเปิด แล้วปล่อยทิ้งไว้ เชื้อน้ำส้มสายชูจะเจริญเป็นแผ่นฝ้าอยู่ที่ผิวหน้า ซึ่งจะเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้กลายเป็นน้ำส้มสายชู กระบวนการผลิตเป็นแบบเบ็ดเสร็จ วิธีนี้ต้องใช้เวลานานและมีประสิทธิภาพต่ำ (Cruess, 1958) การหมักวิธีนี้มักเกิดไม่สมบูรณ์ ซึ่งพบว่ามีเอทานอลเหลืออยู่ในน้ำส้มสายชูที่ได้ (Florenzani and Balloni, 1969)

2. กรรมวิธีการหมักแบบเร็ว (quick process)

มีการเพิ่มพื้นที่ผิวของแผ่นฝ้าของเชื้อน้ำส้มสายชู และปรับปรุงระบบการให้อากาศ ถังหมักที่ใช้เรียกว่า เจนเนอเรเตอร์ (generator) ภายในบรรจุวัสดุตัวกลาง (packing) เพื่อให้เชื้อเกาะแล้วค่อย ๆ ให้สารละลายแอลกอฮอล์ไหลผ่านวัสดุตัวกลางอย่างช้า ๆ จากส่วนบนลงสู่ส่วนล่าง ในขณะที่การพ่นอากาศจะทำจากด้านล่างขึ้นไปทางด้านบน ในอัตราการให้อากาศ 0.8-0.9 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมงต่อวัสดุตัวกลาง 1 ลูกบาศก์เมตร หากการให้อากาศมากเกินไปจะทำให้เกิดการสูญเสียแอลกอฮอล์และกรดแอซีติกได้ (Nickol, 1979) เชื้อน้ำส้มสายชูจะเจริญอย่างรวดเร็วและออกซิไดส์แอลกอฮอล์เป็นกรดแอซีติก (นภา, 2537) เนื่องจากการหมักด้วยเจนเนอเรเตอร์นี้เป็นระบบปิด ความร้อนจึงสะสมอยู่ภายในถังหมัก จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมอุณหภูมิของถังหมักไม่ให้สูงเกินไป (Adams, 1985) ในวิธีการนี้ยังพบปัญหาของการอุดตันของวัสดุตัวกลาง มักพบในถังหมักที่มีปริมาตรกรดต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ (Nickol, 1979) จึงได้มีการพัฒนาวิธีการหมักเพื่อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

3. กรรมวิธีการหมักแบบอาหารเหลว (submerged process)

วิธีนี้ไม่ต้องใช้วัสดุตัวกลาง แต่เชื้อจะอยู่ในสารละลายแอลกอฮอล์โดยตรง การให้อากาศจะให้ในลักษณะของฟองอากาศ โดยมีใบพัดปั่นกวนให้เชื้อและฟองอากาศกระจายทั่วทั้งถังหมัก จากการศึกษา พบว่า เมื่อทำการลดขนาดของฟองอากาศจะให้ผลดีกว่าการเพิ่มปริมาณอากาศ เนื่องจากการเพิ่มปริมาณอากาศมีผลทำให้มีการสูญเสียแอลกอฮอล์และกรดแอซีติกมากขึ้น (Hromatka and Ebner, 1959) ถังหมักที่นิยม คือ ถังหมักแบบแอซีเตเตอร์ (acetator) ทำด้วยเหล็กสแตนเลส มีขนาดตั้งแต่ 750–12,000 ลิตร มีระบบการให้อากาศที่มีประสิทธิภาพสูง มีระบบกวน (agitator) อยู่ที่ก้นถัง มีระบบทำความเย็น โดยจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ประมาณ 30 องศาเซลเซียส แต่จะมีปัญหาการเกิดฟอง แก้ไขโดยใช้สารทำลายฟองบางชนิด เช่น ซิลิโคน (silicone) โดยการผลิตจะควบคุมการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยจะสิ้นสุดการหมักเมื่อปริมาณแอลกอฮอล์ในสารละลายเหลืออยู่ 0.1–0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยจะมีเครื่องตรวจเตือนเป็นระบบอัตโนมัติ โดยสามารถผลิตน้ำส้มสายชูได้ปริมาณกรดแอซีติก 12 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาเพียง 35 ชั่วโมง (Adams, 1985) ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีการหมักอื่น ๆ ที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งในวิธีการนี้จะควบคุมง่าย ใช้แรงงานคนและพื้นที่น้อย ทำให้เหมาะสมต่อการทำในระดับอุตสาหกรรม แต่มีต้นทุนการผลิตสูง ต้องใช้พลังงานมาก และเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียจะแขวนลอยในน้ำหมัก จึงยุ่งยากในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ สำหรับโรงงานผลิตน้ำส้มสายชูบางแห่งในประเทศไทย ทางบริษัทที่จำหน่ายถังหมักจะจำหน่ายเชื้อน้ำส้มสายชูสายพันธุ์ที่ไม่เจริญบนอาหารแข็งธรรมดา และสารอาหารที่เรียกว่าแอซีโตไซม์ (acetozyme) โดยนำมาผสมกับสารละลายเอทานอลเป็นวัตถุดิบ โดยไม่มีการเปิดเผยส่วนประกอบ ทำให้ต้องมีการสำรองกล้าเชื้อไว้เพื่อเหตุขัดข้อง ซึ่งทำให้มีความยุ่งยากในการผลิต (รสสุคนธ์, 2528)

การผลิตน้ำส้มสายชูเข้มข้น

การทำน้ำส้มสายชูให้เข้มข้น เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารบรรจุกระป๋องเช่น อาหารผักดอง หรืออุตสาหกรรมอื่น ๆ โดยวิธีการ “slush – freezing” โดยนำน้ำส้มสายชูมาแช่แข็งจนกระทั่งเกิดเกล็ดน้ำแข็งขึ้นมา แล้วจึงแยกเอาเกล็ดน้ำแข็งนั้นออกไปโดยการเหวี่ยงแยก (centrifuge) น้ำส้มสายชูที่แยกเอาเกล็ดน้ำแข็งออกไปแล้วจะมีความเข้มข้นสูงขึ้นถึง 20-30 เปอร์เซ็นต์ (ในรูปของกรดแอซีติก) จากน้ำส้มสายชูเริ่มต้นความเข้มข้น 10-13 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น นอกจากนั้น เกล็ดน้ำแข็งที่แยกออกจากการเหวี่ยงแยกจะมีกรดแอซีติกปนอยู่เล็กน้อย ซึ่งยังมีปริมาณกรดแอซีติก 1-2.5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสามารถนำมาละลายและใช้ในการเตรียมน้ำหมักเพื่อใช้ในการหมักต่อไป แต่วิธีนี้มีค่าใช้จ่ายสูง ต่อมามีการศึกษาพบว่า สามารถผลิตน้ำส้มสายชูในถังหมักแอซีเตเตอร์ให้มีความเข้มข้นของกรดแอซีติกสูงถึง 15 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) แต่มีข้อจำกัดที่ความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Acetobacter* sp. (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532)

ต่อมาได้มีการพัฒนากระบวนการหมัก 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกของการหมัก เริ่มด้วยวัตถุดิบที่มีกรดแอซีติก 7-10 เปอร์เซ็นต์ และแอลกอฮอล์ 5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเติมแอลกอฮอล์ลงไปเพิ่มในถังหมักแรก เมื่อความเข้มข้นรวมของกรดแอซีติกและแอลกอฮอล์ในน้ำหมักสูงขึ้นจึงถ่ายน้ำหมักบางส่วนไปสู่ถังที่สอง ทำการหมักจนแอลกอฮอล์หมดที่อุณหภูมิ 27-34 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิตน้ำส้มสายชูที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นถึง 18.5 เปอร์เซ็นต์ (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532)

นอกจากนี้ สามารถใช้วิธีทางกายภาพและทางเคมีทำให้น้ำส้มสายชูเข้มข้นได้หลายวิธี เช่น การกลั่นลำดับส่วน ทำให้น้ำส้มสายชูที่มีกรด 10 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มความเข้มข้นเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ หรือการเติม trichlorofluoromethane ในน้ำส้มสายชูที่อุณหภูมิต่ำแล้วกลั่นทำให้ได้น้ำส้มสายชูเข้มข้นถึง 87 เปอร์เซ็นต์ หรือวิธีการแช่แข็ง (freezing) แล้วแยกเอาผลึกน้ำแข็งออกจะได้น้ำส้มสายชูที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 12 เปอร์เซ็นต์ เป็น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น (บรรจงจิตร, 2529)

การออกแบบการทดลองโดยวิธีทากุชิ

วิธีทากุชิเป็นวิธีออกแบบการทดลองที่พัฒนาโดย Dr. Genichi Taguchi เมื่อปี ค. ศ. 1980 เป็นเทคนิค หรือกลไกทางวิทยาศาสตร์สำหรับการกำหนดค่า และการปรับปรุงเครื่องมือ กระบวนการ และวัตถุดิบที่เกี่ยวข้องกับการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ให้ง่าย หรือสะดวกขึ้น การปรับปรุงนี้มีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงลักษณะ และลดจำนวนของความผิดพลาดลงพร้อม ๆ กัน โดยศึกษาถึงการควบคุมตัวแปรหลักในกระบวนการ และการหาสภาวะที่เหมาะสมของการทดลอง หรือออกแบบการทดลองเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด (Madhav, 1989) วิธีทากุชิมีการออกแบบการทดลองโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ fractional factorial ร่วมกับ orthogonal array (OA) (Box *et al*., 1988) ซึ่งเป็นตารางที่ประกอบไปด้วยการทดลองและระดับของปัจจัยในแต่ละการทดลอง มีหลายประเภทขึ้นกับจำนวนปัจจัยและระดับของปัจจัยนั้น โดย OA จะมีจำนวนน้อยที่สุดเท่ากับ L_4 (Lochner and Matar, 1990) แสดงตัวอย่าง OA (L_4) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 $L_4 (2^3)$ Orthogonal array

การทดลอง	ปัจจัย		
	1	2	3
A	Level 1	Level 1	Level 1
B	Level 1	Level 2	Level 2
C	Level 2	Level 1	Level 2
D	Level 2	Level 2	Level 1

ที่มา: Roy (2001)

การวัดค่าในวิธีทากุชิจะแสดงในรูปของ Signal/Noise ratio (S/N ratio) ซึ่งถูกใช้เพื่อวัดอิทธิพลของ noise factor (ตัวแปรที่ไม่สามารถควบคุมได้ในกระบวนการ) ที่มีต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ หรือกระบวนการ โดยอาศัยการวัดลักษณะของคุณภาพ (quality characteristic, QC) ซึ่งสามารถแสดงถึงความต้องการการเปลี่ยนแปลงของผลการทดลองที่ต้องการต่างกันออกไป ประกอบด้วย 3 รูปแบบ ดังนี้

1. QC = B Bigger is better

$$S/N\ ratio = -10\log\left(\frac{\sum\left(\frac{1}{y}\right)^2}{N}\right) \quad (1)$$

2. QC = S Smaller is better

$$S/N\ ratio = -10\log\left(\frac{\sum y^2}{N}\right) \quad (2)$$

3. QC = N Nominal is best

$$S/N\ ratio = -10\log\left(\frac{\sum(y-y_0)^2}{N}\right) \quad (3)$$

โดย y, y_0 และ N หมายถึง ผลการทดลอง ผลการทดลองที่กำหนด และจำนวนการทดลอง ตามลำดับ

นอกจากนี้ทากุชิยังนำเอาการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance, ANOVA) มาใช้เพื่อพิจารณาอิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองที่ได้

ขั้นตอนการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ

ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน (Roy, 2001) ดังนี้

1. การวางแผนการทดลอง (Planning experiment)

เป็นขั้นตอนกำหนดจุด ประสงค์ที่ต้องการ รวมทั้งพิจารณาปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบ

2. การออกแบบการทดลอง (Designing of experiment : DOE)

เป็นขั้นตอนของการกำหนดหรือเลือก OA ที่เหมาะสมกับระบบ รวมทั้งกำหนดปัจจัยและระดับของปัจจัยโดยมีวัตถุประสงค์ดังนี้

- บ่งชี้หน้าที่หลัก ผลข้างเคียง และแบบ หรือชนิดของความผิดพลาด
- บ่งชี้ปัจจัยรบกวน และสภาวะที่ใช้ในการทดสอบสำหรับการคำนวณการเสื่อมคุณภาพ
- บ่งชี้ลักษณะของคุณภาพที่สังเกตได้ และหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการทดลอง
- บ่งชี้ปัจจัยควบคุม และระดับต่าง ๆ ของปัจจัย
- ออกแบบการทดลองแบบเมทริกซ์ และการวิเคราะห์ข้อมูลการทดลอง

3. การทำการทดลอง (Conducting experiment)

เป็นขั้นตอนของการทำการทดลองตามสภาวะของปัจจัยและระดับของปัจจัยที่กำหนดในการออกแบบการทดลองแบบเมทริกซ์ที่ได้กำหนดไว้

4. การวิเคราะห์ผลการทดลอง (Analysing experiment)

เป็นขั้นตอนของการพิจารณาผลของปัจจัย และระดับของปัจจัยว่าปัจจัยใด มีผลความสำคัญกับระบบ รวมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบที่ทำให้ได้ผลได้สูงที่สุด

5. การทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลอง (confirming or predicted)

เป็นขั้นตอนของการพิสูจน์ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อระบบที่หาได้นั้น มีความเหมาะสมและได้ผลได้ตามที่ต้องการจริงหรือไม่ รวมทั้งใช้สภาวะนั้นศึกษาผลที่เกิดขึ้นต่อระบบ

ข้อดีของการออกแบบการทดลองตามวิธีทากุชิ

1. เป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้ได้ง่าย และใช้ได้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการสื่อสาร และโทรคมนาคม เป็นต้น

2. ช่วยลดจำนวนของการทดลอง ทำให้ประหยัดเวลา และต้นทุนในการทดลอง

3. ช่วยให้การทำการทดลองง่าย และสะดวกขึ้น

4. ให้ผลลัพธ์ที่น่าเชื่อถือได้ และตรงตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง

การทดสอบทางประสาทสัมผัส

การประเมินทางด้านประสาทสัมผัส เป็นกฎเกณฑ์ทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้วัดค่า วิเคราะห์ผล และสรุปผลจากปฏิกิริยาต่าง ๆ ต่อผลิตภัณฑ์ที่ได้รับจากความรู้สึกของมนุษย์ในแง่การมองเห็น การได้รับกลิ่น รสชาติ การสัมผัส และการได้ยิน เป็นต้น ผลของการประเมินทางด้านประสาทสัมผัสสามารถนำมาใช้วิเคราะห์การรับรู้ผลิตภัณฑ์ว่ามีความเป็นเอกภาพ และมีความสำคัญต่อการยอมรับของมนุษย์ได้

วิธีการ Hedonic Scaling เป็นวิธีการทดสอบที่อ้างถึงลำดับความพอใจ และไม่พอใจทางจิตวิทยาของผู้บริโภค วิธีดังกล่าวเป็นการวัดการยอมรับอย่างแท้จริงจากปฏิกิริยาของผู้บริโภคในเทอมของระดับการชอบ หรือไม่ชอบของผลิตภัณฑ์ที่กำหนดให้ภายใต้สภาวะที่กำหนดไว้ วิธีการนี้อยู่บนพื้นฐานความเชื่อที่ว่าการตอบสนองโดยตรงเป็นความรู้สึกที่มีเหตุผลมากกว่าการคาดคะเนพฤติกรรมจริงในอาหารมากกว่าการตอบสนองที่ขึ้นอยู่กับเหตุผล

ข้อดีของการทดสอบแบบใช้สเกลในการพรรณนา

เปรียบเทียบกับการทดสอบการประเมินทางประสาทสัมผัสอื่น ๆ พบว่าการทดสอบแบบ Hedonic scaling เป็น การทดสอบที่ง่าย และเข้าใจได้ง่ายที่สุด โดยมีข้อดีหลักดังนี้

1. พบว่าเป็นวิธีที่ใช้การตรวจสอบอย่างมีประสิทธิภาพในความแตกต่างน้อย ๆ ในระดับของความชอบในอาหารที่คล้าย ๆ กัน และใช้ตรวจสอบความแตกต่างได้อย่างหยาบ ๆ แม้ว่าเมื่อเวลาผู้ประเมิน และสภาวะการทดสอบมีความแปรปรวน

2. การทดสอบนี้ใช้แบบสอบถาม และข้อเสนอแนะที่ง่ายซึ่งทำให้มีเหตุผลที่รู้จักคิด และทำให้ผลิตภัณฑ์สามารถถูกลำดับต่อการประเมินครั้งแรกได้

3. สเกลแบบ Hedonic scale สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างในกลุ่มของลักษณะความชอบที่มีต่อผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะในการสำรวจภาคสนาม และสามารถช่วยกำหนดระดับการยอมรับผลิตภัณฑ์ได้

4. เป็นวิธีที่มีประโยชน์ในการตรวจสอบการยอมรับโดยเฉพาะ อาหารที่ไม่ปกติ หรือไม่ใช่การทดสอบเปรียบเทียบตัวอย่าง

5. การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลจากการทดสอบแบบ Hedonic scaling มีความง่าย แม้ว่าประชากรตัวอย่างจะมาก

ข้อด้อยของการทดสอบแบบใช้สเกลในการพรรณนา

แม้ว่าผู้ใช้ส่วนใหญ่อาจจะพบว่าการใช้ Hedonic scaling มีประโยชน์มาก แต่การทดสอบนี้ก็ยังมีข้อด้อยดังนี้

1. โดยเฉพาะประเทศที่ไม่ได้ใช้ภาษาอังกฤษเป็นการสื่อความหมาย ความจำเป็นในการแปลความหมายของระดับในสเกลเป็นสิ่งที่สำคัญ เนื่องจากแต่ละประเทศจะมีการใช้ภาษาบอกระดับคะแนนที่ต่าง ๆ กัน ซึ่งส่งผลให้เกิดความเข้าใจผิดในผลการทดลองได้

2. ผู้ทดสอบที่ทำการทดสอบแบบ Hedonic scaling มักเป็นผู้ทดสอบชิมที่ไม่ได้ผ่านการฝึกอบรมมาก่อน ดังนั้นการสะท้อนความรู้สึกจึงอยู่บนพื้นฐานของทัศนคติของตัวผู้บริโภคเองมากกว่าที่จะสะท้อนถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่แท้จริง จึงจำเป็นต้องใช้ผู้ทดสอบจำนวนมาก

3. การลำดับสเกลแบบ Hedonic rating scale ไม่สามารถนำมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ของการควบคุมคุณภาพเพราะว่าความแปรปวนมากซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ระหว่างการประเมิน

นอกจากข้อจำกัดข้างต้น การทดสอบเชิงพรรณนาแบบ Hedonic scaling พบว่ามีการประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางมากที่สุดในวิธีการประเมินทางประสาทสัมผัส อย่างไรก็ตามไม่มีความแน่นอนว่าผู้ใช้ในการทดสอบนี้จะตระหนักในข้อจำกัดเพียงพอ หรือไม่ เพื่อระวังการใช้การทดสอบนี้อย่างไม่ถูกต้องสำหรับเป็นเครื่องมือในการประเมินทางประสาทสัมผัส (ไพโรจน์, 2545)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ถังหมัก (Eyela รุ่น M-100, Japan) ขนาด 2 ลิตร พร้อมระบบควบคุมการกวน, ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ

2. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Micro Centrifuge); (Spectrafuge 16 M, Labnet, USA และ Sigma 203, B. Braun Biotech International, Germany)

3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer); (Photomech 301-D, Optima,Japan)

4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath); (280 series water bath, Pricision, USA)

5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter); (M-11, HORIBA, Japan)

6. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator); (Memmert, Germany)

7. เครื่องชั่งละเอียด (Balance); (FR-200MKII, S&D Company Limited, Japan)

8. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave); (Labo Autoclave, Sanyo, Japan)

9. เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับการทดลองและวิเคราะห์

10. เครื่องไมโครคอมพิวเตอร์

จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักไวน์สับปะรดคือ *Saccharomyces cerevisiae kyo kai* (ธนพร, 2547) และแบคทีเรียที่ใช้ผลิตน้ำส้มสายชูหมัก คือ *Acetobacter sp.* รวมทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Acetobacter aceti* รหัส TISTR 102, 522 และ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* รหัส TISTR 086, 107 ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแอซีติกที่สามารถออกซิไดส์เอทานอลให้เป็นกรดแอซีติกได้ โดยสั่งซื้อจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และ แบคทีเรียกรดแอซีติก *Acetobacter sp.* IFRPD ได้รับความอนุเคราะห์จาก สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (IFRPD)

อาหารเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อและอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับเก็บรักษาแบคทีเรียกรดแอซีติกเพื่อเป็น stock culture และกล้าเชื้อ ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งมีส่วนประกอบ ดังนี้

1. glucose	20.0	กรัม/ลิตร
2. peptone	10.0	กรัม/ลิตร
3. beef extract	10.0	กรัม/ลิตร
4. yeast extract	5.0	กรัม/ลิตร
5. sodium acetate	5.0	กรัม/ลิตร
6. K_2HPO_4	2.0	กรัม/ลิตร
7. tri-ammonium citrate	2.0	กรัม/ลิตร
8. $MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม/ลิตร
9. $MnSO_4.4H_2O$	0.2	กรัม/ลิตร
10. Tween 80	1	มิลลิลิตร

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่ใช้ในฟลาสก์เพื่อผลิตกรดแอซีติก (Hoyer's media) (De Ley and Frateur, 1974) ประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$, Univar) 0.1 กรัม, ได-โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4, Univar) 0.01 กรัม, โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออโธฟอสเฟต (KH_2PO_4, Univar) 0.09 กรัม, แมกนีเซียมซัลไฟต์ไฮเดรต ($MgSO_4$ $7H_2O$, Univar) 0.025 กรัม, ฟรอริกคลอไรด์ ($FeCl_2$ $6H_2O$, Ajax) 0.0005 กรัม, เอทานอล 3 มิลลิลิตร ในปริมาตรน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

วัตถุดิบ

1. สับปะรดพันธุ์ภูเก็ต อายุ 18-20 เดือน
2. น้ำตาลทรายมิตรขนาด 1 กิโลกรัม
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 N (NaOH, Univar)

วิธีการ

1. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแอซีติกที่เหมาะสมในการผลิตกรดแอซีติก

การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของแบคทีเรียกรดแอซีติก *Acetobacter sp.* ทั้ง 5 สายพันธุ์สำหรับการผลิตกรดแอซีติกด้วยการหมักแบบเบ็ดเสร็จ โดยนำกล้าเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS agar เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวน 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 27 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวน 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (Steiner and Sauer, 2001) ใช้เป็นกล้าเชื้อ 10% สำหรับการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตรต่อไป

การเพาะเลี้ยงในฟลาสก์

ทำการหมักแบบเบ็ดเสร็จโดยมีปริมาตรการทำงานทั้งหมด 300 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ (Hoyer's media) ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยคัดเลือก *Acetobacter sp.* ทั้ง 5 สายพันธุ์ เพื่อหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแอซีติก โดยใช้ไวน์สับปะรดเป็นสารอาหารตั้งต้น บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวน 250 รอบต่อนาที ทำการหมักจนแบคทีเรียกรดแอซีติกเติบโตเข้าสู่ระยะคงตัว (stationary phase) โดยพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร (optical density, OD_{600}) เมื่อความหนาแน่นของเซลล์คงที่หรือเริ่มลดลงจึงยุติการเพาะเลี้ยง โดยเก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ทุก ๆ 6 ชั่วโมงตลอดการทดลอง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ และกรดแอซีติก จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลอง เพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและการผลิตกรดแอซีติก เพื่อสรุปผลการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแอซีติกที่เหมาะสมที่สุด

2. การผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ด้วยวิธีการทากุชิ

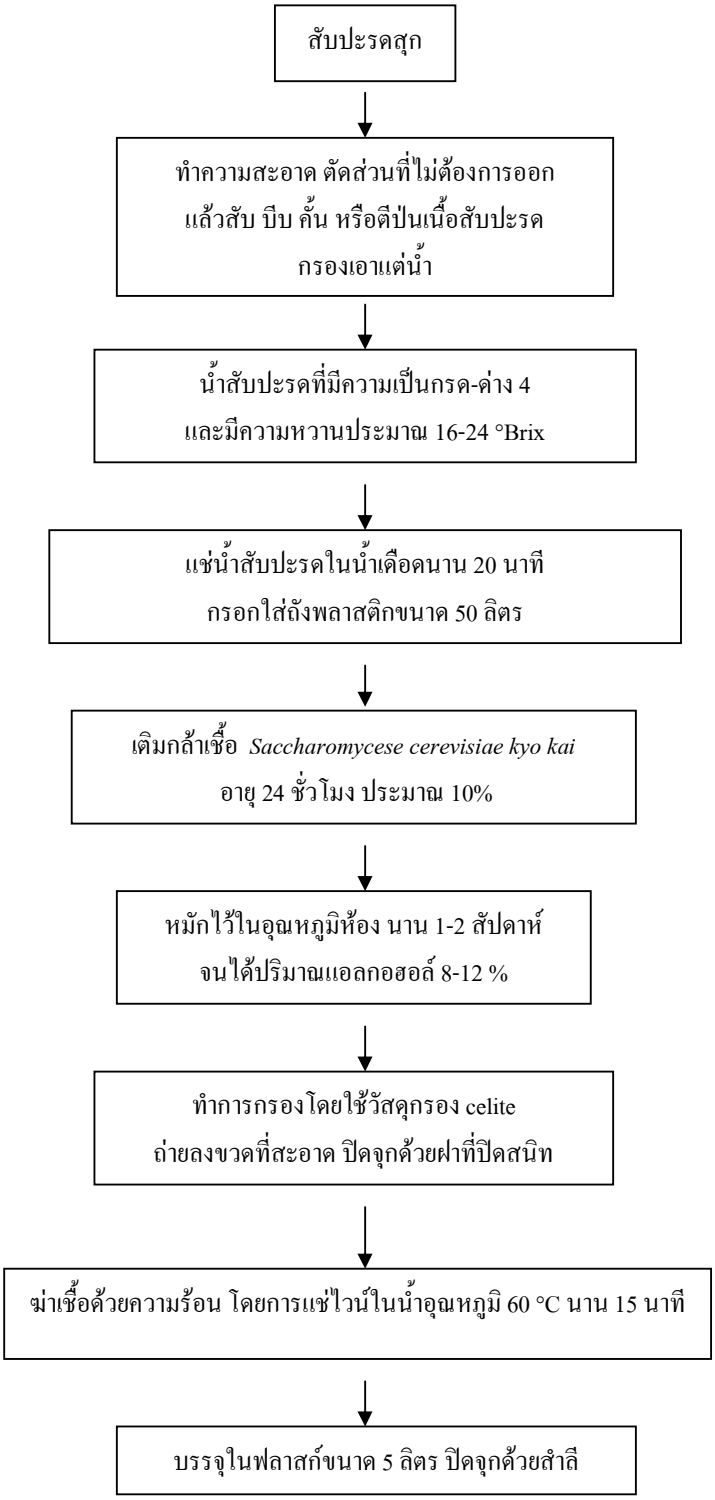
2.1 การเตรียมไวน์สับปะรด

การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae kyo kai* สำหรับการผลิตไวน์สับปะรดด้วยการหมักแบบเบ็ดเสร็จ โดยนำกล้าเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ YM agar เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ YM ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวน 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ YM ปริมาตร 270 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวน 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ YM ปริมาตร 2700 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวน 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อ 10% สำหรับการเพาะเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 50 ลิตรต่อไป

