# รายงานผลการวิจัย
# มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

## การผลิตน้ำส้มสายชูจากสาโท
## VINEGAR PRODUCTION FROM RICE WINE(SATO)

โดย

จุฑามาศ มณีวงศ์

2551

# รายงานผลการวิจัย
# มหาวิทยาลัยแม่โจ้

**เรื่อง** การผลิตน้ำส้มสายชูจากสาโท

VINEGAR PRODUCTION FROM RICE WINE(SATO)

**ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย** ประจำปี 2550

จำนวน 260,000 บาท

**หัวหน้าโครงการ** นางสาวจุฑามาศ มณีวงศ์

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

10 กันยายน 2551

# การผลิตน้ำส้มสายชูจากสาโท

# VINEGAR PRODUCTION FROM RICE WINE(SATO)

**นางสาวจุฑามาศ มณีวงศ์**

MISS CHUTAMAS MANEEWONG

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

## บทคัดย่อ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของอะซิติกแอซิตแบคทีเรีย จากการคัดเลือกพบว่า OR2 ผลิตกรดได้สูงสุด เมื่อจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางพันธุศาสตร์พบว่าเป็นแบคทีเรีย *Acetobacter tropicalis* จากการศึกษาคุณสมบัติบางประการพบว่า *A. tropicalis* เจริญได้ใน แอลกอฮอล์ 5% และกรด 1% นอกจากนี้ยังทนต่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ได้ถึง 14% และทนต่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกได้ถึง 15% เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของ *A. tropicalis* พบว่า เมื่อเลี้ยงในสาโทที่ประกอบด้วยแอลกอฮอล์ 8% กรดอะซิติก 3% และเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส ผลิตกรดได้ 2.71% ในวันที่ 3 ของการเลี้ยง ในขณะที่เลี้ยง *A. tropicalis* ในสาโทกลั่น ซึ่งประกอบด้วย แอลกอฮอล์ 3% กรดอะซิติก 3% และให้อากาศที่มีความเข้มข้นของออกซิเจน 7.7 mg/l ผลิตกรดได้ 3.69% ในวันที่ 3 ของการเลี้ยง

## Abstract

Acetic acid bacteria is the main microorganism for vinegar production. OR2 was the high acid production strain from screening and this strain was indentified as *Acetobacter tropicalis* by morphology and phylogenetic. *A. tropicalis* characteristics were determined, This strain grew in 5% alcohol and 1% acetic acid while alcohol tolerance reached to 14 % and acid tolerance reached to 15%. Acid production of *A. tropicalis* from rice wine(sa-to) was optimized. Rice wine composted 8% alcohol, 3% acetic acid and aerated with 140 rpm shaking flask at 30$^{o}$C produced 2.71% acid in day 3 of cultivation. Whereas, cultivation *A. tropicalis* in distilled-rice wine consisted 3% alcohol, 3% acetic acid and aerated with 7.7 mg/l oxygen produced 3.69% acid in day 3 of cultivation.

# สารบัญเรื่อง


| | หน้า |
|---|---|
| บทนำ | 1 |
| ตรวจเอกสาร | 2 |
| อุปกรณ์และวิธีการทดลอง | 7 |
| ผลการทดลองและวิจารณ์ | 14 |
| สรุปผลการทดลอง | 32 |
| เอกสารอ้างอิง | 34 |

# สารบัญตาราง


| | หน้า |
|---|---|
| ตารางที่ 1 แสดงถึงแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตกรดน้ำส้มสายชูที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู | 4 |
| ตารางที่ 2 การคัดแยกเชื้อที่ผลิตกรดจากแหล่งที่มาต่างๆ | 14 |
| ตารางที่ 3 การทดสอบเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต | 14 |

# สารบัญภาพ

หน้า


รูปที่ 1 แสดงถึงอิทธิพลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของของเอทานอลและกรดอะซิติก ที่มีผลต่อการยับยั้งต่อการเจริญของแบคทีเรีย 6

รูปที่ 2 แสดงปริมาณการผลิตกรดของเชื้อแต่ละไอโซเลตของ OR เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน 16

รูปที่ 3 แสดงสัณฐานวิทยาของเชื้อ และการเกิดวงใสของเชื้อที่คัดแยกได้จากส้ม OR ในแต่ละไอโซเลต 17

รูปที่ 4 ลำดับเบสของไอโซเลต OR2 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับ *Acetobacter tropicalis* 18

รูปที่ 5 ผลของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่อการผลิตกรด และปริมาณเซลล์ของ*A. tropicalis* 20

รูปที่ 6 ผลของความเข้มข้นของกรดอะซิติกในสาโทต่อการผลิตกรด และปริมาณเซลล์ของ *A. tropicalis* 22

รูปที่ 7 ผลของการให้อากาศแบบเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆต่อการผลิตกรด และปริมาณเซลล์ของ *A. tropicalis* 24

รูปที่ 8 ผลการผลิตกรดที่เพิ่มขึ้น และปริมาณเซลล์ของ *A. tropicalis* เมื่อเลี้ยง ในสาโทกลั่นที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่างๆ 27

รูปที่ 9 ผลการผลิตกรดที่เพิ่มขึ้น และปริมาณเซลล์ของ *A. tropicalis* เมื่อเลี้ยง ในสาโทกลั่นที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกแตกต่างกัน 29

รูปที่10 ผลการผลิตกรดที่เพิ่มขึ้น และปริมาณเซลล์ *A. tropicalis* เมื่อให้อากาศ ที่ความเข้มข้นของปริมาณออกซิเจนในสาโทกลั่นแตกต่างกัน 31

# บทนำ

น้ำส้มสายชูเป็นผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากการหมักเอทานอลโดยใช้จุลินทรีย์ในกลุ่ม acetic acid bacteria ซึ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถออกซิไดซ์เอทานอลให้เปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติก วัตถุดิบที่นิยมนำมาผลิตน้ำส้มสายชูโดยส่วนใหญ่จะเป็นเอทานอลที่ได้จากการหมัก ผลไม้ รวม

น้ำส้มสายชู (vinegar) จัดเป็นเครื่องปรุงรสอาหารที่เรารู้จักกันมานาน และใช้กันอย่างแพร่หลายในชีวิตประจำวันของครอบครัวไทย โดยนำมาประกอบอาหารที่ต้องการรสเปรี้ยว หรือใช้หมักดองถนอมอาหาร น้ำส้มสายชูที่บริโภคกันทั่วไปในครัวเรือนเป็นน้ำส้มสายชูกลั่น ซึ่งมีปริมาณกรดน้ำส้มอยู่ ร้อยละ 4-7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นอกจากนี้ยังมีน้ำส้มสายชูหมักซึ่งเป็นน้ำส้มสายชูที่หมักจากวัตถุดิบธรรมชาติโดยเฉพาะจากผลไม้ และธัญญาพืชต่างๆ โดยนำมาทำการหมักให้กลายเป็นแอลกอฮอล์ก่อน จากนั้นจึงหมักกับจุลินทรีย์ในกลุ่ม acetic acid bacteria จนได้กรด

ในการศึกษาการหมักน้ำส้มสายชูหมักในครั้งนี้ ได้ทำการคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตกรดน้ำส้ม(acetic acid) จากธรรมชาติ และ ทำการผลิตน้ำส้มสายชูจากสาโทโดยการให้อากาศแบบเขย่า และการผลิตน้ำส้มสายชูจากสุรากลั่นโดยการให้อากาศแบบพ่น เพื่อหาสภาวะในการผลิตกรดของเชื้อที่คัดแยกได้ เพื่อที่จะนำไปปรับใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักต่อไป

# ตรวจเอกสาร

## น้ำส้มสายชู

น้ำส้มสายชูมาจากภาษาฝรั่งเศสว่า Vinaigre แปลว่า ไวน์ที่มีรสเปรี้ยวมาก (Vin = Wine aigre = รสเปรี้ยว ) ดังนั้นน้ำส้มสายชู จึงมีความหมายว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำให้เกิดกรดน้ำส้ม (Acetification) ของวัตถุดิบพวกน้ำตาลหรือแป้งที่ผ่านกระบวนการหมักแอลกอฮอล์มาแล้ว (วราวุฒิ, 2538)

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูนั้นมีหลายอย่างเช่น การผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ การผลิตน้ำส้มสายชูจากผลไม้ต่างๆ การผลิตน้ำส้มสายชูจากข้าวมอลต์ การผลิตน้ำส้มสายชูจากแอลกอฮอล์ (Lipp *et al*., 1998) การผลิตน้ำส้มสายชูจากมันเทศ การผลิตน้ำส้มสายชูจากข้าว-โชซุ (Ye *et al*., 2004)

ซึ่งตามมาตรฐานของสำนักงานอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ได้แบ่งชนิดของน้ำส้มสายชูออกเป็นชนิดต่างๆดังนี้

Cider vinegar และ Apple vinegar เป็นน้ำส้มสายชูหมักที่ได้จากแอปเปิ้ลเป็นวัตถุดิบและมีกรดน้ำส้ม ไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส

Wine vinegar และ Grape vinegar เป็นน้ำส้มสายชู ได้จากองุ่นเป็นวัตถุดิบมีกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส

Malt vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากข้าวมอลท์หรือข้าวอื่นๆที่ถูกย่อยโดยข้าวมอลต์เป็นวัตถุดิบและมีกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส

Sugar vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากน้ำตาล กากน้ำตาล มีกรดน้ำส้มสายชูไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส

Glucose vinegar คือน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักสารละลายกลูโคสมีกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส

Spirit vinegar distilled vinegar และ Grain vinegar คือน้ำส้มสายชูที่ได้จากแอลกอฮอล์กลั่นและมีกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส (วราวุฒิ, 2538)

สำหรับประเทศไทยได้มีมาตรฐานของน้ำส้มสายชูกำหนดโดยกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 204) พ.ศ.2543 เรื่อง น้ำส้มสายชู ไว้ดังนี้คือ

ข้อที่ 1 น้ำส้มสายชูแบ่งออกเป็น

1. น้ำส้มสายชูหมักได้แก่ผลิตผลที่ได้จากธัญพืช ผลไม้ หรือน้ำตาล แล้วหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีธรรมชาติ

2. น้ำส้มสายชูกลั่น ได้แก่การทำสุราขาวเจือจาง หรือแอลกอฮอล์เจือจาง หมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีธรรมชาติ หรือได้มาจากการกลั่นน้ำส้มสายชูหมักหรือน้ำส้มสายชูกลั่น

3. น้ำส้มสายชูเทียม ได้แก่การเอากรดอะซิติกมาเจือจางกับน้ำ

ข้อที่ 2 สำหรับคุณภาพและมาตรฐานของน้ำส้มสายชูหมักและน้ำส้มสายชูกลั่นมีดังนี้คือ

1. ต้องมีกรดอะซิติกไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ100 มิลลิลิตร

2. ต้องไม่มีกรดน้ำส้ม (Acetic acid) ที่ไม่ได้มาจากการผลิตน้ำส้มสายชูหมักหรือน้ำส้มสายชูกลั่นตามกรรมวิธีธรรมชาติ

3. ต้องไม่มีการเจือจางกรดซัลฟูริก หรือกรดแร่อิสระอย่างอื่น

4. ต้องไม่มีตะกอนเว้นไว้แต่ตะกอนอันเกิดขึ้นตามธรรมชาติจากกรรมวิธีที่ผลิต

5. ต้องไม่มีหนอนน้ำส้ม (Vinegar eel)

ข้อ 3 การแต่งสีน้ำส้มสายชูหมักหรือน้ำส้มสายชูกลั่น ให้ใช้สีน้ำตาลไหม้(Caramel)

ข้อ 4 สำหรับน้ำส้มสายชูเทียมต้องมีคุณภาพและมาตรฐานดังนี้

1. ต้องมีกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4 กรัมและไม่เกิน 7 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

2. ต้องไม่มีกรดซัลฟูริกหรือกรดแร่อิสระอย่างอื่น

3. ต้องไม่มีตะกอน

4. ไม่มีการเจือจางสีชนิดใดๆ

ข้อ 5 น้ำส้มสายชูหมัก น้ำส้มสายชูกลั่นและน้ำส้มสายชูเทียมที่ผลิตและจำหน่ายต้องมีฉลากและในการแสดงฉลากนั้น อย่างน้อยต้องมีข้อความเป็นอักษรหรือภาษาไทยเห็นได้ชัดเจน (ประเภทของน้ำส้มสายชู, 2550: ออนไลน์)

**เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชู**

เชื้อที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของ *Acetobacter* sp. และ *Gluconobacter* sp. ซึ่งจะสามารถออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดอะซิติกได้โดยภายใต้สภาวะที่มีอากาศ(วราวุฒิ, 2538) ดังจะเห็นได้จากตารางที่1

**ตารางที่** 1 แสดงถึงแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตกรดน้ำส้มสายชูที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู

| **แบคทีเรีย** | **ที่มา** |
|---|---|
| *Acetobacter aceti* | Ory *et al*., 2004 |
| *Acetobacter rancens* | Nanba *et al*., 1985 |
| *Acetobacter europaeus* **,** *Acetobacter xylinum* *Acetobacter diazotrophicus* , *Acetobacter hansenii* *Acetobacter liquefaciens* | Sokollek *et al.,* 1998 |
| *Acetobacter pasteurianus* , *Acetobacter peroxydans* | วราวุฒิ, 2538 |
| *Gluconobacter* sp. | สุมณฑา, 2545 |

**ขั้นตอนการหมักน้ำส้มสายชู**

การหมักน้ำส้มสายชูเป็นกรรมวิธีการหมัก 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนแรกเป็นการหมักน้ำตาลให้กลายเป็นเอทธิลแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยการทำงานของยีสต์

ขั้นที่สอง คือการออกซิไดซ์พวกแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดน้ำส้ม โดยการทำงานของพวกแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้ม ปฏิกิริยาทางด้านเคมีเขียนได้ดังนี้ (Solieri and Giudici., 2007)

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{ยีสต์}} 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

น้ำตาล ยีสต์ เอทธิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์

$$C_2H_5OH \xrightarrow{\text{แบคทีเรีย (Acetobacter)}} CH_3COOH + H_2O$$

เอทธิลแอลกอฮอล์ แบคทีเรีย (*Acetobacter*) กรดน้ำส้มสายชู น้ำ

ส่วนการหมักน้ำส้มสายชูนั้นก็จะมีการหมักหลายแบบเช่น การหมักแบบครั้งเดียว เป็นการหมักที่จะไม่มีการเติมอาหารหรือวัตถุดิบและจะทำการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก (Arnold *et al*., 2002 และ Horiuchi *et al*., 1999) การหมัก

แบบต่อเนื่องเป็นการหมักที่มีการเติมอาหารหรือวัตถุดิบระหว่างกระบวนการหมักและมีการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ไปพร้อมๆกับการเติมอาหารใหม่โดยที่จะมีอัตราการเก็บเกี่ยวเท่ากับอัตราการเติมอาหารใหม่ลงไป (Fregapane *et al.*, 2003) แต่ส่วนใหญ่จะนิยมใช้การหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง เนื่องจากการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง จะเป็นการหมักที่เลี้ยงโดยมีการเติมอาหารหรือวัตถุดิบระหว่างกระบวนการหมัก เพื่อปรับความเข้มข้นของอาหารที่ใช้เลี้ยงให้คงที่และมีสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก และจะมีการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ซึ่งการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเป็นการประยุกต์การหมักแบบครั้งเดียวกับการหมักแบบต่อเนื่องเข้าด้วยกัน โดยการหมักน้ำส้มสายชูนั้นจะต้องคำนึงถึงวัตถุดิบตั้งต้น ที่ใช้ว่ามีความเข้มข้นของเอทานอลและความเข้มข้นของกรดอะซิติกนั้นเหมาะสมหรือไม่ ซึ่งโดยปกติแล้วเนื่องจากความเข้มข้นของเอทานอลและกรดอะซิติกที่สูงจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียซึ่งความเหมาะสมของความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้จะอยู่ในช่วงระหว่าง 13 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกรดอะซิติกจะอยู่ในช่วงระหว่าง 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งในการหมักน้ำส้มสายชูเป็นปฏิกิริยา ที่ต้องการออกซิเจน เนื่องจากแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติกจะทำการออกซิไดซ์เอทานอลเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกในสภาวะที่มีอากาศ ซึ่งโดยปกติแล้วอัตราการไหลของอากาศจะใช้ที่ 0.2 vvm หรืออัตราการไหลของอากาศ 150 ลิตรต่อนาที โดยมีความเข้มข้นของออกซิเจนอยู่ที่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมกับแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูจะอยู่ในช่วง 30-31 องศาเซลเซียส ส่วนการเก็บผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูนั้นจะเก็บในช่วงที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกอยู่ ที่ 70-80 กรัมต่อลิตร และ ความเข้มข้นของเอทานอลไม่เกิน 8 กรัมต่อลิตร (Ory *et al.*, 2002 ; 2004)

**สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชู**

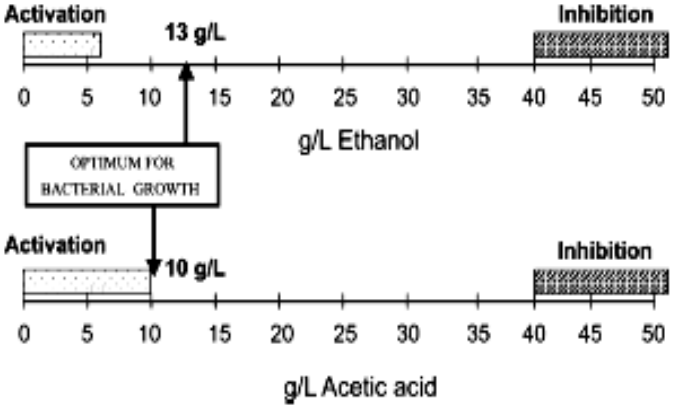
อิทธิพลความเข้มข้นของเอทานอลโดยส่วนใหญ่แล้วความเข้มข้นของเอทานอลจะอยู่ในช่วงร้อยละ 8-12 (วราวุฒิ, 2538) ซึ่งจากการศึกษาอัตราการเจริญของแบคทีเรียพบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลอยู่ในช่วง 0.5 และ 6 กรัมต่อลิตร จะมีอัตราการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นจาก 0.13 ไปเป็น 0.21 ต่อชั่วโมง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไปเป็น 30 กรัมต่อลิตร ก็ยังมีส่วนที่เหลือเจริญต่อไปแต่เมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 40 กรัมต่อลิตร จะยับยั้งการเจริญและอัตราการเจริญลดลง และถ้าเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลเป็น 120 กรัมต่อลิตร จะไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

อิทธิพลความเข้มข้นของกรดอะซิติก กรดอะซิติกมีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมหรืออัตราการเจริญของเชื้อ *Acetobacter aceti* ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ10-14(สุมณฑา, 2545) ซึ่งจะสังเกตได้จากความเข้มข้นกรดอะซิติกที่ผลิตได้นั้นมักจะมีความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 10

กรัมต่อลิตร และจากการศึกษาเมื่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่อยู่ในอาหารเป็น 20 กรัมต่อลิตร จะมีผลในการยับยั้ง และเมื่อมีความเข้มข้นเป็น 40 กรัมต่อลิตร จะขัดขวางการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และถ้าเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซิติกเป็น 60 กรัมต่อลิตร จะยับยั้งการเจริญถึงร้อยละ 70

อิทธิพลของการให้อากาศในการหมักนั้นจะมีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้น ซึ่งจะส่งผลทำให้มีอัตราการผลิตกรดเพิ่มขึ้นด้วยแต่ถ้าให้อากาศมากเกินไปก็จะมีผลไปยับยั้งกิจกรรมและมีผลกระทบต่อการผลิตกรดได้เช่นกันดังนั้นจึงต้องให้อากาศในปริมาณที่เหมาะสม

จากรูปที่ 1 จึงสรุปได้ว่าอัตราการเจริญของเชื้อ *Acetobacter aceti* ที่เหมาะสมต่อความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารที่ใช้ในการหมักอยู่ที่ประมาณ 13 กรัมต่อลิตรส่วนอัตราการเจริญของแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* ที่เหมาะสมต่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกในอาหารอยู่ที่ประมาณ 10 กรัมต่อลิตร (Ory *et al*., 2002)




**รูปที่** 1 แสดงถึงอิทธิพลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของของเอทานอลและกรดอะซิติกที่มีผลต่อการยับยั้งต่อการเจริญของแบคทีเรีย

ที่มา: (Ory *et al*., 2002)

**ประโยชน์ของน้ำส้มสายชู**

ใช้ในการปรุงรสอาหาร เพื่อเพิ่มรสชาติ แต่ปัจจุบันนี้ นิยมนำน้ำส้มสายชูหมักมาชงเป็นเครื่องดื่มสำหรับบริโภค โดยผสมน้ำผึ้งและน้ำอุ่น เนื่องด้วยน้ำส้มสายชูหมักมีประโยชน์ต่อสุขภาพช่วยให้ระบบต่างๆ ในร่างกายดีขึ้น แล้วยังช่วยให้กระปรี้กระเปร่า ทำให้ระบบย่อยอาหารดี ทำลายเชื้อแบคทีเรีย รา ไวรัส ในร่างกาย ลดความดันโลหิต ช่วยขจัดเสมหะและน้ำมูก ลดการสะสมไขมันในร่างกาย เช่น ในหลอดเลือด และส่วนต่างๆ ของร่างกาย (ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง, ประโยชน์ของน้ำส้มสายชู, 2550: ออนไลน์)

# อุปกรณ์และวิธีการ

## อุปกรณ์

### วัตถุดิบ

สาโท

### เครื่องมือ

1) เครื่องชั่งดิจิตอล 4 ตำแหน่ง
2) ตู้เขี่ยเชื้อ (lamina air flow cabinet)
3) เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator)
4) เครื่องเขย่า (shaker)
5) ตู้เย็น
6) เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (orbital shaker)
7) หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
8) ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
9) ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส
10) อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
11) เครื่องดูดจ่ายสารอัตโนมัติ
12) บิวเรต
13) กล้องจุลทรรศน์
14) ตะเกียงแอลกอฮอล์
15) ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
16) คิวเวต (cuvette)
17) ปั๊มลม
18) เครื่องแก้วชนิดต่างๆ

### สารเคมี

1) sodium hydroxide (NaOH)
2) sodium hydrogen phosphate
3) glucose
4) agar
5) yeast extract

6) calcium carbonate ($CaCO_3$)

7) acetic acid

8) ethanol 95%

9) phenolphthalein

10) crystal violet

11) iodine

12) safranin

13) alcohol

14) glycerol

**วิธีการทดลอง**

1. **การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อ**

เก็บตัวอย่างผลไม้ เกสรดอกไม้ และน้ำผึ้งมาทำการเจือจางในน้ำกลั่นที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตรไปทำการ spread plate ลงไปบนอาหารแข็งสำหรับแยกเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1-2 วันแล้วทำการแยกโคโลนีเดี่ยวเพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2. **การคัดแยกเชื้อที่ผลิตกรด**

การคัดแยกเชื้อที่ผลิตกรดเบื้องต้นในอาหารแข็งโดยนำเชื้อที่ได้จากการคัดแยกในข้อ 1 มาทดสอบลงบนอาหารสำหรับทดสอบการผลิตกรดโดยนำเชื้อที่ได้มาทำการ Steak ลงบนอาหารสำหรับทดสอบการผลิตกรด (ดังแสดงในภาคผนวก ก) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1-2 วัน เพื่อตรวจสอบว่าถ้าเชื้อเกิดการผลิตกรดก็จะทำให้เห็นวงใส

การคัดแยกเชื้อที่ผลิตกรดโดยใช้อาหารเหลว (เลี้ยงในหลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) นำเชื้อที่ได้จากการคัดแยกในข้อ 1 มาทดสอบลงบนอาหารสำหรับทดสอบการผลิตกรดโดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อถ่ายเชื้อลงในอาหารสำหรับทดสอบ (ดังแสดงในภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นวิเคราะห์การผลิตกรด

