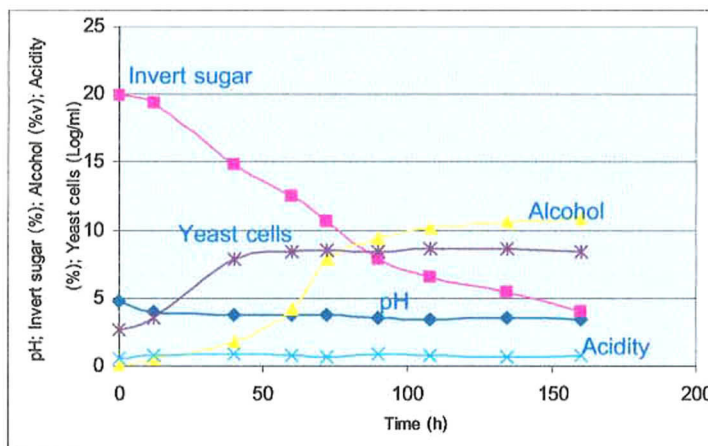


ผลการทดลอง

การผลิตไวน์ข้าวโพดเพื่อใช้ในการปรับ “หัวเชื่อน้ำส้ม WK”

ในการหมักไวน์ข้าวโพดตามวิธีของ Krusong *et al.* (2007; 2010) ด้วย “เชื้อยีสต์ M30” ซึ่งเป็นยีสต์ตกตะกอน (flocculating yeast) ในถังหมักขนาด 100 ลิตร ได้ผลการหมักดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่า “เชื้อยีสต์ M30” สามารถทำการหมักได้อย่างรวดเร็วโดยสามารถผลิตไวน์ที่มีแอลกอฮอล์ 10.6% ภายในเวลา 160 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (30-32°C) น้ำไวน์ที่ได้จะนำไปผ่านการกรองและใช้ตลอดการศึกษการปรับสภาพ “หัวเชื่อน้ำส้ม WK”



ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณเซลล์ยีสต์ ปริมาณน้ำตาล (invert sugar) ค่า pH และค่า acidity ในระหว่างการหมักไวน์ข้าวโพดด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ที่อุณหภูมิห้อง (30-32°C)

การออกแบบระบบการให้แอลกอฮอล์เพื่อสนับสนุนระบบ Repeated fed batch fermentation ในถังหมักต้นแบบ “กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ” ขนาด 50 ลิตร

เนื่องด้วยในการศึกษานี้มุ่งเน้นเรื่องการปรับสภาพ “หัวเชื่อน้ำส้ม WK” ให้สามารถทนและสร้างกรดได้ที่ระดับ 8-10% โดยอาศัยเทคนิคด้าน Fed-batch กล่าวคือ อาศัยการให้สารอาหารที่จำเป็นเป็นช่วง ๆ ซึ่งในที่นี้สารอาหารที่จำเป็นต่อการสร้างกรด คือ แอลกอฮอล์ ดังนั้นในการศึกษาจึงจำเป็นต้องทำการออกแบบระบบการให้แอลกอฮอล์เข้าไปในถังหมักต้นแบบของระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (mash-air mixing system; “MAMS”) ขนาด 50 ลิตร ทั้งนี้ระบบของการให้แอลกอฮอล์เข้าสู่หัวหมักแสดงในภาพที่ 2ก ซึ่งประกอบด้วยระบบปั๊มแอลกอฮอล์และควบคุมอัตราการไหล จากนั้นจึงทำการติดตั้งระบบดังกล่าวเข้าไปในถังหมักต้นแบบ “MAMS” (ภาพที่ 2ข และ 2ค) โดยมีท่อนำแอลกอฮอล์เข้าสู่ด้านล่างของถังหมักต้นแบบ “MAMS” อนึ่งระบบปั๊มและระบบควบคุมอัตราการไหลที่ติดตั้งกับถังหมัก “MAMS” เพื่อให้สามารถควบคุมความเข้มข้นของกรดอะซิติกในระหว่างน้ำหมักให้แน่นอน เนื่องจากกรดอะซิติกเกิดจากการเปลี่ยนแอลกอฮอล์ในน้ำหมักภายใต้สภาพที่มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ ดังนั้นการควบคุมระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์จะส่งผลโดยตรงต่อความเข้มข้นของกรดอะซิติก (Arnold *et al.*, 2002)