การผลิตไวน์สับปะรด

ทำการหมักแบบเบ็ดเสร็จโดยมีปริมาตรการทำงานทั้งหมด 30 ลิตร โดยใช้น้ำสับปะรดที่มีความหวานประมาณ 16-24 °Brix พีเอช 4 โดยนำน้ำสับปะรดมาแช่ในน้ำเดือดนาน 20 นาที กรองใส่ถังพลาสติกขนาด 50 ลิตร ปิดฝาทิ้งไว้ 1 คืน เติมกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae kyo kai* 10% ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง นาน 1-2 สัปดาห์ จนได้ปริมาณแอลกอฮอล์ 8-12% จากนั้นทำการกรองโดยใช้วัสดุกรอง celite ถ่ายลงขวดที่สะอาด ปิดขวดให้สนิท และทำการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน โดยการแช่ไวน์ในน้ำอุณหภูมิ 60 องศษเซลเซียส นาน 15 นาที นำไวน์สับปะรดที่ได้เป็นสารอาหารตั้งต้นในการผลิตกรดแอซีติกต่อไป



ภาพที่ 4 แผนภูมิขั้นตอนการผลิตไวน์สับปะรด

2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดด้วยวิธีการทากุชิ

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแอซีติก ซึ่งมีทั้งหมด 4 ปัจจัย 3 ระดับ โดยทำการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากุชิโดยใช้ Orthogonal array (OAs) อธิบายการทดลองที่มีปัจจัยการทดลองทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ (1) ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (2) ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ (3) พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด และ (4) อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ แต่ละปัจจัยกำหนดไว้ 3 ระดับ ได้การทดลองแบบ L_9 ที่มีทั้งหมด 9 การทดลอง ประกอบด้วยจำนวนของภาวะการทดลองที่ขึ้นอยู่กับระดับของปัจจัยที่กำหนดแสดงในตารางที่ 5 และตารางที่ 7 แสดงภาพรวมของ $L_9 (3^4)$ OAs ที่ใช้ในการศึกษานี้ โดยอาศัยตารางสำเร็จรูปที่กำหนด L_9 (Roy, 2001)

ตารางที่ 5 ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองการผลิตกรดแอซีติก

ปัจจัย	ระดับ		
	1	2	3
1. ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	IFRPD	TISTR 102	Mix (1:1)
2. ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ (%)	8	10	12
3. พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด	5	5.5	6.0
4. อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ (°C)	25	30	35

ตารางที่ 6 แสดง $L_9(3^4)$ OAs ของการผลิตกรดแอซีติก

ชุดการทดลอง	คอลัมน์			
	1	2	3	4
A	1	1	1	1
B	1	2	2	2
C	1	3	3	3
D	2	1	2	3
E	2	2	3	1
F	2	3	1	2
G	3	1	3	2
H	3	2	1	3
I	3	3	2	1

ที่มา : Roy (2001)

ทำการทดลองโดยมีชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ พีเอช เริ่มต้นของไวน์สับปะรด และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ ตามตารางที่ 5 ปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 นอร์มัล การผลิตกรดแอซีติกจะใช้ไวน์สับปะรดที่ปรับพีเอชเป็นสารอาหารตั้งต้นที่มีปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที ทำการหมักจนแบคทีเรียกรดแอซีติกเติบโตเข้าสู่ระยะคงตัว (stationary phase) โดยพิจารณาค่าความขุ่นของเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร (optical density, OD_{600}) เมื่อความหนาแน่นของเซลล์คงที่หรือเริ่มลดลง จึงยุติการเพาะเลี้ยง โดยเก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ทุก ๆ 8 ชั่วโมงตลอดการทดลอง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ และกรดแอซีติก จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองตามวิธีการทากุชิ เพื่อสรุปผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์

ตารางที่ 7 ปัจจัยและระดับภายใต้สภาวะของการทดลองการผลิตกรดแอซีติกระดับฟลาสก์

ชุดการทดลอง	ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์(%)	พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด	อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ (°C)
A	IFRPD	8	5	25
B	IFRPD	10	5.5	30
C	IFRPD	12	6	35
D	TISTR 102	8	5.5	35
E	TISTR 102	10	6	25
F	TISTR 102	12	5	30
G	Mix (1:1)	8	6	30
H	Mix (1:1)	10	5	35
I	Mix (1:1)	12	5.5	25

2.3 การยืนยันการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จภายใต้สภาวะที่เหมาะสมระดับฟลาสก์

หลังจากการวิเคราะห์ข้อมูลการหมักกรดแอซีติกระดับฟลาสก์ตามวิธีการทากุชิแล้วทำการทดลองซ้ำการหมักกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยที่ได้จากข้อ 2.2 ที่ศึกษามาทั้งหมด และนำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวนั้นมาทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2 โดยทำซ้ำ 2 ชุด เพื่อยืนยันผลการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว

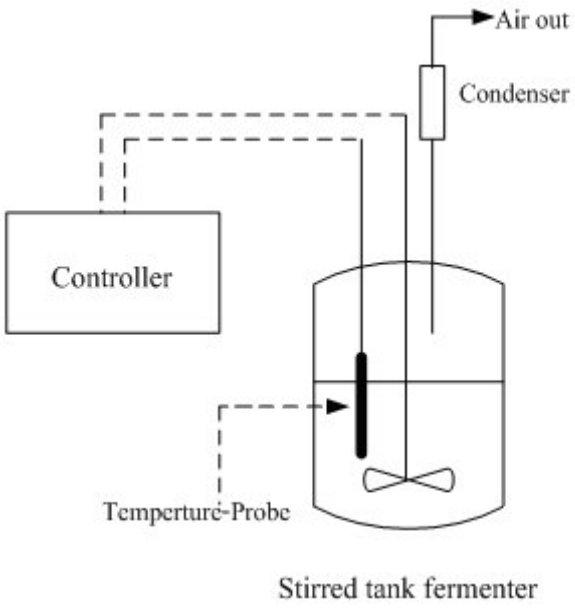
2.4 การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของแบคทีเรียกรดแอซีติก *Acetobacter sp.* สำหรับการผลิตกรดแอซีติกด้วยการหมักแบบเบ็ดเสร็จ โดยนำกล้าเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS agar เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวน 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 90 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวน 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อ 10% สำหรับการเพาะเลี้ยงในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการขนาด 2 ลิตร ต่อไป

การผลิตกรดแอซีติกในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการทดลองโดยใช้เชื้อผสมของ *Acetobacter aceti* TISTR 102 กับ IFRPD ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์เท่ากับ 8% พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดเท่ากับ 5.5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ไวน์สับปะรดเป็นสารอาหารตั้งต้น ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการขนาด 2 ลิตร อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm ทำการหมักจนแบคทีเรียกรดแอซีติกเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) โดยพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร (optical density, OD_{600}) เมื่อความหนาแน่นของเซลล์คงที่หรือเริ่มลดลง จึงยุติการเพาะเลี้ยงโดยเก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ทุก ๆ 4 ชั่วโมง ตลอดการทดลอง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ และกรดแอซีติก จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลอง เพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์การเติบโตและการผลิตกรดแอซีติก เพื่อสรุปผลการผลิตกรดแอซีติกที่สูงที่สุด



ภาพที่ 5 การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

3. การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

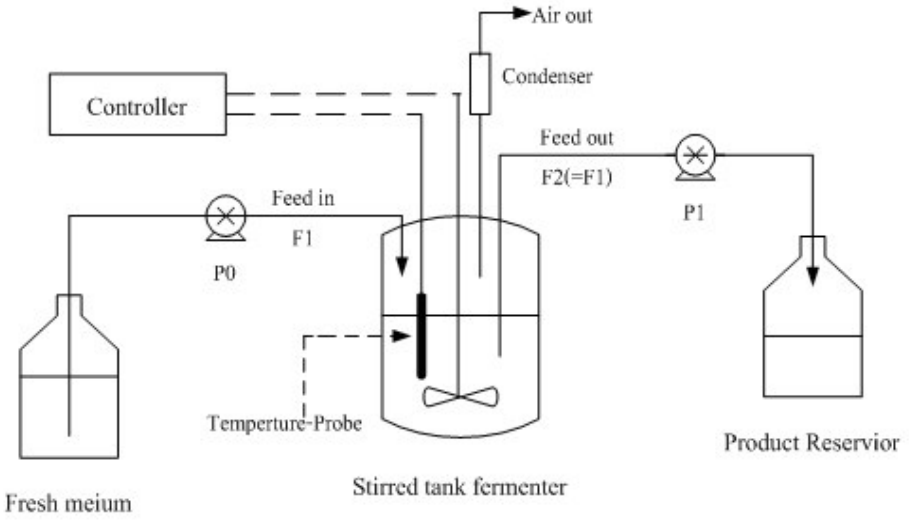
3.1 ผลของอัตราการเจือจาง

การเตรียมกล้าเชื้อ

นำกล้าเชื้อของแบคทีเรียกรดแอซีติกที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS โดยเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ potato broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงฟลาสก์ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ potato broth ปริมาตร 90 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงในถังหมักต่อไป

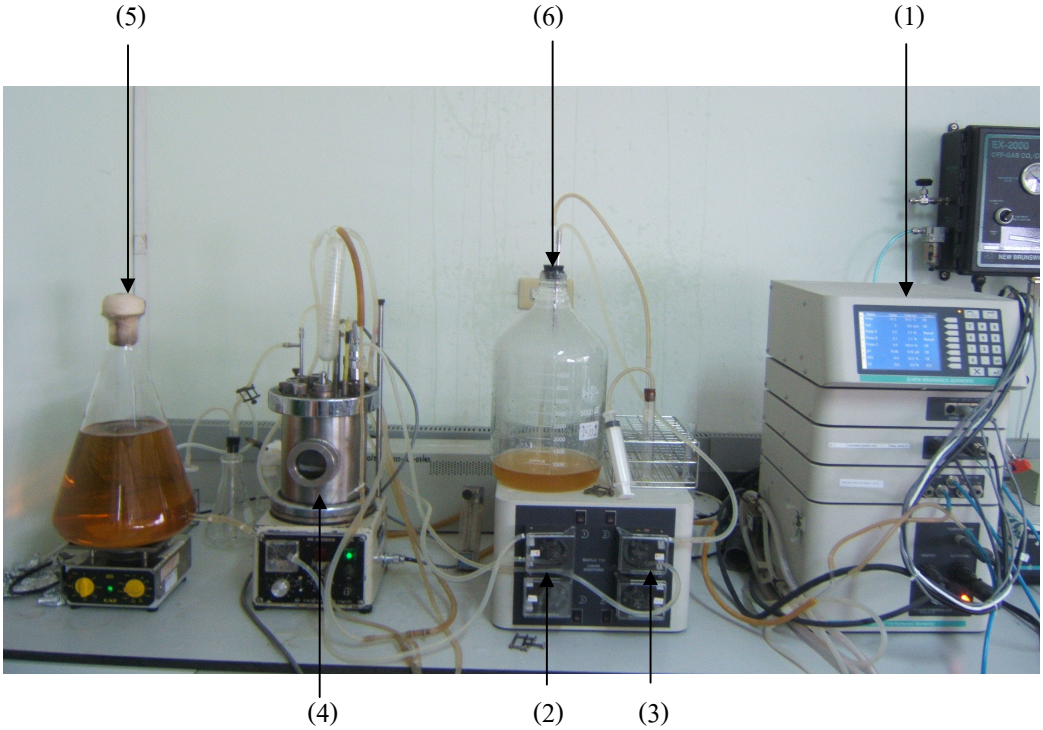
การเพาะเลี้ยงในถังหมัก

ทำการหมักแบบเบ็ดเสร็จโดยมีปริมาตรทำงานทั้งหมด 1.00 ลิตร ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการขนาด 2 ลิตร ควบคุมสภาวะการหมักดังนี้ เชื้อผสมระหว่าง *Acetobacter aceti* TISTR 102 กับ IFRPD ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์เท่ากับ 8% พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดเท่ากับ 5.5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ไวน์สับปะรดเป็นสารอาหารตั้งต้น อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm ทำการหมักจนเชื้อเติบโตถึงระยะปลายของการเติบโตทวีคูณ (late-log phase) ทำการเปลี่ยนการหมักเป็นแบบต่อเนื่องโดยการเติมไวน์สับปะรดซึ่งเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่เข้าสู่ถังหมักด้วยอัตราการไหล (F1) ซึ่งคำนวณจากอัตราการเจือจาง (dilution rate, D) ที่กำหนด (D=F/V) และสูบน้ำหมักออกจากถังหมักด้วยอัตราการไหลออก (F2) ที่เท่ากับอัตราการไหลเข้าของไวน์สับปะรดใหม่ (F2=F1) คือ 0.03 และ 0.05 ต่อชั่วโมง โดยกำหนดให้ปริมาตรการแทนที่น้ำหมักเท่ากับ 4 เท่า ทำการเพาะเลี้ยงจนเข้าสู่สภาวะคงตัว (steady state) เก็บตัวอย่างน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ทุก ๆ 4 ชั่วโมงตลอดการทดลอง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ และกรดแอซีติก จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลอง เพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตและการผลิตกรดแอซีติก เพื่อสรุปผลการผลิตกรดแอซีติกที่สูงที่สุด



ภาพที่ 6 การผลิตกรดแอซีติกแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ F1 และ F2 อัตราการไหลเข้าของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ และอัตราการไหลออกของน้ำหมักของถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 7 แสดงระบบควบคุมการผลิตกรดแอซีติกแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

(1) อุปกรณ์ควบคุมอัตโนมัติ

(2) เครื่องสูบอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่เข้าสู่ถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ควบคุมอัตราการไหลเข้า F1

(3) เครื่องสูบน้ำหมักออกจากถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ควบคุมอัตราการไหลออก F2

(4) ถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ควบคุมพีเอชและอุณหภูมิ

(5) ถังเติมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ (Feed tank)

(6) ถังเก็บน้ำหมัก (Storage tank)

3.2 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมัก

นำเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากการผลิตแบบต่อเนื่องในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ โดยมีอัตราการเจือจาง 0.05 ต่อชั่วโมงโดยเติมสารให้ความหวาน 4 ชนิด คือ มอลทิทอล ฟรุกโตโอลิโกแซกคาไรด์ ไซลิทอล น้ำผึ้ง มาทำการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยใช้วิธี Hedonic test โดยให้คะแนนความชอบที่ระดับ 1–9 (1 คือ ไม่ชอบมากพิเศษ ถึง 9 คือ ชอบมากพิเศษ) ใช้ผู้ทดสอบทั่วไป จำนวน 50 คน โดยลักษณะที่ทดสอบ คือ สี กลิ่น รสหวาน รสเปรี้ยว และความชอบโดยรวม แล้วนำคะแนนที่ได้จากการทดสอบมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ระยะเวลาทำการวิจัย

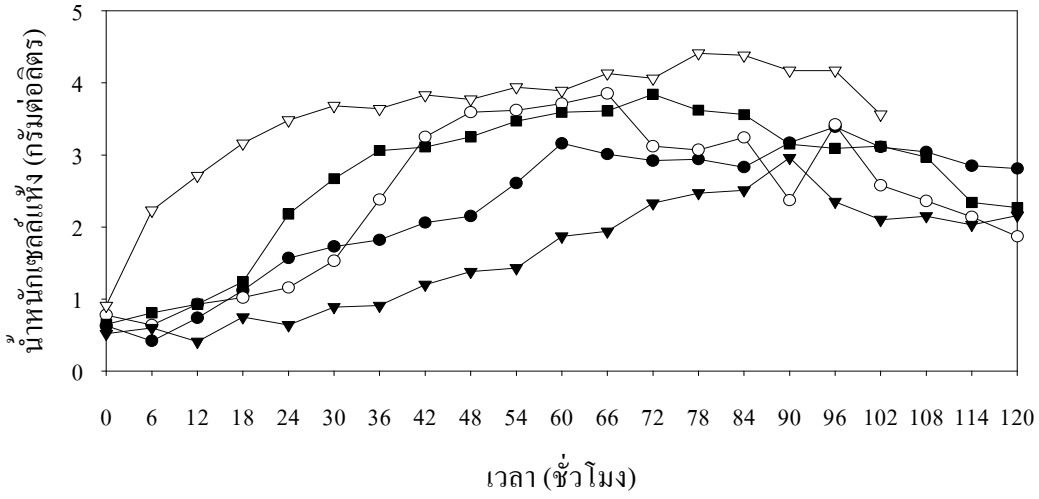
ระยะเวลาการวิจัยเริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2548 ถึงเดือนมีนาคม 2551

ผลและวิจารณ์

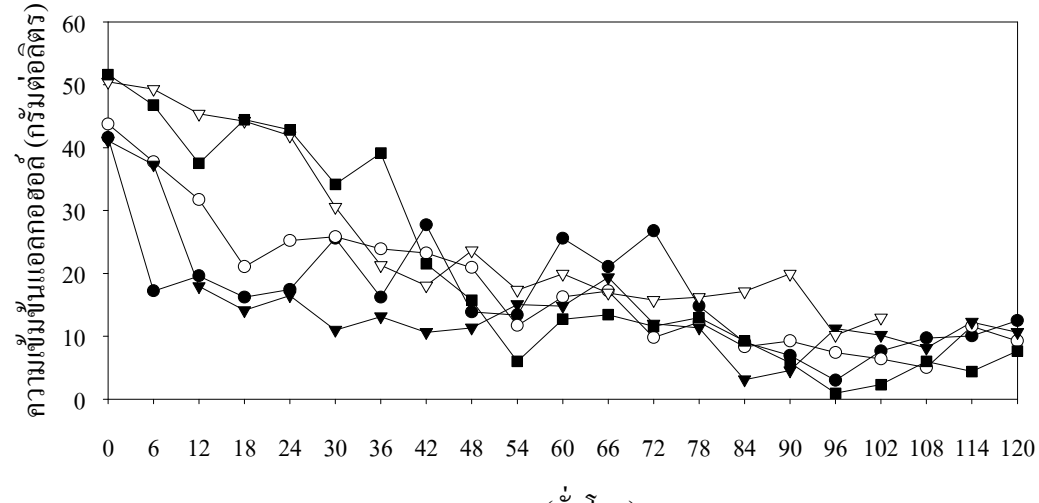
1. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแอซีติกที่เหมาะสมในการผลิตกรดแอซีติก

การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จจากแบคทีเรียกรดแอซีติก 5 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียกรดแอซีติก *Acetobacter aceti* รหัส TISTR 522, 086, 107, 102 และ *A. aceti* รหัส IFRPD ในระดับฟลาสก์ปริมาตร 300 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที และพีเอชเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ (Hoyer's media) เท่ากับ 5 เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์สับปะรด สามารถสรุปผลการทดลองดังนี้ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ และกรดแอซีติก ตามลำดับ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ดังภาพที่ 8-10 ตามลำดับ

จากการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ รหัส TISTR 522, 086,107, 102 และ IFRPD ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ (Hoyer's media) พบว่า เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด เท่ากับ 4.41 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 78 ชั่วโมง และเชื้อ *A. aceti* TISTR 107 มีน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยที่สุด เท่ากับ 2.96 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 90 ชั่วโมง (ภาพที่ 8) ส่วนปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เริ่มต้น ดังนี้ 41.587, 43.738, 41.109, 50.463 และ 51.620 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยกำหนดให้ปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เริ่มต้นที่ใส่ในอาหารเพาะเลี้ยง เท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 9) ส่วนปริมาณความเข้มข้นของกรดแอซีติก พบว่าเชื้อ *A. aceti* IFRPD ผลิตกรดแอซีติกได้สูงที่สุด เท่ากับ 21.035 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 96 ชั่วโมง และเชื้อ *A. aceti* TISTR 086 ผลิตกรดแอซีติกได้ต่ำที่สุด เท่ากับ 3.005 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 48ชั่วโมง (ภาพที่ 10) สามารถคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการเติบโตและการผลิตกรดแอซีติกของแบคทีเรียกรดแอซีติก *Acetobacter aceti* สรุปได้ดังตารางที่ 8

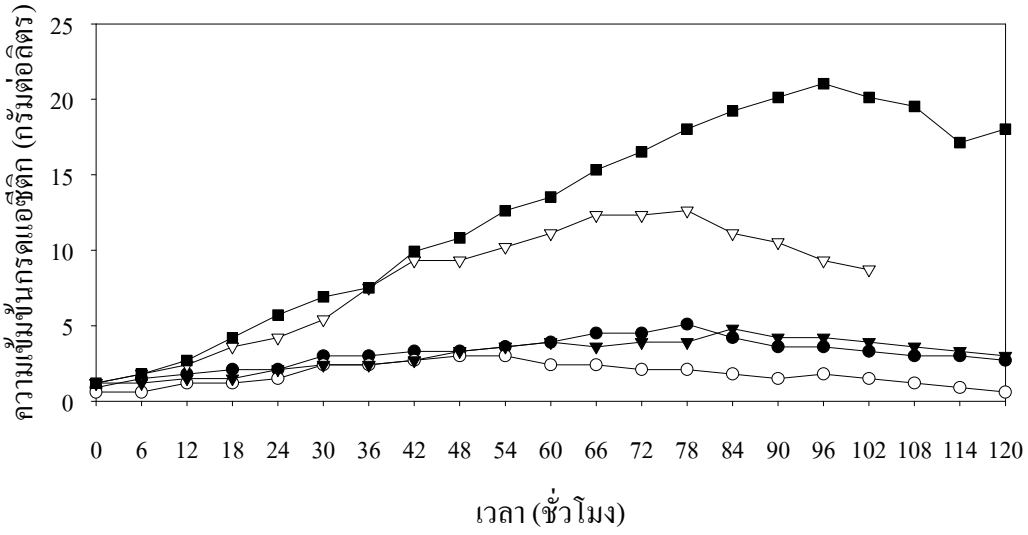


ภาพที่ 8 น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์ระหว่างการเพาะเลี้ยงระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราเขย่า 250 รอบต่อนาที (สัญลักษณ์ ●,○,▼,△ และ ■ *A. aceti* รหัส 522, 086, 107, 102 และ IFRPD ตามลำดับ)



ภาพที่ 9 ปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ของแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์ระหว่างการเพาะเลี้ยงระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราเขย่า 250 รอบต่อนาที

(สัญลักษณ์ ●,○,▼,△ และ ■ *A. aceti* รหัส 522, 086, 107, 102 และ IFRPD ตามลำดับ)



ภาพที่ 10 ความเข้มข้นของกรดแอซีติกของเชื้อแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์ระหว่างการเพาะเลี้ยงระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราเขย่า 250 รอบต่อนาที

(สัญลักษณ์ ●,○,▼,△ และ ■ *A. aceti* รหัส 522, 086, 107, 102 และ IFRPD ตามลำดับ)

ตารางที่ 8 แสดงพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการเติบโตและการผลิตกรดแอซีติกของแบคทีเรียกรดแอซีติก *Acetobacter aceti*.