3. **การเก็บรักษาเชื้อ**

นำเชื้อที่ได้จากการคัดแยกใน ข้อ 2 ที่มีการผลิตกรดมาเก็บรักษาใน กลีเซอรอลโดยนำโคโลนีเดี่ยวใส่ลงไปในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ(ดังแสดงในภาคผนวก ก) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน เก็บในกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นร้อยละ 40 จากนั้นเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

4. **การเตรียมกล้าเชื้อ**

นำเชื้อออกมาจากตู้เย็นที่ -80 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ภายใต้อุณหภูมิห้องดูดเชื้อออกมา 1000 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้ออีกครั้งเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อต่อไป

5. **การจัดจำแนกเชื้อ**

ทำการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาโดยนำเชื้อที่ผลิตกรดได้ปริมาณสูงสุดมาทำการย้อมแกรม โดยดูลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำเชื้อที่ได้ไปจัดจำแนกโดยวิธีการทางดีเอ็นเอ(DNA analysis) วิเคราะห์ดูความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสของจุลินทรีย์โดยการนำเชื้อที่ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน มาทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดทดสอบและการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจด้วยเทคนิค polymerase chain reaction จากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์ดูความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสของจุลินทรีย์

6. **การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ**

6.1 **สภาวะการทนแอลกอฮอล์**

เตรียมอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงเชื้อโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในอาหารที่มีแอลกอฮอล์ที่มีการเพิ่มระดับความเข้มข้นเริ่มตั้งแต่ร้อยละ 1 ไปจนถึงระดับความเข้มข้นที่เซลล์ไม่สามารถเจริญได้

6.2 **ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหมาะสม**

เตรียมอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ ปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เริ่มต้นตั้งแต่ร้อยละ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 นำกล้าเชื้อที่เตรียมจากข้อ 4 ใส่กล้าเชื้อร้อยละ 1 ใส่ลงอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่างๆ จากนั้นนำไปเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน วิเคราะห์หาปริมาณกรด

6.3 **สภาวะการทนกรด**

เตรียมอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงเชื้อโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในอาหารที่มีกรดอะซิติกโดยมีการเพิ่มระดับความเข้มข้นเริ่มตั้งแต่ร้อยละ 1 ไปจนถึงระดับความเข้มข้นที่เซลล์ไม่สามารถเจริญได้

**6.4 ปริมาณกรดที่เหมาะสม**

เตรียมอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 6.2 จากนั้นปรับความเข้มข้นของกรดเริ่มต้นตั้งแต่ร้อยละ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ10 ลงไปในแต่ละขวด นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 4 ใส่กล้าเชื้อร้อยละ 1 ใส่ลงไปในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อที่ปรับความเข้มข้นของกรด นำไปเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน วิเคราะห์หาปริมาณกรด

**7. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดเมื่อทำการเลี้ยงโดยการให้อากาศแบบเขย่า**

**7.1 การศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหมาะสม**

เตรียมสาโท ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรขวดละ 150 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เริ่มต้นตั้งแต่ร้อยละ 2,3,4,5,6,7 และ8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำกล้าเชื้อที่เตรียมจากข้อ 4 มาร้อยละ 1 ใส่ลงในสาโทแต่ละขวดที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่างๆ จากนั้นนำไปเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน วิเคราะห์หาปริมาณกรดที่เกิดขึ้น

**7.2 การศึกษาปริมาณกรดที่เหมาะสม**

เตรียมสาโทที่ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 7.1 ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรปริมาตรขวดละ 150 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของกรดเริ่มตั้งแต่ร้อยละ 2,3,4,5,6,7 และ 8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรนำกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 4 มา ร้อยละ 1 ใส่ลงไปในสาโทที่มีกรดอะซิติกความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำไปเลี้ยงแบบเขย่าเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน วิเคราะห์หาปริมาณกรดที่เกิดขึ้น

**7.3 การศึกษาความเร็วรอบในการเลี้ยงที่เหมาะสม**

เตรียมสาโทที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 7.1 และปริมาณกรดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 7.2 นำกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 4 ใส่กล้าเชื้อร้อยละ 1 ลงไปในสาโทที่เตรียมไว้ซึ่งมีปริมาณแอลกอฮอล์และกรดที่เหมาะสมจากนั้นเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ คือ 100,120,140,160,180 และ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน วิเคราะห์หาปริมาณกรดที่เกิดขึ้น

**8. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดเมื่อทำการเลี้ยงโดยการให้อากาศแบบพ่น**

**8.1 การศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหมาะสม**

เตรียมสาโทกลั่น ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรขวดละ 300 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เริ่มต้นตั้งแต่ร้อยละ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 นำกล้าเชื้อที่เตรียมจากข้อ 4 ดูดเชื้อมาร้อยละ 1 ใส่ลงในสาโทกลั่นที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่างๆ จากนั้นเลี้ยงแบบให้อากาศแบบพ่นโดยมีความเข้มข้นของออกซิเจน 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน วิเคราะห์หาปริมาณกรดที่เกิดขึ้น

**8.2 การศึกษาปริมาณกรดที่เหมาะสม**

เตรียมสาโทกลั่นใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตรปริมาตรขวดละ 300 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของกรดเริ่มตั้งแต่ร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ ปรับปริมาตรของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 8.1นำกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 4 ใส่กล้าเชื้อร้อยละ 1 ใส่ลงไปในสาโทกลั่นที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมและความเข้มข้นของกรดที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นเลี้ยงแบบให้อากาศแบบพ่นโดยมีความเข้มข้นของออกซิเจน 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน วิเคราะห์หาปริมาณกรดที่เกิดขึ้น

**8.3 การศึกษาการให้อากาศ**

เตรียมสาโทกลั่นในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ในปริมาตร 300 มิลลิลิตรที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 8.1 และปริมาณกรดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 8.2 นำกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 4 ใส่กล้าเชื้อร้อยละ 1ลงไปในสาโทกลั่นที่เตรียมไว้ซึ่งมีปริมาณแอลกอฮอล์และกรดที่เหมาะสม จากนั้นให้อากาศแบบพ่นโดยมีความเข้มข้นของออกซิเจนที่ 0 , 0.4, 1.60, 3.85 และ 7.70 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน วิเคราะห์หาปริมาณกรดที่เกิดขึ้น

## 9. วิธีวิเคราะห์

### 9.1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรด

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณกรดที่เกิดขึ้น โดยดูดมาตัวอย่างละ 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ทำการไทเตรทด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อหาปริมาตรกรดที่เกิดขึ้น

### 9.2 การนับจำนวนเซลล์

นำตัวอย่างจากน้ำเลี้ยงมานับจำนวนเซลล์โดยใช้ Heamacytometer

# ผลการทดลองและวิจารณ์

## 1. ผลการคัดแยกเชื้อ

ผลจากการคัดแยกเชื้อเบื้องต้นที่ผลิตกรดจากแหล่งที่มาต่างๆได้แก่ ผลไม้ 4 ชนิด คือ ส้ม (OR) สัปปะรด (PA) มังคุด (MT) ฝรั่ง (GU) ดอกไม้ 8 ชนิด คือ คูน , ลาเวนเดอร์, อินทนิน , ดอกมะขาม , ดอกพุด , ดอกเข็ม , คุณนายตื่นสาย ,ดอกมะยม และน้ำผึ้ง จากแหล่งดังกล่าวสามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลต และไอโซเลตที่ให้ปริมาณการผลิตกรดได้สูงที่สุดคือ OR2 ให้ปริมาณกรดคือ 8.4 กรัม ต่อ ลิตร รองลงมาคือไอโซเลต OR3 , OR1 , OR5 , OR6 , OR4 , PA1 , OR7 , GU2 , MT1 , MT2 , GU1 , PA3 , PA2 , GU3 , C3 , C6 , C4 , PA4 , C8 , C5 , C2 , C7 , C1 และไอโซเลตที่ให้ปริมาณการผลิตกรดน้อยที่สุดหรือไม่ผลิตกรดได้แก่ น้ำผึ้ง ทำการศึกษาพบว่าเชื้อที่คัดแยกได้จากส้มให้ปริมาณกรดมากที่สุด แสดงผลดังตารางที่ 2

นำเชื้อที่คัดได้จากส้ม (OR) ทั้งหมด ทำการทดสอบเลี้ยงบนอาหารที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตพบว่าไอโซเลตOR ทั้งหมดมีการผลิตกรดทำให้เกิดวงใสขึ้นเนื่องจากเชื้อมีการผลิตกรดไปทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนตเกิดเป็นวงใส แสดงผลดังตารางที่ 3 และเมื่อทำการทดสอบโดยการนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวและดูปริมาณกรดทำการเป็นเวลา 5 วัน พบว่าในวันที่ 3 ของการหมัก เชื้อไอโซเลต OR2 ผลิตกรดมากที่สุดคือร้อยละ 1.24 น้ำหนักต่อปริมาตร รองลงมาคือ OR7 , OR6 , OR4 , OR1 , OR5 และ OR3 ตามลำดับ แสดงผลดังรูปที่ 2

จากการศึกษาของ (ศุภยางค์, 2547) พบว่ามักพบจุลินทรีย์ในแหล่งที่มีน้ำตาลหรือเอทานอลที่มีความเป็นกรดเล็กน้อย เช่น ดอกไม้ , ผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว , ไวน์ , เบียร์ และน้ำผึ้ง

**ตารางที่ 2** การคัดแยกเชื้อที่ผลิตกรดจากแหล่งที่มาต่างๆ

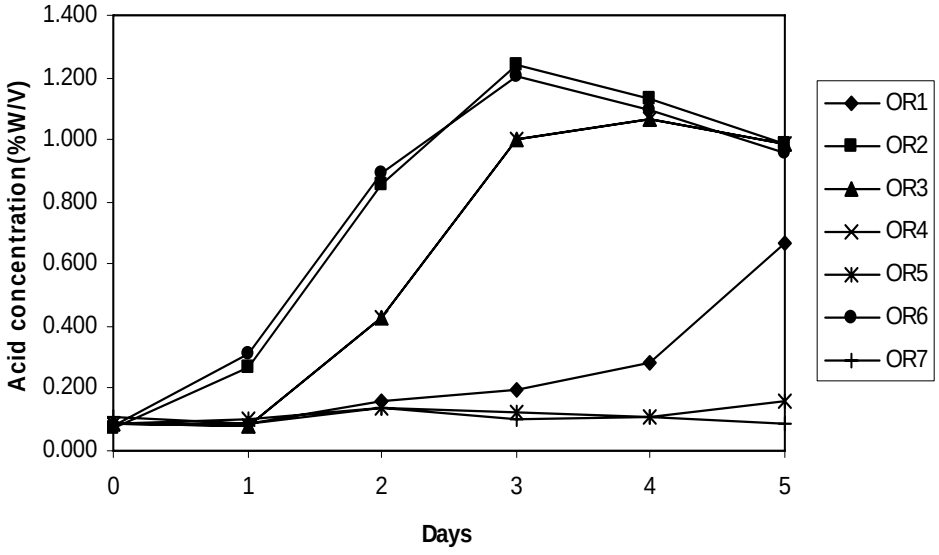
| ไอโซเลต | ลักษณะโคโลนี | ปริมาณกรด(กรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|
| OR2 | สีครีมใส | 8.40 |
| OR3 | สีครีมใส | 7.86 |
| OR1 | สีครีมใส | 6.66 |
| OR5 | สีครีมใส | 6.06 |
| OR6 | สีครีมใส | 5.64 |
| OR4 | สีครีมใส | 3.18 |
| PA1 | สีครีมใส | 3.00 |

**ตารางที่ 2 (ต่อ)** การคัดแยกเชื้อที่ผลิตกรดจากแหล่งที่มาต่างๆ

| ไอโซเลต | ลักษณะโคโลนี | ปริมาณกรด(กรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|
| OR7 | สีครีมใส | 2.82 |
| GU2 | สีขาวขุ่น | 2.58 |
| MT1 | สีขาวขุ่น | 2.34 |
| MT2 | สีขาวขุ่น | 2.16 |
| GU1 | สีขาวขุ่น | 2.10 |
| PA3 | สีครีมใส | 2.04 |
| PA2 | สีครีมใส | 1.44 |
| GU3 | สีขาวขุ่น | 1.32 |
| C3 | สีขาวขุ่น | 1.26 |
| C6 | สีขาวขุ่น | 1.20 |
| C4 | สีขาวขุ่น | 1.14 |
| PA4 | สีครีมใส | 1.08 |
| C8 | สีขาวขุ่น | 1.70 |
| C5 | สีขาวขุ่น | 0.90 |
| C2 | สีขาวขุ่น | 0.84 |
| C7 | สีครีมใส | 0.78 |
| C1 | สีขาวขุ่น | 0.72 |
| NA | ไม่เกิด | ไม่เกิด |