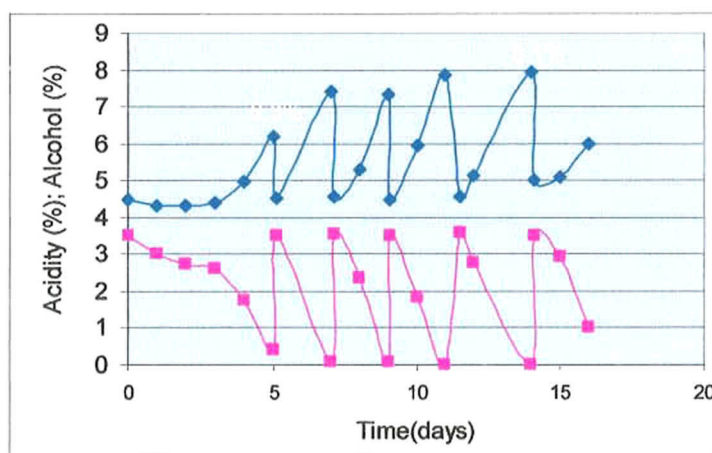
ภาพที่ 2 การติดตั้งระบบปั๊มแอลกอฮอล์และควบคุมการไหลเข้าสู่ถังหมักต้นแบบของระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (mash-air mixing system; “MAMS”) ขนาด 50 ลิตร : (ก) ระบบปั๊มแอลกอฮอล์และควบคุมการไหลเข้า; (ข) ถังหมัก “MAMS” ที่ติดตั้งระบบปั๊มแอลกอฮอล์และควบคุมการไหลเข้า; (ค) ท่อนำแอลกอฮอล์เข้าสู่ด้านล่างของถังหมัก “MAMS”

ผลการคัดเลือกเซลล์ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” เพื่อใช้ในการปรับสภาพด้วยการควบคุมความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration) เท่ากับ 8.0

เนื่องด้วยเป้าหมายหลักต้องการปรับสภาพ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ให้สามารถทนและสร้างกรดได้ในช่วง 8-10% ดังนั้นจึงจำเป็นต้องได้ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” เบื้องต้นที่สามารถที่จะทนและสร้างกรดที่ 8% ให้ได้ก่อน อนึ่งตามปกติแล้วสภาพที่จะทำให้ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” สามารถทนและสร้างกรดได้ 8% ต้องมาจากสภาพที่ใช้เลี้ยง “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” นั้นจะต้องอยู่ในสภาพที่มีปริมาณความเข้มข้นทั้งหมด (total concentration; TC) เท่ากับ 8.0 ก่อน ดังนั้นในการศึกษาในขั้นตอนนี้จึงทำการเตรียมสภาพการหมักโดยการปรับปริมาณความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 8.0 ตามวิธีการที่ระบุใน Krusong *et al.* (2007) ซึ่งประกอบด้วย กรดอะซิติกและแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 4.5% และ 3.5% ตามลำดับ โดยทำการปรับสภาพการหมักด้วยระบบ Semi-continuous processes โดยเลือกใช้การคั่งผลึกภัณฑ์ (น้ำส้มสายชูหรือกรดอะซิติก) ออกจากถังหมัก 40-50% (Krusong *et al.*, 2007; 2010; 2011) เมื่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สุดท้ายในน้ำหมัก (final alcohol value) ลดลงถึง 0.3-0.5% (Arnold *et al.*, 2002; Fregapane *et al.*, 2003; de Ory *et al.*, 2002, 2004; Krusong *et al.*, 2007, 2010, 2011; Ndoye *et al.*, 2007) จึงเติมไวน์ข้าวโพดเข้าไปในถังหมักในปริมาณเดียวกันกับที่นำน้ำส้มสายชูออกจากถังหมัก โดยควบคุมความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 8.0 เช่นเดิม ทำ

การทดลองเช่นนี้จำนวน 5 รอบ (จากเดิมที่ระบุไว้ในแผนการศึกษาเพียง 3 รอบ) ภายหลังจากที่ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ปรับตัวเข้ากับสภาพที่ใช้ในการปรับสภาพเริ่มต้น (สังเกตได้จากปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักลดลงถึง 0.3-0.5%)