สายพันธุ์	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ, h^{-1})	ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$, g/g)	ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$, g/g)	($Y_{P/X}$, g/g)	อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_S, g/g h)	อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p, g/g h)	อัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_P, g/l h)
TISTR 522	0.031	0.020	0.044	2.20	0.040	0.025	0.049
TISTR 086	0.042	0.088	0.088	1.00	0.238	0.032	0.054
TISTR 107	0.022	0.041	0.078	1.90	0.193	0.032	0.042
TISTR 102	0.014	0.057	0.294	5.20	0.149	0.048	0.165
IFRPD	0.023	0.055	0.370	6.70	0.193	0.082	0.220

หมายเหตุ TISTR 522 คือ *Acetobacter aceti* TISTR 522

TISTR 086 คือ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 086

TISTR 107 คือ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 107

TISTR 102 คือ *Acetobacter aceti* TISTR 102

IFRPD คือ *Acetobacter aceti* IFRPD จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากตารางที่ 8 เมื่อพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการเติบโตและการผลิตกรดแอซีติกของแบคทีเรียกรดแอซีติก พบว่า เชื้อ *A. aceti* TISTR 522 มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลได้เซลล์ ($Y_{x/s}$) ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{p/s}$) อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_s) อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p) และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) เท่ากับ 0.031ต่อชั่วโมง 0.020 กรัมต่อกรัม 0.044 กรัมต่อกรัม 0.040 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง 0.025 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง และ 0.049 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

ส่วนเชื้อ *A. aceti* TISTR 086 มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลได้เซลล์ ($Y_{x/s}$) ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{p/s}$) อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_s) อัตราจำเพาะของการผลิตกรด แอซีติก (q_p) และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) เท่ากับ 0.042 ต่อชั่วโมง 0.088 กรัมต่อกรัม 0.088 กรัมต่อกรัม 0.238 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง 0.032 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง และ 0.054 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

ส่วนเชื้อ *A. aceti* TISTR 107 มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลได้เซลล์ ($Y_{x/s}$) ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{p/s}$) อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_s) อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p) และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) เท่ากับ 0.022 ต่อชั่วโมง 0.041 กรัมต่อกรัม 0.078 กรัมต่อกรัม 0.193 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง 0.032 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง และ 0.042 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

ส่วนเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลได้เซลล์ ($Y_{x/s}$) ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{p/s}$) อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_s) อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p) และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) เท่ากับ 0.014 ต่อชั่วโมง 0.057 กรัมต่อกรัม 0.294 กรัมต่อกรัม 0.149 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง 0.048 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง และ 0.165 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

ส่วนเชื้อ *A. aceti* IFRPD มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลได้เซลล์ ($Y_{x/s}$) ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{p/s}$) อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_s) อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p) และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) เท่ากับ 0.023 ต่อชั่วโมง 0.055 กรัมต่อกรัม 0.370 กรัมต่อกรัม 0.193 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง 0.082 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง และ 0.220 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบค่าจลนพลศาสตร์ของการเติบโตและการผลิตกรดแอซีติกของแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแอซีติก *Acetobacter aceti* TISTR 086 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(μ), ผลได้เซลล์ ($Y_{x/s}$) และอัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_s) สูงสุด คือ 0.042 ต่อชั่วโมง , 0.088 กรัมต่อกรัม และ 0.238 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียกรดแอซีติก *A.aceti* IFRPD จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มีผลได้กรดแอซีติก ($Y_{p/s}$), อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p) และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) สูงสุด คือ 0.370 กรัมต่อกรัม 0.082 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง และ 0.220 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

จากผลการทดลอง *A. aceti* TISTR 086 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและผลได้เซลล์สูงที่สุด แต่มีอัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติกต่ำกว่า *A. aceti* IFRPD ประมาณ 2 เท่า จึงทำให้ได้ผลได้กรดแอซีติกและอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรของ *A. aceti* IFRPD มากกว่าประมาณ 4 เท่า ส่วนอัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์มีค่าไม่แตกต่างกันมาก คือ 0.238 กับ 0.193 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง โดย *A. aceti* TISTR 086 นั้น เป็นเชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าจะใช้แหล่งคาร์บอน เพื่อผลิตสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ได้ (รสสุคนธ์, 2528) จึงทำให้เซลล์ผลิตกรดแอซีติกได้น้อยลง และจากการศึกษาการใช้น้ำคั้นสับปะรดแทนน้ำมะพร้าวเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. aceti* subsp. *xylinum* ในการผลิตวุ้นมะพร้าว โดยแปรผันอัตราส่วนผสมระหว่างน้ำมะพร้าวกับน้ำคั้นเปลือกสับปะรดเขียวและเหลือง พบว่าการใช้น้ำมะพร้าวผสมกับน้ำคั้นเปลือกสับปะรดในอัตราส่วน 1:1 ให้ความหนาของแผ่นวุ้นดีที่สุด คือ 1.15 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 10 วันโดยมีพีเอชในน้ำคั้นเปลือกสับปะรดขียวและเหลือง ดังนี้ 3.5 และ 5.0 ตามลำดับ (วรัญญู, 2533) เพราะฉะนั้นแบคทีเรียกรดแอซีติก *A. aceti* TISTR 086 จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้เพื่อผลิตวุ้นเซลลูโลสมากกว่า

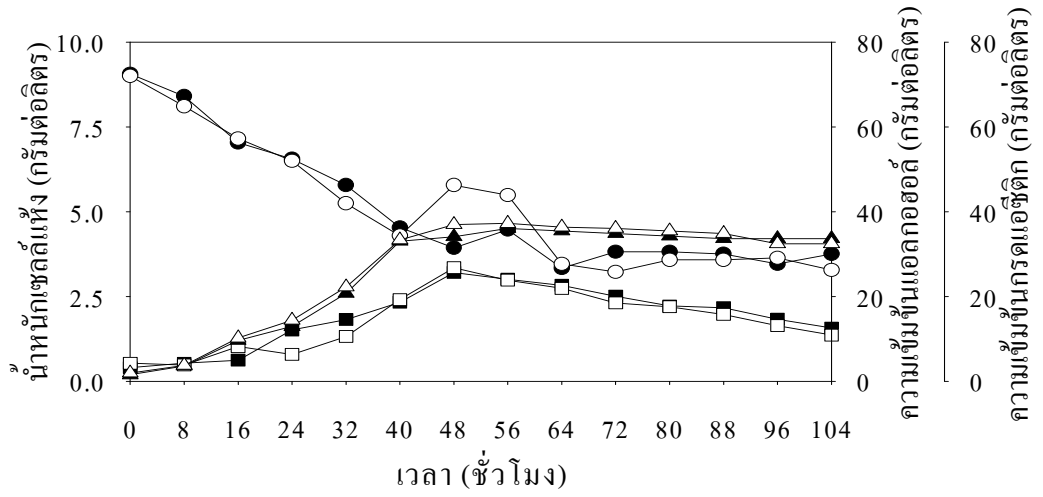
จากรายงานของ มาลัย (2548) ได้ใช้เวลาในการหมักน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำสับปะรดเป็นระยะเวลานาน 1-2 เดือนจึงจะได้น้ำส้มสายชูหมักที่มีปริมาณความเข้มของกรดแอซีติก 4 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเชื้อ *A. aceti* IFRPD เป็นเชื้อที่สามารถผลิตกรดแอซีติกได้สูงที่สุด และ *A. aceti* TISTR 102 เป็นเชื้อที่สามารถผลิตกรดแอซีติกได้มากรองจากเชื้อ *A. aceti* IFRPD ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียกรดแอซีติกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแอซีติกคือ *A. aceti* IFRPD จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยพิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรและผลได้ของกรดแอซีติก โดยมีสายพันธุ์ *A. aceti* TISTR 102 ที่มีแนวโน้มที่ดีจากการพิจารณาจากเกณฑ์ดังกล่าวใกล้เคียงกัน แม้ว่าสายพันธุ์ *A. aceti* TISTR 102 จะมีอัตราการเติบโตจำเพาะต่ำที่สุด

2. การผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์

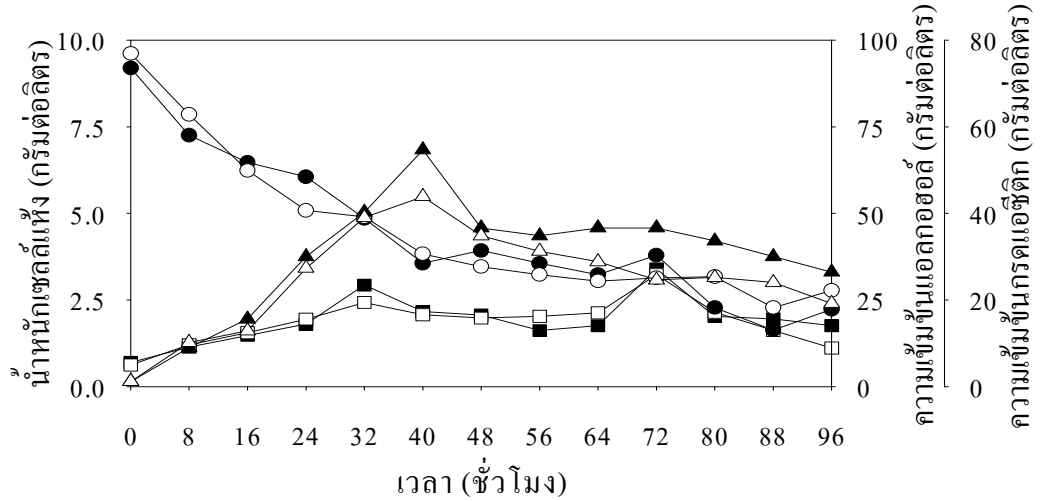
2.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดด้วยวิธีการทากุชิ

การศึกษาการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเขย่า 250 รอบต่อนาที ซึ่งออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ ประกอบด้วย 4 ปัจจัย (3 ระดับ 4 ปัจจัย ดูตารางที่ 5 ในอุปกรณ์และวิธีการ) อาศัยตาราง L_9 (3^4) มีทั้งหมด 9 การทดลอง (ดูตารางที่ 7 ในอุปกรณ์และวิธีการ) โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 0-120 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 11-19

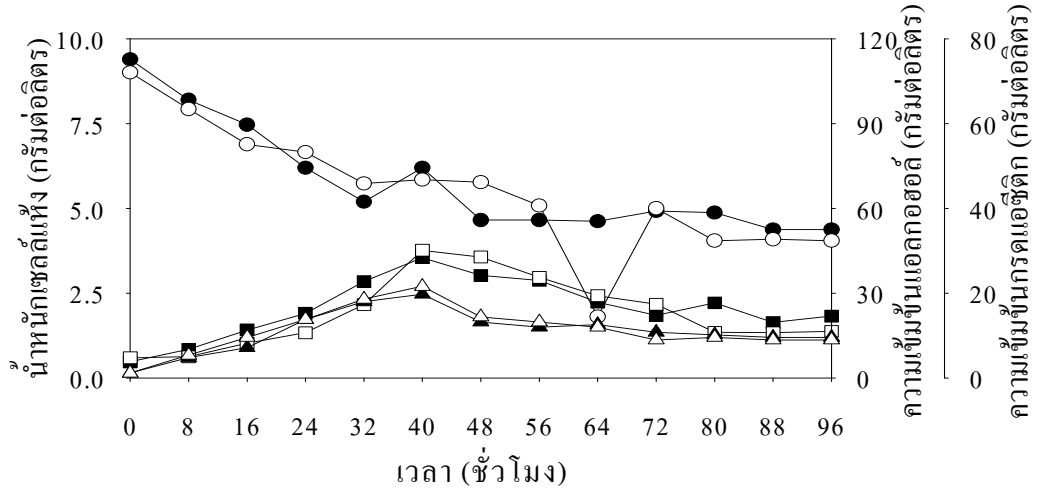
การทดลองทั้ง 2 ซ้ำ ใน 9 ชุดการทดลอง ให้ผลใกล้เคียงกัน คือ ในชุดการทดลอง H ซึ่งมีสภาวะการทดลอง ดังนี้ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ผสม *A. aceti* IFRPD กับ *A. aceti* TISTR 102 ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ 10%, พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด 5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ 35 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้นของกรดแอซีติกเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 63.706 กรัมต่อลิตร และชุดการทดลอง F ซึ่งมีสภาวะการทดลอง ดังนี้ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ *A. aceti* TISTR 102 ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ 12%, พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด 5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ 30 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้นของกรดแอซีติกเฉลี่ยต่ำสุด เท่ากับ 7.212 กรัมต่อลิตร ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติกของผลการทดลอง 9 ชุดการทดลอง แสดงดังภาพที่ 11-19



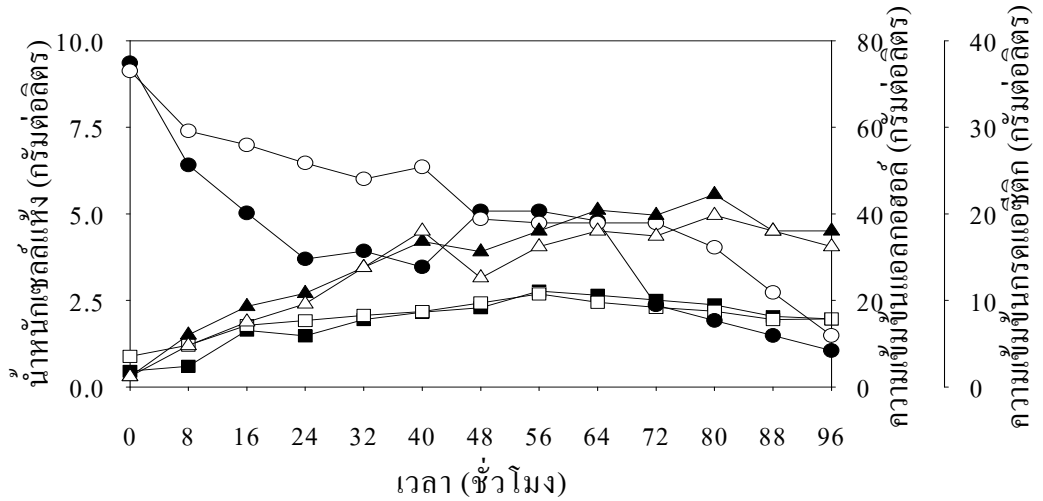
ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง A (ดูตารางที่ 5-7 หน้า 32-34) (สัญลักษณ์ ■,□ ●,○ และ ▲,△ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ และกรดแอซีติกของชุดที่ 1 กับ 2 ตามลำดับ)



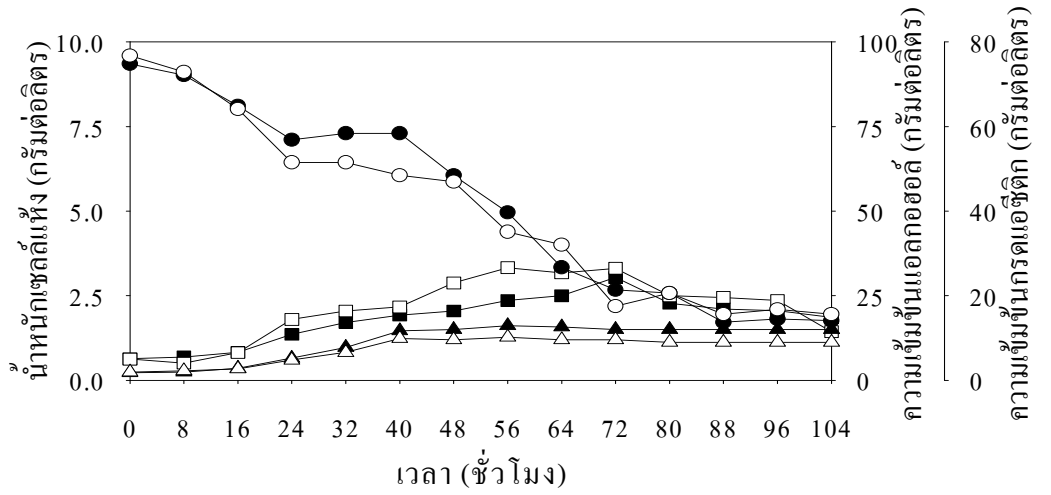
ภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง B (ดูตารางที่ 5-7 หน้า 32-34) (สัญลักษณ์ ■,□ ●,○ และ ▲,△ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ และกรดแอซีติกของชุดที่ 1 กับ 2 ตามลำดับ)



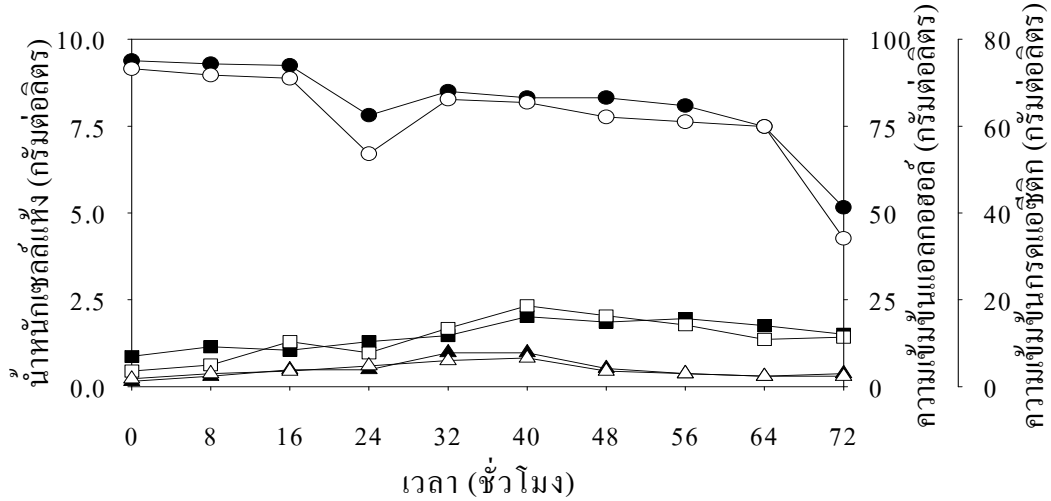
ภาพที่ 13 การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง C (ดูตารางที่ 5-7 หน้า 32-34) (สัญลักษณ์ ■,□ ●,○ และ ▲,△ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ และกรดแอซีติกของชุดที่ 1 กับ 2 ตามลำดับ)



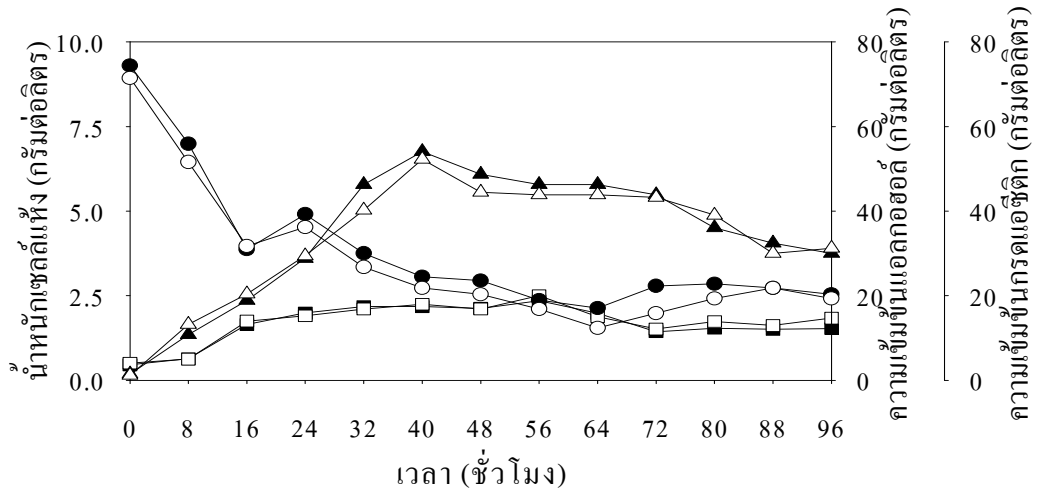
ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง D (ดูตารางที่ 5-7 หน้า 32-34) (สัญลักษณ์ ■,□ ●,○ และ ▲,△ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ และกรดแอซีติกของชุดที่ 1 กับ 2 ตามลำดับ)



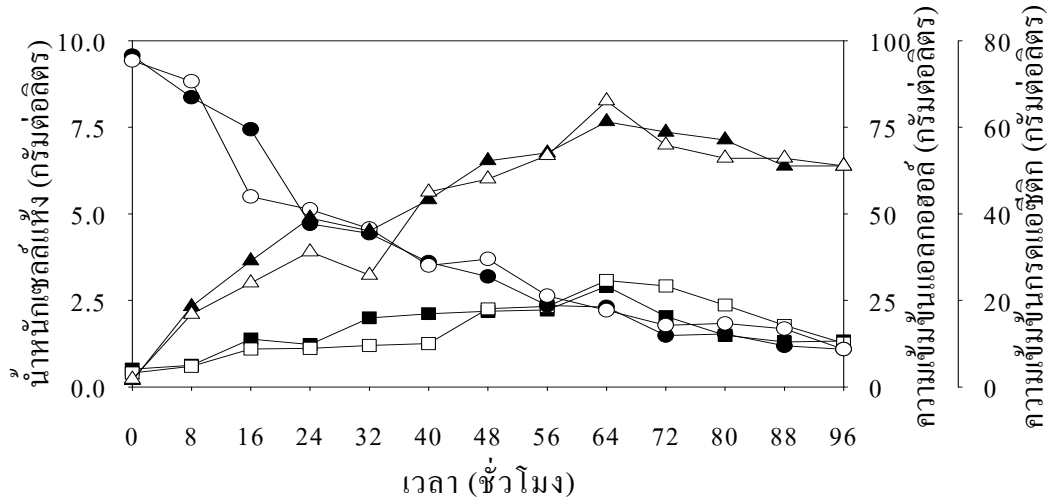
ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง E (ดูตารางที่ 5-7 หน้า 32-34) (สัญลักษณ์ ■,□ ●,○ และ ▲,△ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ และกรดแอซีติกของชุดที่ 1 กับ 2 ตามลำดับ)



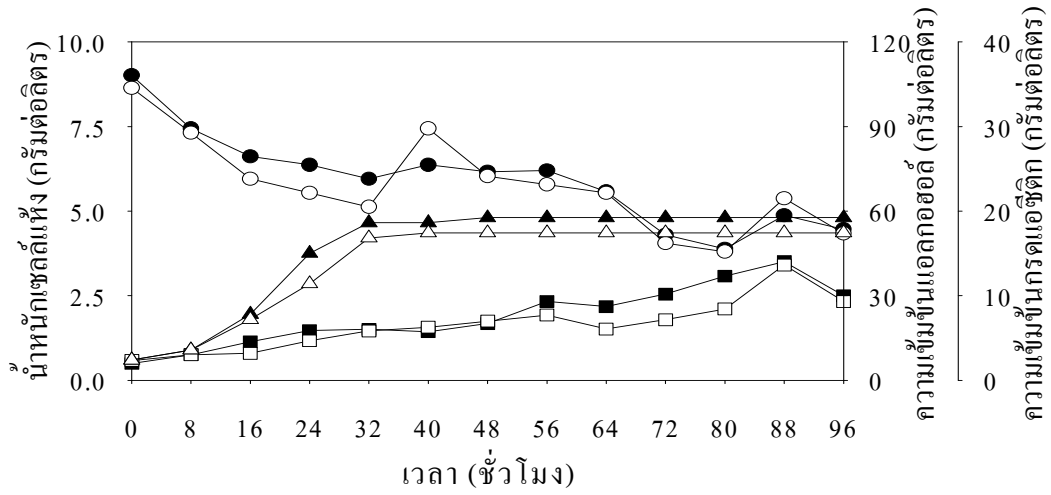
ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง F (ดูตารางที่ 5-7 หน้า 32-34) (สัญลักษณ์ ■,□ ●,○ และ ▲,△ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ และกรดแอซีติกของชุดที่ 1 กับ 2 ตามลำดับ)



ภาพที่ 17 การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง G (ดูตารางที่ 5-7 หน้า 32-34) (สัญลักษณ์ ■,□ ●,○ และ ▲,△ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ และกรดแอซีติกของชุดที่ 1 กับ 2 ตามลำดับ)



ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง H (ดูตารางที่ 5-7 หน้า 32-34) (สัญลักษณ์ ■,□ ●,○ และ ▲,△ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ และกรดแอซีติกของชุดที่ 1 กับ 2 ตามลำดับ)



ภาพที่ 19 การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก ระหว่างการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ของชุดการทดลอง I (ดูตารางที่ 5-7 หน้า 32-34) (สัญลักษณ์ ■,□ ●,○ และ ▲,△ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ และกรดแอซีติกของชุดที่ 1 กับ 2 ตามลำดับ)

2.1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแอซีติก จากความเข้มข้นของกรดแอซีติก (C_P)

ความเข้มข้นกรดแอซีติก (C_P) จากผลการทดลองทั้งหมด สรุปดังตารางที่ 9 โดยแสดงค่าเฉลี่ย ค่ากลางค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าอัตราส่วน Signal/Noise ratio S/N ratio) สูตรคำนวณหาค่า Mean-Squared Deviation (MSD) และค่าอัตราส่วน S/N แสดงในภาคผนวก ข ในการวิเคราะห์ผลการทดลองอาศัยค่าอัตราส่วน S/N ใช้คำนวณค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับของปัจจัยเพื่อพิจารณาอิทธิพลของปัจจัย และระดับของปัจจัยที่เหมาะสม แสดงดังตารางที่ 10 และภาพที่ 20 จากนั้นวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยต่อความเข้มข้นกรดแอซีติก โดยวิธี ANOVA แสดงดังตารางที่ 11

จากตารางที่ 9 พบว่า มีความเข้มข้นเฉลี่ยของกรดแอซีติกที่ได้อยู่ระหว่าง 7.212-63.706 กรัมต่อลิตร และค่ากลางของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นกรด แอซีติกอยู่ระหว่าง 0.00025-0.01963

ส่วนอัตราส่วน S/N จะมีความสัมพันธ์กับผลการทดลองดังนี้ หากการทดลองชุดใดมีความเข้มข้นกรดแอซีติกสูง การทดลองนั้นก็จะมีค่าอัตราส่วน S/N สูงขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากการออกแบบการทดลองเป็นแบบ QC=B (Bigger is better) จากผลการทดลองในตารางที่ 9 พบว่าเมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นของกรดแอซีติกเฉลี่ยสูงสุด จะได้ชุดการทดลอง H ซึ่งประกอบด้วยสภาวะที่ใช้ในการผลิตกรดแอซีติก คือ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (เชื้อผสมระหว่าง *A. aceti* IFRPD และ *A. aceti* TISTR 102 ในอัตราส่วน 1:1), ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ 10%, พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด 5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ 35 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้นของกรดแอซีติกเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 63.706 กรัม/ลิตร

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์อิทธิพลของแต่ละปัจจัย โดยใช้ค่าความเข้มข้นของกรดแอซีติก (C_p) จากตารางที่ 10 พบว่าปัจจัยที่มีค่าอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกมากที่สุด คือ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 44.970% รองลงมา คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์เท่ากับ 33.973% ส่วนอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ และพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด เป็นปัจจัยที่มีค่าอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกน้อยที่สุดเท่ากับ 16.112% และ 4.946% ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาจากค่าอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกจากค่าดังกล่าวสามารถบอกได้ว่าชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกมากที่สุด และพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกน้อยที่สุด

เมื่อพิจารณาค่า sum of squares ของแต่ละปัจจัยจากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ค่าความเข้มข้นของกรดแอซีติกในตารางที่ 11 จะเห็นว่า ปัจจัย A คือ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ มีค่า sum of squares สูงสุดเท่ากับ 3197.364 แสดงว่าชนิดของเชื้อจุลินทรีย์มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของกรดแอซีติกมากที่สุด ส่วนปัจจัย C คือ พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด มีค่า sum of squares น้อยที่สุดเท่ากับ 190.260 แสดงว่า พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของกรดแอซีติกน้อยที่สุด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีต่อความเข้มข้นกรดแอซีติกในตารางที่10 ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น ส่วนร้อยละค่าอิทธิพล (Percent contribution) ของแต่ละปัจจัยเรียงตามลำดับมากไปหาน้อยได้ดังนี้ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (48.495%), ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ (35.276%), อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ (11.216%) และพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด (2.621%) ตามลำดับ ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับค่า sum of squares อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่า ทุกปัจจัยมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นกรดแอซีติกอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.001$ ยกเว้น ปัจจัยของพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดเท่านั้นที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นกรดแอซีติกอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.025$

จากภาพที่ 20 สามารถพิจารณาระดับของแต่ละปัจจัยที่มีค่าอัตราส่วน Signal/Noise สูงสุด ซึ่งสามารถสรุประดับของแต่ละปัจจัยที่เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแอซีติกเมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นกรดแอซีติกได้ดังนี้ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ผสมของ *A. aceti* TISTR 102 กับ *A. aceti* IFRPD ในอัตราส่วน1:1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ 8% พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด 5.5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ 35 องศาเซลเซียส โดยการวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มข้นกรดแอซีติก สรุปดังในตารางที่ 12

หากพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมที่ได้กับสภาวะในชุดการทดลอง H มีความเข้มข้นของกรดแอซีติกเฉลี่ยสูงสุด พบว่า มีบางสภาวะที่มีค่าแตกต่างกัน ได้แก่ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ กับพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด โดยในชุดการทดลอง H ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ 10% และพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด 5 แต่ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกรองลงมาจากชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (ตารางที่ 10) จากการศึกษาของรสสุคนธ์ (2528) พบว่า เชื้อ *A. aceti* 103 สามารถผลิตกรดแอซีติกได้ดีในไวน์น้ำมะพร้าวที่มีความเข้มข้นเอทานอล 8 % และยังคงผลิตกรดแอซีติกได้ดีเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเอทานอลเป็น 10 % โดยไม่ต้องเติมสารอาหารเพิ่ม ส่วนพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกน้อยที่สุด พบว่าทั้งสองสภาวะที่ได้มีค่าไม่ต่างกันมาก คือ 5.5 และ 5 ตามลำดับ โดยแบคทีเรีย *Acetobacter* sp. เจริญเติบโตได้ดีที่พีเอชค่อนข้างต่ำ พบว่าเจริญเติบโตได้ที่ระดับพีเอช 4.0-4.5 และเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับพีเอช 5.4-6.3 (จิราภรณ์, 2529; De Ley and Frateur, 1974) โดยสามารถคำนวณความเข้มข้นกรดแอซีติก ผลได้กรดแอซีติก และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรที่คาดไว้ เมื่อทำการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทากุชิ เท่ากับ 69.4 กรัม/ลิตร, 0.96 กรัมต่อกรัม และ 1.36 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ (สูตรคำนวณในภาคผนวก ข)

ตารางที่ 9 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์โดยวิธีทากุชิ พิจารณาจากความเข้มข้นกรดแอซีติก

ชุดการทดลอง	ความเข้มข้นกรดแอซีติก (กรัม/ลิตร)		ค่าเฉลี่ย	MSD	อัตราส่วนS/N
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2			(dB)
A	36.060	37.262	36.661	0.00074	31.280
B	54.691	43.873	49.282	0.00042	33.696
C	19.833	21.636	20.734	0.00234	26.309
D	22.237	19.833	21.035	0.00228	26.416
E	12.922	10.217	11.569	0.00779	21.087
F	7.813	6.611	7.212	0.01963	17.070
G	54.090	52.287	53.188	0.00035	34.512
H	61.302	66.110	63.706	0.00025	36.065
I	19.232	17.429	18.330	0.00299	25.231

หมายเหตุ สภาวะการทดลองของแต่ละชุดการทดลอง (A-I) แสดงดัง ตารางที่ 7 หน้า 34

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มข้นของกรดแอซีติก ในการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์

ระดับ	1	2	3	4
1	30.428	30.736	28.138	25.866
2	21.524	30.283	28.448	28.426
3	31.936	22.870	27.303	29.596
ค่าต่ำสุด	21.524	22.870	27.303	25.866
ค่าสูงสุด	31.936	30.736	28.448	29.596
ค่าอิทธิพล[1]	10.411	7.865	1.145	3.730
% ค่าอิทธิพล[2]	44.970%	33.973%	4.946%	16.112%

หมายเหตุ [1] ค่าอิทธิพลเท่ากับผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด

[2] % ค่าอิทธิพล คำนวณดังสูตรคำนวณในภาคผนวก ข โดยใช้ค่าอิทธิพลรวมเท่ากับ 23.151

1, 2, 3 และ 4 หมายถึง ปัจจัยของการผลิตกรดแอซีติก (ตารางที่ 7 หน้า 34)

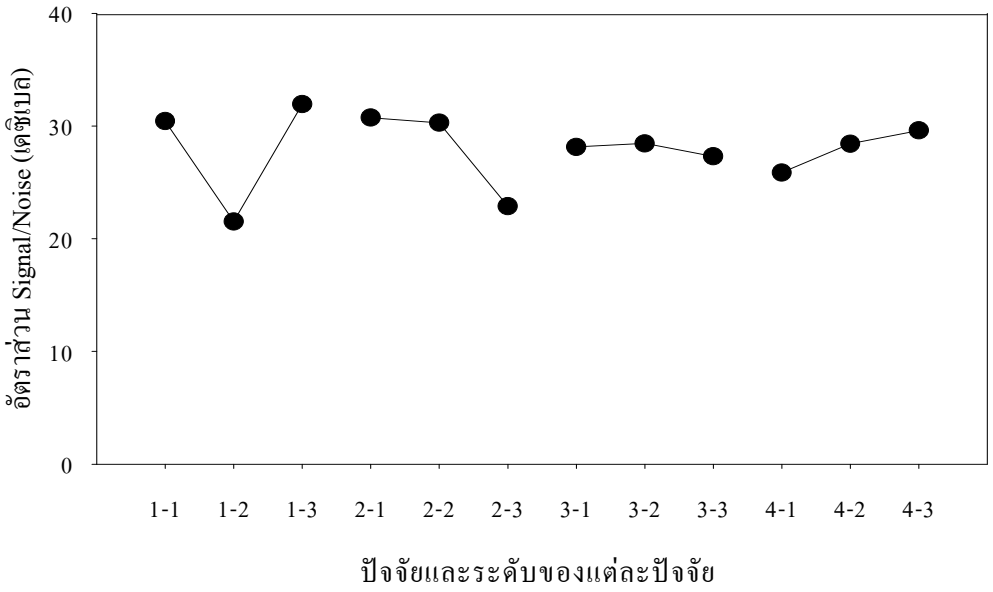
ตารางที่ 11 การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อความเข้มข้นของกรดแอซีติก (C_p) โดยวิธี ANOVA

Factor	DOF[1]	Sum of Squares[1]	Variance[1]	F-Ratio[1]	Percent contribution	Confidence[1]	Significant
1	2	3197.364	1598.682	173.478	48.495	100.000%	*****
2	2	2330.871	1165.435	126.465	35.276	100.000%	*****
3	2	190.260	95.13	10.322	2.621	99.532%	***
4	2	753.666	376.833	40.891	11.216	99.997%	*****
Error	9	82.938	9.215		2.392		
Total	17	6555.101			100.00		

หมายเหตุ 1, 2, 3 และ 4 หมายถึง ปัจจัยของการผลิตกรดแอซีติก (ตารางที่ 7 หน้า 34)

***** และ *** มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ และ $p < 0.025$ ตามลำดับ

[1] วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ข



ภาพที่ 20 สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของกรดแอซีติกในการผลิตกรดแอซีติกระดับฟลาสก์

ตารางที่ 12 สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแอซีติกจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากุชิ เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นกรดแอซีติก

ปัจจัยการทดลอง	ระดับการทดลอง	รายละเอียด
1: ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	3	เชื้อจุลินทรีย์ผสม
2: ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ (%)	1	8
3: พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด	2	5.5
4: อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ (^{o}C)	3	35

2.1.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแอซีติก จากผลได้ของกรดแอซีติก ($Y_{p/s}$)

ผลได้ของกรดแอซีติก ($Y_{P/S}$) ได้ผลการทดลองทั้งหมดดังตารางที่ 13 โดยแสดงค่าเฉลี่ย ค่ากลางค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าอัตราส่วน Signal/Noise ratio (S/N ratio) สูตรคำนวณหาค่า Mean-Squared Deviation (MSD) และค่าอัตราส่วน S/N แสดงในภาคผนวก ข ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง อาศัยค่าอัตราส่วน S/N ใช้คำนวณค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับของปัจจัย เพื่อพิจารณาอิทธิพลของปัจจัย และระดับของปัจจัยที่เหมาะสม แสดงดังตารางที่ 14 และภาพที่ 21 ส่วนการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยต่อความเข้มข้นกรดแอซีติก อาศัยวิธีวิเคราะห์ ANOVA แสดงดังตารางที่ 15

จากผลการทดลองในตารางที่ 13 พบว่า ผลได้ของกรดแอซีติกเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.182-0.961 กรัมต่อกรัม และค่ากลางของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลได้ของกรดแอซีติกอยู่ระหว่าง 1.091-47.742

ส่วนอัตราส่วน S/N จะมีความสัมพันธ์กับผลการทดลองดังนี้ หากการทดลองชุดใดมีผลได้ของกรดแอซีติกสูง การทดลองนั้นก็จะมีค่าอัตราส่วน S/N สูงขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากการออกแบบการทดลองเป็นแบบ QC=(Bigger is better) จากผลการทดลองในตารางที่ 13 เมื่อพิจารณาจากค่าผลได้กรดแอซีติกเฉลี่ยสูงสุด จะได้ชุดการทดลอง A ซึ่งประกอบด้วยสภาวะที่ใช้ในการผลิตกรดแอซีติก คือ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์: *A. aceti* IFRPD, ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ 8%, พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด 5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ 25 องศาเซลเซียส โดยมีค่าผลได้กรดแอซีติกเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.961 กรัมต่อกรัม

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์อิทธิพลของแต่ละปัจจัย โดยใช้ค่าผลได้ของกรดแอซีติก ($Y_{P/S}$) จากตารางที่ 14 พบว่าปัจจัยที่มีค่าอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกมากที่สุด คือ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 48.924% รองลงมา คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์เท่ากับ 41.074% ส่วนอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ และพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด เป็นปัจจัยที่มีค่าอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกน้อยที่สุดเท่ากับ 8.071% และ 1.931% ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาจากค่าอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกจากค่าดังกล่าวสามารถบอกได้ว่าชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกมากที่สุด และพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกน้อยที่สุด ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ผลการทดลองพิจารณาจากความเข้มข้นกรดแอซีติก

เมื่อพิจารณาค่า sum of squares ของแต่ละปัจจัยจากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ผลได้กรดแอซีติกในตารางที่ 15 จะเห็นว่า ปัจจัย A คือ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ มีค่า sum of squares สูงสุดเท่ากับ 0.809 แสดงว่าชนิดของเชื้อจุลินทรีย์มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของกรดแอซีติกมากที่สุด ส่วนปัจจัย C คือ พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด มีค่า sum of squares น้อยที่สุดเท่ากับ 0.025 แสดงว่า พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของกรดแอซีติกน้อยที่สุด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีต่อความเข้มข้นกรดแอซีติกในตารางที่ 14 ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น ส่วนร้อยละค่าอิทธิพล (Percent contribution) ของแต่ละปัจจัยเรียงตามลำดับมากไปหาน้อยได้ดังนี้ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (50.137%), ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ (34.037%), อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ (3.647%) และพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด (0.190%) ตามลำดับ ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับค่า sum of squares อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อผลได้กรดแอซีติกอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.001$ $p < 0.01$ และ $p < 0.1$ คือ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ ตามลำดับ ยกเว้น ปัจจัยของพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดเท่านั้นที่ไม่มีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์ผลการทดลองที่พิจารณาจากผลได้กรดแอซีติก อย่างมีนัยสำคัญ

จากภาพที่ 21 สามารถพิจารณาระดับของแต่ละปัจจัยที่มีอัตราส่วน Signal/Noise สูงสุด ซึ่งสามารถสรุประดับของแต่ละปัจจัยที่เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแอซีติกเมื่อพิจารณาจากผลได้กรดแอซีติกได้ดังนี้ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ *A. aceti* IFRPD ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ 8% พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด5.5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ35 องศาเซลเซียส โดยการวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อผลได้กรดแอซีติก สรุปดังในตารางที่ 16

หากพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมที่ได้กับสภาวะในชุดการทดลอง A ที่มีผลได้กรดแอซีติกเฉลี่ยสูงสุด พบว่า พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด ระหว่างสองสภาวะแตกต่างกัน คือ 5.5 และ 5 ตามลำดับ แต่พบว่าจากการวิเคราะห์ผลการทดลองพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดไม่มีอิทธิพลต่อผลได้กรดแอซีติกอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 14) ส่วนอุณหภูมิที่บ่มเชื้อมีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกน้อยรองจากพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด ฉะนั้นความแตกต่างของอุณหภูมิ จึงมีบทบาทน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับปัจจัยชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นแอลกอฮอล์ของไวน์สับปะรด ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรียกรดแอซีติกจะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง แต่จะสูญเสียกิจกรรมในการผลิตกรดแอซีติกไปอย่างสมบูรณ์ จากการแยกเชื้อ *Acetobacter aceti* สายพันธุ์ 1023 พบว่าสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแอซีติกได้ดี และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 38 องศาเซลเซียส จะสูญเสียกิจกรรมไป 55 เปอร์เซ็นต์ (Ohmori *et al*., 1982) นอกจากนั้น มีการคัดเลือกเชื้อน้ำส้มสายชู 10 สายพันธุ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแอซีติกได้ดี และนำมาทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่า เชื้อส่วนมากสามารถเจริญและผลิตกรดแอซีติกได้ดีที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส โดยมีเชื้อ *Acetobacter* sp. 170-1 สามารถผลิตกรดแอซีติกที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสได้ผลใกล้เคียงกับการผลิตกรดแอซีติกที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส และยังมีเชื้อ *A. aceti* 103, *Acetobacter* sp. 170-1, *Acetobacter* sp. 249-1และ *Acetobacter* sp. 265-2 ที่สามารถผลิตกรดได้สูงกว่า 3.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และยังผลิตกรดแอซีติกได้สูงกว่า 1.9 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (รสสุคนธ์, 2528) เชื้อเหล่านี้จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มสายชูโดยการหมักในเจนเนอเรเตอร์หรือ การหมักแบบอาหารเหลวโดยที่จะช่วยลดต้นทุนการผลิตในด้านการหล่อเย็นเพื่อลดอุณหภูมิ จากผลการวิเคราะห์คำนวณหาความเข้มข้นกรดแอซีติก ผลได้กรดแอซีติก และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรที่คาดไว้ เมื่อทำการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทากุชิ เท่ากับ 58.4 กรัมต่อลิตร, 1.16 กรัมต่อกรัม และ 1.30 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ (สูตรคำนวณในภาคผนวก ข)

ตารางที่ 13 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ โดยวิธีทากุชิ พิจารณาจากผลได้ของกรดแอซีติก

ชุดการทดลอง	$Y_{P/S}$ (กรัม/กรัม)		ค่าเฉลี่ย	MSD	อัตราส่วน S/N (dB)
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2			
A	0.911	1.012	0.961	1.091	-0.377
B	1.004	0.746	0.875	1.395	-1.445
C	0.384	0.499	0.441	5.400	-7.324
D	0.329	0.450	0.389	7.090	-8.506
E	0.287	0.184	0.235	20.840	-13.189
F	0.252	0.112	0.182	47.742	-16.789
G	0.918	0.913	0.915	1.193	-0.767
H	0.675	0.734	0.704	2.026	-3.066
I	0.492	0.245	0.368	10.397	-10.169

หมายเหตุ สภาวะการทดลองของแต่ละชุดการทดลอง (A-I) แสดงดัง ตารางที่ 7 หน้า 34

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อผลได้ของกรดแอซีติกในการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์

ระดับ	1	2	3	4
1	-3.049	-3.217	-6.744	-7.912
2	-12.828	-5.900	-6.707	-6.334
3	-4.667	-11.427	-7.093	-6.298
ค่าต่ำสุด	-12.828	-11.427	-7.093	-7.912
ค่าสูงสุด	-3.049	-3.217	-6.707	-6.298
ค่าอิทธิพล[1]	9.778	8.209	0.386	1.613
% ค่าอิทธิพล[2]	48.924%	41.074%	1.931%	8.071%

หมายเหตุ [1] ค่าอิทธิพลเท่ากับผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด

[2] % ค่าอิทธิพล คำนวณดังสูตรคำนวณในภาคผนวก ข โดยใช้ค่าอิทธิพลรวมเท่ากับ 19.986

1, 2, 3 และ 4 หมายถึง ปัจจัยของการผลิตกรดแอซีติก (ตารางที่ 7 หน้า 34)

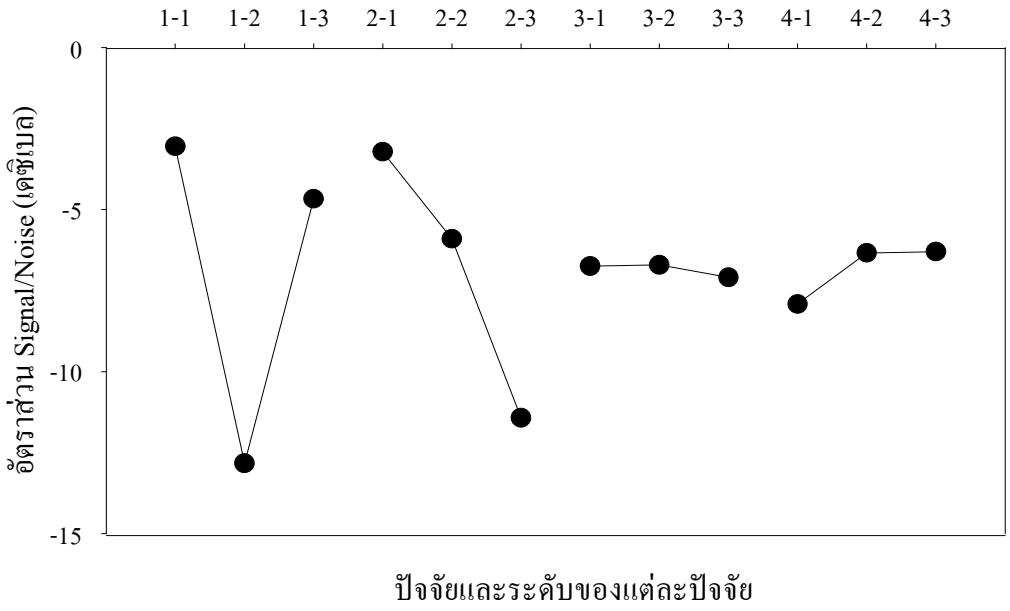
ตารางที่ 15 การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อผลได้ของกรดแอซีติก ($Y_{P/S}$) โดยวิธี ANOVA

Factor	DOF[1]	Sum of Squares[1]	Variance[1]	F-Ratio[1]	Percent contribution	Confidence[1]	Significant
1	2	0.809	0.404	36.554	50.137	99.995%	*****
2	2	0.556	0.278	25.136	34.037	99.979%	****
3	2	0.025	0.012	1.135	0.190	63.656%	-
4	2	0.079	0.039	3.586	3.647	92.844%	*
Error	9	0.098	0.01		11.989		
Total	17	1.57			100.00		

หมายเหตุ 1, 2, 3 และ 4 หมายถึง แฟกเตอร์ของการผลิตกรดแอซีติก (ตารางที่ 7 หน้า 34)

***** และ * มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ และ $p < 0.1$ ตามลำดับ

[1] วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ข



ภาพที่ 21 สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อผลได้ของกรดแอซีติกในการผลิตกรดแอซีติกระดับฟลาสก์

ตารางที่ 16 สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแอซีติกจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากุชิ เมื่อพิจารณาจากผลได้ของกรดแอซีติก

ปัจจัยการทดลอง	ระดับการทดลอง	รายละเอียด
1: ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	1	*A. aceti* IFRPD
2: ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ (%)	1	8
3: พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด	2	5.5
4: อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ (^{o}C)	3	35

2.1.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแอซีติกพิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p)

อัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) จากผลการทดลองทั้งหมด สรุปดังตารางที่ 17 โดยแสดงค่าเฉลี่ย ค่ากลางค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าอัตราส่วน Signal/Noise ratio (S/N ratio) สูตรคำนวณหาค่า Mean-Squared Deviation (MSD) และค่าอัตราส่วน S/N แสดงในภาคผนวก ข ในการวิเคราะห์ผลการทดลองอาศัยค่าอัตราส่วน S/N ใช้คำนวณค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับของปัจจัย เพื่อพิจารณาอิทธิพลของปัจจัย และระดับของปัจจัยที่เหมาะสม แสดงดังตารางที่ 18 และภาพที่ 22 ส่วนการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยต่อความเข้มข้นกรดแอซีติก อาศัยวิธีวิเคราะห์ ANOVA แสดงดังตารางที่ 19

จากตารางที่ 17 พบว่า อัตราการผลิตเชิงปริมาตรเฉลี่ยของกรดแอซีติกที่ได้อยู่ระหว่าง 0.156-1.293 กรัม/ลิตร ชั่วโมง และค่ากลางของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรอยู่ระหว่าง 0.601-45.290

ส่วนอัตราส่วน S/N จะมีความสัมพันธ์กับผลการทดลองดังนี้ หากการทดลองใดมีอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรสูง การทดลองนั้นก็จะมีค่าอัตราส่วน S/N สูงขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากการออกแบบการทดลองเป็นแบบ QC=B (Bigger is better) เมื่อพิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรเฉลี่ยสูงสุด จะได้ชุดการทดลอง G ซึ่งประกอบด้วยสภาวะที่ใช้ในการผลิตกรดแอซีติก คือ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (เชื้อผสมระหว่าง *A. aceti* IFRPD และ *A. aceti* TISTR 102 ในอัตราส่วน 1:1), ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ 8%, พีเอชเริ่มต้น 6 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ 30 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1.293 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์อิทธิพลของแต่ละปัจจัย โดยใช้ค่าอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร(Q_p) จากตารางที่ 18 พบว่าปัจจัยที่มีค่าอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกมากที่สุด คือ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 47.304% รองลงมา คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์เท่ากับ 28.916% ส่วนอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ และพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด เป็นปัจจัยที่มีค่าอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกน้อยที่สุดเท่ากับ 12.923%, 10.857% ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาจากค่าอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกจากค่าดังกล่าวสามารถบอกได้ว่าชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกมากที่สุด และพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแอซีติกน้อยที่สุด ซึ่งได้ผลทำนองเดียวกับจากการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยพิจารณาจากความเข้มข้นกรดแอซีติกและผลได้กรดแอซีติกข้างต้น

เมื่อพิจารณาค่า sum of squares ของแต่ละปัจจัยจากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ผลได้กรดแอซีติกในตารางที่ 19 จะเห็นว่า ปัจจัย A คือ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ มีค่า sum of squares สูงสุดเท่ากับ 1.477 แสดงว่าชนิดของเชื้อจุลินทรีย์มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของกรดแอซีติกมากที่สุด ส่วนปัจจัย C คือ พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด มีค่า sum of squares น้อยที่สุดเท่ากับ 0.040 แสดงว่า พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของกรดแอซีติกน้อยที่สุด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีต่อการผลิตกรดแอซีติกเมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นกรดแอซีติกในตารางที่ 18 ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น ส่วนร้อยละค่าอิทธิพล (Percent contribution) ของแต่ละปัจจัยเรียงตามลำดับมากไปหาน้อยได้ดังนี้ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (53.583%), ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ (23.713%), อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ (18.654%) และพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด (1.138%) ตามลำดับ ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับค่า sum of squares อย่างไรก็ตาม ทุกปัจจัยมีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.001$ ยกเว้นปัจจัยของพีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดเท่านั้นที่มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรอย่างมีนัยสำคัญที่ $p< 0.05$

จากภาพที่ 22 สามารถพิจารณาระดับของแต่ละปัจจัยที่มีอัตราส่วน Signal/Noise สูงสุด ซึ่งสามารถสรุประดับของแต่ละปัจจัยที่เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแอซีติกเมื่อพิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรได้ดังนี้ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ผสม *A. aceti* IFRPD กับ *A. aceti* TISTR 102 ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ 8% พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด5.5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ 30 องศาเซลเซียส โดยการวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร สรุปดังในตารางที่ 20

หากพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมที่ได้กับสภาวะในชุดการทดลอง G มีอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรเฉลี่ยสูงสุด พบว่า มีบางสภาวะที่มีค่าแตกต่างกัน ได้แก่ พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด แต่พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรน้อยที่สุด (ตารางที่ 18) โดยมีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ (ตารางที่ 19)โดยทั้งการทดลองสองสภาวะที่วิเคราะห์ได้มีค่าต่างกัน คือ 5.5 และ 6 ตามลำดับ โดยทั่วไปแบคทีเรีย *Acetobacter* sp. เจริญเติบโตได้ที่ระดับพีเอช 4.0-4.5 และเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับพีเอช 5.4-6.3 (จิราภรณ์, 2529 De Ley and Frateur, 1974) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากการวิเคราะห์สามารถคำนวณความเข้มข้นกรดแอซีติก ผลได้กรดแอซีติก และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร เท่ากับ 60.7 กรัมต่อลิตร, 0.96 กรัมต่อกรัม และ 1.52 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ (สูตรคำนวณในภาคผนวก ข)

ตารางที่ 17 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์โดยวิธีทากุชิ พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร

ชุดการทดลอง	Q_p (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)		ค่าเฉลี่ย	MSD	อัตราส่วนS/N (dB)
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2			
A	0.749	0.787	0.768	1.699	-2.301
B	1.342	1.123	1.232	0.674	1.712
C	0.498	0.522	0.510	3.851	-5.856
D	0.368	0.405	0.386	6.741	-8.287
E	0.248	0.196	0.222	21.149	-13.253
F	0.184	0.128	0.156	45.290	-16.560
G	1.354	1.234	1.293	0.601	2.210
H	0.825	0.894	0.859	1.361	-1.337
I	0.548	0.458	0.503	4.049	-6.074