**ตารางที่ 3** การทดสอบเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต

| ไอโซเลท | เกิดวงใส |
|---|---|
| OR1 | เกิด |
| OR2 | เกิด |
| OR3 | เกิด |
| OR4 | เกิด |
| OR5 | เกิด |
| OR6 | เกิด |
| OR7 | ไม่เกิด |




**รูปที่**2 แสดงปริมาณการผลิตกรดของเชื้อแต่ละไอโซเลตของ OR เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

## 2. การจัดจำแนกเชื้อและการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ

### 2.1 การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา

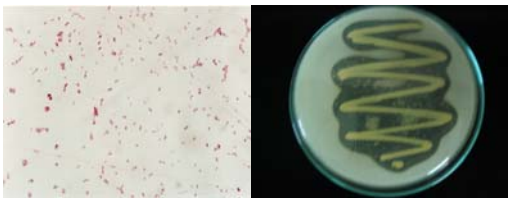
ผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า เชื้อที่ได้ มีลักษณะโคโลนีเป็นสีครีมใส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 1 มิลลิเมตร เมื่อทำการศึกษาโดยการส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เชื้อมีรูปร่าง กลม แกรมลบ และเมื่อนำเชื้อที่คัดเลือกได้ไปเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย $CaCO_3$ เกิดวงใส ดังแสดงรูปที่ 3

### 2.2 การศึกษาการทนแอลกอฮอล์

จากการศึกษาการทนแอลกอฮอล์ของ *A. tropicalis* เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่มีแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1-15 โดยเพิ่มความเข้มข้นของแอลกอฮอล์จาก ร้อยละ 1 ไปจนความเข้มข้นเป็นร้อยละ 15 พบว่า *A. tropicalis* สามารถทนแอลกอฮอล์ได้ถึงร้อยละ 14 และสามารถเจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงในแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5

### 2.3 การศึกษาการทนกรด

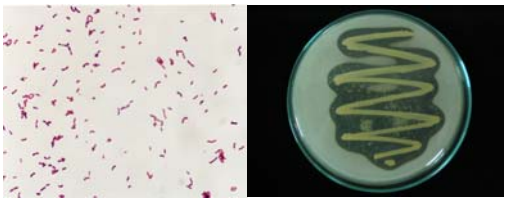
จากการศึกษาการทนกรดของ *A. tropicalis* เมื่อนำไปเลี้ยงในในอาหารที่มีกรดที่ความเข้มข้นร้อยละ 1-16 โดยเพิ่มความเข้มข้นของกรดจากร้อยละ 1 ไปจนความเข้มข้นเป็นร้อยละ 16 พบว่า *A. tropicalis* สามารถทนกรดได้ถึงร้อยละ 15 สามารถเจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงในกรดที่ความเข้มข้นร้อยละ 1



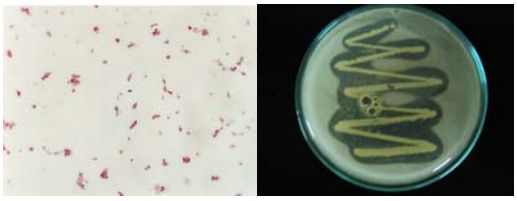
ก.

ข.

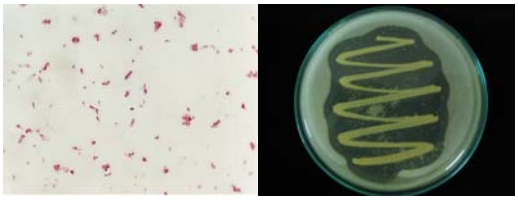
ค.



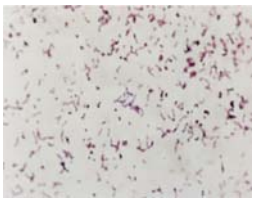
ง.



จ.



ฉ



ช.

**รูปที่** 3 แสดงสัณฐานวิทยาของเชื้อ และการเกิดวงใสของเชื้อที่คัดแยกได้จากส้ม OR ในแต่ละไอโซเลต

ก. เชื้อไอโซเลต OR1 ข. เชื้อไอโซเลต OR2 ค. เชื้อไอโซเลต OR3

ง. เชื้อไอโซเลต OR4 จ. เชื้อไอโซเลต OR5 ฉ. เชื้อไอโซเลต OR6

ช. เชื้อไอโซเลต OR7 ไม่เกิดวงใส

### 2.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

เมื่อนำไอโซเลต OR2 ทำการสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง และหาลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ แล้วนำลำดับเบสดังแสดงในรูปที่ 4 มาทำการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม BLASTP 2.5 (www.ncbi.nlh.gov) พบว่าลำดับเบสตรงกับแบคทีเรีย *Acetobacter tropicalis* ร้อยละ 99

```
Query 1   CATGCAGCA-CTGTGCTGTAGGTCCCTTGCGGG-AATGCCCATCTCTGGACACAGCCTAC   58
Sbjct 976 CATGCAGCACCTGTGCTGTAGGTCCCTTGCGGGAAATGCCCATCTCTGGACACAGCCTAC 917
Query 59  ACATACAAGCCCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGC 118
Sbjct 916 ACATACAAGCCCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGC 857
Query 119 TTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGG 178
Sbjct 856 TTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGG 797
Query 179 TGTGCTTATCGCGTTAGCTACGACACTGAACAACTAAGTTGCCCAACATCCAGCACACAT 238
Sbjct 796 TGTGCTTATCGCGTTAGCTACGACACTGAACAACTAAGTTGCCCAACATCCAGCACACAT 737
Query 239 CGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCT 298
Sbjct 736 CGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCT 677
Query 299 CAGCGTCAGTCATGAGCCAGGTTGCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAATATCTACG 358
Sbjct 676 CAGCGTCAGTCATGAGCCAGGTTGCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTTCCCAATATCTACG 617
Query 359 AATTTCACCTCTACACTGGGAATTCCACAACCCTCTCTCACACTCTAGTCTGCACGTATC 418
Sbjct 616 AATTTCACCTCTACACTGGGAATTCCACAACCCTCTCTCACACTCTAGTCTGCACGTATC 557
Query 419 AAATGCAGCTCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTCACATCTGACTGTACAAACCGCCTACAC 478
Sbjct 556 AAATGCAGCTCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTCACATCTGACTGTACAAACCGCCTACAC 497
Query 479 GCCCTTTACGCCCAGTCATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTG 538
Sbjct 496 GCCCTTTACGCCCAGTCATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTG 437
Query 539 GCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTGCGGGTACCGTCATCATCGTCCCCGCCGAAAGTG 598
Sbjct 436 GCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTGCGGGTACCGTCATCATCGTCCCCGCCGAAAGTG 377
Query 599 CTTTACAATCCGAAAACCTTCTTCACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGGTTGCCCCCAT 658
Sbjct 376 CTTTACAATCCGAAAACCTTCTTCACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGGTTGCCCCCAT 317
Query 659 TGTCCAATACTCCCCACTGCTGCCTCCAGTAG 690
Sbjct 316 TGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAG 285
```

**รูปที่** 4 ลำดับเบสของไอโซเลต OR2 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับ *Acetobacter tropicalis*

## 3. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดเมื่อทำการเลี้ยงโดยการให้อากาศแบบเขย่า

### 3.1 การศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

จากการศึกษาหาความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด โดยใช้สาโทที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์แตกต่างกัน ดังนี้คือ ร้อยละ 5 , 6, 7, 8, 9 และ 10 น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อ *A. tropicalis* ร้อยละ 1 ลงในสาโทนำไปเลี้ยงโดยการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดโดยการไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ร้อยละ 8 ให้ผลการผลิตกรดในปริมาณสูงที่สุด คือร้อยละ 0.70 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และมีปริมาณเซลล์ 0.20 x $10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเลี้ยง รองลงมาคือ ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ร้อยละ 9, 10, 7, 6 และ 5 ให้ผลการผลิตกรดดังนี้ คือ ร้อยละ 0.68, 0.67, 0.63, 0.56 และ 0.46 น้ำหนักต่อปริมาตร และปริมาณเซลล์ที่ 0.15 x $10^8$, 0.13 x $10^8$, 0.76 x $10^8$ , 0.66 x $10^8$, และ 0.48 x $10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5 ดังนั้นจากผลการทดลองนี้จึงเลือกระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ร้อยละ 8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรใช้ในการทดสอบในขั้นต่อไป

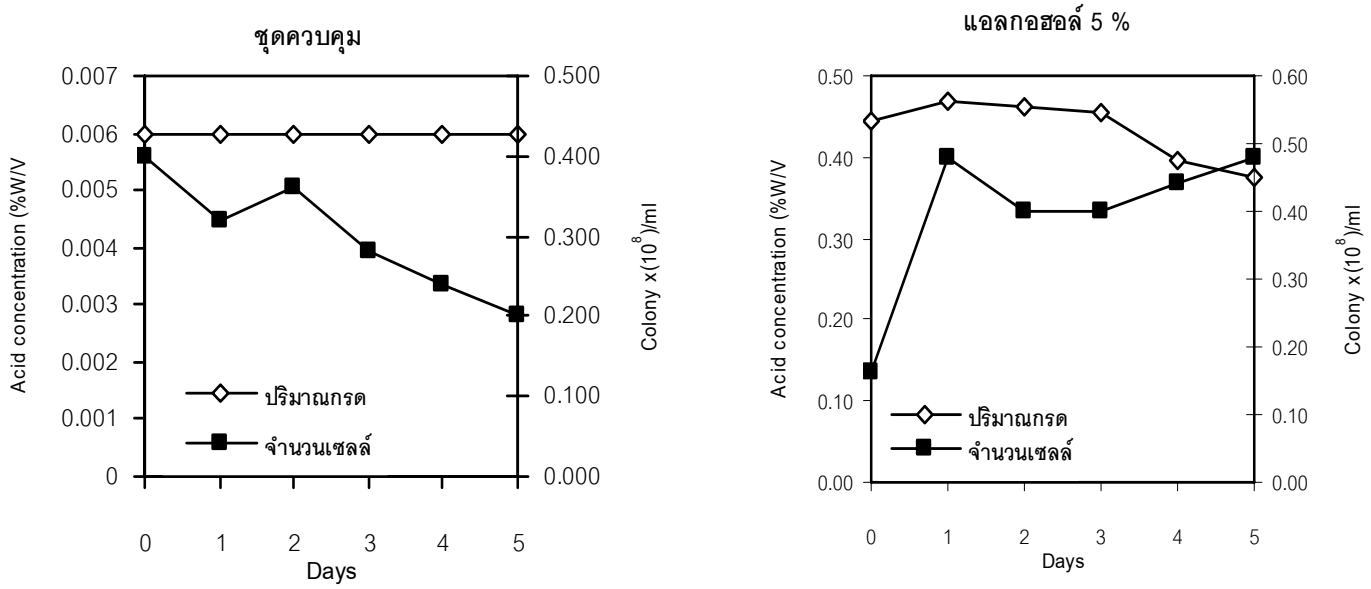
จากการศึกษาของ Gomez *et al.,* (1994) ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Acetobacter aceti* พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตกรดอะซิติกคือ 13 กรัมต่อลิตร และจากผลการทดลองที่ได้แตกต่างกันมาก