จากผลการปรับสภาพ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” (ดังภาพที่ 3) แสดงให้เห็นว่า “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ที่ผ่านการปรับสภาพมาเป็นเวลา 8 ปี สามารถที่จะปรับสภาพที่ TC = 8 ได้อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้สังเกตได้จากที่ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” สามารถปรับตัวได้ในระยะเวลาเพียง 5 วัน เท่านั้น ซึ่งรวดเร็วกว่าที่พบโดยทั่วไปที่หัวเชื้อน้ำส้มสายชู หรือ Acetic acid bacteria ใช้ระยะเวลาประมาณ 7-15 วันในการปรับตัวเข้ากับสภาพน้ำหมักใหม่ ผลการทดลองนี้บ่งชี้เป็นเบื้องต้นได้ว่า “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” สามารถที่ทนต่อสภาพของกรดสูง (high acid stress) อย่างสมบูรณ์ได้ที่ TC = 8 แล้ว นอกจากนี้แล้วเมื่อทำการปรับสภาพให้มีการหมักในรอบที่ 2-5 ถัดไป พบว่า “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” สามารถที่จะสร้างกรดได้สูงขึ้นเรื่อยๆ จาก 6.3% ในรอบที่ 1 เป็น 8.1% ในรอบที่ 5 ดังนั้นจึงทำการปรับสภาพในรอบที่ 6 จากนั้นจึงเก็บ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” เมื่อเริ่มรอบที่ 6 ได้ 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

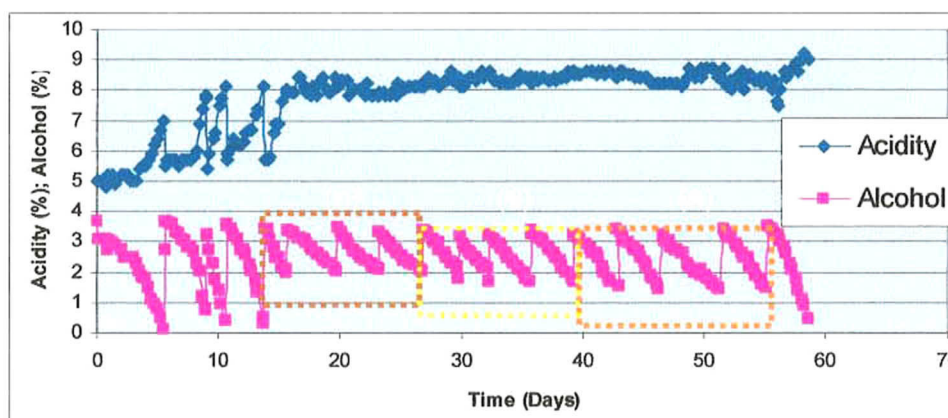


ภาพที่ 3 ผลของการปรับสภาพเพื่อคัดเลือก “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ในถังหมักต้นแบบของระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ ขนาด 50 ลิตร ในสภาพที่ใช้ TC = 8 ที่อุณหภูมิ 30°C

ผลของการปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch

ในการปรับสภาพ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ด้วยเทคนิค Repeated fed batch นั้นอาศัย “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ที่ผ่านขั้นตอนการคัดเลือกที่ผ่านมา ดังนั้นในการปรับสภาพจึงเริ่มต้นที่ TC = 8 เช่นเดิม

เนื่องด้วยวัตถุประสงค์หลักที่มีผลต่อการสร้างกรดของ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” คือ แอลกอฮอล์ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่การใช้แอลกอฮอล์เป็นวัตถุดิบสำหรับควบคุมให้เกิดสภาพการทนกรดที่สูง (Acid stress) โดยอาศัยการควบคุมปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักซึ่งจะเริ่มต้นที่ 3.5% จากนั้นเมื่อปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักลดลงถึง 2% จึงทำการปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำหมักให้กลับมาเท่ากับ 3.5% ทำการหมักต่อไปจนกระทั่งปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักลดลงถึง 2% จึงดำเนินการเช่นเดิม ดำเนินการหมักเช่นนี้ 4 รอบ (จากเดิมที่ระบุไว้ 3 รอบ ในแผนการทดลอง) หลังจากการควบคุมการลดลงของแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง 2.0% จากนั้นจึงเริ่มต้นการควบคุมการลดลงของแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง 1.75% จนถึงขั้นตอนสุดท้ายที่ควบคุมการลดลงของแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง 1.5% ทั้งนี้ทั้งสองสภาพการศึกษาดำเนินการเช่นเดียวกับกรณีแรกทุกประการ สำหรับผลของการปรับสภาพ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch แสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 การปรับสภาพ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ด้วยเทคนิค Repeated fed batch โดยอาศัยการควบคุมการลดลงของแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง : (ก) 2.0%; (ข) 1.75%; (ค) 1.5%

จากภาพที่ 4 พบว่า ในช่วงแรกก่อนที่จะทำการปรับสภาพได้ทำการหมักในสภาพ TC = 8 จำนวน 4 รอบของการหมัก ในรอบแรกของการหมักบ่งชี้ว่า “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ที่คัดเลือกมาสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพการหมักได้อย่างดี สังเกตได้จากระยะเวลาในการลดลงของแอลกอฮอล์จนถึงระดับ 0.3-0.5% เกิดขึ้นเพียง 6 วัน ในขณะที่รอบที่ 2 ถึง 4 สังเกตเห็นการพัฒนาในการผลิตกรดของ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” จาก 7.1% ถึง 8.2% ภายในช่วงวันที่ 6 ถึง 14