หมายเหตุ สภาวะการทดลองของแต่ละชุดการทดลอง (A-I) แสดงดัง ตารางที่ 7 หน้า 34

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรในการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์

ระดับ	1	2	3	4
1	-2.148	-2.793	-6.733	-7.209
2	-12.700	-4.292	-4.216	-4.213
3	-1.733	-9.497	-5.633	-5.160
ค่าต่ำสุด	-12.700	-9.497	-6.733	-7.209
ค่าสูงสุด	-1.733	-2.793	-4.216	-4.213
ค่าอิทธิพล[1]	10.967	6.704	2.517	2.996
% ค่าอิทธิพล[2]	47.304%	28.916%	10.857%	12.923%

หมายเหตุ [1] ค่าอิทธิพลเท่ากับผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด

[2] % ค่าอิทธิพล คำนวณดังสูตรคำนวณในภาคผนวก ข โดยใช้ค่าอิทธิพลรวมเท่ากับ 23.184

1, 2, 3 และ 4 หมายถึง ปัจจัยของการผลิตกรดแอซีติก (ตารางที่ 7 หน้า 34)

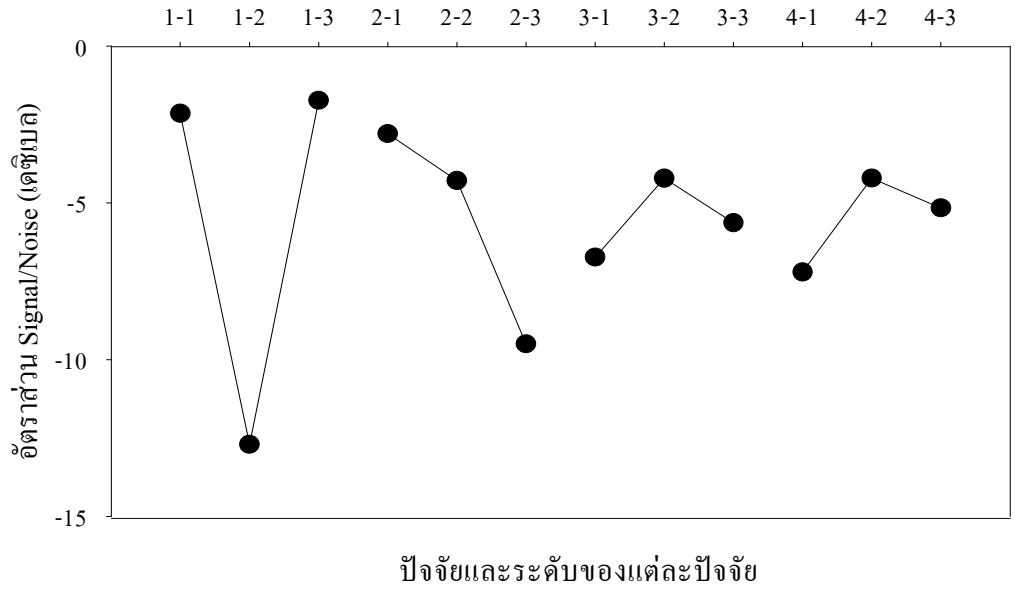
ตารางที่ 19 การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) โดยวิธี ANOVA

Factor	DOF[1]	Sum of Squares[1]	Variance[1]	F-Ratio[1]	Percent contribution	Confidence[1]	Significant
1	2	1.477	0.738	157.48	53.583	100.000%	*****
2	2	0.659	0.329	70.249	23.713	100.000%	*****
3	2	0.040	0.02	4.324	1.138	95.170%	**
4	2	0.520	0.26	55.477	18.654	99.999%	*****
Error	9	0.042	0.004		2.912		
Total	17	2.74			100.00		

หมายเหตุ 1, 2, 3 และ 4 หมายถึง แฟกเตอร์ของการผลิตกรดแอซีติก (ตารางที่ 7 หน้า 34)

***** และ ** มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ และ $p < 0.05$ ตามลำดับ

[1] วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ข



ภาพที่ 22 สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร ในการผลิตกรดแอซีติกระดับฟลาสก์

ตารางที่ 20 สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแอซีติกจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากุชิ เมื่อพิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร

ปัจจัยการทดลอง	ระดับการทดลอง	รายละเอียด
1: ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	3	เชื้อจุลินทรีย์ผสม
2: ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ (%)	1	8
3: พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด	2	5.5
4: อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ (^{o}C)	2	30

2.2 การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จภายใต้สภาวะที่เหมาะสมระดับฟลาสก์

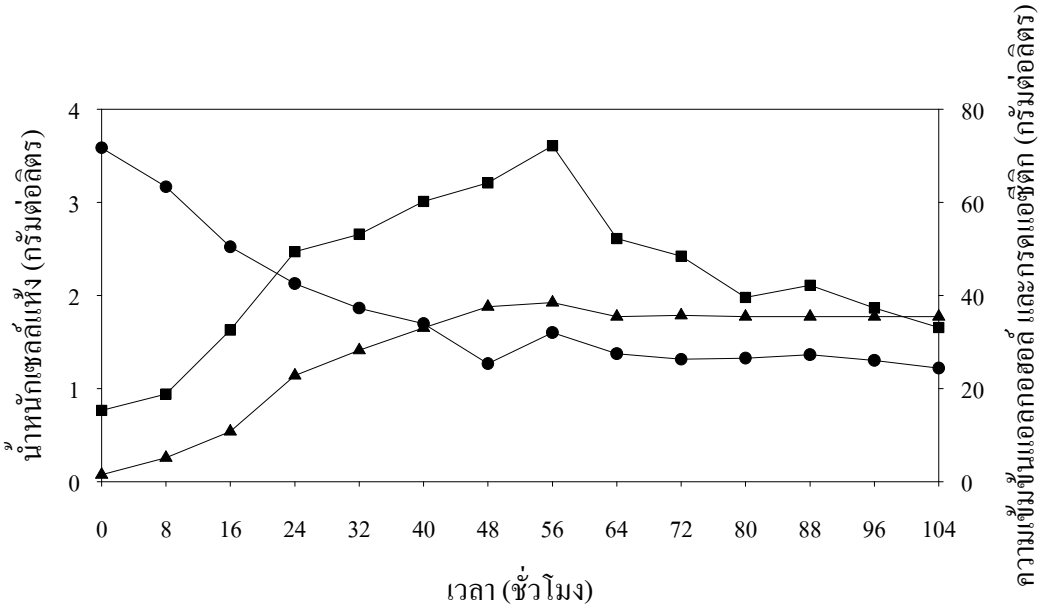
จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดด้วยวิธีทากุชิ สรุปสภาวะที่เหมาะสม โดยพิจารณาความเข้มข้น ผลได้ และ อัตราการผลิตเชิงปริมาตรของกรดแอซีติก 3 สภาวะ (ตารางที่ 12, 16 และ 20) และทำการทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลองดังต่อไปนี้

2.2.1 พิจารณาจากความเข้มข้นของกรดแอซีติก

การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปริมาตรทำงาน 300 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้รับการออกแบบการทดลองโดยวิธีทากุชิ คือ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ผสมของ *A. aceti* TISTR 102 กับ *A. aceti* IFRPD ในอัตราส่วน1:1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ 8% พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด 5.5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ 35 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 12) ผลการทดลองแสดงความเข้มข้นแอลกอฮอล์และกรดแอซีติกเฉลี่ยของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จ ดังภาพที่ 23 ซึ่งจะเห็นว่า มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด เท่ากับ 3.610 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 56 ชั่วโมง ส่วนปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เหลือ คือ 24.379 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณความเข้มข้นของกรดแอซีติกสามารถผลิตกรดแอซีติกได้สูงที่สุด เท่ากับ 38.464 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 56 ชั่วโมง จากผลการทดลองที่ได้สามารถคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในระดับฟลาสก์ สรุปได้ดังตารางที่ 21

พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากความเข้มข้นกรดแอซีติก พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$) ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$) อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_S) อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p) และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) เท่ากับ 0.028 ต่อชั่วโมง 0.058 กรัมต่อกรัม 0.839 กรัมต่อกรัม 0.449 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง 0.386 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง และ 0.810 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาจากการยืนยันของการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า ความเข้มข้นกรดแอซีติกที่ผลิตได้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 38.464 กรัมต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าการทดลองที่ออกแบบโดยวิธีทากุชิซึ่งได้ความเข้มข้นกรดแอซีติกสูงสุดเท่ากับ 66.110 กรัมต่อลิตร (ชุดการทดลอง H ชุดที่ 2, ตารางที่ 11) โดยความเข้มข้นกรดแอซีติกที่ได้มีค่าต่ำกว่าค่าที่คำนวณได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากเป็นการทดลองในระดับฟลาสก์ ที่ไม่มีการควบคุมพีเอช และอัตราการให้อากาศในกระบวนการหมักแบบให้อากาศ การควบคุมการกวนและการให้อากาศของออกซิเจนระหว่างการหมักเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ได้ผลได้ที่สูงที่สุดและทำให้เชื้อแบคทีเรียมีชีวิตอยู่ได้ (Osuga et al., 1984) โดยทั่วไปถังหมักที่มีประสิทธิภาพดีควรจะมีหัวกระจายอากาศ ซึ่งให้อากาศออกมามีลักษณะเป็นฟองละเอียดเล็กสม่ำเสมอทั่วกันทุกจุดในเครื่องหมัก เพื่อให้ออกซิเจนสามารถแพร่กระจายเข้าไปในน้ำหมักได้รวดเร็วสม่ำเสมอ และมีโอกาสสัมผัสกับน้ำหมักได้นาน เพื่อให้ออกซิเจนสามารถถ่ายโอนเข้าสู่เฟสน้ำหมักได้มากที่สุด ขนาดของฟองอากาศจึงขึ้นอยู่กับขนาดรูของหัวกระจายอากาศ จากการศึกษาหัวกระจายอากาศรูปกรวย ขนาดรูตะแกรง 40 mesh จะให้ผลดีกว่าแบบอื่น ๆ เช่น รูปทรงกลม หรือตะแกรงที่มีรูโตกว่า 40 mesh (นิคม, 2522) เพราะฉะนั้นการผลิตกรดแอซีติกในระดับฟลาสก์ที่มีความเข้มข้นสับสเทรตสูง จะต้องคำนึงถึงปัจจัยของการให้อากาศเป็นสำคัญ



ภาพที่ 23 การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากความเข้มข้นกรดแอซีติก (ดูตารางที่ 12 หน้า 60)
(สัญลักษณ์ ■, ● และ ▲ น้ำหนักเซลล์แห้ง, ความเข้มข้นแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก)

ตารางที่ 21 จลนพลศาสตร์การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (พิจารณาจากความเข้มข้นกรดแอซีติก)

พารามิเตอร์	การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์
ความเข้มข้นกรดแอซีติก (C_p, g/l)	38.46
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ, h^{-1})	0.028
ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$, g/g)	0.058
ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$, g/g)	0.839
อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_S, g/g h)	0.449
อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p, g/g h)	0.386
อัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p, g/l h)	0.810

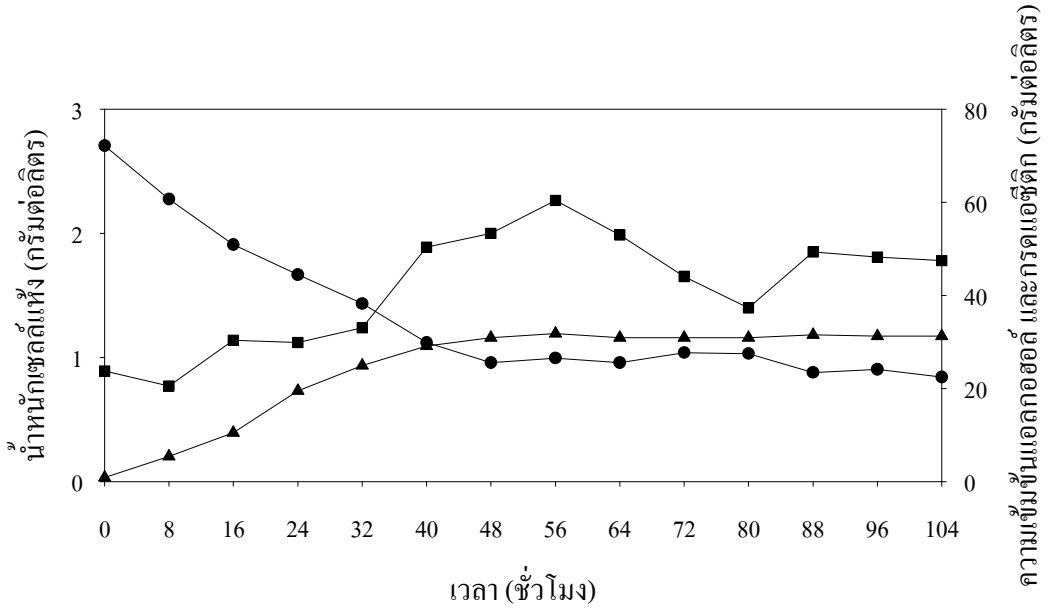
2.2.2 พิจารณาจากผลได้ของกรดแอซีติก

การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปริมาตรทำงาน 300 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้รับการออกแบบการทดลองโดยวิธีทากุชิ คือ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์: *A. aceti* IFRPD ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์: 8% พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด: pH 5.5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ: 35°C (ตารางที่ 16 หน้า 67) ผลการทดลองแสดงความเข้มข้นแอลกอฮอล์และกรดแอซีติกเฉลี่ยของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จ ดังภาพที่ 24 ซึ่งจะเห็นว่า มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด เท่ากับ 2.265 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 56 ชั่วโมง ส่วนปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เหลือ คือ 22.467 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณความเข้มข้นของกรดแอซีติกสามารถผลิตกรดแอซีติกได้สูงที่สุด เท่ากับ 31.853 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 56 ชั่วโมง จากผลการทดลองที่ได้สามารถคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สรุปได้ดังตารางที่ 22

พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์เฉลี่ยของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่กำหนด พิจารณาจากผลได้กรดแอซีติก พบว่า มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$) ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$) อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_S) อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_P) และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_P) เท่ากับ 0.022 ต่อชั่วโมง 0.030 กรัมต่อกรัม 0.703 กรัมต่อกรัม 0.639 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง 0.454 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง และ 0.679 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองที่ได้ พบว่า ผลได้กรดแอซีติกที่ได้ 0.703 กรัมต่อกรัม ซึ่งมีค่าน้อยกว่าจากค่าที่คำนวณได้จากการทดลองที่ออกแบบโดยวิธีทากุชิที่มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.012 กรัมต่อกรัม จากชุดการทดลองA (ตารางที่ 13) จากการศึกษาการคัดเลือกเชื้อน้ำส้มสายชู 10 สายพันธุ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแอซีติกได้ดี และเมื่อนำมาทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่า เชื้อส่วนมากสามารถเจริญและผลิตกรดแอซีติกได้ดีที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส แต่มีบางสายพันธุ์ที่ยังคงผลิตกรดแอซีติกได้ที่อุณหภูมิ 37-40 องศา-เซลเซียส (รสสุคนธ์, 2528) และถ้าอุณหภูมิมากกว่า 34 องศาเซลเซียสจะทำให้การเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลง (พรทิพย์, 2524) และ *A. aceti* สามารถสร้างกรดแอซีติกจากการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ได้ในช่วง 2-12% โดยความเข้มข้นแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมในการหมัก อยู่ในช่วง 10-13% ดังนั้นปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นของน้ำหมักจึงมีความสำคัญมาก ถ้าใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์มากกว่าหรือเท่ากับ 14% จะ

ปรากฏมีพวกเมือก (zoogloeal mat) เกิดขึ้นเกิดสภาวะจำกัดออกซิเจนจึงทำให้แอลกอฮอล์เปลี่ยนเป็นกรดแอซีติกได้ยากและไม่สมบรูณ์ แต่การใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ต่ำจะทำให้ได้ปริมาณกรดแอซีติกต่ำลง (Prescott and Dunn อ้างโดยศิริวรรณ, 2527)



ภาพที่ 24 การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากผลได้ของกรดแอซีติก (ดูตารางที่ 16 หน้า 67)
(สัญลักษณ์ ■, ● และ ▲ น้ำหนักเซลล์แห้ง, ความเข้มข้นแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก)

ตารางที่ 22 จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (พิจารณาจากความผลได้ของแอซีติก)

พารามิเตอร์	การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์
ความเข้มข้นกรดแอซีติก (C_P, g/l)	31.85
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ, h^{-1})	0.022
ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$, g/g)	0.030
ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$, g/g)	0.703
อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_S, g/g h)	0.639
อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_P, g/g h)	0.454
อัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_P, g/l h)	0.679

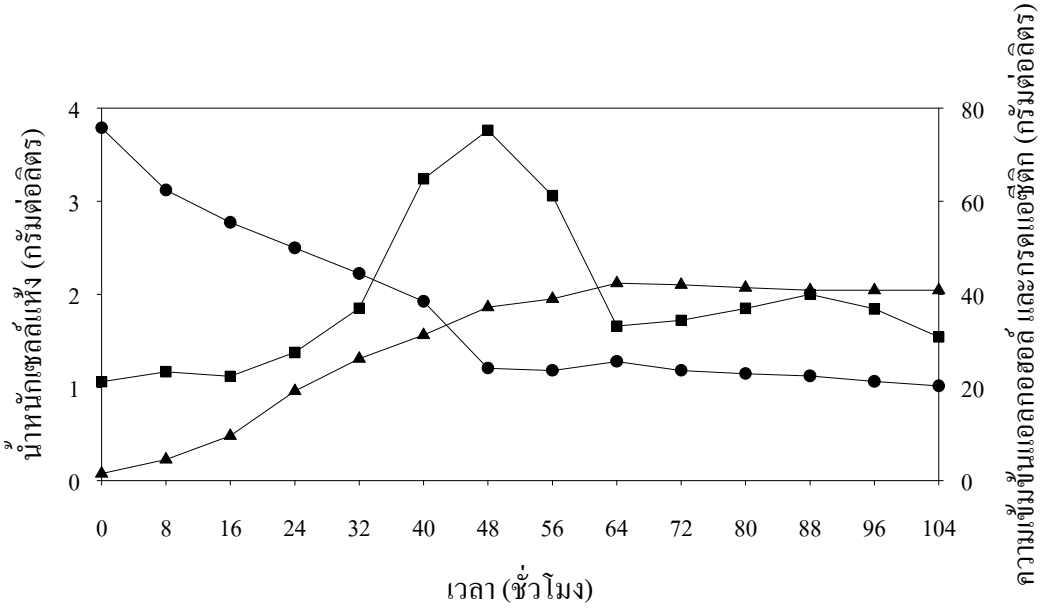
2.2.3 พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร

การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปริมาตรทำงาน 300 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้รับการออกแบบการทดลองโดยวิธีทากุชิ คือ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ผสมของ *A. aceti* TISTR 102 กับ *A. aceti* IFRPD ในอัตราส่วน1:1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์: 8% พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด: pH 5.5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ: 30°C (ตารางที่ 20 หน้า 73) ผลการทดลองแสดงความเข้มข้นแอลกอฮอล์และกรดแอซีติกเฉลี่ยของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จ ดังภาพที่ 25 ซึ่งจะเห็นว่า มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด เท่ากับ 3.762 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 48 ชั่วโมง ส่วนปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เหลือ คือ 20.315 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณความเข้มข้นของกรดแอซีติกสามารถผลิตกรดแอซีติกได้สูงที่สุด เท่ากับ 42.371 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 64 ชั่วโมง จากผลการทดลองที่ได้สามารถคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมข้างต้น สรุปได้ดังตารางที่ 23

พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร พบว่ามีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$) ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$) อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_S) อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p) และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) เท่ากับ 0.041 ต่อชั่วโมง 0.059 กรัมต่อกรัม 0.795 กรัมต่อกรัม 0.583 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง 0.484 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง และ 0.792 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาจากการยืนยันผลการทดลอง พบว่า อัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรที่ได้คือ 0.792 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ซึ่งน้อยกว่าจากค่าที่คำนวณได้จากการทดลองที่ออกแบบโดยวิธีทากุชิที่มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.354 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง (การทดลองชุด G ชุดที่ 1, ตารางที่ 17) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.760 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง โดยอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรที่ได้ต่ำกว่าค่าที่คำนวณได้ เท่ากับ 1.52 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง อาจเนื่องจากการยืนยันการทดลองนี้เป็นการทดลองในระดับฟลาสก์ และมีการใช้แบคทีเรียกรดแอซีติกเป็นแบบการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม ที่อาจเกิดสภาวะการยับยั้งของแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้งสองชนิด และทำให้การผลิตกรดแอซีติกลดลง ถ้าความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดแอซีติกทั้งหมดเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแอซีติกจะลดลง โดยที่ตัวแปรอื่นๆ คงที่ (Ebner and Frings อ้างโดย พรทิพย์, 2524) ดังจะเห็นว่าแบคทีเรียกรดแอซีติกผลิตกรดแอซีติกได้ 39.065 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นเอทานอลถึง 23.662 กรัมต่อ

ลิตร จึงทำให้มีความเข้มข้นทั้งหมดมีค่าเพิ่มสูง จึงมีผลทำให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแอซีติกลดลงอย่างเห็นได้ชัด



ภาพที่ 25 การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (ดูตารางที่ 20 หน้า 73)
(สัญลักษณ์ ■, ● และ ▲ น้ำหนักเซลล์แห้ง, ความเข้มข้นแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก)

ตารางที่23 จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร)

พารามิเตอร์	การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์
ความเข้มข้นกรดแอซีติก (C_P, g/l)	42.37
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ, h^{-1})	0.041
ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$, g/g)	0.059
ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$, g/g)	0.795
อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_S, g/g h)	0.583
อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_P, g/g h)	0.484
อัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_P, g/l h)	0.792

2.3 เปรียบเทียบการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปริมาตรการทำงาน 300 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้รับการออกแบบการทดลองโดยวิธีทากุชิ โดยพิจารณาความเข้มข้น ผลได้ และ อัตราการผลิตเชิงปริมาตรของกรดแอซีติก 3 สภาวะ (ตารางที่ 12, 16 และ 20) สามารถสรุปค่าประมาณจากการออกแบบการทดลองโดยวิธีทากุชิและค่าจากการทดลอง ดังตารางที่ 24

เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นของกรดแอซีติก พบว่าค่าประมาณจากการออกแบบโดยวิธีทากุชิของความเข้มข้นของกรดแอซีติก ผลได้กรดแอซีติก และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร เท่ากับ 69.40 กรัมต่อลิตร 0.961 กรัมต่อกรัม และ 1.361 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าจากการทดลองประมาณ 2 เท่า

เมื่อพิจารณาจากผลได้กรดแอซีติก พบว่าค่าประมาณจากการออกแบบโดยวิธีทากุชิของความเข้มข้นของกรดแอซีติก ผลได้กรดแอซีติก และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร เท่ากับ 58.34 กรัมต่อลิตร 1.158 กรัมต่อกรัม และ1.298 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าจากการทดลองประมาณ 1.8 เท่า

เมื่อพิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร พบว่าค่าประมาณจากการออกแบบโดยวิธีทากุชิของความเข้มข้นของกรดแอซีติก ผลได้กรดแอซีติก และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร เท่ากับ 60.65 กรัมต่อลิตร 0.957 กรัมต่อกรัม และ1.518 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าจากการทดลองประมาณ 1.4 เท่า

พิจารณาจากทั้ง 3 สภาวะ พบว่าค่าประมาณจากการออกแบบโดยวิธีทากุชิมีค่าสูงกว่าค่าจากการทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องจากเป็นการทดลองในระดับฟลาสก์ที่ไม่มีการควบคุมพีเอช และอัตราการให้อากาศ โดยในกระบวนการหมักแบบให้อากาศ การควบคุมการกวนและการให้อากาศของออกซิเจนระหว่างการหมักเป็นสิ่งสำคัญ จากการศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเปลือกและแกนสับปะรด จากวิธีการหมักแบบมีการเติมอากาศ เปรียบเทียบกับการหมักแบบตั้งทิ้งไว้ พบว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศจะให้ปริมาณกรดแอซีติกเร็วกว่า โดยสามารถผลิตกรดแอซีติกที่มี

ความเข้มข้น 6.2-6.5% ภายในเวลา 4 วัน ซึ่งให้ผลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับการหมักแบบตั้งทิ้งไว้ (ประดิษฐ์ และคณะ, 2522)

ตารางที่ 24 ค่าประมาณของความเข้มข้นของกรดแอซีติก (C_P) ผลได้ของกรดแอซีติก ($Y_{P/S}$) และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