### 3.2 การศึกษาปริมาณกรดอะซิติกที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

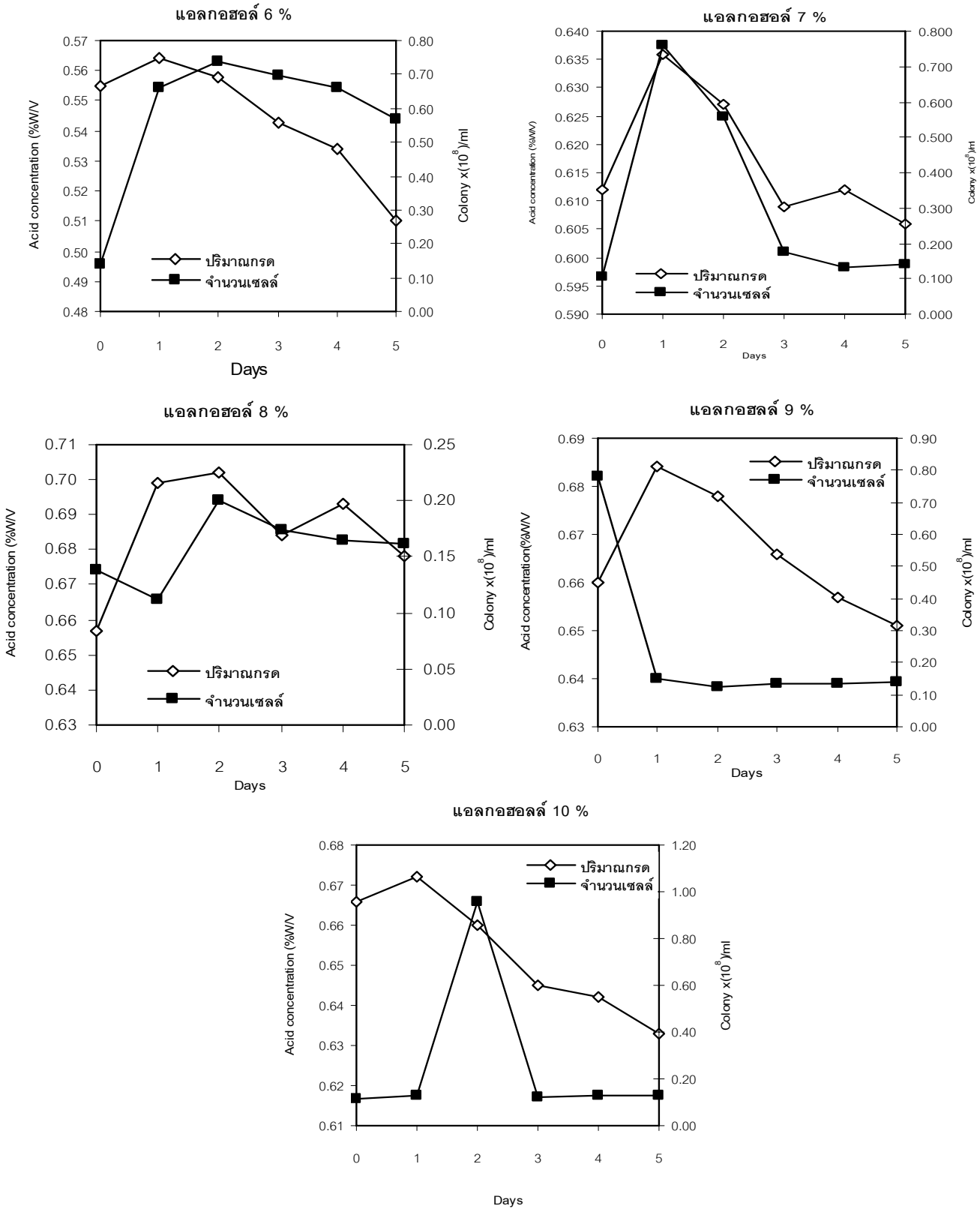
จากการศึกษาหาความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสม ต่อการผลิตกรดโดยใช้ความเข้มข้นของกรดอะซิติกแตกต่างกัน ดังนี้คือ ร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในสาโทที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอล์ร้อยละ 8 โดยน้ำหนักต่อปริมาณ 150 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อ *A. tropicalis* ร้อยละ 1 ลงในสาโทปรับความเข้มข้น นำไปเลี้ยงโดยการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดโดยการไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ พบว่า ที่ความเข้มข้นของกรดที่ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ผลการผลิตกรดเพิ่มขึ้นในปริมาณสูงที่สุด คือ ร้อยละ 0.12 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และปริมาณเซลล์ที่ 8.4 x $10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือความเข้มข้นของกรดร้อยละ 2, 1, และ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรให้ผลการผลิตกรดเพิ่มขึ้นดังนี้ คือ ร้อยละ 0.045, 0.012, และ 0.010 น้ำหนักต่อปริมาตร

ตามลำดับ และปริมาณเซลล์ที่ 7.66 x $10^8$, 1.58 x $10^8$, และ 0.98 x $10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 6 ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงเลือกระดับความเข้มข้นของกรดที่ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรใช้ในการทดสอบในขั้นต่อไป

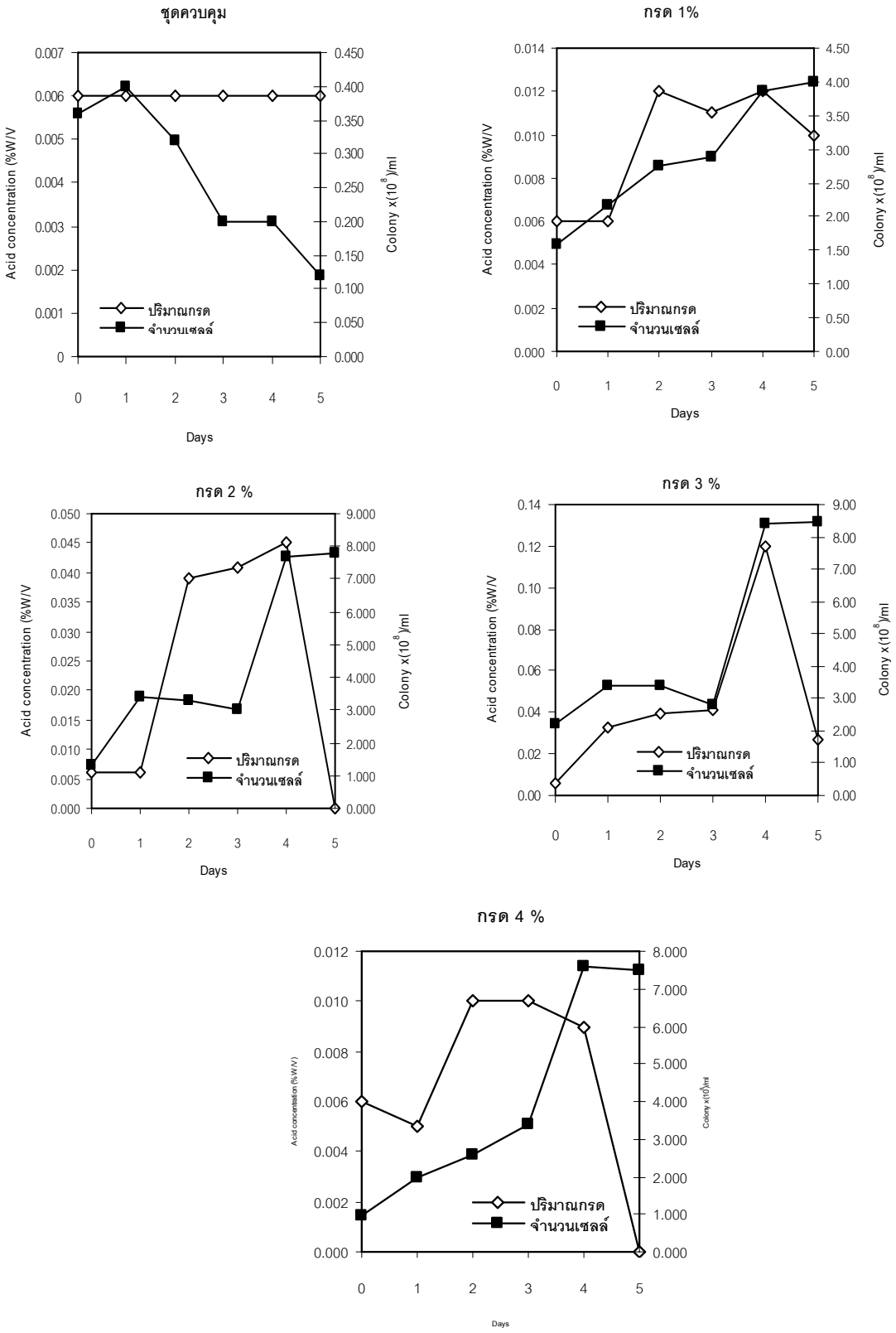
จากการศึกษาของ Gomez *et al.,* (1994) พบว่าปริมาณกรดอะซิติกที่ต่ำกว่า 10 กรัมต่อลิตรมีผลการกระตุ้นต่อการเจริญของแบคทีเรีย และจากงานวิจัยของ Sokollek *et al.,* (1998) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. LTH 4073 และ *Acetobacter* sp. LTH 4342 ในอาหาร ที่มีความเข้มข้นของกรดที่ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. LTH 4073 สามมารถผลิตกรดได้ถึงร้อยละ 4.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเชื้อ *Acetobacter* sp. LTH 4342 สามารถผลิตกรดได้ถึงร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเมื่อเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกมากว่าร้อยละ 2 จะมีผลทำให้การผลิตกรดได้น้อยกว่าร้อยละ 2 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองพบว่า *A. tropicalis* สามารถผลิตกรดได้ไม่แตกต่างกับเชื้อที่กล่าวมา และเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นตั้งแต่ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรมีผลทำให้ผลิตกรดได้น้อยลง




**รูปที่ 5** ผลของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่อการผลิตกรด และปริมาณเซลล์ของ *A. tropicalis*




**รูปที่** 5 (ต่อ) ผลของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่อการผลิตกรด และปริมาณเซลล์ของ *A. tropicalis*

