วิธีการทดลอง

เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30

เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์ข้าวโพดที่ใช้ในการศึกษา คือ เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ซึ่งต่อไปในรายงานจะเรียกว่า "**เชื้อยีสต์ M30**" เป็นเชื้อยีสต์ในกลุ่มเชื้อยีสต์ตกตะกอน (Flocculate yeast) ซึ่งได้รับอนุเคราะห์จาก ดร.จรูญ คำนวนตา อดีตผู้อำนวยการ สกว. ฝ่ายอุตสาหกรรม และ ศ.ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในการเตรียมหัวเชื้อยีสต์ทำโดยการเขี่ย "**เชื้อยีสต์ M30**" ที่เลี้ยงในอาหาร MY agar slant นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ลงในอาหารเหลว MY 100 มล. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm นาน 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักไวน์ต่อไป

แบคทีเรีย *Acetobacter aceti* WK

หัวเชื้อที่ใช้ คือ *A. aceti* WK (ซึ่งต่อไปจะเรียกว่า "**หัวเชื้อน้ำส้ม WK**") เป็นหัวเชื้อน้ำส้มสายชูที่คัดเลือกและปรับปรุง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546-ปัจจุบัน (ประมาณ 8 ปี ในปี พ.ศ. 2554) ที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนึ่ง "**หัวเชื้อน้ำส้ม WK**" ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้ผ่านการพัฒนาปรับปรุงให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกจากไวน์ข้าวโพด (Corn vinegar) แล้วดังรายงานวิจัยของ Krusong *et al.* (2007; 2010; 2011) ดังนั้นจึงสามารถใช้ "**หัวเชื้อน้ำส้ม WK**" ในการศึกษาได้

การผลิตไวน์จากข้าวโพด

ทำการหมักไวน์ข้าวโพดตามวิธีการของ วราวุฒิ ครูส่ง (2545) โดยใช้ข้าวโพด 5% ปรับสภาพความหวานในน้ำหมักเท่ากับ 20% pH เท่ากับ 5.5 และเติมแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05% และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.2% (ดัดแปลงจาก Kumnuanta and Vongsuvanlert, 1982) ทำการฆ่าเชื้อด้วยการต้มเดือดเป็นเวลา 30 นาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปหมักด้วย "**เชื้อยีสต์ M30**" เป็นเวลา 5-7 วัน ที่อุณหภูมิ 30-32°ซ

เมื่อการหมักสิ้นสุดให้นำน้ำไวน์ที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการพาสเจอไรส์ก่อนที่จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักน้ำส้มสายชูต่อไป

การออกแบบระบบการให้แอลกอฮอล์เพื่อสนับสนุนระบบ Repeated fed batch fermentation ในถังหมักต้นแบบ "กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ" ขนาด 50 ลิตร

สืบเนื่องจากหัวหน้าผู้วิจัยและทีมงานของบริษัท แอกโกรนิก้า จำกัด ได้ประดิษฐ์ถังหมักต้นแบบ "**กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ**" ซึ่งได้ยื่นจดสิทธิบัตรในนามของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อวันที่ 13 ตุลาคม พ.ศ. 2551 ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้**ถังหมักต้นแบบของระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (mash-air mixing system)** หรือเรียกโดยย่อว่า "MAMS" ขนาด 50 ลิตร ซึ่งเป็นถังสแตนเลสลักษณะ Double jacket โดยควบคุมอุณหภูมิการหมักให้เท่ากับ 30±1°ซ ด้วยระบบหล่อเย็น อนึ่งระบบการหมักที่พัฒนาขึ้นสามารถก่อให้เกิดการให้อากาศที่เพียงพอต่อการทำงานของ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK"

ทำการออกแบบระบบการให้สารอาหารที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์เข้าสู่น้ำหมัก จากนั้นจึงทำการติดตั้งระบบดังกล่าวเข้าไปในถังหมัก "MAMS" ต้นแบบขนาด 50 ลิตร ซึ่งประกอบด้วยระบบปั๊มและระบบควบคุมอัตราการไหล ทั้งนี้เพื่อให้สามารถควบคุมความเข้มข้นของกรดอะซิติกในระหว่างน้ำหมักได้อย่างแน่นอน

การคัดเลือกเซลล์ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" เพื่อใช้ในการปรับสภาพด้วยการควบคุมความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration) เท่ากับ 8.0