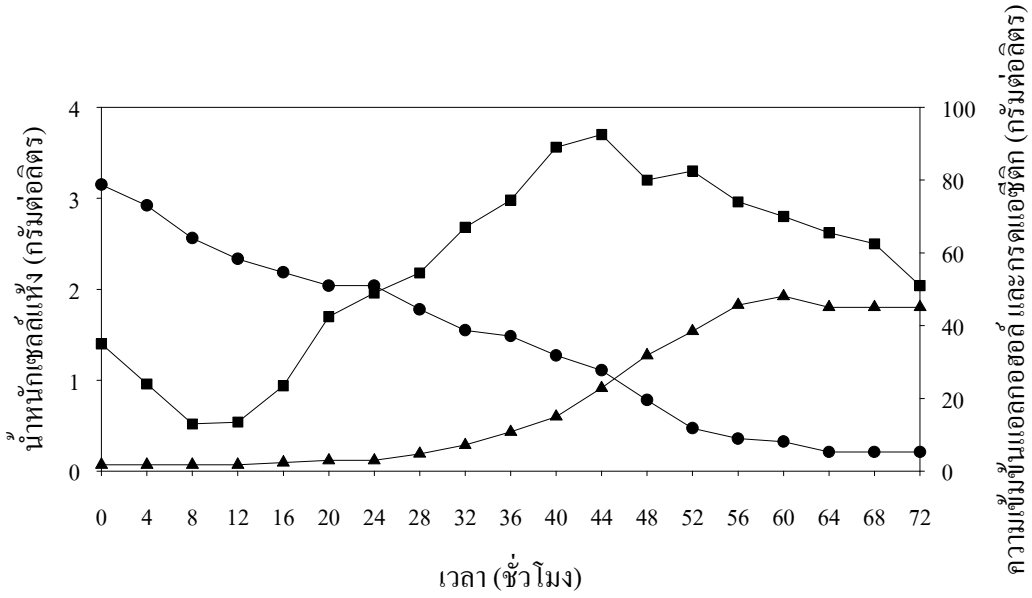
ค่าพารามิเตอร์	Y_{exp}	ผลจากการทดลอง
(1) ความเข้มข้นของกรดแอซีติก (C_P)		
C_P	69.40	38.46
$Y_{P/S}$	0.961	0.839
Q_P	1.361	0.810
(2) ผลได้ของกรดแอซีติก ($Y_{P/S}$)		
C_P	58.34	31.85
$Y_{P/S}$	1.158	0.703
Q_P	1.298	0.679
(3) อัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p)		
C_P	60.65	42.37
$Y_{P/S}$	0.957	0.795
Q_P	1.518	0.792

2.4 การผลิตกรดแอซีติกในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร)

การผลิตกรดแอซิติกในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้ไวน์สับปะรดเป็นสารอาหารตั้งต้น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการขนาด 2 ลิตร อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทากุชิ พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (ตารางที่ 20 หน้า 73) โดยมีสภาวะดังนี้ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์: *A. aceti* TISTR 102 กับ *A. aceti* IFRPD ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้นแอลกอฮอล์เริ่มต้น 8% พีเอชของไวน์สับปะรดเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงความเข้มข้นแอลกอฮอล์ และกรดแอซีติก ดังภาพที่ 26พบว่า มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด เท่ากับ 3.70 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 44 ชั่วโมง ส่วนปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เริ่มต้น คือ 78.711 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เริ่มต้นที่ใส่ในอาหารเพาะเลี้ยง เท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร โดยเหลือแอลกอฮอล์เพียง 5.302 กรัมต่อลิตรเท่านั้น ส่วนปริมาณความเข้มข้นของกรดแอซีติกสามารถผลิตกรดแอซีติกได้สูงที่สุด เท่ากับ 48.080 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 60 ชั่วโมง จากผลการทดลองสามารถคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทากุชิข้างต้น สรุปได้ดังตารางที่ 25

จากตารางที่ 25 ซึ่งแสดงพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทากุชิ พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$) ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$) อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_S) อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p) และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) เท่ากับ 0.067 ต่อชั่วโมง 0.030 กรัมต่อกรัม 0.735 กรัมต่อกรัม 0.712 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง 0.202 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง และ 0.601 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร พบว่า การผลิตกรดแอซีติกในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ มีค่าอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรต่ำกว่าค่าประมาณที่คำนวณจากวิธีทากุชิ เนื่องจากแบคทีเรียกรดแอซีติกต้องการออกซิเจนในการผลิตกรดแอซีติก ดังนั้นในการหมักจึงต้องมีการให้อากาศอย่างเพียงพอ เพื่อเปลี่ยนเอทานอลให้เป็นกรดแอซีติก จากการศึกษาเครื่องหมักแบบแพคเบดคอลัมน์ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์สับปะรด โดยมีอัตราการให้อากาศ 0.02 และ 0.05 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที จะเกิดกรดแอซีติก 5.2 และ4.6% ตามลำดับในชั่วโมงที่ 80 เมื่อเพิ่มปริมาณการให้อากาศ ความเข้มข้นแอลกอฮอล์จะลดลง ซึ่งอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมคือ 0.02 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที (พรทิพย์, 2524) และในถังหมักอนุกรมสองขั้นแบบแยกคอลัมน์ อัตราการให้ที่เหมาะสม คือ 0.04 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที โดยผลิตกรดแอซีติกได้ 3.85 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเมื่อให้อากาศเพียง 0.02 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที โดยให้ชั้นละ 0.01 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที จะให้ผลไม่ดี เพราะอากาศ 0.02 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที นี้มีแรงดันเพียงเล็กน้อย ซึ่งเครื่องหมักแบบสองขั้นจำเป็นต้องให้อากาศมาก (ศิริวรรณ, 2527) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ว่า ในการหมักน้ำส้มสายชูควรให้อัตราการให้อากาศอยู่ในช่วง 0.02-0.05 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที ไม่ควรจะสูงหรือต่ำกว่านี้ เนื่องจากอัตราการให้อากาศสูงเกินไป จะทำให้แอลกอฮอล์ และกรดแอซีติกบางส่วนสูญเสียไป (Kreipe อ้างโดยศิริวรรณ, 2527) แต่ในการศึกษาการผลิตกรดแอซีติกในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ในการทดลองนี้มีการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที ซึ่งสูงกว่าอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมถึง 20 เท่า จึงอาจทำให้อัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรต่ำลง เพราะเกิดการสูญเสียแอลกอฮอล์และกรดแอซีติกได้



ภาพที่26 การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (ตารางที่ 20 หน้า 73)
(สัญลักษณ์ ■, ● และ ▲ น้ำหนักเซลล์แห้ง, ความเข้มข้นแอลกอฮอล์และกรดแอซีติก)

ตารางที่25 พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทากุชิ

พารามิเตอร์	การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จ (ถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ)
ความเข้มข้นกรดแอซีติก (C_P, g/l)	48.08
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ, h^{-1})	0.067
ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$, g/g)	0.030
ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$, g/g)	0.735
อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_S, g/g h)	0.712
อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_P, g/g h)	0.268
อัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_P, g/l h)	0.601

2.5 เปรียบเทียบการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์และถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปริมาตรการทำงาน 300 มิลลิลิตร และถังหมักระดับห้องปฏิบัติการขนาด 2 ลิตร ปริมาตรการทำงาน 1 ลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทากุชิ พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (ตารางที่ 20 หน้า 73) โดยมีสภาวะดังนี้ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์: *A. aceti* TISTR 102 กับ *A. aceti* IFRPD ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้นแอลกอฮอล์เริ่มต้น 8% พีเอชของไวน์สับปะรดเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ 30 องศาเซลเซียส สามาถสรุปได้ดังตารางที่ 26

การผลิตกรดแอซีติกในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร พบว่ามีความเข้มข้นกรดแอซีติก อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ เท่ากับ 48.08 กรัมต่อลิตร 0.067 ต่อชั่วโมง และ 0.712 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าจากการผลิตกรดแอซีติกระดับฟลาสก์ เนื่องจากแบคทีเรียกรดแอซีติกต้องการออกซิเจนในการผลิตกรดแอซีติก ดังนั้นในการหมักจึงต้องมีการให้อากาศอย่างเพียงพอเพื่อเปลี่ยนเอทานอลให้เป็นกรดแอซีติก จากการศึกษาการทำน้ำส้มสายชูหมักจากเปลือกและแกนสับปะรด โดยวิธีการหมักแบบมีการเติมอากาศ เปรียบเทียบกับการหมักแบบตั้งทิ้งไว้ พบว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศจะให้ผลการผลิตกรดแอซีติกเร็วกว่า สามารถผลิตกรดแอซีติกที่มีความเข้มข้น 6.2-6.5 ภายในเวลา 4 วัน ซึ่งให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ประดิษฐ์ และคณะ, 2522) และยังต้องการสารอาหารเสริมที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* นอกจากแอลกอฮอล์ กรดแอซีติก เกลือแอมโมเนียม ยีสต์สกัดแล้ว แมนนิทอลก็มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อเช่นกัน เพราะเชื้อ *A.aceti* สามารถออกซิไดซ์แมนนิทอล แมนโนส เป็นแหล่งคาร์บอนได้ อย่างไรก็ตาม แมนนิทอลจะถูกใช้ไปในระยะแรกของการหมักเท่านั้น โดยแมนนิทอลจะมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อ *A.aceti* เท่านั้น ดังนั้นการเติมแมนนิทอลควรเติมในปริมาณที่ไม่มากเกินไป ซึ่งควรใส่ในปริมาณ 0.05% ก็เพียงพอ และสารอาหารที่จำเป็นอีกตัวคือไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เนื่องจากเป็นแหล่งของฟอสเฟตที่มีส่วนสำคัญในขบวนการเมแทบอลิซึม โดยใช้ในปริมาณ 0.3% ซึ่งให้ผลการผลิตกรดแอซีติกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการไม่ใส่ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (พรทิพย์, 2524)

ตารางที่26 พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จจากไวน์สับปะรดระดับฟลาสก์ และถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทากุชิ (พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร)

พารามิเตอร์	ฟลาสก์	ถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ
ความเข้มข้นกรดแอซีติก (C_P, g/l)	42.37	48.08
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ, h^{-1})	0.041	0.067
ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$, g/g)	0.059	0.030
ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$, g/g)	0.795	0.735
อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_S, g/g h)	0.583	0.712
อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p, g/g h)	0.484	0.268
อัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_P, g/l h)	0.792	0.601

3. การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

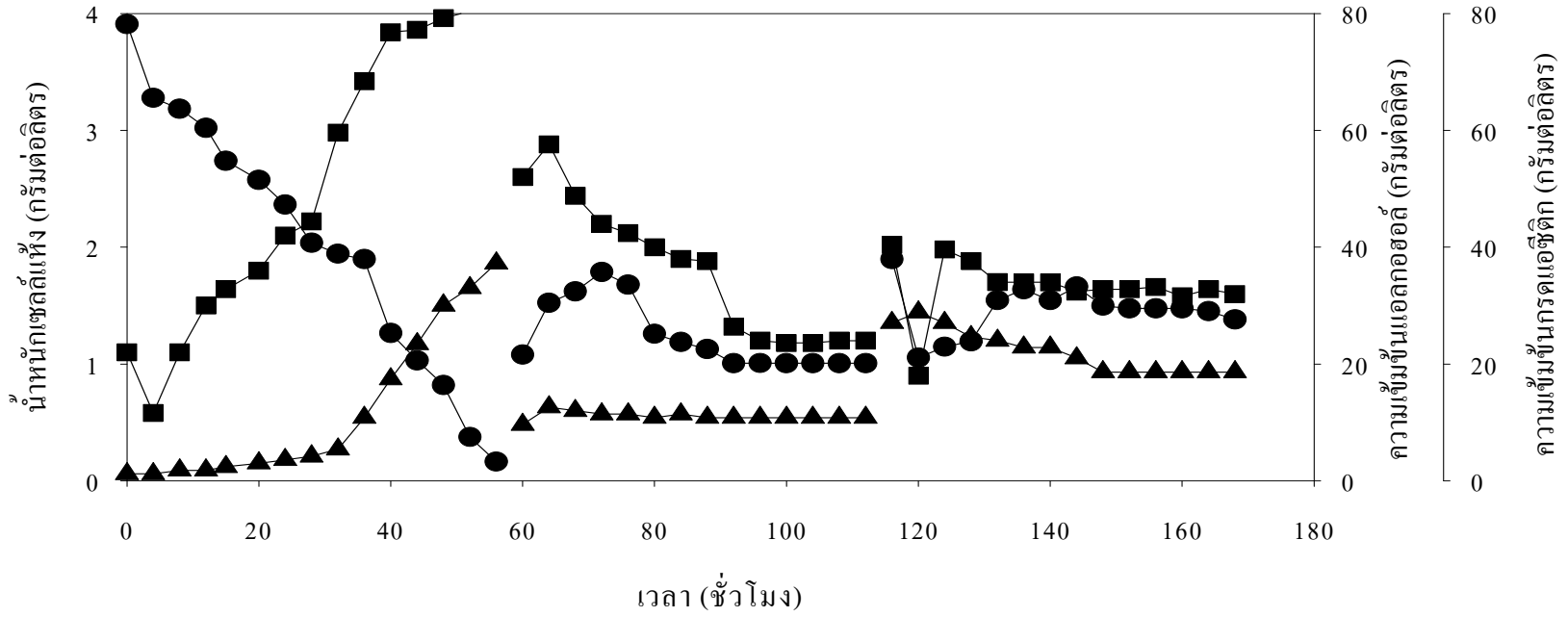
3.1 ผลของอัตราการเจือจาง

การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ มีปริมาตรการทำงาน 1 ลิตร โดยการแปรผันอัตราการเจือจางเป็น 0.03 และ 0.05 ต่อชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สรุปได้จากวิธีทากุชิ โดยควบคุมสภาวะการหมักดังนี้ เชื้อจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *A. aceti* 102 กับ *A. aceti* IFRPD ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์เท่ากับ 8% พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดเท่ากับ 5.5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 20)โดยใช้ไวน์สับปะรดเป็นสารอาหารตั้งต้น อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 27 พบว่า ณ สภาวะคงตัว (steady state) ความเข้มข้นกรดแอซีติกมีค่าเท่ากับ 10.818 และ 18.631 กรัมต่อลิตร โดยมีความเข้มแอลกอฮอล์เท่ากับ 20.124 และ 29.182 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.03 และ 0.05 ต่อชั่วโมงตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้สามารถคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ สรุปได้ดังตารางที่ 27

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ที่มีอัตราการเจือจาง 0.03 และ0.05 ต่อชั่วโมง พบว่าที่อัตราการเจือจาง 0.05 ต่อชั่วโมง มีผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$) ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$) อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_S) และอัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p) สูงกว่าที่อัตราการเจือจาง 0.03 ต่อชั่วโมง โดยมีอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) 0.932 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าที่คำนวณได้ จากการศึกษาถังหมักแบบคอลัมน์หลายชุดในการผลิตน้ำส้มสายชูอย่างต่อเนื่องจากการใช้ไวน์สับปะรดเป็นวัตถุดิบเริ่มต้น พบว่าอัตราการเจือจางที่ทำให้ปริมาณกรดแอซีติกทุกคอลัมน์คงที่ คือ 0.0192 ต่อชั่วโมง สามารถผลิตกรดแอซีติก 5 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราการผลิตวันละ 7.8 ลิตร ได้อย่างสม่ำเสมอตลอดการทดลองแต่เมื่อทำการหมักเป็นเวลานาน พบว่าปริมาณเชื้อจะลดลง จึงต้องมีดัดแปลงโดยการการป้อนกลับของผลผลิตน้ำหมักในอัตราส่วน 1:0.2 พบว่า อัตราการเจือจางที่ทำให้ปริมาณกรดแอซีติกและเชื้อแบคทีเรียกรดแอซีติกคงที่ คือ 0.0216 ต่อชั่วโมง และรายงานพบว่าการผลิตน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่องให้อัตราการผลิตสูงที่สุดโดยการผลิตแบบกึ่งต่อเนื่องและไม่ต่อเนื่องมีอัตราการผลิตรองลงมา คือเท่ากับ 6.0 และ 5.4 ลิตรต่อวัน ตามลำดับ (ประพนธ์, 2531)

ตารางที่ 27 พารามิเตอร์จลนศาสตร์ของการผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 20)

พารามิเตอร์	ถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ	
	0.03	0.05
ความเข้มข้นกรดแอซีติก (C_P, g/l)	10.82	18.63
ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$, g/g)	0.020	0.032
ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$, g/g)	0.181	0.367
อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_S, g/g h)	1.485	1.562
อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p, g/g h)	0.268	0.573
อัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_P, g/l h)	0.325	0.932



ภาพที่ 27 การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องด้วยเชื้อผสมในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทากุชิ โดยควบคุมที่อัตราการเจือจาง 0.03 และ 0.05 ต่อชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ที่เติม (S_0) 80 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด 5.5, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

(สัญลักษณ์ ■,● และ▲ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นแอลกอฮอล์และกรดแอซีติกในการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (a) และแบบต่อเนื่องที่มีอัตราการเจือจาง 0.03 (b) และ 0.05 ต่อชั่วโมง (c) ตามลำดับ)

3.2 การเปรียบเทียบการผลิตกรดแอซีติกในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จและต่อเนื่อง

การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบเบ็ดเสร็จและต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ มีปริมาตรการทำงาน 1 ลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สรุปได้จากวิธีทากุชิ โดยควบคุมสภาวะการหมักดังนี้ เชื้อจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *A. aceti* 102 กับ *A. aceti* IFRPD ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์เท่ากับ 8% พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดเท่ากับ 5.5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 20) โดยใช้ไวน์สับปะรดเป็นสารอาหารตั้งต้น อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm จากผลการทดลองที่ได้สามารถคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ สรุปได้ดังตารางที่ 27

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตของทั้ง 2 กระบวนการ คือ แบบเบ็ดเสร็จกับต่อเนื่อง สามารถผลิตน้ำส้มสายชูที่มีความเข้มข้น 48.08 กับ 18.63 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยการผลิตกรดแอซีติกแบบต่อเนื่อง จะมีอัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร เท่ากับ 1.562 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง 0.573 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง และ 0.932 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จ เนื่องจากการหมักแบบเบ็ดเสร็จเป็นเทคนิคในอุตสาหกรรมการผลิตเซลล์จุลินทรีย์ตลอดจนการผลิตเมแทบอไลต์ปฐมภูมิและทุติยภูมิ ในกรณีของการผลิตเซลล์จุลินทรีย์จะมีการควบคุมสภาวะต่าง ๆ เพื่อใช้ให้เกิดการผลิตเซลล์สูงสุด ส่วนกรณีการผลิตเมแทบอไลต์ปฐมภูมินั้นมักจะควบคุมให้มีระยะการเติบโตแบบเอกซ์โพเนนเชียลยาวนานที่สุด ซึ่งมีลักษณะกลับกันกับกรณีของการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่จะต้องให้มีระยะการเติบโตแบบเอกซ์โพเนนเชียลสั้นลงและให้เข้าสู่ระยะการเติบโตแบบคงที่ยาวนานที่สุด (สาโรจน์และประวิทย์, 2538) ส่วนการหมักแบบต่อเนื่องการหมักเป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารเข้าไปในถังหมักและแยกเอาผลิตภัณฑ์ออกมาตลอดเวลา ทำให้สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้สูงสุดในระยะเวลาเท่ากันเมื่อเทียบกับการหมักแบบเบ็ดเสร็จ โดยสามารถผลิตน้ำส้มสายชูที่มีความเข้มข้นประมาณ 2% ในอัตราการผลิต 1.2 ลิตรต่อวัน

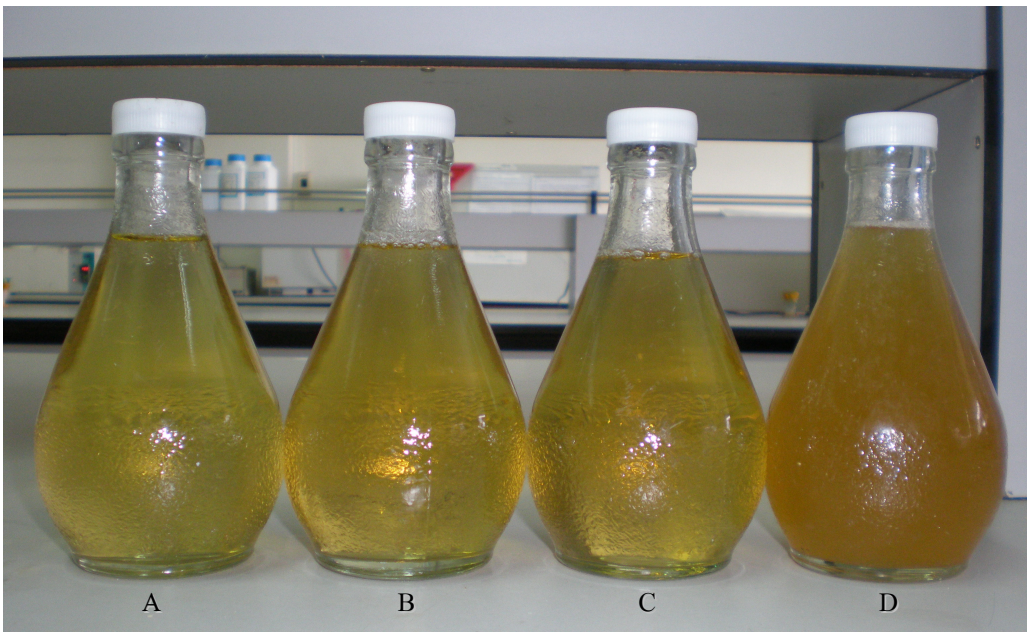
ตารางที่ 28 พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรด ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการแบบเบ็ดเสร็จและต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง 0.05 ต่อชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทากุชิ (พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร)

พารามิเตอร์	แบบเบ็ดเสร็จ	แบบต่อเนื่อง D = 0.05 ชม$^{-1}$
ความเข้มข้นกรดแอซีติก (C_P, g/l)	48.08	18.63
อัตราการเจริญจำเพาะ (μ, h^{-1})	0.067	0.050
ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$, g/g)	0.030	0.032
ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$, g/g)	0.735	0.367
อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_S, g/g h)	0.712	1.562
อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_P, g/g h)	0.268	0.573
อัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_P, g/l h)	0.601	0.932

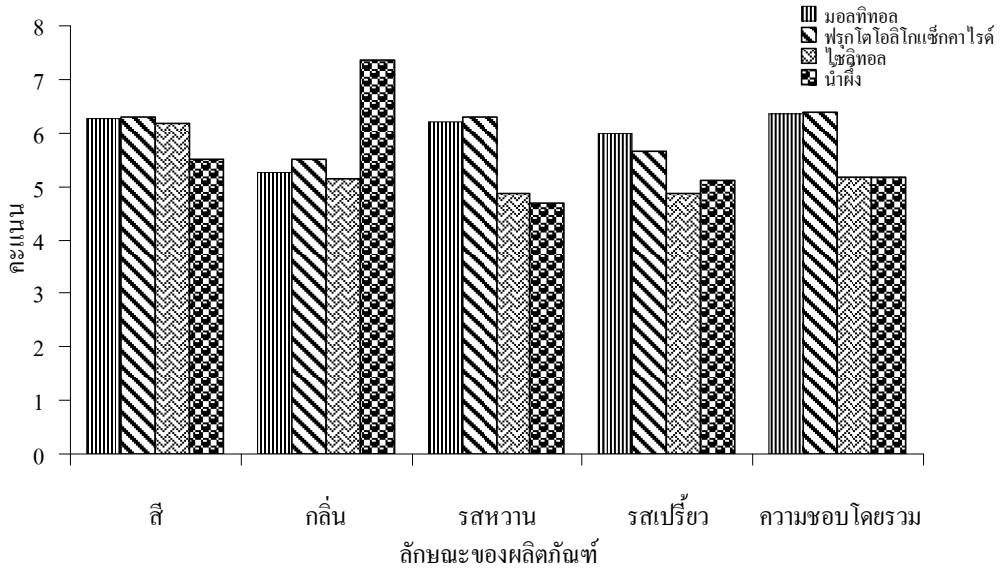
4. การทดสอบทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมัก

การผลิตเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์สับปะรดโดยอาศัยน้ำส้มสายชูหมักที่ผลิตได้เป็นวัตถุดิบ กำหนดการเติมแต่งสารให้ความหวาน 4 ชนิด ที่มีน้ำตาลสุขภาพ 3 ชนิดได้แก่ มอลทิทอล ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ไซลิทอล เปรียบเทียบกับน้ำผึ้ง เท่ากับ 7%(w/v) หลังจากการผสมได้บรรจุเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักปรุงแต่งตามสูตรลงขวดแก้ว และนำไปฆ่าเชื้อโดยการพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลซียส นาน 5 นาที แล้วนำมาทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการทดสอบความชอบจากการให้คะแนนความชอบ (hedonic scaling) ที่มีสเกลความชอบ 9 คะแนน โดยกำหนดให้ชนิดของสารให้ความหวานเป็นชุดการทดลอง และกำหนดผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสเป็น Block โดยประเมินในเรื่องสี กลิ่น ความหวาน ความเปรี้ยว และความชอบโดยรวม แสดงดังภาพที่ 28-29 และตารางที่ 29 พบว่า เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจะมีคะแนนอยู่ในช่วง 6-7 ยกเว้นด้านสีของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมน้ำผึ้งที่มีคะแนน 7.36 ซึ่งถือเป็นระดับคะแนนปานกลาง เหตุผลระดับคะแนนของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักอยู่ในระดับเดียวกันนั้นอาจเนื่องจาก ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูไม่ได้เป็นเครื่องดื่มที่นิยมดื่มในชีวิตประจำวัน อาจมีเฉพาะผู้บริโภคจำนวนน้อยเท่านั้น ทำให้ผู้ทดสอบไม่คุ้นเคยกับรสชาติของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมัก และไม่ทราบว่าคุณลักษณะที่ดีของเครื่องดื่มของน้ำส้มสายชูหมัก ดังนั้นระดับคะแนนที่ได้จากการทดสอบประสาทสัมผัสเป็นผลสรุปจากความชอบส่วนตัว

เมื่อการเปรียบเทียบความแตกต่างทางด้านสีของตัวอย่างพบว่า เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ มีคะแนนระหว่าง 6-7 ซึ่งเป็นความชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลาง โดยไม่มีความแตกต่างกับเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมมอลทิทอลและไซลิทอล ขณะที่เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมน้ำผึ้ง มีคะแนน 5.50 ซึ่งเป็นคะแนนที่บอกว่าเฉยๆ ต่อผลิตภัณฑ์ โดยมีความแตกต่างกับเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมสารให้ความหวานชนิดอื่น ๆ ส่วนด้านกลิ่นของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมน้ำผึ้ง มีคะแนนความชอบปานกลาง คือ 7.36 โดยมีความแตกต่างกับเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมสารให้ความหวานชนิดอื่น ๆ ส่วนด้านความเปรี้ยวเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมมอลทิทอลมีคะแนนความชอบเล็กน้อยในกลุ่มของผลิตภัณฑ์ โดยไม่แตกต่างกับเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ แต่มีความแตกต่างกับเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมไซลิทอลกับน้ำผึ้ง และเมื่อพิจารณาทางด้านความหวานและความชอบโดยรวมพบว่า เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ มีคะแนนความชอบปานกลางโดยไม่มีความแตกต่างกับเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูที่ผสมมอลทิทอล แต่มีความแตกต่างกับเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูที่ผสมไซลิทอลกับน้ำผึ้ง



