ในการนำน้ำอ้อยมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักไวน์น้ำอ้อยเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำส้มสายชูนั้น ถ้าน้ำอ้อยได้ผ่านขั้นตอนการเตรียมที่ดีและถูกสุขลักษณะ น้ำอ้อยที่ได้นั้นสามารถที่จะใช้ได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านการให้ความร้อนหรือเติมสารเคมี (KMS) เพื่อฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อย แต่ถ้าน้ำอ้อยนั้นมีปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นสูงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ทันที ควรที่จะนำน้ำอ้อยนั้นมาผ่านขั้นตอนการให้ความร้อนระดับพาสเจอไรส์โดยอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-15 นาที หรือ ถ้าเลือกใช้สารเคมีก็ควรเติม KMS ที่ระดับความเข้มข้นอย่างน้อย 200 ppm แต่ถ้าน้ำอ้อยมีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนสูงมากอาจต้องใช้ที่ความเข้มข้น 500 ppm หรือสูงกว่า น้ำอ้อยที่เติมสารเคมี KMS ในปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสม ควรเก็บรักษาไม่เกิน 2 สัปดาห์

การหมักไวน์น้ำอ้อยจากเชื้อยีสต์ตกตะกอน *S. cerevisiae* M30 น้ำอ้อยที่ใช้สามารถที่จะใช้ได้ทั้งในสภาพที่เติมสารอาหาร (ประกอบด้วย 0.6% ยีสต์สกัด , 0.4% $(NH_4)_2SO_4$, 0.8% KH_2PO_4 และ 0.2% $MgSO_4.7H_2O$) และไม่เติมสารอาหารก็ได้ แต่จำเป็นต้องปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 4.0 – 4.5 ความหวานที่เหมาะสมของน้ำอ้อยควรที่จะปรับให้มีความหวานประมาณ 20% ทำการหมักโดยใช้กระบวนการหมุนเวียนเซลล์ยีสต์ (Cell Recycle Process) ในอัตราการหมุนวนที่เหมาะสมเท่ากับ 50 ml/min โดยใช้เวลาในการหมัก 1-2 วัน ได้น้ำไวน์ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ประมาณ 8% ขึ้นไป

สภาพที่เหมาะสมในการหมักไวน์น้ำอ้อยสำหรับการขยายขนาดการหมัก พบว่า สามารถทำการเจือจางน้ำอ้อยได้โดยปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ไม่มีความแตกต่างเชิงสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับที่ไม่ได้ทำการเจือจางน้ำอ้อย ในขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักไวน์หรือแอลกอฮอล์จากน้ำอ้อยด้วยเชื้อยีสต์ M30 อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 35 - 37 องศาเซลเซียส

ลักษณะการหมักต่อปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ในไวน์น้ำอ้อย พบว่า การหมักแบบ Repeated Batch Fermentation สามารถทำการหมักได้มากกว่า 10 ครั้งโดยให้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่การหมักแบบ Cell Recycle ที่เหมาะสมควรเป็นระบบที่มีการนำเซลล์ออกจากทางด้านล่างของถังแล้วนำวนกลับเข้าไปสู่ด้านบนของถัง ส่วนการหมักแบบ Fed Batch สามารถเพิ่มปริมาณแอลกอฮอล์ในไวน์น้ำอ้อยได้เป็นอย่างดี

ในการขยายขนาดการหมักไวน์น้ำอ้อยในห้องปฏิบัติการจาก 1 ลิตร เป็น 5 20 และ 100 ลิตร ตามลำดับนั้น พบว่า ประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์ในไวน์น้ำอ้อยโดยเฉพาะรูปแบบ (Profile) ของการหมักใกล้เคียงกัน แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นในการขยายขนาดการผลิต คือ ปัญหาความร้อนสะสม ดังนั้นในการออกแบบถังหมักในระดับอุตสาหกรรมจึงจำเป็นต้องพิจารณาถึงระบบการหล่อเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการหมักด้วย สำหรับปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ประมาณ 8% เมื่อทำการหมักไม่เกิน 72 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง โดยใช้น้ำอ้อยที่เติมและไม่เติมสารอาหาร ปรับ pH เท่ากับ 4.0 – 4.5 และปรับความหวานเท่ากับ 20%

การคัดเลือกเชื้อ Acetic acid bacteria เพื่อผลิตกรดอะซิติคหรือน้ำส้มสายชูได้ พบว่า จากตัวอย่างทั้งสิ้น 205 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกเชื้อที่ต้องการได้เพียง 4 เชื้อเท่านั้น โดยเชื้อทั้ง 4 เชื้อสามารถสร้างกรดอะซิติคได้ใกล้เคียงกัน แต่จะมีความแตกต่างตรงกลิ่นของผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ " **สป5** " เป็นเชื้อที่ให้กลิ่นหอมของ ester ที่เด่นชัดมาก ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงจะเลือกใช้เชื้อ นี้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างกรดอะซิติคต่อไป ทั้งนี้เชื้อ "**สป5**" เป็นเชื้อติดสีแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน เจริญได้ในที่มีอากาศ สามารถสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส ไม่สร้างเซลลูโลสและเม็ดสีน้ำตาล และยังมีสมบัติ Overoxidation จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงสรุปว่า เชื้อ " **สป5** " จัดเป็นเชื้อใน

กลุ่มของ *Acetobacter aceti* ทั้งนี้ตามหลักการจำแนกชนิดของแบคทีเรียของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan and Gibbons, 1974) และ Gibbs and Shapton (1968)

สภาพที่เหมาะสมที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์น้ำอ้อยโดยเชื้อด้วยเชื้อ " **สป5** " ในถังหมักแบบ Airlift ประกอบด้วย (ร้อยละ) แอมโมเนียมซัลเฟต (แหล่งไนโตรเจน) 0.4 น้ำตาลกลูโคส 1.0 กรดอะซิติค 1.0 แอลกอฮอล์ 6.0 ปริมาณหัวเชื้อ 7.5 และปริมาณอากาศ 0.5 vvm นอกจากนี้แล้วสภาพการหมักแบบตรึงเซลล์เชื้อ " **สป5** " บนตัวกลางเป็นสภาพการหมักที่สามารถผลิตกรดได้ตามเป้าหมาย และจากการศึกษาพบว่า ใยบวบและแผ่นกรอง(ที่ใช้ในการกรองน้ำในบ่อเลี้ยงปลา)เป็นตัวกลางที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเชื้อ " **สป5** " อย่างไรก็ตามทางโรงงานที่ร่วมโครงการได้ขอให้ใช้แผ่นกรอง(ที่ใช้ในการกรองน้ำในบ่อเลี้ยงปลา) เนื่องจากสามารถที่จะจัดซื้อได้ง่ายกว่าใยบวบ

ในการศึกษาถึงจำนวนรอบของการหมัก (Repeated Batch Fermentation) ในสภาพที่ใช้แผ่นกรองเป็นตัวกลางสำหรับตรึงเซลล์ของเชื้อ " **สป5** " เพื่อใช้ในการผลิตกรดอะซิติคในการหมักแบบ Airlift พบว่า ปริมาณกรดที่ได้รับสูงสุดในแต่ละรอบของการหมักจะได้ในวันที่ 6 – 7 ของการหมักแต่ละรอบ และยังสามารถหมักกรดอะซิติคได้ติดต่อกันถึง 8 รอบ (รอบละ 7 วัน) โดยที่ปริมาณกรดที่ผลิตสูงสุดอยู่ระหว่าง 2.1-2.6% นับตั้งแต่รอบที่ 4 เป็นต้นไป