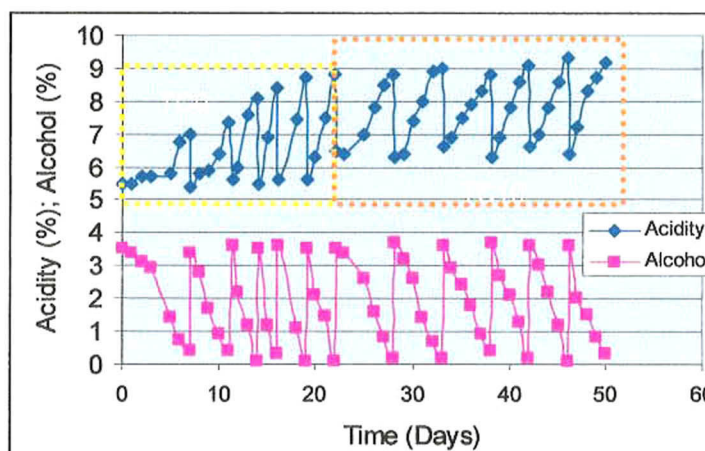
กรณีของการปรับสภาพด้วยการควบคุมการลดลงของแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง 2.0% (ภาพที่ 4ก) ดำเนินการ 4 รอบ โดยรอบแรกใช้เวลา 2 วัน จากนั้นรอบที่ 2-4 ใช้เวลา 3-4 วัน สภาพที่เกิดขึ้นก่อให้เกิดกรดอยู่ระหว่าง 7.8-8.6% และทำให้ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” สามารถทนสภาพกรดดังกล่าวได้ ทั้งนี้สังเกตได้จากปริมาณกรดที่สูงขึ้นเรื่อย ๆ จากนั้นจึงทำการปรับสภาพด้วยการควบคุมการลดลงของปริมาณแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง 1.75% (ภาพที่ 4ข; วันที่ 26 - 40) จำนวน 4 รอบ โดยแต่ละรอบใช้ระยะเวลาเพียง 3-4 วัน กรดที่เกิดขึ้นในช่วงนี้อยู่ในระหว่าง 8.2-8.6 อย่างต่อเนื่อง ในช่วงนี้ช่วยทำให้เกิดสภาพความทนกรดของ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” เพิ่มขึ้น สำหรับช่วงสุดท้ายของการปรับสภาพเริ่มตั้งแต่วันที่ 40 จนถึงวันที่ 55 เป็นช่วงการปรับสภาพด้วยการควบคุมการลดลงของปริมาณแอลกอฮอล์จาก 3.5% ถึง 1.50% (ภาพที่ 4ค) จำนวน 4 รอบ โดยแต่ละรอบใช้ระยะเวลาเพียง 3-5 วัน ในช่วงนี้ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” สามารถทนสภาพกรดสูงระหว่าง 8.2-8.7%

การปรับสภาพในช่วง 55 วัน โดยอาศัยเทคนิค Repeated fed batch พบว่า “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” สามารถทนต่อสภาพกรดสูงได้อย่างต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้สามารถใช้งานได้จริง นอกจากนี้แล้วในช่วงท้ายสุดของการหมัก (วันที่ 55 - 59) “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ที่ผ่านการปรับสภาพสามารถที่จะสร้างกรดได้สูง 9.3% ซึ่งเป็นตรรกะยืนยันว่า “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” สามารถปรับตัวได้อย่างแท้จริง ดังนั้นจึงนำ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ที่ปรับได้นี้ไปผ่านขั้นตอนการผลิตน้ำส้มสายชูต่อไป

ผลของการหมักน้ำส้มสายชูด้วย “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ที่ผ่านการปรับสภาพทนกรด

ในการศึกษาในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะดำเนินการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์ข้าวโพดที่ใช้ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิค Repeated fed batch โดยทำการหมักในถังหมัก “MAMS” ต้นแบบขนาด 50 ลิตร ทั้งนี้สภาพการหมักที่ระบุไว้ในแผนการศึกษาจะใช้สภาพที่มีความเข้มข้นทั้งหมด (TC) เท่ากับ 10 หรือ เขียนโดยย่อว่า “TC = 10” แต่เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาในการปรับสภาพนั้นได้ใช้สภาพที่ TC = 8 ดังนั้นจึงได้ตัดสินใจเลือกดำเนินการหมักเป็น 2 สภาพ กล่าวคือสภาพแรกทำการปรับให้ TC = 9 ก่อน โดยดำเนินการหมักเป็นจำนวน 6 รอบ จากนั้นจึงปรับสภาพเป็น TC = 10 แล้วดำเนินการ