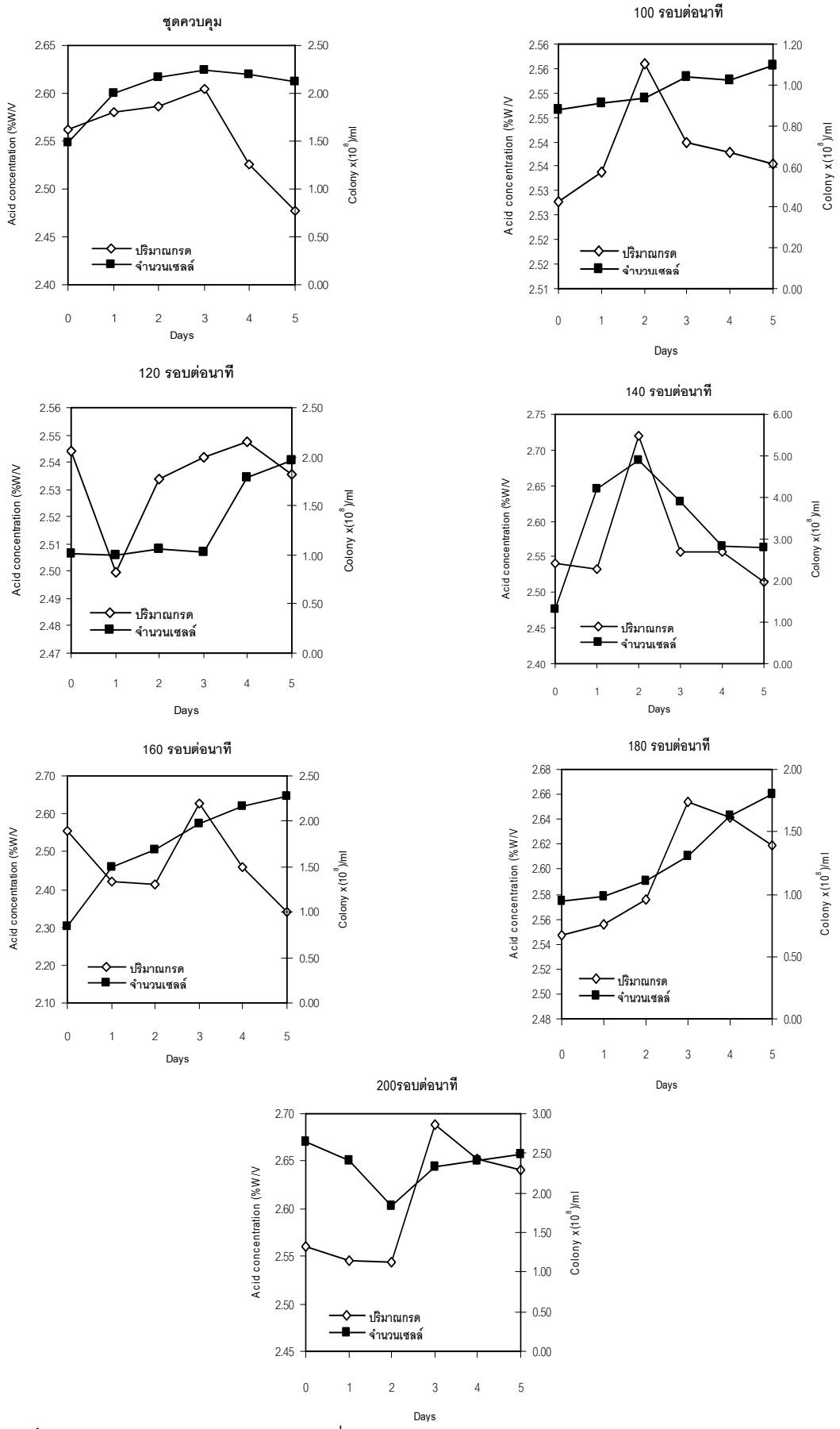



**รูปที่ 6** ผลของความเข้มข้นของกรดอะซิติกในสาโทต่อการผลิตกรด และปริมาณเซลล์ของ *A. tropicalis*

### 3.3 การศึกษาความเร็วรอบในการเลี้ยงที่เหมาะสม

ผลจากการศึกษาการให้ความเร็วรอบต่างๆที่เหมาะสมคือ 100 , 120 , 140 , 160 , 180 และ 200 รอบต่อนาที โดยใช้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ร้อยละ 8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและความเข้มข้นของกรดที่ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในสาโท 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อ *A. tropicalis* ร้อยละ 1 ลงในสาโท เลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆที่อุณหภูมิห้อง ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดโดยการไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ พบว่าที่ความเร็วรอบที่ 140 รอบต่อนาทีให้ผลการผลิตกรดในปริมาณสูงที่สุดคือร้อยละ 2.71 น้ำหนักต่อปริมาตรในวันที่ 2 ของการเลี้ยงและมีปริมาณเซลล์ที่ $4.90 \times 10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที ให้ผลการผลิตกรดคือ ร้อยละ 2.68 น้ำหนักต่อปริมาตรในวันที่ 3 ของการเลี้ยงและมีปริมาณเซลล์ที่ $2.33 \times 10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร และที่ 180 รอบต่อนาทีให้ผลการผลิตกรดดังนี้ ร้อยละ 2.65 น้ำหนักต่อปริมาตรในวันที่ 3 ของการเลี้ยงและมีปริมาณเซลล์ที่ $1.30 \times 10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร และที่ 160 รอบต่อนาทีให้ผลการผลิตกรดดังนี้ ร้อยละ 2.62 น้ำหนักต่อปริมาตรในวันที่ 3 ของการเลี้ยงและมีปริมาณเซลล์ที่ $1.97 \times 10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตรและที่ 100 รอบต่อนาทีให้ผลการผลิตกรดดังนี้ ร้อยละ 2.55 น้ำหนักต่อปริมาตรในวันที่ 2 ของการเลี้ยงและมีปริมาณเซลล์ที่ $0.93 \times 10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร และที่ 120 รอบต่อนาทีให้ผลการผลิตกรดดังนี้ ร้อยละ 2.54 น้ำหนักต่อปริมาตรในวันที่ 4 ของการเลี้ยงและมีปริมาณเซลล์ที่ $1.78 \times 10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 7 ดังนั้นจากผลการทดลองควรเลือกระดับความเร็วรอบที่140 รอบต่อนาที ซึ่งใช้เวลาในการหมักสั้นและมีปริมาณกรดอะซิติกมากเพื่อเป็นการประหยัดต้นทุน

จากการศึกษาของ Sokollek *et al.,* (1998) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *Acetobacter* sp. โดยใช้ความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อซึ่งก็สอดคล้องกับผลการทดลอง ที่ได้ทำการศึกษาหาความเร็วรอบต่างๆที่เชื้อสามารถเจริญและผลิตกรดอะซิติกในปริมาณที่มาก




**รูปที่ 7** ผลของการให้อากาศแบบเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆต่อการผลิตกรด และปริมาณเซลล์ของ *A. tropicalis*

## 4. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดเมื่อทำการเลี้ยงโดยการให้อากาศแบบพ่น

### 4.1 การศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหมาะสม

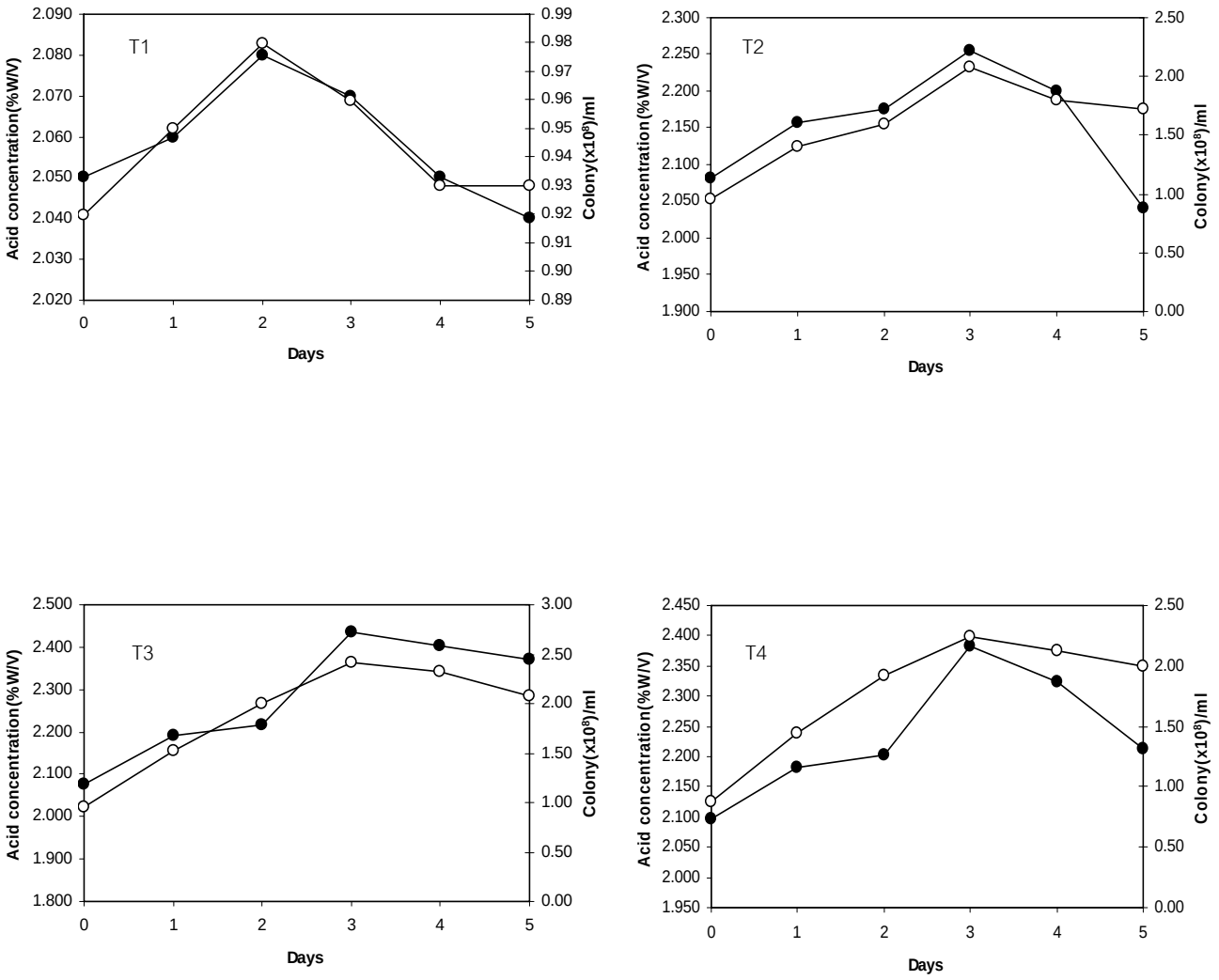
จากการศึกษาหาความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด โดยใช้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์แตกต่างกัน ดังนี้คือ ร้อยละ 2 , 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 จากนั้นถ่ายเชื้อ *A. tropicalis* ร้อยละ 1 ลงในสาโทกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตรความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงโดยให้อากาศที่มีความเข้มข้นของปริมาณออกซิเจนที่ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดโดยการไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ร้อยละ 3 ให้ผลการผลิตกรดในปริมาณสูงที่สุด คือร้อยละ 2.44 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และปริมาณเซลล์ 2.42 x $10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตรในวันที่ 3 ของการเลี้ยง รองลงมาคือความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ร้อยละ 4, 5, 6, 2, 8 และ 7 ให้ผลการผลิตกรดดังนี้ คือ ร้อยละ 2.38, 2.31, 2.28, 2.26, 2.24 และ 2.21 น้ำหนักต่อปริมาณ และปริมาณเซลล์ที่ 2.24 x $10^8$, 2.16 x $10^8$, 2.16 x $10^8$ , 2.08 x $10^8$, 2.08 x $10^8$ และ 2.08 x $10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 8 ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงเลือกระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรใช้ในการทดสอบในขั้นต่อไป

จากการงานวิจัยของ Ndoye *et al.*, (2006;2007) ได้เลี้ยงเชื้อ *Acetobacter pasteurlanus LMG 1625*$^T$ ที่เลี้ยงในอาหารที่มี ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเมื่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสพบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดได้ ร้อยละ 2.2 และได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter senegalensis* ที่คัดแยกได้จากมะม่วงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ร้อยละ 5 พบว่าเชื้อ *A. senegalensis* เมื่อเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องสามารถผลิตกรดได้มากที่สุดถึงร้อยละ 6.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองพบว่าเชื่อ *A. tropicalis* สามารถผลิตกรดได้ไม่แตกต่างกับเชื้อ *Acetobacter pasteurlanus LMG 1625*$^T$