ภาพที่ 28 ผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักที่ผสมสารให้ความหวาน 4 ชนิด คือ (A) มอลทิทอล (B) ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (C) ไซลิทอล และ (D) น้ำผึ้ง



ภาพที่ 29 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์สับปะรด

ตารางที่ 29 การประเมินคุณค่าทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักผสมสารให้ความหวาน

ลักษณะผลิตภัณฑ์	ชนิดของสารให้ความหวาน			
	มอลทิทอล	ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	ไซลิทอล	น้ำผึ้ง
สี	6.28[b]	6.30[b]	6.18[b]	5.50[a]
กลิ่น	5.26[a]	5.50[a]	5.14[a]	7.36[b]
ความหวาน	6.20[b]	6.30[b]	4.88[a]	4.68[a]
ความเปรี้ยว	5.98[b]	5.66[b]	4.88[a]	5.10[a]
ความชอบโดยรวม	6.36[b]	6.38[b]	5.16[a]	5.18[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรด โดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ รหัส TISTR 522, 086,107, 102 และ IFRPD ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ (Hoyer's media) พบว่า เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด เท่ากับ 4.41 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณความเข้มข้นของกรดแอซีติก พบว่าเชื้อ *A. aceti* IFRPD ผลิตกรดแอซีติกได้สูงที่สุด เท่ากับ 21.035 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 96 ชั่วโมง และเชื้อ *A. aceti* TISTR 086 ผลิตกรดแอซีติกได้ต่ำที่สุด เท่ากับ 3.005 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 48ชั่วโมง

จากผลการทดลอง *A. aceti* TISTR 086 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและผลได้เซลล์สูงที่สุด แต่มีอัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติกต่ำกว่า *A. aceti* IFRPD ประมาณ 2 เท่า จึงทำให้ได้ผลได้กรดแอซีติกและอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรของ *A. aceti* IFRPD มากกว่าประมาณ 4 เท่า ส่วนอัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์มีค่าไม่แตกต่างกันมาก คือ 0.238 กับ 0.193 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง โดย *A. aceti* TISTR 086 นั้น เป็นเชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าจะมีการใช้แหล่งคาร์บอน จนได้สารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียกรดแอซีติกที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแอซีติกคือ *A. aceti* IFRPDจากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ *A. aceti* TISTR 102 โดยพิจารณาจากผลได้กรดแอซีติกและอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรเป็นหลัก ตามลำดับ

การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปริมาตรทำงาน 300 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้รับการออกแบบการทดลองโดยวิธีทากุชิ เมื่อพิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร คือ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ผสมของ *A. aceti* TISTR 102 กับ *A. aceti* IFRPD ในอัตราส่วน1:1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์: 8% พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรด: pH 5.5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ: 30°C พบว่า มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด เท่ากับ 3.762 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 48 ชั่วโมง ส่วนปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เหลือ คือ 20.315 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณความเข้มข้นของกรดแอซีติกสามารถผลิตกรดแอซีติกได้สูงที่สุด เท่ากับ 42.371 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 64 ชั่วโมง

พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จภายใต้สภาวะที่เหมาะสมระดับฟลาสก์ พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร พบว่ามีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลได้เซลล์ ($Y_{x/s}$) ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{p/s}$) อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_s) อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p) และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) เท่ากับ 0.041 ต่อชั่วโมง 0.059 กรัมต่อกรัม 0.795 กรัมต่อกรัม 0.583 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง 0.484 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง และ 0.792 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ พิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ที่คำนวณได้จากการทดลอง พบว่า อัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตรเฉลี่ยที่ได้ คือ 0.792 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ซึ่งมีค่าน้อยกว่าจากค่าที่คำนวณได้จากการทดลองที่ออกแบบโดยวิธีทากุชิที่มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.354 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง

การผลิตกรดแอซิติกแบบเบ็ดเสร็จ โดยใช้ไวน์สับปะรดเป็นสารอาหารตั้งต้น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ขนาด 2 ลิตร อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทากุชิ พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร โดยมีสภาวะดังนี้ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์: *A. aceti* TISTR 102 กับ *A. aceti* IFRPD ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้นแอลกอฮอล์เริ่มต้น 8% พีเอชของไวน์สับปะรดเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ 30 องศาเซลเซียส พบว่า มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด เท่ากับ 3.70 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 44 ชั่วโมง เหลือแอลกอฮอล์เพียง 5.302 กรัมต่อลิตรเท่านั้น ส่วนปริมาณความเข้มข้นของกรดแอซีติกสามารถผลิตกรดแอซีติกได้สูงที่สุด เท่ากับ 48.080 กรัมต่อลิตร ในเวลาที่ 60 ชั่วโมง

พารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทากุชิ พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$) ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$) อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_S) อัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p) และอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) เท่ากับ 0.067 ต่อชั่วโมง 0.030 กรัมต่อกรัม 0.735 กรัมต่อกรัม 0.712 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง 0.202 กรัมต่อกรัม ชั่วโมง และ 0.601 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ตามลำดับ

การผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ มีปริมาตรการทำงาน 1 ลิตร โดยการแปรผันอัตราการเจือจางเป็น 0.03 และ 0.05 ต่อชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สรุปได้จากวิธีทากุชิ โดยควบคุมสภาวะการหมักดังนี้ เชื้อจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *A. aceti* 102 กับ *A. aceti* IFRPD ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์เท่ากับ 8% พีเอชเริ่มต้นของไวน์สับปะรดเท่ากับ 5.5 และอุณหภูมิที่บ่มเชื้อเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ไวน์สับปะรดเป็นสารอาหารตั้งต้น อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm พบว่า ณ สภาวะคงตัว (steady state) ความเข้มข้นกรดแอซีติกมีค่าเท่ากับ 10.818 และ 18.631 กรัมต่อลิตร โดยมีความเข้มข้นแอลกอฮอล์เท่ากับ 20.124 และ 29.182 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.03 และ 0.05 ต่อชั่วโมงตามลำดับ

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ที่มีอัตราการเจือจาง 0.03 และ0.05 ต่อชั่วโมง พบว่าที่อัตราการเจือจาง 0.05 ต่อชั่วโมง มีผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$) ผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$) อัตราจำเพาะของการใช้แอลกอฮอล์ (q_S) และอัตราจำเพาะของการผลิตกรดแอซีติก (q_p) สูงกว่าที่อัตราการเจือจาง 0.03 ต่อชั่วโมง โดยมีอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p) 0.932 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าที่คำนวณได้

การผลิตเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์สับปะรดโดยอาศัยน้ำส้มสายชูหมักที่ผลิตได้เป็นวัตถุดิบ กำหนดการเติมแต่งสารให้ความหวาน 4 ชนิด ได้แก่ มอลทิทอล ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ไซลิทอล และน้ำผึ้ง เท่ากับ 7%(w/v) แล้วนำมาทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการทดสอบความชอบจากการให้คะแนนความชอบ (hedonic scaling) ที่มีสเกลความชอบ 9 คะแนน โดยกำหนดให้ชนิดของสารให้ความหวานเป็นชุดการทดลอง และกำหนดผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสเป็น Block โดยประเมินในเรื่องสี กลิ่น ความหวาน ความเปรี้ยว และความชอบโดยรวม พบว่า เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจะมีคะแนนอยู่ในช่วง 4-6 ยกเว้นด้านสีของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมน้ำผึ้งที่มีค่าสูง 7.36 ซึ่งถือเป็นระดับคะแนนปานกลาง ดังนั้นระดับคะแนนที่ได้จากการทดสอบประสาทสัมผัสเป็นผลสรุปจากความชอบส่วนตัว เมื่อพิจารณาทางด้านความหวานและความชอบโดยรวมพบว่า เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่ผสมฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ มีคะแนนความชอบสูงสุด โดยไม่มีความแตกต่างกับเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูที่ผสมมอลทิทอล แต่มีความแตกต่างกับเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูที่ผสมไซลิทอลกับน้ำผึ้ง

ข้อเสนอแนะ

1. ในการผลิตกรดแอซีติกจากไวน์สับปะรดในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ควรจะมีอัตราการให้อากาศ 0.02-0.05 vvm (ประพนธ์, 2531) ซึ่งเป็นอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมและเพียงพอต่อการผลิตกรดแอซีติก

2. การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์สับปะรดแบบต่อเนื่อง เมื่อทำการศึกษาผลของอัตราการเจือจาง อาจจะเพิ่มถังหมักเพื่อให้การผลิตกรดแอซีติกแบบต่อเนื่องหลายขั้นตอนที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จิราภรณ์ สุขุมาวาสี พวงเพ็ญ สูยะนันทน์ และสุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์. 2529. อุตสาหกรรมการหมักกับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 1: 57-90.

ธนพร เมฆพะโยม. 2547. **การศึกษาการผลิตไวน์สับปะรดแบบต่อเนื่อง**. เทคนิควิจัย ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิคม ติปะวาโร. 2522. **การศึกษาเครื่องหมักแบบคอลัมน์ในการผลิตยีสต์ (*Candida utilis*) เอทานอล และกรดแอซีติกจากน้ำสับปะรด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

นภา โล่ห์ทอง. 2537. **กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต**. พิมพ์ครั้งที่3. ฟันนี่พับบลิชชิ่ง. กรุงเทพ.

บรรจงจิตร มหินทรเทพ. 2529. **การผลิตลูกแป้งน้ำส้มสายชูและอิทธิพลของสมุนไพรต่อจุลินทรีย์ในลูกแป้ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประดิษฐ์ ครุวัณณา, มาลัย เมืองน้อย, ประภา เฟื่องฟูพงศ์ และฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง. 2522. **การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเปลือกและแกนสับปะรด**. งานวิจัยประจำปี 2521 สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประพันธ์ ประสพวัฒนา. 2531. **เครื่องหมักแบบหลายคอลัมน์ในการผลิตน้ำส้มสายชูอย่างต่อเนื่องจากไวน์สับปะรด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรทิพย์ รัตนะ. 2524. **การศึกษาเครื่องหมักแบบแพคเบดคอลัมน์ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์สับปะรด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เพ็ญพรรณ พุ่มชูศรี. 2505. **การทำน้ำส้มจากผลไม้ และน้ำผลไม้**. แผนกวิชา เคหเศรษฐศาสตร์ คณะกสิกรรมและสัตวบาล. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2545. **การประเมินทางประสาทสัมผัส**. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

มาลัย บุญรัตนกรกิจ. 2548. **คู่มืออบรมการทำน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลไม้**. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ราชกิจจานุเบกษา. 2523. **เล่มที่ 97 ตอนที่ 38** หน้า 772.

รสสุคนธ์ เหล่าไพบูลย์. 2528. **การคัดเลือกสายพันธ์เชื้อน้ำส้มสายชูที่เหมาะสมต่อวิธีการผลิตแบบต่าง ๆ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรรณา มาลาพันธุ์. 2530. **การศึกษาศักยภาพของถังปฏิกิริยาแบบไบโอดิสต์ในการผลิตน้ำส้มสายชู**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วราวุฒิ ครูส่งและ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. **เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพ.

วรัญญ พลูสวัสดิ์. 2539. **การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Acetobacter xylinum* (วุ้นมะพร้าว) จากน้ำคั้นของเปลือกสับปะรด**. ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริวรรณ จงจิระศิริ. 2527. **การศึกษาเครื่องหมักแบบหลายชั้นในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์สับปะรด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิวาพร ศิวเวชช. 2520. **การแปรรูปอาหารโดยการหมักดอง**. เอกสารประกอบการบรรยายวิชา. วทอ 424 ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาโรจ์ ศิริศันสนียกุล และประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2538. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน1**. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพ.

สำนักมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2527. **มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำส้มสายชู**. กระทรวงอุตสาหกรรม.

Adams, M.R. 1985. **Vinegar. In Microbiology of Fermented Foods**. Vol 1. Elsevier Applied Science Publishers. London.

Amerine, M. A. and C. S. Ough. 1974. **Wine and Must Analysis**. John Willy & Sons, New York.

Anam, D. 1995. **Pure component properties**. www.cheric.org.

Box, G., S. Bisgaard and C. Fung. 1988. An explanation and critique of Taguchi's contributions to quality engineering. **Qual. Reliab. Eng. Int**. 4: 123-131.

Conner, H.A. and R.J. Allgeier. 1976. Vinegar : It's history and development. **Adv. Appl. Microbiol**. 20: 81–133.

Cruess, W.V. 1958. **Commercial Fruit and Vegetable Products: A Textbook for student, Investigators and Manufacturer**. 4 th ed., McGraw-Hill, New York. 884 p.

De Ley, J. and J. Frateur. 1974. **The genus Acetobacter. Bergey's Manual of Determination Bacteriology**. Baltimore : The Williams and wilkins.

Ebner, H. 1982. **Vinegar in Prescott and Dunn's Industrial Microbiology**. AVI Publishing Com., Inc. Westport, Connecticut.

Florenzani, G. and W. Balloni. 1969. Microbiological study of the alcoholic beverage Tuba and the vinegar Sukang puti prepared from the sap of Nipa fruticans in the philippine. **J. Agr. Ital. (Pisa)**. 69(3): 148-457.

Furia, T.E. 1975. **Handbook of Food Additives**. 2 nd ed. CRC Press, Inc., Ohio.

Hromatka, O. and H. Ebner. 1959. Vinegar by submerged oxidative fermentation. **J. Ind. Eng. Chem. (Ind. ed.) 5**1(10): 1279-1280.

Jun-Ichi, H., K. Tohru and K. Masayoshi. 1999. New vinegar production from onions. **J. Biosci. Bioeng**. 88(1): 107-109.

Lochner, R. H. and J. E. Matar. 1990. **Designing for Quality**. Chapman and Hall, UK.

Madhav, S. P. 1989. **Quality engineering using robust design.** AT&T Bell Laboratories. 67-68.

Nancy Touchette. 2003. **Yeast Point to Multiple Mutations in Neurodegenerative Disease**. http://www.genomenewsnetwork.org/articles/12_03/yeast_screen.shtml.

Nickol, G.B. 1979. Vinegar. **Micro Tech**. p. 155-172. Academic Press, New York.

Ohmori, S., T. Uozumi and T. Beppu. 1982. Loss of acetic acid resistance and ethanol oxidising ability in an *Acetobacter* strain. **J. Agric. Biol. Chem**. 46(2): 381-389.

Osuga. J., Mori. A., dato. J. 1984. Acetic acid production by immobilized *Acetobacter aceti* cell entrapped in a K-Carrageenan gel. **J. Ferment. Technol**. 62: 139-149.

Roy, R. K. 2001. **Design of Experiments using the Taguchi Approach**. John Wiley& Sons, Inc. Canada.

Shimizu, H., K. Miyai, H. Matsushisa, E. Iwasaki and Tomoyeda. 1977. Effect of ethanol on acetic acid oxidation by *Acetobacter aceti*. **Eur. J. Appl. Microbiol**. 3: 303-311.

Steiner P. and U. Sauer. 2001. Proteins induced during adaptation of *Acetobacter aceti* to high acetate concentrations. **J. Appl. Environ. Microbiol**. 67(12) : 5474-5481.

Stanier, R.Y., E.A. Adelberg and J.L. Ingraham. 1976. **The Microbial World**. Prentice-Hall, Inc., New Jersey. 871 p.

Vinegar Connoisseurs International. 2003. **The Vinegar Bacteria**. www.vinegarman.com/zoo_ vinegar_bacteria1.shtml.

William, H. 2000. **Official methods of analysis of AOAC International**. Gaithersburg, Md. : Association of Official Analytical Chemists.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ข้อมูลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ก1 ค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตรของการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่นที่ OD_{600} นาโนเมตร				
	TISTR 522	TISTR 086	TISTR 107	TISTR 102	IFRPD
0	1.350	1.470	1.300	1.600	1.365
6	1.185	1.425	1.350	2.245	2.230
12	1.440	1.685	1.325	2.640	2.470
18	1.840	1.725	1.425	3.130	3.130
24	2.115	1.765	1.385	3.435	3.230
30	2.345	2.075	1.550	3.430	3.590
36	2.445	4.680	1.580	3.535	3.810
42	2.275	5.315	1.700	3.710	3.865
48	2.360	5.615	1.820	3.620	3.925
54	2.815	5.660	1.745	3.815	4.085
60	3.135	5.570	2.265	3.790	4.115
66	3.055	5.700	2.325	3.930	4.125
72	3.040	4.980	2.415	3.905	4.205
78	3.085	4.435	2.615	3.970	4.405
84	3.060	4.690	2.660	4.035	4.370
90	3.110	3.975	2.885	4.015	4.170
96	3.090	4.360	2.430	4.015	4.155
102	2.920	3.965	2.276	4.000	4.160
108	2.900	3.690	2.211		4.020
114	2.550	3.435	2.280		3.315
120	2.520	2.975	2.338		3.250

ตารางผนวกที่ ก2 น้ำหนักเซลล์แห้งของการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)				
	TISTR 522	TISTR 086	TISTR 107	TISTR 102	IFRPD
0	0.630	0.780	0.520	0.910	0.650
6	0.420	0.640	0.600	2.230	0.810
12	0.740	0.930	0.410	2.710	0.930
18	1.120	1.020	0.750	3.160	1.240
24	1.570	1.160	0.640	3.480	2.180
30	1.730	1.530	0.890	3.680	2.670
36	1.820	2.380	0.910	3.640	3.060
42	2.060	3.250	1.200	3.830	3.110
48	2.150	3.590	1.380	3.770	3.250
54	2.610	3.620	1.430	3.940	3.470
60	3.160	3.710	1.870	3.890	3.590
66	3.010	3.850	1.940	4.130	3.610
72	2.920	3.120	2.330	4.060	3.840
78	2.940	3.070	2.470	4.410	3.620
84	2.830	3.240	2.510	4.380	3.560
90	3.170	2.370	2.960	4.170	3.150
96	3.390	3.420	2.350	4.170	3.090
102	3.110	2.580	2.100	3.560	3.120
108	3.040	2.360	2.150		2.970
114	2.850	2.140	2.030		2.340
120	2.810	1.870	2.160		2.270

ตารางผนวกที่ ก3 ความเข้นข้นแอลกอฮอล์ของการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ (กรัมต่อลิตร)				
	TISTR 522	TISTR 086	TISTR 107	TISTR 102	IFRPD
0	41.587	43.738	41.109	50.463	51.620
6	17.208	37.731	37.285	49.306	46.759
12	19.598	31.713	17.925	45.370	37.500
18	16.204	21.065	14.120	44.216	44.444
24	17.447	25.231	16.491	41.898	42.824
30	25.574	25.813	10.994	30.556	34.178
36	16.204	23.901	13.145	21.296	39.120
42	27.725	23.214	10.648	18.056	21.528
48	13.862	20.918	11.343	23.611	15.741
54	13.384	11.711	15.057	17.361	6.019
60	25.574	16.252	14.815	19.907	12.731
66	21.065	17.208	19.359	16.898	13.426
72	26.769	9.799	12.000	15.741	11.574
78	14.818	12.269	11.343	16.204	12.963
84	9.028	8.333	3.107	17.130	9.259
90	6.944	9.259	4.541	19.907	5.787
96	3.009	7.409	11.250	10.185	0.926
102	7.639	6.378	10.185	12.963	2.315
108	9.722	5.019	8.126		6.019
114	10.038	11.574	12.269		4.398
120	12.500	9.259	10.648		7.639

ตารางผนวกที่ ก4 ความเข้มข้นกรดแอซีติกของการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแอซีติกทั้ง 5 สายพันธุ์

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกรดแอซีติก (กรัมต่อลิตร)				
	TISTR 522	TISTR 086	TISTR 107	TISTR 102	IFRPD
0	0.902	0.601	1.202	1.202	1.202
6	1.503	0.601	1.202	1.803	1.803
12	1.803	1.202	1.503	2.404	2.705
18	2.104	1.202	1.503	3.606	4.207
24	2.104	1.503	2.104	4.207	5.710
30	3.005	2.404	2.404	5.409	6.912
36	3.005	2.404	2.404	7.513	7.513
42	3.306	2.705	2.705	9.316	9.917
48	3.306	3.005	3.306	9.316	10.818
54	3.606	3.005	3.606	10.217	12.621
60	3.907	2.404	3.907	11.119	13.523
66	4.508	2.404	3.606	12.321	15.326
72	4.508	2.104	3.907	12.321	16.528
78	5.109	2.104	3.907	12.621	18.030
84	4.207	1.803	4.808	11.119	19.232
90	3.606	1.503	4.207	10.518	20.134
96	3.606	1.803	4.207	9.316	21.035
102	3.306	1.503	3.907	8.715	20.134
108	3.005	1.202	3.606		19.533
114	3.005	0.902	3.306		17.129
120	2.705	0.601	3.005		18.030

ตารางผนวกที่ ก5 น้ำหนักเซลล์แห้งของชุดการทดลอง A-I ชุดที่ 1 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ

เวลา (ชั่วโมง)	ชุดการทดลอง								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
0	0.400	0.700	0.480	0.460	0.640	0.870	0.460	0.520	0.500
8	0.530	1.140	0.850	0.600	0.690	1.150	0.640	0.630	0.760
16	0.620	1.480	1.420	1.640	0.830	1.050	1.650	1.390	1.140
24	1.510	1.810	1.910	1.480	1.360	1.300	1.990	1.230	1.470
32	1.820	2.930	2.850	1.950	1.710	1.470	2.180	2.000	1.510
40	2.330	2.170	3.550	2.160	1.930	2.020	2.180	2.120	1.440
48	3.210	2.070	3.030	2.290	2.050	1.860	2.130	2.190	1.680
56	3.010	1.620	2.880	2.770	2.360	1.960	2.350	2.230	2.330
64	2.830	1.760	2.240	2.650	2.500	1.761	1.980	2.910	2.180
72	2.510	3.400	1.850	2.510	3.040	1.510	1.440	2.040	2.550
80	2.220	2.030	2.220	2.380	2.280		1.540	1.500	3.080
88	2.170	1.960	1.640	2.040	2.110		1.510	1.300	3.510
96	1.830	1.761	1.830	1.970	2.060		1.530	1.330	2.500
104	1.570				1.860				2.220
112									1.910

ตารางผนวกที่ ก6 น้ำหนักเซลล์แห้งของชุดการทดลอง A-I ชุดที่ 2 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ

เวลา	ชุดการทดลอง								
(ชั่วโมง)	A	B	C	D	E	F	G	H	I
0	0.530	0.630	0.600	0.890	0.630	0.450	0.510	0.410	0.590
8	0.480	1.210	0.630	1.210	0.510	0.630	0.630	0.600	0.760
16	1.020	1.560	1.030	1.780	0.820	1.300	1.750	1.100	0.800
24	0.790	1.950	1.340	1.920	1.800	0.970	1.910	1.120	1.170
32	1.320	2.430	2.170	2.070	2.050	1.680	2.110	1.200	1.460
40	2.410	2.080	3.770	2.180	2.170	2.330	2.250	1.260	1.570
48	3.350	1.980	3.570	2.430	2.880	2.040	2.110	2.260	1.750
56	2.980	2.030	2.970	2.690	3.330	1.780	2.500	2.330	1.930
64	2.740	2.130	2.430	2.450	3.180	1.360	1.880	3.080	1.520
72	2.310	3.230	2.180	2.300	3.310	1.430	1.520	2.920	1.790
80	2.198	2.150	1.350	2.190	2.500		1.740	2.370	2.110
88	1.970	1.620	1.340	1.950	2.450		1.620	1.780	3.410
96	1.640	1.120	1.380	1.970	2.360		1.840	1.270	2.330
104	1.360				1.440				2.110
112									1.830

ตารางผนวกที่ ก7 ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ของชุดการทดลอง A-I ชุดที่ 1 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ

เวลา (ชั่วโมง)	ชุดการทดลอง								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
0	72.519	91.959	112.754	74.861	93.511	93.808	74.399	95.656	108.135
8	67.271	72.551	98.429	51.294	90.172	92.884	55.915	83.641	89.286
16	56.298	64.695	89.649	40.203	81.107	92.421	30.961	74.399	79.365
24	52.481	60.536	74.399	29.575	71.088	78.096	39.279	47.135	76.389
32	46.279	48.521	62.384	31.423	72.996	85.028	30.037	44.362	71.429
40	36.260	35.582	74.399	27.726	72.996	83.179	24.492	36.044	76.389
48	31.489	39.279	55.915	40.665	60.592	83.179	23.567	31.885	73.909
56	35.782	35.582	55.915	40.665	49.618	80.869	18.946	23.567	74.405
64	26.718	32.348	55.453	38.355	33.397	74.861	17.098	23.105	66.964
72	30.534	37.893	59.150	18.946	26.718	51.587	22.321	14.881	51.587
80	30.534	22.817	58.532	15.377	25.763		22.817	15.377	46.627
88	30.057	16.369	52.579	11.905	17.176		21.825	11.905	58.532
96	27.672	22.321	52.579	8.433	18.130		20.337	10.913	53.571
104	30.057				17.653				44.147
112									40.179

ตารางผนวกที่ ก8 ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ของชุดการทดลอง A-I ชุดที่ 2 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ

เวลา	ชุดการทดลอง								
(ชั่วโมง)	A	B	C	D	E	F	G	H	I
0	72.042	96.118	108.133	73.013	95.897	91.497	71.429	94.270	103.671
8	64.885	78.558	95.194	59.150	91.126	89.649	51.587	88.262	87.798
16	57.252	62.384	82.717	55.915	80.153	88.725	31.746	54.991	71.429
24	52.004	50.832	79.945	51.756	64.408	67.006	36.210	51.294	66.468
32	41.985	48.983	68.854	48.059	64.408	82.717	26.786	45.749	61.508
40	34.351	38.355	70.240	50.832	60.592	81.793	21.825	35.120	89.286
48	46.279	34.658	69.316	38.817	58.683	77.634	20.337	36.969	72.421
56	43.893	32.348	60.998	37.893	43.893	76.248	16.865	26.340	69.444
64	27.672	30.499	21.719	37.893	40.076	74.861	12.401	22.181	66.468
72	25.763	31.423	60.074	37.893	21.947	42.659	15.873	17.857	48.611
80	28.626	31.746	48.611	32.242	25.763		19.345	18.353	45.635
88	28.626	22.817	49.107	21.825	19.561		21.825	16.865	64.484
96	29.103	27.778	48.611	11.905	20.992		19.345	10.913	52.083
104	26.240				19.561				38.690
112									34.722