หมักต่ออีกจำนวน 6 รอบ อนึ่งการหมักใช้ระบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous fermentation) โดยอาศัยการดึงน้ำหมัก (discharge) ออกจากถังหมักในอัตรา 50% ตามวิธีการที่ระบุใน Krusong *et al.* (2010) สำหรับผลการศึกษาแสดงอยู่ในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ผลของการหมักน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์ข้าวโพดด้วย “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิค Repeated fed batch ในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (“MAMS”) ที่อุณหภูมิ 30°C โดยปรับสภาพ น้ำหมัก TC = 9 ในช่วงเริ่มต้นถึงวันที่ 22 และ TC = 10 ตั้งแต่วันที่ 22 ถึง 50

ผลของการหมักน้ำส้มสายชูจากจากไวน์ข้าวโพดด้วย “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิค Repeated fed batch ในถังหมัก “MAMS” ที่อุณหภูมิ 30°C (ดังแสดงในภาพที่ 5) แสดงให้เห็นว่า “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนกรด (acid stress) นั้นสามารถทนต่อสภาพกรดที่ TC = 9 ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักนี้ได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้สังเกตได้จากที่ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” สามารถปรับตัวเข้ากับน้ำหมักใหม่ได้ในระยะเวลาเพียง 7 วัน เท่านั้น หลังจากนั้นจะพบว่า “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” สามารถที่จะพัฒนาการสร้างกรดเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในระหว่างรอบการหมักที่ 2-6 โดยอัตราการสร้างกรด (Acidification rate; ETA) เพิ่มขึ้นจาก 0.0074 %/h ถึง 0.0604 %/h ดังแสดงในตารางที่ 1 หลังจากนั้นจึงทำการปรับสภาพน้ำหมักขึ้นเป็น TC = 10 พบว่า ระยะเวลาในการหมักแต่ละรอบเพิ่มขึ้นเป็น 4-5 วัน ต่อรอบ (ดังแสดงในภาพที่ 5 และ ตารางที่ 1) พร้อมกับมีปริมาณกรดที่สร้างขึ้นจาก “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ได้ถึงระดับ 9-9.3% อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงอัตราในการสร้างกรด (ETA) ในสภาพการหมักที่ TC = 10 กลับน้อยกว่าที่ได้รับจากในสภาพการหมักที่ TC = 9 ทั้งนี้เนื่องจากสภาพ TC = 10 เป็นสภาพที่มีความเครียดต่อ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ที่สูงนั่นเอง

ตารางที่ 1 อัตราการสร้างกรด (Acidification rate) ของ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch ในน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าวโพดที่หมักด้วยระบบกึ่งต่อเนื่องในถังหมักระบบผสมอากาศเข้ากับน้ำหมัก (“MAMS”) ที่อุณหภูมิ 30°C จำนวน 12 รอบของการหมัก

รอบการหมัก	TC ในน้ำหมัก	ปริมาณกรด เมื่อการหมักเริ่มต้น (%)	ปริมาณกรด เมื่อการหมักสิ้นสุด (%)	ระยะเวลาในการสร้างกรด (วัน)	Acidification rate ² (%/h)
1 ¹	9	5.5	6.75	7	0.0074
2	9	5.4	7.36	4	0.0204
3	9	5.6	8.1	3	0.0347
5	9	5.6	8.7	3	0.0431
7	10	6.5	8.5	5	0.0167
8	10	6.3	9.0	5	0.0225
9	10	6.6	8.8	5	0.0183
10	10	6.3	9.1	4	0.0292
11	10	6.6	9.3	4	0.0281
12	10	6.4	9.2	4	0.0292

¹ รอบการหมักที่ 1 เป็นระยะเวลาที่ “หัวเชื้อน้ำส้ม WK” ใช้ในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพการหมัก (Lag phase); ² Acidification rate (ETA) คำนวณจากปริมาณกรดที่สร้างขึ้นในรอบการหมักหารด้วยระยะเวลาที่ใช้ในการสร้างกรดในแต่ละรอบการหมัก; อัตราการคั่งน้ำหมัก (Discharging rate) ออกจากน้ำหมักจากถังหมักในระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง เท่ากับ 50%