**4.2 การศึกษาปริมาณกรดที่เหมาะสม**

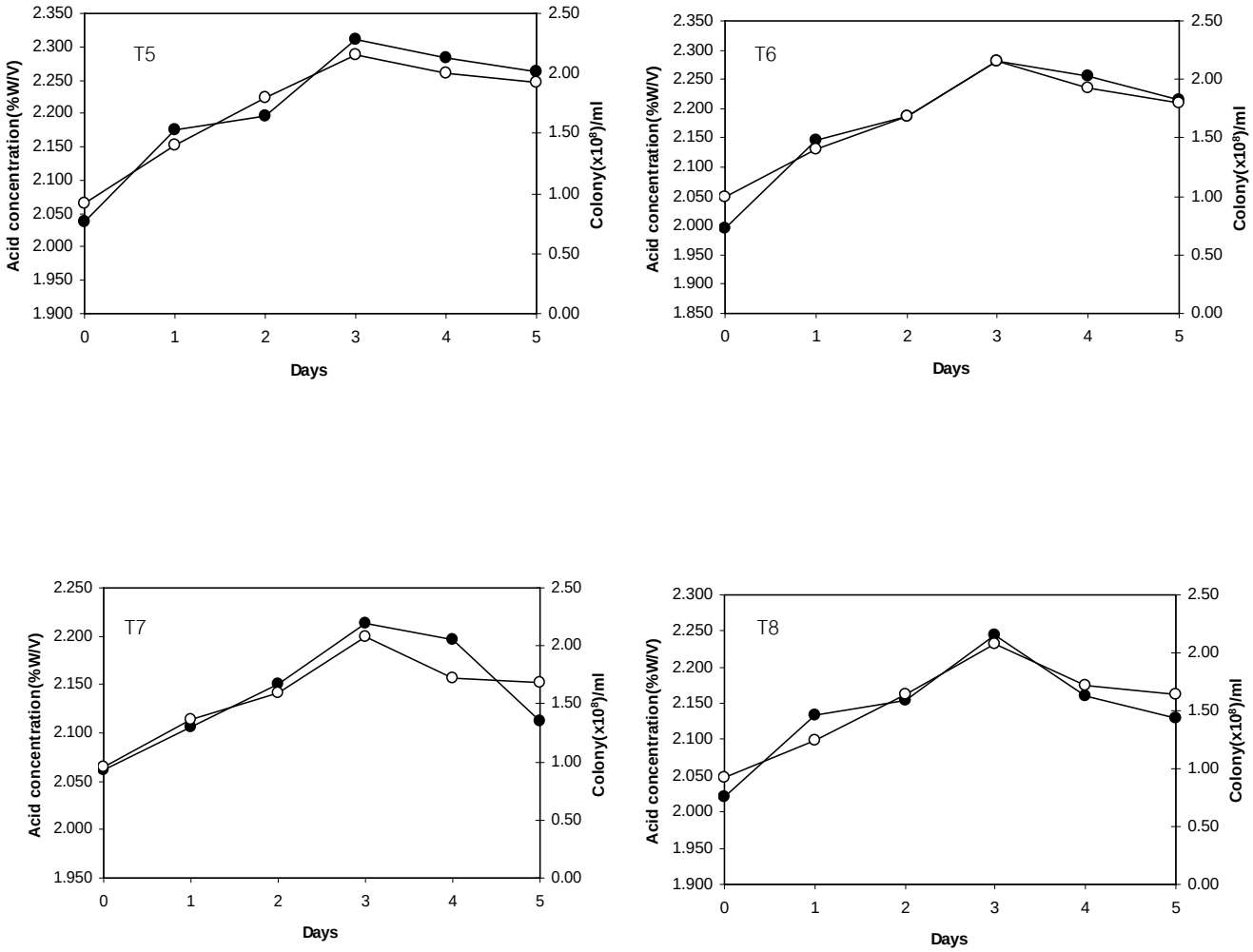
จากการศึกษาหาความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโดยความเข้มข้นของกรดอะซิติกแตกต่างกัน ดังนี้คือ ร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 จากนั้นถ่ายเชื้อ *A. tropicalis* ร้อยละ 1 ลงในสาโทกลั่นที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับความเข้มข้นกรดที่ความเข้มข้นต่างๆ ร้อยละ 1 ในสาโทกลั่น 300 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงโดยให้อากาศที่มีความเข้มข้นของปริมาณออกซิเจนที่ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดโดยการไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ พบว่า ที่ความเข้มข้นของกรดที่ร้อยละ 3 ให้ผลการผลิตกรดเพิ่มขึ้นสูงที่สุด คือ ร้อยละ 0.24 น้ำหนักต่อปริมาตร และปริมาณเซลล์ที่ $2.40 \times 10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือความเข้มข้นของกรดร้อยละ 5, 4, 2 และ 1 ให้ผลการผลิตกรดเพิ่มขึ้นดังนี้ คือ ร้อยละ 0.23, 0.19, 0.12 และ 0.08 น้ำหนักต่อปริมาตร และปริมาณเซลล์ที่ $1.64 \times 10^8$, $2.28 \times 10^8$, $1.96 \times 10^8$ และ $1.36 \times 10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 9 ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงเลือกระดับความเข้มข้นของกรดที่ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรใช้ในการทดสอบในขั้นต่อไป

จากงานวิจัยของ Sokollek *et al.,* (1998) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* sp. LTH 4073 และ *Acetobacter* sp. LTH 4342 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกรดที่ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. LTH 4073 สามารถผลิตกรดได้ถึงร้อยละ 4.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเชื้อ *Acetobacter* sp. LTH 4342 สามารถผลิตกรดได้ถึงร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเมื่อเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกมากกว่าร้อยละ 2 จะมีผลทำให้การผลิตกรดได้น้อยกว่าร้อยละ 2 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองพบว่า *A. tropicalis* สามารถผลิตกรดได้ไม่แตกต่างกับเชื้อที่กล่าวมา และเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของกรดเพิ่มขึ้นมีผลทำให้ผลิตกรดได้น้อยลง



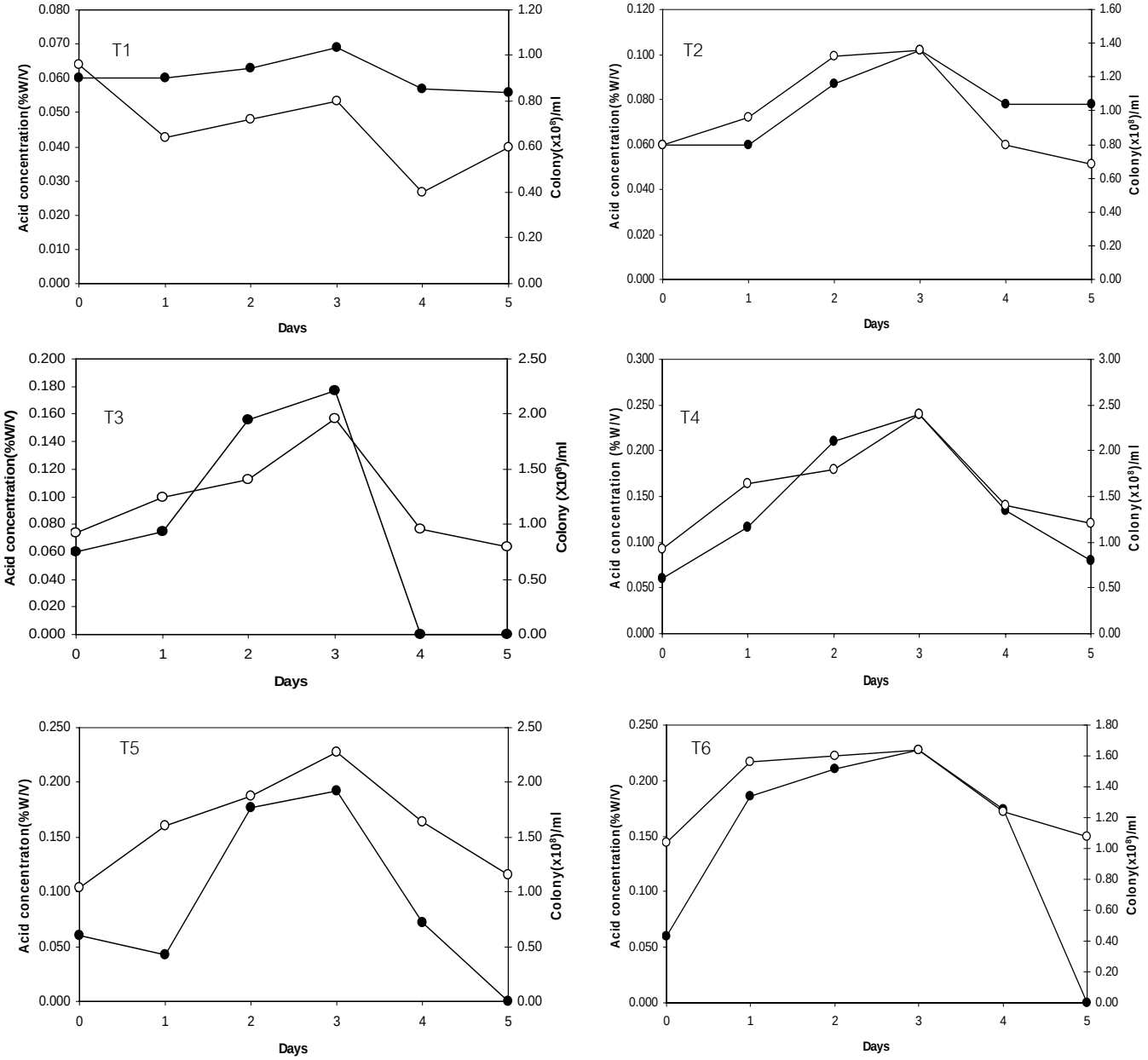

**รูปที่** 8 ผลการผลิตกรดที่เพิ่มขึ้น และปริมาณเซลล์ของ *A. tropicalis* เมื่อเลี้ยงในสาโทกลั่นที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่างๆ ; T1= ชุดควบคุม T2= ร้อยละ 2 T3= ร้อยละ 3 T4= ร้อยละ 4 T5= ร้อยละ 5 T6= ร้อยละ 6 T7= ร้อยละ 7 และ T8= ร้อยละ 8

- • ปริมาณการผลิตกรด
- ° ปริมาณเซลล์ที่เจริญระหว่างการเลี้ยง




**รูปที่** 8 (ต่อ) ผลการผลิตกรดที่เพิ่มขึ้น และปริมาณเซลล์ของ *A. tropicalis* เมื่อเลี้ยงในสาโทกลั่นที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่างๆ ; T1= ชุดควบคุม T2= ร้อยละ 2 T3= ร้อยละ 3 T4= ร้อยละ 4 T5= ร้อยละ 5 T6= ร้อยละ 6 T7= ร้อยละ 7 และ T8= ร้อยละ 8

- ● ปริมาณการผลิตกรด
- ○ ปริมาณเซลล์ที่เจริญระหว่างการเลี้ยง




**รูปที่** 9 ผลการผลิตกรดที่เพิ่มขึ้น และปริมาณเซลล์ของ *A. tropicalis* เมื่อเลี้ยงในสาโทกลั่นที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกแตกต่างกัน ; T1= ชุดควบคุม T2= ร้อยละ 1 T3= ร้อยละ 2 T4= ร้อยละ 3 T5= ร้อยละ 4 และ T6= ร้อยละ 5

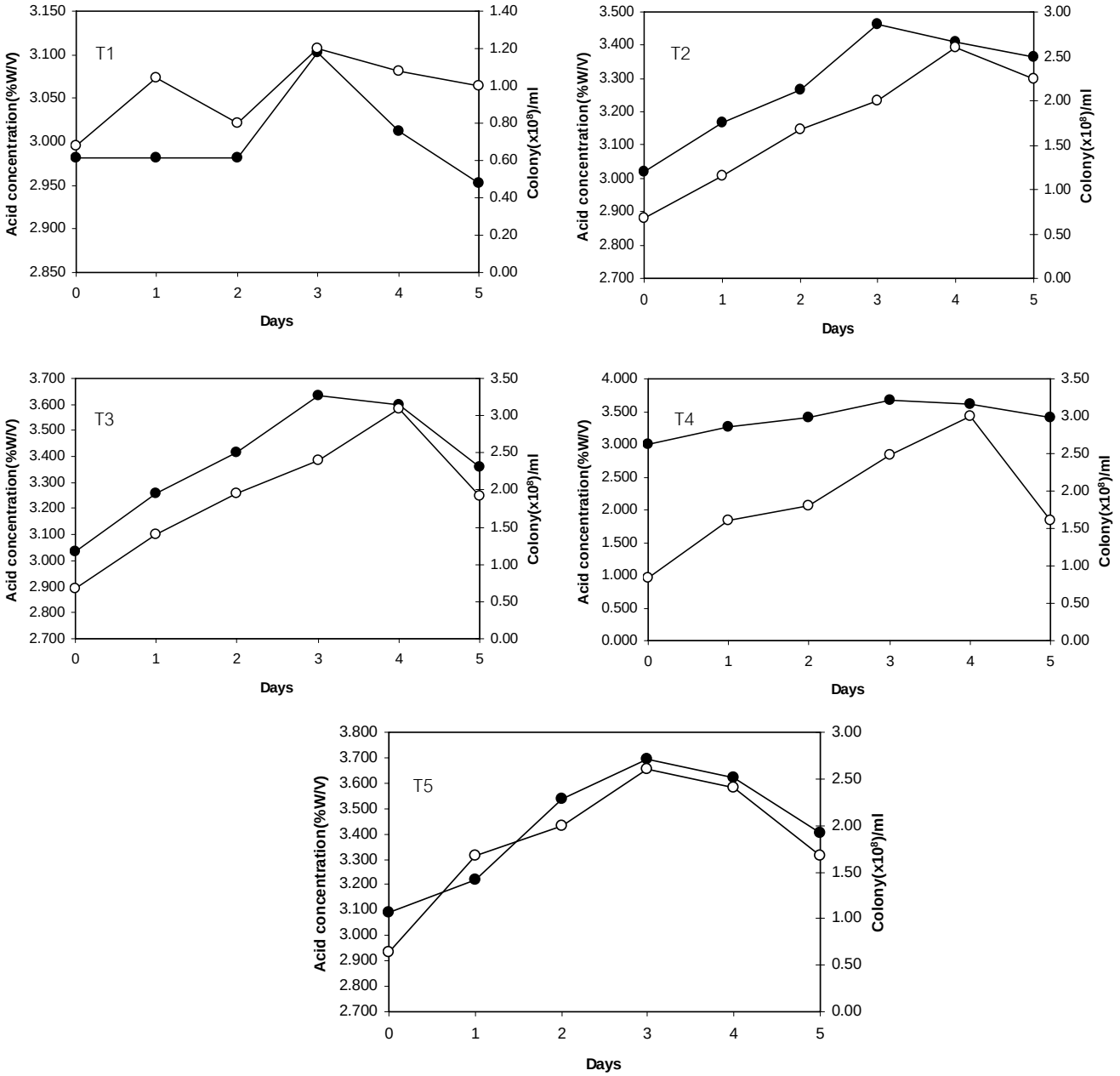
- ● ปริมาณการผลิตกรด
- ○ ปริมาณเซลล์ที่เจริญระหว่างการเลี้ยง