ตารางผนวกที่ ก9 ความเข้มข้นกรดแอซีติกของชุดการทดลอง A-I ชุดที่ 1 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ

เวลา	ชุดการทดลอง								
(ชั่วโมง)	A	B	C	D	E	F	G	H	I
0	1.503	1.202	1.202	1.202	1.803	1.202	1.503	1.503	2.404
8	3.606	9.015	4.808	6.010	1.953	2.404	10.818	18.631	3.606
16	9.616	15.626	7.212	9.316	2.855	3.907	18.932	29.149	7.813
24	12.922	30.050	13.823	10.818	5.259	3.907	28.848	39.065	15.025
32	20.735	40.267	18.030	13.823	7.813	7.813	46.277	36.060	18.631
40	33.055	54.691	19.833	16.828	11.720	7.813	54.090	43.272	18.631
48	34.107	36.661	13.222	15.626	12.020	4.207	48.681	52.287	19.232
56	36.060	34.858	12.020	18.030	12.922	3.005	46.277	54.090	19.232
64	35.459	36.661	12.621	20.434	12.621	2.404	46.277	61.302	19.232
72	34.858	36.661	10.818	19.833	12.020	3.005	43.873	58.898	19.232
80	34.257	33.656	10.217	22.237	12.020		36.060	57.095	19.232
88	33.656	30.050	9.616	18.030	12.020		32.454	51.085	19.232
96	33.656	26.444	9.616	18.030	12.020		30.050	51.085	19.232
104	33.656				12.020				18.631
112									16.828

ตารางผนวกที่ ก10 ความเข้มข้นกรดแอซีติกของชุดการทดลอง A-I ชุดที่ 2 จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ

เวลา	ชุดการทดลอง								
(ชั่วโมง)	A	B	C	D	E	F	G	H	I
0	1.953	1.202	1.202	1.202	1.953	1.803	1.202	1.803	2.404
8	3.756	10.217	5.409	4.808	2.254	3.005	13.222	16.828	3.606
16	10.217	12.922	9.616	7.513	2.705	3.606	20.434	24.040	7.212
24	14.424	27.346	13.823	9.616	4.808	4.808	29.449	31.252	11.419
32	22.237	39.065	18.631	13.823	6.611	6.010	40.267	25.843	16.828
40	33.356	43.873	21.636	18.030	9.917	6.611	52.287	45.075	17.429
48	36.962	34.858	14.424	12.621	9.616	3.606	44.474	48.080	17.429
56	37.262	31.252	13.222	16.227	10.217	3.005	43.873	53.489	17.429
64	36.361	28.848	12.020	18.030	9.616	2.404	43.873	66.110	17.429
72	36.060	24.641	9.015	17.429	9.616	2.404	43.272	55.893	17.429
80	35.459	25.242	9.616	19.833	9.015		39.065	52.888	17.429
88	34.858	24.040	9.015	18.030	9.015		30.050	52.888	17.429
96	32.454	19.232	9.015	16.227	9.015		31.252	51.085	17.429
104	32.454				9.015				17.429
112									16.227

ตารางผนวกที่ ก11 จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากุชิ

ชุดการทดลอง	ชุดที่ 1			ชุดการทดลอง	ชุดที่ 2		
	พารามิเตอร์				พารามิเตอร์		
	C_P	$Y_{P/S}$	Q_P		C_P	$Y_{P/S}$	Q_P
A	36.060	0.911	0.749	A	37.262	1.012	0.787
B	54.691	1.004	1.342	B	43.873	0.746	1.123
C	19.833	0.384	0.498	C	21.636	0.499	0.522
D	22.237	0.329	0.368	D	19.833	0.450	0.405
E	12.922	0.287	0.248	E	10.217	0.184	0.196
F	7.813	0.252	0.184	F	6.611	0.112	0.128
G	54.090	0.918	1.354	G	52.287	0.913	1.234
H	61.302	0.675	0.825	H	66.110	0.734	0.894
I	19.232	0.492	0.548	I	17.429	0.245	0.458

หมายเหตุ สภาวะการทดลองของแต่ละชุดการทดลอง (A-I) แสดงดัง ตารางที่ 7 หน้า 34

ตารางผนวกที่ ก12 การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากความเข้มข้นกรดแอซีติก (C_p)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		
	เซลล์	แอลกอฮอล์	กรดแอซีติก
0	0.765	71.702	1.503
8	0.940	63.337	5.109
16	1.630	50.430	10.818
24	2.470	42.543	22.838
32	2.658	37.285	28.247
40	3.012	33.939	33.055
48	3.210	25.335	37.563
56	3.610	32.027	38.464
64	2.610	27.486	35.459
72	2.421	26.291	35.760
80	1.980	26.530	35.459
88	2.110	27.247	35.459
96	1.865	26.052	35.459
104	1.655	24.379	35.459

ตารางผนวกที่ ก13 การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากผลได้กรดแอซีติก ($Y_{P/S}$)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		
	เซลล์	แอลกอฮอล์	กรดแอซีติก
0	0.890	72.180	0.902
8	0.770	60.707	5.409
16	1.140	50.908	10.518
24	1.120	44.455	19.533
32	1.240	38.241	24.942
40	1.890	29.876	29.149
48	2.000	25.574	30.952
56	2.265	26.530	31.853
64	1.987	25.574	30.952
72	1.653	27.725	30.952
80	1.400	27.486	30.952
88	1.850	23.423	31.553
96	1.810	24.140	31.252
104	1.780	22.467	31.252

ตารางผนวกที่ ก14 การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		
	เซลล์	แอลกอฮอล์	กรดแอซีติก
0	1.060	75.765	1.503
8	1.170	62.380	4.508
16	1.120	55.449	9.616
24	1.376	49.952	19.232
32	1.853	44.455	26.144
40	3.239	38.480	31.252
48	3.762	24.140	37.262
56	3.060	23.662	39.065
64	1.660	25.574	42.371
72	1.722	23.662	42.070
80	1.850	22.945	41.469
88	2.000	22.467	40.868
96	1.843	21.272	40.868
104	1.543	20.315	40.868

ตารางผนวกที่ ก15 การผลิตกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (Q_p)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		
	เซลล์	แอลกอฮอล์	กรดแอซีติก
0	1.40	78.711	1.803
4	0.96	73.002	1.803
8	0.52	64.029	1.803
12	0.54	58.320	1.803
16	0.94	54.649	2.404
20	1.70	50.979	3.005
24	1.96	50.979	3.005
28	2.18	44.454	4.808
32	2.68	38.744	7.212
36	2.98	37.113	10.818
40	3.56	31.811	15.025
44	3.70	27.732	22.838
48	3.20	19.576	31.853
52	3.30	11.827	38.464
56	2.96	8.972	45.676
60	2.80	8.157	48.080
64	2.62	5.302	45.075
68	2.50	5.302	45.075
72	2.04	5.302	45.075

ตารางผนวกที่ ก16 การผลิตกรดแอซีติกแบบต่อเนื่องในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พิจารณาจากอัตราการผลิตกรดแอซีติกเชิงปริมาตร (อัตราการเจือจาง เท่ากับ 0.03 และ 0.05 ต่อชั่วโมง และความเข้มข้นแอลกอฮอล์ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ที่เติม เท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		
	เซลล์	แอลกอฮอล์	กรดแอซีติก
แบบเบ็ดเสร็จ (56 ชั่วโมง)			
0	1.10	78.184	1.202
4	0.58	65.543	1.202
8	1.10	63.670	1.803
12	1.50	60.393	1.803
16	1.64	54.775	2.404
20	1.80	51.498	3.005
24	2.10	47.285	3.606
28	2.22	40.730	4.207
32	2.98	38.858	5.409
36	3.42	37.921	10.818
40	3.84	25.281	17.429
44	3.86	20.599	23.439
48	3.96	16.386	30.050
52	4.02	7.491	33.055
56	4.06	3.277	37.262
แบบต่อเนื่อง $D = 0.03\ h^{-1}$ (52 ชั่วโมง)			
60	2.60	21.574	9.616
64	2.88	30.457	12.621
68	2.44	32.415	12.020
72	2.20	35.741	11.419
76	2.12	33.574	11.419
80	2.00	25.154	10.818

ตารางผนวกที่ ก16 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		
	เซลล์	แอลกอฮอล์	กรดแอซีติก
84	1.90	23.741	11.419
92	1.88	22.549	10.818
96	1.32	20.121	10.818
100	1.20	20.161	10.818
104	1.18	20.123	10.818
108	1.18	20.111	10.818
112	1.20	20.113	10.818
116	1.20	20.113	10.818
แบบต่อเนื่อง D = 0.05 h^{-1} (52 ชั่วโมง)			
120	2.02	37.921	27.045
124	0.90	21.067	28.848
128	1.98	22.940	27.045
132	1.88	23.876	24.641
136	1.70	30.899	24.040
140	1.70	32.772	22.838
144	1.70	30.899	22.838
148	1.62	33.240	21.035
152	1.64	29.963	18.631
156	1.64	29.494	18.631
160	1.66	29.494	18.631
164	1.58	29.494	18.631
168	1.64	29.026	18.631
172	1.60	27.622	18.631

หมายเหตุ การเปลี่ยนระบบการเพาะเลี้ยงจากแบบเบ็ดเสร็จไปเป็นระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องและระหว่างระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่ D = 0.03 และ 0.05 ต่อชั่วโมงใช้เวลาประมาณ 30 นาที

ภาคผนวก ข
การประมาณค่าพารามิเตอร์

ตารางผนวกที่ ข1 สูตรการคำนวณพารามิเตอร์ในการทดลองการหมักกรดแอซีติกแบบเบ็ดเสร็จ

พารามิเตอร์	สูตรคำนวณ
ผลได้เซลล์ ($Y_{X/S}$, กรัม/กรัม)	$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$
ผลได้กรดแลกติก ($Y_{P/S}$, กรัม/กรัม)	$Y_{P/S} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S_t}$
อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (q_S, กรัม/กรัม ชั่วโมง)	$q_S = \frac{1}{\bar{X}}\left(\frac{dS}{dt}\right) = \frac{1}{\left(\frac{X_t + X_0}{2}\right)}\left(\frac{S_0 - S_t}{t - t_0}\right)$
อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (q_P, กรัม/กรัม ชั่วโมง)	$q_P = \frac{1}{\bar{X}}\left(\frac{dP}{dt}\right) = \frac{1}{\left(\frac{X_t + X_0}{2}\right)}\left(\frac{P_t - P_0}{t - t_0}\right)$
อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_P, กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	$Q_P = \frac{dP}{dt} = \left(\frac{P_t - P_0}{t - t_0}\right)$

หมายเหตุ เมื่อ X, S, P หมายถึง ความเข้มข้นเซลล์ แอลกอฮอล์ กรดแอซีติก ตามลำดับ มีหน่วยเท่ากับ กรัมต่อลิตร และ t หมายถึง เวลา มีหน่วยเท่ากับ ชั่วโมง

ตัวห้อย 0 และ t หมายถึง ที่เวลาเริ่มต้น และที่เวลาใด ๆ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ ข2 สูตรการคำนวณพารามิเตอร์ในการทดลองการหมักกรดแอซีติกแบบต่อเนื่อง ณ สภาวะคงตัว

พารามิเตอร์	สูตรคำนวณ
อัตราการเจือจาง (D, ชั่วโมง$^{-1}$)	$D = \frac{F}{V}$
ผลได้กรดแลกติก ($Y_{P/S}$, กรัม/กรัม)	$Y_{P/S} = \frac{P}{(S_0 - S)}$
อัตราจำเพาะการใช้กลูโคส (q_S, กรัม/กรัม ชั่วโมง)	$q_S = \frac{D(S_0 - S_t)}{X}$
อัตราจำเพาะการผลิตกรดแลกติก (q_P, กรัม/กรัม ชั่วโมง)	$q_P = \frac{DP}{X}$
อัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร (Q_P, กรัม/ลิตร ชั่วโมง)	$Q_P = DP$

หมายเหตุ เมื่อ X, S, P หมายถึง ความเข้มข้นเซลล์ แอลกอฮอล์ กรดแอซีติก ตามลำดับ มีหน่วยเท่ากับ กรัมต่อลิตร

_ตัวห้อย 0 และ t หมายถึง ที่เวลาเริ่มต้น และที่เวลาใด ๆ ตามลำดับ

การคำนวณในการออกแบบโดยวิธีทากุชิ (Roy, 2001)

1. เปอร์เซ็นต์อิทธิพล (% main effect)

$$\text{เปอร์เซ็นต์อิทธิพล} = \frac{(\text{ค่าอิทธิพลสูงสุด} - \text{ค่าอิทธิพลต่ำสุด})}{\text{ค่าอิทธิพลรวม}} \times 100 \qquad (4)$$

2. ค่า Factor sum of square (SS_{Factor})

$$SS_{Factor} = \frac{N \times r}{L} \sum_{k=1}^{L} \left(\bar{y}_k - \bar{\bar{y}}\right)^2 \qquad (5)$$

3. ค่า Error sum of square (SS_{Error})

$$SS_{Error} = \sum (SD)^2 \times \left(r - 1\right) \qquad (6)$$

4. ค่าองศาอิสระของปัจจัย (DOF_{Factor})

$$DOF_{Factor} = L - 1 \qquad (7)$$

5. ค่าองศาอิสระของข้อผิดพลาด (DOF_{Error})

$$DOF_{Error} = N\left(r - 1\right) \qquad (8)$$

6. ค่าองศาอิสระรวม (DOF_{Total})

$$DOF_{Total} = \left(N \times r\right) - 1 \qquad (9)$$

7. ค่าความแปรปรวน (variance, Var)

$$\text{Var} = \frac{\text{SS}}{\text{DOF}} \tag{10}$$

8. ค่าสัดส่วนความแปรปรวน (variance ratio, F_{ratio})

$$F_{ratio} = \frac{\text{Var}}{\text{Var}_{\text{Error}}} \tag{11}$$

9. ค่าความเชื่อมั่น (confidence)

$$\text{Confidence} = 100 - F_{DIST}\left(F_{ratio}, \text{DOF}_{\text{Factor}}, \text{DOF}_{\text{Error}}\right) \text{x } 100 \tag{12}$$

10. ค่ากลางของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean-Squared Deviation, MSD)

$$MSD = \frac{(\frac{1}{Y_1^2}) + (\frac{1}{Y_2^2}) + ... + (\frac{1}{Y_n^2})}{N} \tag{13}$$

11. การหาค่าผลการทดลองที่คาดไว้ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

(result expected at optimum condition, Y_{opt})

$$\begin{aligned} Y_{opt} = {} & \bar{T} + \left(\overline{A_2} - \bar{T}\right) + \left(\overline{B_2} - \bar{T}\right) + \left(\overline{C_3} - \bar{T}\right) + \left(\overline{D_3} - \bar{T}\right) \\ & + \left(\overline{E_3} - \bar{T}\right) + \left(\overline{F_3} - \bar{T}\right) + \left(\overline{G_3} - \bar{T}\right) + \left(\overline{H_2} - \bar{T}\right) \end{aligned} \tag{14}$$

หมายเหตุ F_{DIST} เป็นค่าที่คำนวณโดยใช้ฟังก์ชันสำเร็จรูปในโปรมแกรม excel โดยเป็นความสัมพันธ์ระหว่างค่า F_{ratio}, $\text{DOF}_{\text{Factor}}$, $\text{DOF}_{\text{Error}}$ โดย y, $\bar{y}$, N, r, L, k และ $\bar{T}$ หมายถึง ผลการทดลอง ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง จำนวนการทดลอง จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง จำนวนระดับของปัจจัย ระดับของปัจจัย และค่าเฉลี่ยของผลรวมของผลการทดลองทั้งหมด ตามลำดับ และ $\overline{A_2}$, $\overline{B_2}$, $\overline{C_3}$, $\overline{D_3}$, $\overline{E_3}$, $\overline{F_3}$, $\overline{G_3}$ และ $\overline{H_2}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของผลรวมของผลการทดลองของแต่ละระดับของปัจจัยที่เหมาะสมที่ได้

ภาคผนวก ค
วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้ง

1. เตรียมหลอดทดลองที่อบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน 2 หลอด
2. ดูดตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ
3. นำไปหมุนเหวี่ยงแยกที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินส่วนใส แช่แข็งเก็บไว้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส, แอลกอฮอล์ และกรดแอซีติก
4. ล้างเซลล์ด้วยการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองนำไปหมุนเหวี่ยงแยกอีกครั้ง รินส่วนใสทิ้งและทำซ้ำ 1–2 ครั้ง
5. นำเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ทิ้งให้เย็นในเดสิเคเตอร์ และทำการชั่งน้ำหนักหลอดทดลองที่แน่นอนอีกครั้ง
7. คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนี้

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดทดลองและเซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอดทดลอง (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \times 10^{-3}}$$

การวิเคราะห์ปริมาณกรดแอซีติก (ดัดแปลงจาก William, 2000)

สารเคมี

ก. น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์

เตรียมโดยนำน้ำกลั่นมาต้มเดือด 20 นาที

ข. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N

เตรียมจากโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัมเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดแก้วที่ทนด่าง ก่อนใช้นำมาหาความเข้มข้นมาตรฐานก่อน

การหาความเข้มข้นมาตรฐานของ 0.1 N NaOH ทำได้โดยชั่ง acid potassium phthalate (อบ 2 ชั่วโมงที่ 120 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง) อย่างละเอียดประมาณ 0.3 กรัม เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จึงเติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 90 – 100 มิลลิลิตร เมื่อ acid potassium phthalate ($KHC_8H_4O_4$) ละลาย จึงเติมสารละลายฟีนอลฟทาลีน 2–3 หยด แล้วไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N ความเข้มข้นมาตรฐาน คำนวณได้จากสูตร

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

ค. สารละลายฟีนอลฟทาลีน (phenolphthalein)

ชั่งฟีนอลฟทาลีน 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่างที่ปั่นแยกเซลล์แล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลฟทาลีน 2–3 หยด แล้วไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน NaOH ที่มีความเข้มข้น 0.1 N จนกระทั่งถึงจุดยุติ สีชมพู คำนวณปริมาณกรดแอซีติกได้ตามสูตร

$$\text{กรดแอซีติก (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)} = \frac{NxVx60.1x100}{1000x1}$$

กำหนดให้ N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

V = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกฮอล์ โดยวิธีไดโครเมตออกซิเดชัน (Amerine, 1974)

วิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์โดยวิธีไดโครเมตออกซิเดชัน(dichromate oxidation) เป็นวิธีหาแอลกอฮอล์โดยวิธีทางเคมี โดยการนำสารตัวอย่างมากลั่น แอลกอฮอล์ที่ถูกกลั่นออกมาจะทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ที่ทราบปริมาณแน่นอนและมากเกินพอในภาวะที่เป็นกรดได้เป็นกรดแอซีติกดังแสดงในสมการที่ 1 ไดโครเมทส่วนที่เหลือจะทำปฏิกิริยากับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต(ferrous ammonium sulfate; $Fe(NH_4)_2(SO_2)_2$) ดังแสดงในสมการที่ 2 โดยใช้ 1,10 ฟีแนนโทรลีนเฟอร์รัสซัลเฟต (1,10– phenenthroline ferrous sulfate) เป็นอินดิเคเตอร์ โดยสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีน้ำตาล

$$2Cr_2O_7^{-2} + 3C_2H_5OH + 16H^- \longrightarrow 4Cr^{3+} + 3CH_3COOH + 11H_2O \qquad (15)$$

$$Cr_2O_7^{-2} + 6\,Fe^{+2} + 14H^- \longrightarrow 2\,Cr^{3+} + 6Fe^{+3} + 7H_2O \qquad (16)$$

เครื่องมือ

1. ชุดกลั่น (distillation apparatus)
2. บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร
3. ปีเปตแบบวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร และ 25 มิลลิลิตร
4. ขวดรูปชมพู่ (erlenmayer flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 250 มิลลิลิตร
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้ (water bath)

สารเคมี

1. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (Potassium dichromate solution) ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) 33.77 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 325 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

2. สารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_2)_2).6H_2O$) 135 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 750 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร ลงไปอย่างช้า ๆ ทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. สารละลาย 1,10 ฟีแนนโทรลีนเฟอรัสซัลเฟต ละลายเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) 0.70 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมออโธฟีแนนโทรลีน (o–phenanthroline) 1.49 กรัม คนให้ละลาย และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. เติมน้ำกลั่นลงในขวดก้นกลมสำหรับกลั่น 100 มิลลิลิตร

2. ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดก้นกลมสำหรับกลั่น ต่อชุดกลั่นให้พร้อมสำหรับกลั่น

3. ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 25 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร เป็นตัวรองรับ นำไปวางไว้ที่ปลายส่วนควบแน่น (condenser) โดยให้ปลายของส่วนควบแน่นจุ่มลงในสารละลาย

4. กลั่นด้วยความร้อนต่ำจนได้ส่วน distillate รวมกับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต จนมีปริมาตรประมาณ 40–45 มิลลิลิตร จึงหยุดกลั่น

5. ฉีดล้างส่วนควบแน่นด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย ให้ลงไปอยู่รวมในฟลาสก์สารละลายโปแตสเซียมไดโครเมต

6. นำขวดสารละลายที่ได้ ไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที เพื่อให้แอลกอฮอล์ทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมไดโครเมตที่อยู่ในสารละลายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นถ่ายสารละลาย พร้อมทั้งใช้น้ำกลั่นเล็กน้อยฉีดล้างสารละลายทั้งหมดลงสู่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

7. ไตเตรทกับสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียวใส เติมสารละลาย 1–10 ฟีแนนโทรลีนเฟอรัสซัลเฟต ลงไปประมาณ 10 หยด แล้วไตเตรทต่อจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จดปริมาตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไปเป็นค่า V_A

8. ทำ blank โดยปิเปตน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 25 มิลลิลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที นำมาไตเตรทกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตตามข้อ7 จดปริมาตรสารละลายที่ใช้เป็น V_B

9. นำค่า V_A และ V_B ที่ได้คำนวณหาปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่าง

$$\text{ปริมาณแอลกอฮอล์ (\%w/v)} = 25 - \frac{25V_A}{V_B}$$

เมื่อ

A = ปริมาตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไทเทรตสารตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไทเทรตชุดควบคุม (มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ง
ตัวอย่างแบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

แบบสอบถามทางประสาทสัมผัสโดยวิธีการให้คะแนนความชอบของชนิดของสารให้ความหวานที่เป็นที่นิยมของผู้บริโภค ในเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์สับปะรดในระดับความหวานที่เท่ากัน

ชื่อผลิตภัณฑ์ : เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์สับปะรดที่มีสารให้ความหวาน 4 ชนิด คือ มอลทิทอล ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ไซลิทอล และน้ำผึ้ง

คำชี้แจง : กรุณาทดสอบตัวอย่างต่อไปนี้และให้ระดับความชอบและไม่ชอบต่อลักษณะต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ โดยใช้ระดับคะแนนที่เหมาะสมเพื่อแสดงให้เห็นว่าท่านได้อธิบายความรู้สึกชอบและไม่ชอบในระดับใด ก่อนจะทำการชิมตัวอย่างถัดไปกรุณาดื่มน้ำเพื่อเป็นการล้างปาก

โดยให้คะแนนความชอบดังนี้

1 = ไม่ชอบมากเป็นพิเศษ
2 = ไม่ชอบมาก
3 = ไม่ชอบปานกลาง
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย
5 = เฉย ๆ
6 = ชอบเล็กน้อย
7 = ชอบปานกลาง
8 = ชอบมาก
9 = ชอบมากเป็นพิเศษ

รหัสตัวอย่าง	.....	.....	.....	.....
สี กลิ่น รสหวาน รสเปรี้ยว ความชอบโดยรวม				

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

แบบสอบถามพฤติกรรมการยอมรับและการบริโภคเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์สับปะรดที่มีสารให้ความหวาน 4 ชนิด

คำแนะนำ : กรุณาใส่เครื่องหมายใน ( ) ที่ท่านเห็นว่าเหมาะสม และตรงกับความคิดเห็นของท่าน

ส่วนที่ 1 ข้อมูลของผู้ตอบแบบสอบถาม

1. เพศ ( ) หญิง ( ) ชาย
2. อายุ ( ) 16 – 20 ปี ( ) 21 – 25 ปี ( ) 26 – 30 ปี
   ( ) มากกว่า 30 ปี
3. การศึกษา ( ) มัธยมศึกษา ( ) ปริญญาตรี
   ( ) สูงกว่าปริญญาตรี
4. อาชีพ( ) นักเรียน/นิสิต/นักศึกษา ( ) ข้าราชการ/รัฐวิสาหกิจ
   ( ) พนักงานบริษัทเอกชน ( ) ธุรกิจส่วนตัว
   ( ) แม่บ้าน ( ) อื่นๆ โปรดระบุ.....

ส่วนที่ 2 ข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมการบริโภค

5. ท่านเคยรับประทานเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์สับปะรดหรือไม่
   ( ) เคย ( ) ไม่เคย
6. ท่านชอบรับประทานเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์สับปะรดหรือไม่
   ( ) ชอบ ( ) เฉยๆ ( ) ไม่ชอบ
7. ท่านยอมรับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์สับปะรดหรือไม่
   ( ) ยอมรับ ( ) ไม่ยอมรับ เพราะ.....
8. หากมีผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์สับปะรดวางจำหน่าย ท่านคิดว่าจะซื้อมาบริโภคหรือไม่
   ( ) ซื้อ ( ) ไม่แน่ใจ ( ) ไม่ซื้อ เพราะ.....

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวศุภาวิชญ์ฐา สุวรรณแพทย์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 5 สิงหาคม 2525
สถานที่เกิด	ปัตตานี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วาริชศาสตร์) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-