การขยายขนาดการผลิตกรดอะซิติคในสภาพที่ใช้แผ่นกรองเป็นตัวกลางสำหรับตรึงเซลล์ของเชื้อ *Acetobacter spp.* **สป5** " ในถังหมักแบบ Airlift ขนาด 7.5 ลิตร (ปริมาตรที่ใช้ 5 ลิตร) พบว่า ลักษณะการสร้างหรือผลิตกรดอะซิติคเป็นลักษณะเดียวกันกับที่เกิดขึ้นในถังหมัก Airlift ขนาด 1.5 ลิตร กล่าวคือ กรดอะซิติคจะถูกสร้างออกมาน้อยมากใน Batch แรกของการหมัก ในขณะที่เมื่อเชื้อ " **สป5** " ถูกตรึงที่ตัวกลางมากขึ้น ปริมาณกรดที่ผลิตออกมาก็จะเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้สังเกตได้จากปริมาณกรดอะซิติคจะเพิ่มขึ้นในการหมัก Batch ที่ 2 3 และ 4 โดยที่ในการหมัก Batch ที่ 2 3 และ 4 นั้นได้มีการเปลี่ยนเฉพาะไวน์น้ำอ้อยที่เตรียมขึ้นใหม่เท่านั้น ส่วนเชื้อ " **สป5** " ที่ตรึงบนแผ่นกรองนั้นจะใช้จากถังหมักใน Batch ที่ 1 นอกจากนี้ยังพบอีกว่าปริมาณกรดที่ได้จากสูงสุดจาก Batch ที่ 2 3 และ 4 นั้นมีค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนัก (1.98-2.12%) แสดงให้เห็นว่ายังสามารถที่จะใช้ถังหมักดังกล่าวทำการหมักน้ำหมักต่อไปอีกได้

การผลิตกรดอะซิติคในสภาพที่ใช้แผ่นกรองเป็นตัวกลางสำหรับตรึงเซลล์ของเชื้อ *Acetobacter spp.* " **สป5** " ในลักษณะ Semi-Continuous Fermentation ในระดับห้องปฏิบัติการในถังหมัก Airlift (ขนาด 7.5 ลิตร) จำนวน 2 ถัง และเมื่อทำการหมักจนมีปริมาณกรดประมาณ 3% ขึ้นไปจึงทำการเติมไวน์น้ำอ้อยใหม่ (Fresh sugarcane wine) ที่ปรับสภาพให้มีสารอาหารตามที่กำหนดเข้าไปในถังหมักกรดที่ 1 ซึ่งจะทำให้เกิดสภาพการไหลของน้ำหมักไปสู่ถังที่ 2 และทำให้น้ำหมักจากถังที่ 2 ล้นออกเป็นผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูต่อไป

ดังนั้นต้นแบบที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในระดับกึ่งโรงงานที่โรงงานบริษัท Agro-On (ประเทศไทย) จำกัด จึงประกอบด้วย ถังหมักน้ำส้มสายชูในลักษณะถังหมักแบบ Airlift ขนาดความจุ 100 ลิตร จำนวน 6 ถัง ซึ่งจะทำการหมักเป็น series ละ 2 ถัง จำนวน 3 series ที่ขนานกัน แต่ละถังทำการหมักในสภาพที่มีการตรึงเซลล์ของเชื้อ " **สป5** " บนแผ่นกรอง นอกจากนี้แล้วยังมีถังบรรจุไวน์น้ำอ้อย (Fresh sugarcane wine) ขนาดความจุ 400 ลิตร จำนวน 1 ถัง สำหรับใช้ในการเติมลงในถังหมักที่ 1 เมื่อสามารถเริ่มกระบวนการหมักแบบ Semi-continuous fermentation ได้ และถังเก็บผลิตภัณฑ์ (Finished product) หรือ น้ำส้มสายชูที่ได้จากกระบวนการผลิตขนาดความจุ 400 ลิตร จำนวน 1 ถัง อีกทั้งยังต้องมี Pump ซึ่งสามารถควบคุมอัตราการเติมไวน์น้ำอ้อยลงถังหมักน้ำส้มสายชูถังที่1 จำนวน 1 เครื่อง และระบบการให้ลมที่สะอาดเข้าไปถังหมักน้ำส้มสายชูเพื่อให้อากาศเข้าไปในถังหมักน้ำส้มสายชูทั้ง 6 ถัง เพื่อให้สามารถดำเนินการหมักในลักษณะ Airlift ได้

ผลการหมักที่ได้รับในระดับกึ่งโรงงาน พบว่า สามารถดำเนินการหมักในลักษณะ Semi-Continuous

Fermentation ได้ไม่แตกต่างจากที่ได้รับในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้สามารถที่จะหมักได้กรดมากกว่า 3.5 - 4% โดยปริมาณกรดที่สูงได้รับซึ่งสูงกว่า 3% นี้สามารถที่จะบรรลุวัตถุประสงค์ของงานวิจัยและสนองความต้องการของโรงงานได้

ในการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำส้มสายชูที่ผลิตได้จากการหมักโดยการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ยังหน่วยงานวิเคราะห์ พบว่า ปริมาณกรดอะซิติคมีอยู่ประมาณ 3.67 ซึ่งต่ำกว่ามาตรฐานของน้ำส้มสายชูที่ขายอยู่ตามท้องตลาดเพียงเล็กน้อย แต่เป็นปริมาณที่โรงงานสามารถนำไปใช้งานได้โดยตรง นอกจากนี้ปริมาณของแข็ง (Total solids) และปริมาณทองแดง(Copper) อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ในขณะที่ตรวจไม่พบสารหนู (Arsenic) ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ดีมาก อย่างไรก็ตามปริมาณตะกั่ว (Lead) เกินเพียงเล็กน้อย แต่ปริมาณของสังกะสี (Zinc) เกินกว่าเกณฑ์ถึงประมาณเกือบ 6 เท่า ทั้งนี้ปริมาณสังกะสีที่เกินสืบเนื่องจากข้อผิดพลาดจากการประกอบถังหมักและอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมักและการกรองไวน์ซึ่งสามารถที่จะดำเนินการแก้ไขได้

การวิเคราะห์ทางเศรษฐศาสตร์ของกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำอ้อย พบว่า เนื่องจากบริษัท Agro-On (ประเทศไทย) จำกัด สามารถผลิตน้ำส้มสายชูได้เองจึงสามารถลดต้นทุนการสั่งซื้อน้ำส้มสายชูจากต่างประเทศคิดเป็นร้อยละ 30.13 และสามารถประหยัดต้นทุนลงได้คิดเป็นจำนวนเงิน 14,460.00 บาทต่อเดือน

ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่างานวิจัย เรื่อง การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำอ้อยนี้สามารถที่จะดำเนินการได้ผลตามที่ระบุไว้ในวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยได้เป็นอย่างดี

Well prepared under hygienic condition, sugarcane juice was not treated with pasteurization or chemical such as potassium metabisulfite (KMS) addition. However, sugarcane juice which contained high amount of contaminants was not suitable for wine fermentation. It must be pasteurized at 70°C for 5 – 15 min or treated with KMS, at least 200 ppm concentration. The KMS treated sugarcane juice could be kept at room temperature, not more than 2 weeks.

Sugarcane wine which added or no added nutrient composing 0.6% yeast extract , 0.4% $(NH_4)_2SO_4$, 0.8% KH_2PO_4 and 0.2% $MgSO_4.7H_2O$ could be prepared by using an flocculating yeast, *Saccharomyces cerevisiae* M30. The fermenting mash must be adjusted to pH 4.0 – 4.5 and 20% sugar content. The Cell recycle process was used at the 50 ml/min of recycling rate and let ferment for 1 – 2 days. The $\geq$ 8% alcohol content in sugarcane wine was obtained.

Optimum conditions for scaling up of sugarcane wine preparation were investigated. The diluted sugarcane juice could be used and provided the high alcohol content which was not significantly different from that obtained by using undiluted sugarcane juice. In addition, the suitable fermentation temperature of yeast M30 was in between 35 - 37°C.

Effect of fermentation types on alcohol content of sugarcane wine was studied. Repeated batch fermentation could be done for more than 10 times without addition of new culture of *S. cerevisiae* M30. The alcohol content among those were almost the same. In case of cell recycle process, the suitable process was to continuously transfer yeast from the bottom to the top of fermenter. For fed-batch fermentation, the high alcohol content was obtained as usual.

Scaling up of sugarcane wine production from 1L to 5, 20 and 100L were investigated. The similarity of fermentation profiles among these production sizes were obtained while the thermal accumulation in fermenting mash was the main problem. So, the well temperature controlled fermenter must be designed when it was produced in factory. The $\geq$ 8% alcohol content was normally found when the fermentation period were within 72 hrs. in both types of sugarcane juice.

Screening of acetic acid producing bacteria was one of main objective of this research. Only 4 cultures which could provided acetic acid at the acceptable level was obtained from 205 samples. Among the four, the SP5 was the strain which provided good aroma than the other. So, the SP5 strain was selected to be used for the vinegar production in airlift fermenter. Identification of SP5 strain was be done. The gram negative rod-shaped, grew under aerobic condition, acid production from glucose fermentation, no cellulose and no brown-pigment production and over-oxidation were the characteristic properties of this strain. By Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan and Gibbons, 1974) and Gibbs and Shapton (1968), the SP5 strain was determined as *Acetobacter aceti*.

Optimization conditions for vinegar production form sugarcane wine by using the SP5 strain were investigated. The compositions of fermenting mash were sugarcane wine containing 6% alcohol, 0.4% $(NH_4)_2SO_4$, 1% glucose, 1% acetic acid. After inoculating with 7.5% inoculum of SP5 strain, the vinegar was produced in airlift fermenter with 0.5 vvm air supply. The high amount of acetic acid produced was obtained in the immobilized SP5 strain on the carrier. The good carrier used for this purpose were plastic filter which normally used for waste water filtration and gourd which was the natural fiber. However, the plastic filter was mentioned and selected by Agro-On (Thailand) Ltd.

Repeated batch fermentation of vinegar production by immobilized SP5 strain on plastic filter was studied. The highest acidity of each batch was obtained at 6 – 7 days of fermentation. The repeated batch could be conducted for 8 cycles which 7 days per cycle. The 2.1 – 2.6% acidity was obtained from cycle 4 to the last batch.

Scaling up of vinegar production by the immobilized SP5 strain on plastic filter in 7.5 L airlift fermenter with 5L working volume was determined. The similarity profile of acetic acid production as that produced in 1.5L fermenter was found. More acidity was produced when the batch number increased. In addition, the semi-continuous fermentation process was set by using 2 tanks of 7.5L airlift fermenter. The fermenting mash from fermenter 1 could be transferred to fermenter 2 whenever the fresh sugarcane wine was added into the fermenter 1. The $\geq$ 3% acidity of vinegar produced was obtained by this process.

The model of fermenter which was constructed at Agro-On (Thailand) Ltd. was set up to the semi-continuous fermentation process obtained in laboratory scale. There were 6 tanks of 100Lairlift fermenters, one of 400L fresh sugarcane wine tank, one of 400L vinegar product tank and pump which could control the feeding rate of fresh sugarcane wine. The airlift fermenter which contained immobilized SP5 strain on plastic filter was as three series. One series contained two airlift fermenters. The Semi-continuous fermentation was set up. It was found that the vinegar obtained from pilot plant was almost the same that obtained from the lab. The 3.5 - 4% acidity of vinegar product was obtained. This result showed that the main objective of this research succeeded.

Analysis of vinegar obtained from pilot plant was done by sending the sample to analytical agency. The 3.67% acidity was found in the product which was lower than that sold in the market, but it was accepted by factory. The total solid and copper content of product were under standard of TISI while arsenic was not found. The higher content of zinc in the product showed the defect of this product, but this defect was due to the mistake of inner surface of airlift ferment and the wine filtering unit which belonged to Agro-On (Thailand) Ltd.

Economic analysis of vinegar production in pilot plant scale was calculated. It was found that Agro-On (Thailand) Ltd. could reduce vinegar purchasing cost about 30.13% in case of ordering from aboard while the reduction of 14,460.00 baht/month of production cost was accepted.

It could be finally mentioned that this research reached all main targets.