**4.3 การศึกษาการให้อากาศ**

จากการศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม โดยให้อากาศที่ความเข้มข้นของปริมาณออกซิเจน ดังนี้ 0.4 1.60 3.85 และ 7.70 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อ *A. tropicalis* ร้อยละ 1 ลงในสาโทกลั่น โดยที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ร้อยละ 3 และความเข้มข้นของกรดที่ร้อยละ 3 ในสาโทกลั่น 300 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงโดยให้อากาศในปริมาณที่แตกต่างกันที่อุณหภูมิห้อง เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกรด โดยการไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของปริมาณออกซิเจนที่ 7.70 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลการผลิตกรดในปริมาณสูงที่สุด คือ ร้อยละ 3.69 น้ำหนักต่อปริมาตรในวันที่ 3 และปริมาณเซลล์ที่ 2.60 x $10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือความเข้มข้นของปริมาณออกซิเจนที่ 3.85 1.60 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลการผลิตกรดดังนี้ ร้อยละ 3.67, 3.63 และ 3.46 น้ำหนักต่อปริมาณ และปริมาณเซลล์ที่ 2.48 x $10^8$, 2.40 x $10^8$ และ 2.00 x $10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 10 ดังนั้นจากผลการทดลองควรเลือกระดับการให้ความเข้มข้นของออกซิเจนในระดับต่ำ เพื่อเป็นการประหยัดในการลดต้นทุน

จากงานวิจัยของ Ory *et al.*, (2002) ได้เลี้ยงเชื้อ *Acetobacter aceti* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ 70-80 กรัมต่อลิตร(ร้อยละ 7-8 น้ำหนักต่อปริมาตร) และความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ 2.5-5 กรัมต่อลิตร(ร้อยละ 0.25-0.5 น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยที่ให้ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อ *A. aceti* สามารถผลิตกรดได้ถึง80 กรัมต่อลิตร(ร้อยละ 8 น้ำหนักต่อปริมาตร) และเมื่อให้อัตราการให้อากาศในระหว่างการเลี้ยงพบว่าเมื่อให้อัตราการให้อากาศมากเกินไปนั้น มีผลต่อการผลิตกรดอะซิติกลดลง เนื่องจากกิจกรรมของเซลล์ลดลง

จากรายงานของ Tesfaye *et al.*, (2002) พบว่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ระหว่าง 1 ถึง 3 ppm มีผลทำให้อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติกเจริญได้มากที่สุด และที่ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ 8 ppm มีผลทำให้อัตราการผลิตกรดลดลงถึง ร้อยละ 10




**รูปที่** 10 ผลการผลิตกรดที่เพิ่มขึ้น และปริมาณเซลล์ *A. tropicalis* เมื่อให้อากาศที่ความเข้มข้นของปริมาณออกซิเจนในสาโทกลั่นแตกต่างกัน ; T1= ชุดควบคุม T2=0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร T3=1.60 มิลลิกรัมต่อลิตร T4=3.85 มิลลิกรัมต่อลิตร และ T5=7.70 มิลลิกรัมต่อลิตร

- • ปริมาณการผลิตกรด
- ° ปริมาณเซลล์ที่เจริญระหว่างการเลี้ยง

# สรุปผลการทดลอง

การคัดแยกเชื้อที่ผลิตกรดอะซิติกจากแหล่งที่ต่างๆ เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดได้สูงที่สุด มาใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำส้มสายชู จากผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

1. การคัดแยกเชื้อที่ผลิตกรดจากแหล่งต่างๆ พบว่าเชื้อที่ได้จากผลไม้คือ ส้ม (Orange: OR) มีปริมาณการผลิตกรดน้ำส้มสายชูมากที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อที่ได้จากแหล่งอื่น และเมื่อทำการทดสอบโดยเชื้อที่ได้จาก ส้ม(Orange:OR) เลี้ยงในอาหารที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้จากส้มส่วนใหญ่สามารถผลิตกรดทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอนเนตจนเกิดวงใส

2. เมื่อทำการจัดจำแนกเชื้อที่คัดแยกได้โดยวิธีการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีลักษณะโคโลนีสีครีมใส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 1 มิลลิเมตร และเมื่อทำการศึกษาโดยการส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เชื้อมีรูปร่าง กลม แกรมลบ และเมื่อทำการจัดจำแนกเชื้อโดยวิธีการทางดีเอ็นเอวิเคราะห์ พบว่าเป็นเชื้อ *Acetobacter tropicalis*

3. จากการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ โดยการศึกษาสภาวะการทนแอลกอฮอล์ พบว่าเชื้อ *A. tropicalis* นี้สามารถทนแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 14 และสามารถเจริญได้ดีที่แอลกอฮอล์ร้อยละ 5 และสภาวะการทนกรดได้ที่ร้อยละ 15 เจริญได้ดีที่กรดร้อยละ 1

4. จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด ของเชื้อ *A. tropicalis* ในสาโทพบว่าความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และกรดอะซิติกที่เหมาะสมคือร้อยละ 8 และร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเมื่อทำการเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องสามารถผลิตกรดได้ดีที่สุดคือร้อยละ 2.71 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและปริมาณเซลล์อยู่ที่ $4.90 \times 10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร

5. จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด โดยการศึกษาจาก ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสม โดยให้อากาศที่ความเข้มข้นของปริมาณออกซิเจน 0.4 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมของเชื้อ *A. tropicalis* ในการหมักในสาโทกลั่นอยู่ที่ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ร้อยละ 3 จะสามารถผลิตกรดได้ดีที่สุด คือ ร้อยละ 2.44 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และปริมาณเซลล์อยู่ที่ $2.42 \times 10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของกรดที่ ร้อยละ 3 เชื้อ *A. tropicalis* จะสามารถผลิตกรดได้ดีที่สุด คือ ร้อยละ 0.24 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และปริมาณเซลล์อยู่ที่ $2.40 \times 10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการศึกษาความอัตราการให้อากาศในการเลี้ยงที่เหมาะสมที่ปริมาณความเข้มข้นของออกซิเจนต่างๆ พบว่าปริมาณความเข้มข้นของออกซิเจนที่ 0.4, 1.60,

3.85 และ 7.70 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ปริมาณความเข้มข้นของออกซิเจนที่ 7.70 มิลลิกรัมต่อลิตรเชื้อมีความสามารถในการผลิตกรดได้สูงที่สุด ที่ร้อยละ 3.69 โดยน้ำหนักต่อปริมาณปริมาณเซลล์ที่ 2.60 x$10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเทียบกับที่ปริมาณการให้ออกซิเจน 1.60 และ 3.85 พบว่าให้ปริมาณกรดไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมควรเลือกใช้อัตราการให้อากาศที่มีปริมาณความเข้มข้นของออกซิเจนที่ 3.85 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดได้ร้อยละ 3.67 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณเซลล์ที่ 2.48 x $10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร เนื่องจากจะช่วยลดต้นทุนในการผลิต

# เอกสารอ้างอิง


ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2550.**ประโยชน์ของน้ำส้มสายชู**. [ออนไลน์]. แหล่งข้อมูล: http://www1.fda.moph.go.th/consumer/csmb/csmb2545.nsf/c5fea1b96750d7b880256849004e9ab4/ccc25aff22a1a622c7256cbb00229962?OpenDocument . (วันที่ค้นหาข้อมูล: 27 พฤศจิกายน 2550)

**ประเภทของน้ำส้มสายชู**. 2550. [ออนไลน์]. แหล่งข้อมูล: http://www.rdi.ku.ac.th/kasetfair49/Technology/t 45 1/t 45 1.htm. (วันที่ค้นหาข้อมูล: 27 พฤศจิกายน 2550).

วราวุฒิ ครูส่ง.2538.**จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร**.โอ. เอส. พรินติ้งเฮ้าส์, กรุงเทพมหานคร. หน้า 147-150.

ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย. 2547 การพิสูจน์ลักษณะของแบคทีเรียกรัมบวกและกรัมลบ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.หน้า 57-58.

สุมณฑา วัฒนสินธ์. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. หน้า 278-283.

สมใจ วิชัยดิษฐ์. 2540 วิทยาศาสตร์สำหรับประชาชน. วารสารวิทยาศาสตร์. หน้า 381-383

Arnold, S., Becker, T., Delgado, A., Emde, F., and Enenkel, A. 2002. Optimizing high strength acetic acid bioprocess by cognitive methods in an unsteady state cultivation. **Journal of Biotechnology**. 97: 133-145.

Fregapane, G., H, Rubio-Fernandez., and M.D, Salvador. 2003. Continuous production of wine vinegar in bubble column reactor of up to 60-litre capacity. **European Food Research Technology**. 216: 63-67

Horiuchi, J.i., T, Kanno., and M, Kibayashi. 1999. New vinegar production from onions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 88: 107-109.

Gomez, J. M., Romero, L. E., Caro, I., & Cantero, D. (1994). Cinetica de crecimiento de *Acetobacter aceti* sobre sustrato alcoholico. ***Informacion Tecnologica,*** 5(6),55 -63.

Lipp, M., B.S, Radovic., and E, Anklam. 1998. Characterization of vinegar by pyrolysis-mass spectrometry. **Food Control**. 9: 349-355.

Nanba, a., Kimura, K., and Nagai, S. 1985. Vinegar production by *Acetobacter rancevs* cells fixed on a hollow fiber module. **Journal Fermentation Technology**. 63: 175-184.

Ndoye, B., S, Lebecque ., J, Destain ., A. T, Guiro and P, Thonart . 2007. A new pilot plant scale acetifier designed for vinegar production in Sub-Saharan Africa. **Procees Biochemistry**. 42:1561-1565.

----------., R, Dubois Dauphin., L,Tounkara., A. T, Guiro., C, Kere ., B, Diawara and P, Thonart. 2006. Thermoresistant properties of acetic acids bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. **Enzyme and Microbial Technology**. 39: 916-923.

Ory, I.D., L.E, Romero., and D, Cantero. 2002. Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. **Journal of Food Engineering**. 52: 31-37.

----------. 2004. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter aceti.* **Process Biochemistry**. 39: 547-555.

----------. Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production. **Journal of Food Engineering**. 63: 39-45.

Sokollek, S.J., C, Hertel., and W.P, Hammes. 1998. Cultivation and preservation of vinegar bacteria. **Journal of Biotechnology**. 60: 195-206.

Solieri, L., and P, Giudici. 2007. Yeasts associated to traditional balsamic vinegar: Ecological and technological features. **International Journal of Food Microbiology**. xx: xxx-xxx.

Tesfaye, w., M, L, Moraes., M.C, Garcia Parrilla., and A.M, Troncoso. 2002. vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. **Food Science and Technology**. 13: 12-21.

Ye, X.J., S, Morimura., L.s, Han., T, Shigematsu., and K, Kida. 2004. In vitro evaluation of physiological activity of vinegar produced from barley-, sweet potato-, and rice-shochu post-distillation slurry. **Bioscience. Biotechnology. Biochemistry**. 68: 551-556.

# กิตติกรรมประกาศ

ในการวิจัยเรื่องการผลิตน้ำส้มสายชูจากสาโทนี้ สำเร็จไปได้ด้วยดีผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตรที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ปีงบประมาณ 2550 ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อำนวยความสะดวกด้านสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบคุณนายอุเทน หอประหลาด ที่ให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการผลิตสาโท

จุฑามาศ มณีวงศ์