ทำการเตรียมสภาพการหมักโดยการปรับปริมาณความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 8.0 ตามวิธีการที่ระบุใน Krusong *et al.* (2007) ซึ่งประกอบด้วย กรดอะซิติกและแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 4.5% และ 3.5% ตามลำดับ การเลือกใช้ระดับความเข้มข้นนี้เพื่อให้ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ได้รับสภาพที่เตรียมตั้งแต่เริ่มต้น อนึ่งไวน์ที่ใช้ในการศึกษา คือ ไวน์ข้าวโพด และ "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ได้ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นที่เหมาะสมต่อไวน์ข้าวโพดมาแล้ว สำหรับปริมาตรน้ำหมักที่ใช้ในถังหมัก เท่ากับ 30-35 ลิตร

ทำการปรับสภาพการหมักด้วยระบบ Semi-continuous processes โดยเลือกใช้การดึงผลิตภัณฑ์ (น้ำส้มสายชู) ออกจากถังหมัก 40-50% (ตาม 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 ทำการทดลองเช่นนี้จำนวน 3 รอบ ทำการเก็บ "**หัวเชื้อน้ำส้ม WK**" เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไปในรอบสุดท้าย อนึ่งในการควบคุมปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักเท่ากับ 0.3-0.5% นั้นเพื่อก่อให้เกิดผลของกรดอะซิติกที่มีต่อ "**หัวเชื้อน้ำส้ม WK**" เพียงอย่างเดียว

ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณกรดอะซิติกตลอดการศึกษา

การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* WK ด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch

ทำการเตรียมสภาพการหมักโดยการปรับปริมาณความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 8.0 ตามวิธีการที่ระบุใน Krusong *et al.* (2007; 2010; 2011) และเริ่มต้นการหมักด้วย "**หัวเชื้อน้ำส้ม WK**"

เมื่อปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักถึง 2% จึงทำการปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำหมักให้กลับมาเท่ากับ 3.5% จากนั้นทำการหมักจนกระทั่งปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักลดลงถึง 2% จึงดำเนินการเช่นเดิม ดำเนินการหมักเช่นนี้ 3 รอบ

จากนั้นจึงเริ่มต้นการหมักใหม่ ทำการหมักจน**ปริมาณแอลกอฮอล์ลดลง 1.75%** จึงทำการปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำหมักให้กลับมาเท่ากับ 3.5% จากนั้นทำการหมักจนกระทั่งปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักลดลงถึง 1.75% จึงดำเนินการเช่นเดิม ดำเนินการหมักเช่นนี้ 3 รอบ

ขั้นตอนสุดท้ายด้วยทำการหมักจน**ปริมาณแอลกอฮอล์ลดลง 1.50%** จึงทำการปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำหมักให้กลับมาเท่ากับ 3.5% จากนั้นทำการหมักจนกระทั่งปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำหมักลดลงถึง 1.50% จากนั้นจึงทำการเก็บหัวเชื้อเพื่อใช้ในการหมักต่อไป

ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณกรดอะซิติก ตลอดการศึกษา

ผลของการหมักน้ำส้มสายชูด้วย "หัวเชื้อน้ำส้ม WK" ที่ผ่านการปรับสภาพทนกรด

ทำการเตรียมสภาพการหมักโดยการปรับปริมาณความเข้มข้นทั้งหมดเท่ากับ 10.0 ตามวิธีการที่ระบุใน Krusong *et al.* (2007; 2010; 2011) เนื่องจากต้องการทดสอบประสิทธิภาพของ "**หัวเชื้อน้ำส้ม WK**" ที่ผ่านการปรับสภาพให้สามารถทนกรดอะซิติกได้ 8-10% โดยปรับความเข้มข้นของกรดอะซิติกและแอลกอฮอล์เท่ากับ 4.5% และ 5.5% ตามลำดับ ทำการหมักด้วยระบบ Semi-continuous fermentation ในถังหมัก "**MAMS**" ต้นแบบขนาด 50 ลิตร ทำการหมักจำนวน 3 รอบ โดยทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณกรดอะซิติก ตลอดการศึกษา

สถานที่การทดลอง / เก็บข้อมูล

ทำการศึกษาที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก (D312- 313) อาคารเจ้าคุณทหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง