การผลิตน้ำส้มสายชูจากเชื้อ *Acetobacter* species ที่แยกจากวัสดุธรรมชาติ

Study on Acetic Acid Produced by *Acetobacter* species Isolated from Natural Materials

664.55
ณ329ก

โดย

ณัฐดา วิโรจน์แสงอรุณ
สมบูรณ์ ธนาสุควัฒน์

2533

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2531

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การผลิตน้ำส้มสายชูจากเชื้อ Acetobacter species ที่แยกจากวัสดุธรรมชาติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

ณัฐดา วิโรจน์แสงอรุณ

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

2533

I 15847878

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ช
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
ภาพประกอบ	ซ
ตารางประกอบ	ซ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. แนวเหตุผล วัตถุประสงค์ และขอบเขตของการวิจัย	20
3. วัสดุและวิธีการ	22
4. ผลการทดลอง	27
5. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	56
บรรณานุกรม	59
ภาคผนวก	64

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง การผลิตน้ำส้มสายชูจากเชื้อ Acetobacter species ที่แยกจากวัสดุธรรมชาติ

ผู้วิจัยหลัก ณัฐดา วิโรจน์แสงอรุณ

ผู้วิจัยร่วม สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ มิถุนายน พ.ศ. 2533

บทคัดย่อ

ได้แยกเชื้อน้ำส้มสายชูจากวัสดุธรรมชาติ ได้แก่ผัก ผลไม้ และดอกไม้ เป็นต้น โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีเอทธานอล 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี streak plate บนอาหารแข็งที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต พบเชื้อที่สร้างกรดโดยดูจากการสลายของแคลเซียมคาร์บอเนตเห็นเป็นวงใสรอบโคโลนี (colony) 154 ไอโซเลต (isolate) จากตัวอย่าง 156 ตัวอย่าง เชื้อที่แยกได้เป็นเชื้อที่เลี้ยงในภาวะให้อากาศ (shaking culture) 82 ไอโซเลต และภาวะไม่ให้อากาศ (stationary culture) 72 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อน้ำส้มสายชูเหล่านี้มาคัดเลือกสายเชื้อ (strain) ที่มีประสิทธิภาพผลิตกรดน้ำส้มได้สูงในอาหารเหลวที่มีเอทธานอล 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรในภาวะให้อากาศ การทดลองทุกขั้นตอนจะเลี้ยงเชื้อ ณ อุณหภูมิ 30 °เซลเซียส คัดเลือกเชื้อน้ำส้มสายชูได้ 11 ไอโซเลต นำมาทดลองหาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตน้ำส้มสายชู ได้แก่ปริมาณเอทธานอลเริ่มต้น ปริมาณกรดเริ่มต้นตลอดจนอุณหภูมิสูงต่อการผลิตกรดน้ำส้มและการเจริญของเชื้อ พบว่าเชื้อน้ำส้มสายชู 5 ไอโซเลต ได้แก่ NS 05, NS 64S-1, NS 67S, NS 91 และ NS 132S มีประสิทธิภาพผลิตกรดน้ำส้มได้สูงจากเอทธานอลเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยใช้สารแขวนลอยเชื้อในน้ำเกลือปลอดเชื้อปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็น inoculum เชื้อน้ำส้มสายชูทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลวที่มีเอทธานอลเริ่มต้นเป็น 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ทดลองหาประสิทธิภาพในการผลิตกรดน้ำส้มเมื่อมีปริมาณกรดเริ่มต้นเป็น 0,0.5,1.0,1.5 และ 2.0 กรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ารหัสเชื้อ NS 05, NS 91 และ NS 132S ผลิตกรดน้ำส้มได้สูงหากมีปริมาณกรดเริ่มต้นเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนรหัสเชื้อ NS 64S-1 และ NS 67S ผลิตกรดน้ำส้มได้สูงเมื่อมีปริมาณกรดเริ่มต้นเป็น 1.0 เปอร์เซ็นต์ การเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชูในภาวะกรดพบว่ารหัสเชื้อ NS 05, NS 91 และ NS 132S สามารถเจริญได้ในภาวะกรดสูงถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน่าสนใจในแง่การผลิตกรดน้ำส้มระดับโรงงานอุตสาหกรรมที่ไม่สามารถทำให้เกิดภาวะปลอดเชื้อได้ จำเป็นต้องมีการเติมกรดน้ำส้มลงไปในวัตถุดิบเพื่อยับยั้งการ

บนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทดลองหาประสิทธิภาพในการผลิตกรดน้ำส้ม ณ อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตกรดได้ต่ำตลอดจนการเจริญของเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตก็เจริญได้ไม่ดี

เมื่อนำเชื้อน้ำส้มสายชูทั้ง 5 ไอโซเลตมาตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีพบว่าเป็นเชื้อติดสีแกรมลบ (Gram-negative) รูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่มีเอนโดสปอร์ (endospore) ไม่สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลที่ละลายน้ำ มีคุณสมบัติออกซิไดส์แลกเตต (lactate) และแอซีเตต (acetate) เป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ เซลล์มีเอนไซม์แคทาเลส (catalase) และรหัสเชื้อ NS 05 สามารถสร้างเมือกบนผิวหน้าอาหารเหลว เชื้อน้ำส้มสายชูทั้ง 5 ไอโซเลตมีความสามารถสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในการเจริญได้แก่ L-Arabinose, D-Glucose, Glycerol, D-Mannitol, D-Mannose, D-Xylose Ethanol และ D-Galactose เว้นรหัสเชื้อ NS 05 ที่ไม่สามารถใช้ D-Galactose ได้ จากคุณสมบัติต่าง ๆ บางประการที่ทำการทดลองจึงน่าจะจัดเชื้อน้ำส้มสายชูที่แยกและคัดเลือกได้ทั้ง 5 ไอโซเลตเป็น Acetobacter aceti โดยอาจจะเป็นคนละสายเชื้อ (strain)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title : Study on Acetic Acid Produced by Acetobacter species Isolated from Natural Materials

Name of Investigators : Nuttada Virochsaengaroon
Somboon Tanasupawat

Year : June , 1990

ABSTRACT

Acetobacter spp. were isolated from various kinds of vegetables, fruits and flowers in five percent (by volume) ethanol broth. The acetic acid bacteria , then further purified on solid medium containing calcium carbonate by streak-plate technique. Out of 154 cultures isolated from 156 samples, there are 82 cultures isolated in shaking broth and 72 cultures isolated in stationary broth. These isolated cultures, then screened to find the capability to produce acetic acid in the broth containing two percent (by volume) of ethanol in shaking culture. In every step, the control temperature employed was 30 degree Celsius. 11 cultures were selected and were searching for their optimum initial ethanol concentration, initial acidity and high-temperature capability to produce acetic acid and the growth of the cultures. From the experiment, five selected cultures were found. These are NS 05, NS 64S-1, NS 67S, NS 91 and NS 132S. They all showed high efficiency in acetic acid production from four percent initial ethanol (by volume) by employing one percent (by volume) of cell suspension in sterile normal saline as an inoculum. All of the five isolates showed well growth rate in the broth with initial ethanol of two and four percent. When experimenting about the efficiency concerning acetic acid production at the initial acid concentration of 0, 0.5, 1.0 1.5 and 2.0 gram per liter, the isolation number NS 05, NS 91 and NS 132S produced high quantity of acetic acid at initial acidity 0.5 percent and NS 64S-1 and NS 67S produced high acetic acid at initial acidity 1.0 percent. The growth of the acetic acid bacteria in acid

condition were found that the NS 05, NS 91 and NS 132S could sustain the growth in the acid environment as high as 10 percent which is very attractive in term of commercial production in the factory that cannot have the aseptic condition and have to add acetic acid into the raw material to inhibit the contamination from other microorganisms. When operation temperatures were raised up to 35 and 40 degree Celsius, the acetic acid production efficiency was low and the growth of all five isolates were adverse.

Finally, the five selected cultures were examined to identify the morphological, physiological and biochemical characteristics and found that all the cells were Gram-negative, short-rod shape with no endospore, not producing water-soluble brown pigment and were able to oxidize acetate and lactate to carbon-dioxide and water. The cells contain enzyme catalase. The isolation number NS 05 could form film on surface of the broth. In the acid formation test in the carbon sources, all five isolated cultures showed positive results with L-Arabinose, D-GlucoseGlycerol, D-Mannitol, D-Mannose, D-Xylose, Ethanol and D-Galactose except the isolation number NS 05 could not utilized D-Galactose. From the results of this research and the characteristics found, these five isolated cultures should be classified as an Acetobacter aceti which may be originate from different strain.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้สถานที่เพื่อปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ตลอดจนขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้จัดสรรทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2531 และเหนืออื่นใดคือขอบคุณครอบครัวของข้าพเจ้าที่ได้ให้การช่วยเหลือและสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ณัฐดา วิโรจน์แสงอรุณ

ผู้วิจัยหลัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1.-1.2	การผลิตกรดในอาหารเหลวที่มีเอทธานอลปริมาณต่าง ๆ	40-42
2.	การผลิตกรดในอาหารเหลวที่มีเอทธานอล 4 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอซีติกปริมาณต่าง ๆ	44

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1.	คุณสมบัติของแบคทีเรียสกุล Gluconobacter, Acetobacter และ Pseudomonas	12
2.	คุณสมบัติที่จำแนกแบคทีเรียสกุล Acetobacter ออกเป็นชนิด	14
3.	คุณสมบัติที่ใช้จำแนกแบคทีเรียสกุล Acetobacter เป็นชนิดและชนิดย่อย	15
4.	คุณสมบัติที่ใช้จำแนกแบคทีเรียสกุล Acetobacter ออกเป็นชนิดต่าง ๆ	17
4.1	คุณสมบัติอื่น ๆ ที่ใช้จำแนกแบคทีเรียสกุล Acetobacter ออกเป็นชนิดต่าง ๆ	18
5.	การผลิตกรดโดยเชื้อน้ำส้มสายชูที่แยกได้จากผลไม้ชนิดต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานครโดยวิธี Shaking Culture	28
6.	การผลิตกรดโดยเชื้อน้ำส้มสายชูที่แยกได้จากผลไม้ชนิดต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานครโดยวิธี Stationary Culture	31
7.	การผลิตกรดโดยเชื้อน้ำส้มสายชูที่แยกได้	34
8.	การผลิตกรดในอาหารเหลวที่มีเอทธานอล 4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่ม ณ อุณหภูมิ 35 °ซ และ 40 °ซ	45
9.	การเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชูในอาหารเหลวที่มีเอทธานอลปริมาณต่าง ๆ	46
10.	การเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชูในภาวะกรด	50
11.	การเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู ณ อุณหภูมิ 35 °ซ และ 40 °ซ	51
12.	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อน้ำส้มสายชู	53
13.	ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อน้ำส้มสายชู	54
14.	ความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ของเชื้อน้ำส้มสายชู	55

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

น้ำส้มสายชูเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองชนิดหนึ่งที่เป็นของเหลวที่ได้จากการหมักวัตถุดิบที่มีแป้งหรือน้ำตาล หรือมีทั้งแป้งและน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ โดยผ่านกระบวนการหมัก 2 ขั้นตอน คือ

1. การหมักแอลกอฮอล์ (Alcoholic fermentation) เป็นการหมักโดยใช้ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic) มักใช้ยีสต์ Saccharomyces cerevisiae (5,29) ปฏิกิริยามีดังสมการต่อไปนี้

$$\underset{\text{sugar}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{ethanol}}{2C_2H_5OH} + \underset{\text{carbon dioxide}}{2CO_2}$$

โดยทั่วไปจะใช้เวลาหมักแอลกอฮอล์ประมาณ 48-72 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 30 °ซ ก็จะหมักได้สมบูรณ์

2. การหมักน้ำส้มสายชู (Acetification) เป็นการหมักโดยใช้เชื้อน้ำส้มสายชู (Acetobacter spp.) เปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดแอซีติก (acetic acid) ในภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic) ดังสมการที่ 1,2 และ 3 (16)

$$\underset{\text{ethanol}}{CH_3CH_2OH} + (O) \longrightarrow \underset{\text{acetaldehyde}}{CH_3CHO} + H_2O \qquad (1)$$

$$CH_3CHO + H_2O \longrightarrow \underset{\text{hydrated acetaldehyde}}{CH_3C(H)(OH)OH} \qquad (2)$$

$$\underset{\text{hydrated acetaldehyde}}{CH_3C(H)(OH)OH} + (O) \xrightarrow[\text{dehydrogenase}]{\text{acetaldehyde}} \underset{\text{acetic acid}}{CH_3COOH} + H_2O \qquad (3)$$

<u>สมการที่ 1</u> เป็นการออกซิไดส์เอทธานอลเป็นอะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) โดยใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase)

<u>สมการที่ 2</u> เป็นการสร้างกรดน้ำส้มจากอะซิตัลดีไฮด์ ปฏิกิริยาแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือขั้นตอนแรก อะซิตัลดีไฮด์รวมกับน้ำเป็นไฮเดรตเตดอะซิตัลดีไฮด์ (hydrated acetaldehyde) จากนั้นเกิดปฏิกิริยาขั้นที่ 2 ไฮเดรตเตดอะซิตัลดีไฮด์ถูกออกซิไดส์หรือดีไฮโดรจิเนท (dehydrogenate) เป็นกรดแอซีติก โดยเอนไซม์อะซิตัลดีไฮด์ดีไฮโดรจิเนส (acetaldehyde dehydrogenase) ทำให้โปรตอน (proton) 2 ตัวของไฮเดรตเตดอะซิตัลดีไฮด์ ถูกส่งผ่านไปสู่อะตอมของออกซิเจน ดังสมการที่ 3

เมื่อเติมแคลเซียมซัลไฟต์ (calcium sulfite) หรือ แคลเซียมไบซัลไฟต์ (calcium bisulfite) ซึ่งสามารถจับกับสารอัลดีไฮด์ ดังสมการที่ 4 ลงในถังหมักน้ำส้มสายชู พบว่าไม่มีกรดแอซีติกเพิ่มขึ้น จึงเป็นการยืนยันว่าอะซิตัลดีไฮด์ที่สร้างตามสมการที่ 1 เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในการเกิดกรดแอซีติก

$$2\ CH_3CHO + Ca(HSO_3)_2 \longrightarrow 2\ CH\begin{matrix}OH\\|\\-C-SO_3Ca^{\frac{1}{2}}\\|\\H\end{matrix} \qquad (4)$$

อะซิตัลดีไฮด์อาจเปลี่ยนเป็นกรดแอซีติกได้อีกแนวทางหนึ่ง โดยอะซิตัลดีไฮด์ 2 โมเลกุลจากสมการที่ 1 ทำปฏิกิริยากันเองได้กรดแอซีติกและเอทธานอลดังสมการที่ 5 ซึ่งปฏิกิริยาแบบนี้เรียกว่า ปฏิกิริยาแคนนิซซาโร (Cannizaro reaction) ส่วนเอทธานอลที่เกิดขึ้นจะเข้าสู่สมการที่ 1 อีกเป็นวัฏจักร จนกระทั่งกลายเป็นกรดแอซีติกทั้งหมด ในทางทฤษฎีพบว่าเอทธานอล 1 กรัม สามารถเปลี่ยนเป็นกรดแอซีติกได้ 1.31 กรัม (5)

$$CH_3CHO + CH_3CHO \xrightarrow{H_2O} CH_3COOH + CH_3CH_2OH \qquad (5)$$

acetaldehyde — acetic acid — ethanol

<u>สรุปสมการ</u> การออกซิไดส์เอทธานอลเป็นกรดแอซีติกโดยเชื้อน้ำส้มสายชูดังต่อไปนี้

$$C_2H_5OH + O_2 \longrightarrow CH_3COOH + H_2O$$

ethanol — acetic acid

ขั้นตอนการหมักแอลกอฮอล์และกรดแอซีติกควรแยกจากกัน เพราะการสร้างกรดแอซีติกสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และทำให้การหมักแอลกอฮอล์เป็นไปโดยไม่สมบูรณ์ แม้ว่าจะยังคงมีน้ำตาลเหลืออยู่ (5) นอกจากนั้นประสิทธิภาพการให้อากาศในขั้นตอนการออกซิไดส์แอลกอฮอล์เป็นอะซิตัลดีไฮด์แล้วจะเปลี่ยนเป็นกรดแอซีติกจะมีผลต่ออัตราการเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดแอซีติก (11)

น้ำส้มสายชูมีหลายชนิด แต่ละชนิดจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาทำน้ำส้มสายชูและกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแต่น้ำส้มสายชูที่อยู่ภายใต้การควบคุมของพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารจะแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ (4)

1. น้ำส้มสายชูหมัก (Fermented vinegar) หมายถึงน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักธัญญพืช ผลไม้ หรือน้ำตาลด้วยยีสต์ ให้ได้แอลกอฮอล์แล้วหมักต่อด้วยเชื้อน้ำส้มสายชู ตัวอย่างน้ำส้มสายชูหมักได้แก่

ก. Cider-vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักน้ำแอปเปิ้ลโดยผ่านกระบวนการ double fermentation คือใช้ยีสต์หมักน้ำตาลในน้ำผลไม้ไปเป็นแอลกอฮอล์แล้วเชื้อน้ำส้มสายชูจะหมักแอลกอฮอล์ไปเป็นกรดน้ำส้มตามลำดับ พบผลิตมากในประเทศสหรัฐอเมริกา

ข. Malt vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักข้าวบาร์เลย์ที่กำลังงอก ปริมาณแป้งที่มีในวัตถุดิบจะถูกเอนไซม์ไดแอสเตส (diastase) ที่มีอยู่ในข้าวบาร์เลย์ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล น้ำตาลจะถูกหมักต่อไปเป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์และแอลกอฮอล์จะถูกหมักต่อไปจนได้กรดน้ำส้ม

ค. Grain vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักแบบ double fermentation คือ แป้งจากธัญญพืชจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ไดแอสเตสเป็นน้ำตาลเช่นเดียวกับการทำ malt vinegar

ง. Wine vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักน้ำองุ่นโดยผ่านการหมักแบบ double fermentation เช่นเดียวกัน พบมากในประเทศแถบยุโรป

จ. น้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลไม้ ประเทศไทยมีการผลิตน้ำส้มสายชูหมักที่ทำจากน้ำผลไม้โดยผ่านกระบวนการ double fermentation น้ำผลไม้ที่นิยมนำมาทำน้ำส้มสายชู ได้แก่ น้ำสับปะรด น้ำมะพร้าว หรือน้ำตาลมะพร้าว

น้ำส้มสายชูหมักจัดเป็นน้ำส้มสายชูที่มีกลิ่นหอมและรสชาติดี มีสีแตกต่างกันตามสีของวัตถุดิบที่ใช้ผลิต กลิ่นหอมของน้ำส้มสายชูชนิดนี้ได้จากสารบางชนิดที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักและกลิ่นรสจะดียิ่งขึ้นเมื่อเก็บไว้นาน ๆ (1)

2. น้ำส้มสายชูกลั่น (Distilled vinegar , spirit vinegar หรือ white vinegar) เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการนำสุราขาวเจือจางหรือเอทธานอลกลั่นเจือจางมาหมักด้วยเชื้อน้ำส้มสายชูโดยมีการเติมเกลือแร่และอาหารเสริมที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู (1) ได้แก่ แอมโมเนียม ไนโตรเจน ฟอสเฟต กลูโคส ออโตไลส์ยีสต์ (autolysed yeast) วิตามินและเกลือของกรดอินทรีย์บางชนิด (16)

น้ำส้มสายชูกลั่น อาจได้จากการนำน้ำส้มสายชูที่หมักจากสุราขาวเจือจางหรือเอทธานอลเจือจางตามวิธีที่กล่าวข้างต้นมากลั่นอีกครั้ง หรืออาจได้จากการนำน้ำส้มสายชูหมักมากลั่นอีกครั้ง (4) น้ำส้มสายชูกลั่นมีลักษณะใส ไม่มีสี แต่ขาดกลิ่นรสบางอย่างที่พบในน้ำส้มสายชูหมัก (1,10)

3. น้ำส้มสายชูเทียม (Non-brewed vinegar) เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการนำเอากรดแอซีติกเข้มข้นมาเจือจางให้มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 4 กรัมแต่ไม่เกิน 7 กรัมต่อ 100 มิลลิเมตร ณ อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส (4) จัดเป็นน้ำส้มราคาถูกแต่ขาดกลิ่นรสที่ดี (1)

<u>องค์ประกอบของน้ำส้มสายชู</u>

องค์ประกอบของน้ำส้มสายชูจะกล่าวเฉพาะน้ำส้มสายชูที่ได้จากกระบวนการหมัก ได้แก่น้ำ กรดน้ำส้ม และสารอื่น ๆ เล็กน้อย กรดน้ำส้มทำให้น้ำส้มสายชูมีรสเปรี้ยว มีคุณสมบัติป้องกันการเน่าเสีย และเป็นตัวทำลายที่ดี ในพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารได้กำหนดไว้ว่าน้ำส้มสายชูหมักและน้ำส้มสายชูกลั่นต้องมีความเข้มข้นของกรดแอซีติกไม่ต่ำกว่า 4 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ณ อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส (4) ส่วนสารอื่น ๆ ในน้ำส้มสายชูนั้นมีความสำคัญในด้านกลิ่นรสทำให้น้ำส้มสายชูมีกลิ่นรสดีกว่าน้ำส้มสายชูเทียม สารเหล่านี้มีปริมาณเพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจ

ห้องสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชู หรือเป็นสารที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักน้ำส้มสายชู หรืออาจเกิดจากสารทั้งสองอย่างข้างต้น ทำปฏิกิริยากันเช่น เอทธานอลทำปฏิกิริยากับกรดแอซีติก เป็นเอทธิลอะซิเตต (ethyl acetate) ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสในน้ำส้มสายชูชนิดหนึ่ง ในน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักตามธรรมชาติ จะพบสารระเหย 4 ชนิด ได้แก่ อะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) อะซิตัล (acetal) เอทธิลอะซิเตต (ethyl acetate) และเอทธานอล (ethanol) เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีสารที่ทำให้กลิ่นรสของน้ำส้มสายชูดี คือ คาร์บอนิล (carbonyl) แอลกอฮอล์ และเอสเตอร์ (ester) (10)

วิธีการผลิตน้ำส้มสายชู

วิธีการผลิตน้ำส้มสายชูแบ่งเป็น 3 วิธี คือ

1. วิธีผลิตน้ำส้มสายชูแบบช้า (Slow process) หรือ Surface culture

วิธีผลิตน้ำส้มสายชูแบบนี้เป็นวิธีที่มีมาแต่ดั้งเดิม โดยการตั้งไวน์ทิ้งไว้ในภาชนะเปิดแล้วปล่อยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นกรดน้ำส้มเองตามธรรมชาติ เชื้อน้ำส้มสายชูจะเจริญเป็นแผ่นฝ้าที่ผิวหน้าของไวน์ กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูจึงเป็นแบบ batch ซึ่งจำเป็นต้องมีการสร้างแผ่นฝ้าขึ้นใหม่ทุกครั้ง ทำให้มีการสูญเสียซับสเตรต (substrate) บางส่วนไปโดยไม่เกิดกรดน้ำส้ม กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นช้าและมีประสิทธิภาพต่ำ (17) และมักมีหลายสายเชื้อปะปนกัน (5,42) ต่อมาได้มีการปรับปรุงกระบวนการเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นโดยใช้เชื้อน้ำส้มสายชูบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการผลิตกรดน้ำส้ม (47) การผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำตาลสด (Nipa palm sap vinegar) ในประเทศฟิลิปปินส์นั้น ใช้เชื้อที่ติดอยู่ภายในถังหมักและในน้ำส้มสายชูที่เหลืออยู่ในถังหมักเดิมเป็นกล้าเชื้อ (inoculum) การหมักน้ำส้มสายชูด้วยวิธีนี้มักไม่สมบูรณ์ เพราะพบว่ามีเอทธานอลเหลืออยู่ในน้ำส้มสายชูที่ได้ (25,26) การผลิตน้ำส้มสายชูในระดับครัวเรือนและการผลิตจำหน่ายในประเทศปากีสถานจะใช้แม่น้ำส้ม (mother of vinegar) ปริมาณมาก ๆ เป็นกล้าเชื้อ (51) ส่วนในประเทศไทย มักใช้กล้าเชื้อในรูปของลูกแป้งซึ่งเป็นเชื้อน้ำส้มสายชูที่เก็บไว้ในรูปแห้งผลิตน้ำส้มสายชู (36,37)

ต่อมาได้มีการปรับปรุงวิธีการผลิตน้ำส้มสายชูโดยใช้วิธีกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous) เพื่อลดระยะเวลา และการสูญเสียซับสเตรตเนื่องจากการสร้างแผ่นฝ้าใหม่ของเชื้อ เรียกการหมักวิธีนี้ว่า Orleans process โดยใช้ถังไม้ขนาด 50-100 แกลลอน

วางในแนวนอน มีช่องเล็ก ๆ อยู่ส่วนบนซึ่งมักปิดด้วยผ้าฝ้ายเพื่อกันแมลงมิให้เข้าไปข้างใน แต่อากาศสามารถผ่านได้ดี ถังไม้มีท่อต่อจากส่วนบนของถังไว้สำหรับเติมไวน์ลงสู่ก้นถังเพื่อไม่ให้ไปรบกวนแผ่นฝ้า ภายในถังบรรจุหัวเชื้อน้ำส้มสายชูในปริมาณหนึ่งในสามส่วนของถังหมักแล้วเติมสารละลายแอลกอฮอล์หรือไวน์ลงไป เมื่อการหมักดำเนินไปจนได้ปริมาณกรดตามต้องการแล้ว จึงดูดน้ำส้มสายชูออกสองในสามส่วน แล้วเติมสารละลายแอลกอฮอล์ใหม่ลงไปอีก (29) ถังหมักนี้จะต้องทำความสะอาดทุก ๆ 6-8 ปี (5)

ปัจจุบันไม่นิยมผลิตน้ำส้มสายชูแบบช้าแม้ว่าจะเป็นวิธีที่ให้กรดน้ำส้มที่มีคุณภาพดีที่สุด (16,50) เพราะวิธีนี้ไม่มีระบบให้อากาศซึ่งต้องใช้เวลานานหลายเดือนจึงจะเกิดน้ำส้มสายชูที่มีกลิ่นรสดีจากการเจริญของเชื้อชนิดอื่น การหมักนานๆ จะทำให้มีการสูญเสียแอลกอฮอล์ไปเป็นจำนวนมาก โดยการระเหยและเกิดปฏิกิริยา overoxidation (14)

ต่อมาในประเทศญี่ปุ่นมีการผลิตน้ำส้มสายชูโดยใช้วิธีหมักแบบต่อเนื่อง (continuous)(38) โดยให้สารละลายแอลกอฮอล์ไหลผ่านลงถาดตื้น ๆ ทีละถาดที่วางเรียงกันในอัตราคงที่โดยให้รบกวนแผ่นฝ้าน้อยที่สุด พบว่าอัตราการผลิตน้ำส้มสายชูจะสูงกว่าวิธีผลิตแบบเร็ว (quick process) แต่ต่ำกว่าวิธีผลิตแบบซับเมอร์ก (submerged process)

การผลิตน้ำส้มสายชูแบบช้าหรือการใช้เชื้อเจริญที่ผิวหน้านี้จะใช้เวลาการผลิตนานกว่าวิธีอื่น ๆ ถังหมักแบบ Orleans process 1 ถัง จะผลิตน้ำส้มสายชูได้เพียงครึ่งถังต่อเดือน แต่เป็นวิธีที่ง่ายและใช้อุปกรณ์ราคาถูก ไม่ต้องมีระบบหล่อเย็น (cooling system) เพราะกระบวนการเกิดกรดช้า ทำให้ใช้พลังงานน้อยแต่ต้องใช้เนื้อที่และแรงงานมาก ดังนั้นในประเทศที่กำลังพัฒนาที่มีค่าแรงงานและราคาที่ดินต่ำจึงยังคงใช้วิธีนี้อยู่ (5)

2. <u>วิธีผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็ว</u> (Quick process)

วิธีผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็ว มีอัตราการเกิดกรดสูงกว่าวิธีผลิตน้ำส้มสายชูแบบช้า เนื่องจากปรับปรุงให้มีพื้นที่ผิวของแผ่นฝ้าเชื้อน้ำส้มสายชูมากขึ้น ปรับปรุงระบบการให้อากาศ ใช้ถังหมักที่เรียกว่าเจนเนอเรเตอร์ (generator) ภายในบรรจุวัสดุตัวกลาง (packing) เพื่อให้เชื้อเกาะ วัสดุตัวกลางมักนิยมใช้พวกเซลลูโลส (cellulose) เช่น เปลือกไม้ ก้านองุ่น หวาย ซังข้าวโพด ชานอ้อย ถ่านไม้ กระเบื้อง และพลาสติก เป็นต้น

(5,29,42) ก่อนหมักล้างวัสดุตัวกลางให้สะอาดแล้วล้างด้วยน้ำส้มสายชูที่ยังไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ เพื่อให้มีเชื้อน้ำส้มสายชูเกาะกับวัสดุตัวกลาง ในการหมักค่อย ๆ ให้สารละลายแอลกอฮอล์ไหลผ่านวัสดุตัวกลางอย่างช้า ๆ จากส่วนบนถังหมักลงมาถึงก้นถัง พร้อมกับพ่นอากาศจากส่วนล่างขึ้นไป เชื้อน้ำส้มสายชูจะเจริญอย่างรวดเร็ว และจะออกซิไดส์แอลกอฮอล์เป็นกรดน้ำส้มแล้วกรดน้ำส้มจะไหลลงมาในภาชนะที่รองรับ (1) ต่อมามีการปรับปรุงวิธีการผลิตให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นคือ การนำกรดน้ำส้มที่ยังเกิดกรดไม่สมบูรณ์กลับมาผ่านถังหมักอีกครั้ง มีการใช้เครื่องพ่นสารละลายแอลกอฮอล์เพื่อให้มีการกระจายดีขึ้นและมีการควบคุมอุณหภูมิและการให้อากาศภายในถังหมัก ถังหมักที่นิยมใช้เป็นของบริษัท Frings ประเทศเยอรมนี เรียกถังหมักนี้ว่า Frings generator ซึ่งเป็นการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous)

การใช้เจนเนอเรเตอร์ผลิตน้ำส้มสายชู เมื่อเชื้อน้ำส้มสายชูสร้างเซลลูโลส เช่นเชื้อ A. xylinum จะทำให้เกิดการอุดตันของวัสดุตัวกลาง ฉะนั้นเมื่อใช้เจเนอเรเตอร์ไปช่วงเวลาหนึ่งจะต้องทำการเปลี่ยนวัสดุตัวกลางใหม่ แต่การผลิตน้ำส้มสายชูกลั่นนั้นใช้วัตถุดิบที่มีสารอาหารน้อย เชื้อน้ำส้มสายชูจะเจริญเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทำให้สามารถใช้วัสดุตัวกลางหนึ่ง ๆ ได้นานหลายปี (35) ส่วนสารละลายแอลกอฮอล์ที่มีสารอาหารมากอาจทำให้เชื้อเจริญช้าลงโดยการหมักที่อุณหภูมิสูง หรือใช้สารละลายแอลกอฮอล์ที่มีค่า GK [1/] สูง (5)

การผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็ว มักใช้ระบบกึ่งต่อเนื่องจึงต้องเติมเอทธานอลปริมาณเล็กน้อยในน้ำส้มสายชูที่ได้เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยา overoxidation ที่เกิดจากเชื้อน้ำส้มสายชูออกซิไดส์กรดน้ำส้มเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้สูญเสียกรดน้ำส้มไป (46) และการมีเอทธานอลปริมาณเล็กน้อยยังทำให้กลิ่นของน้ำส้มสายชูดีขึ้นด้วย เนื่องจากเอทธานอลจะถูกเปลี่ยนเป็นเอสเตอร์ (ester) ในระหว่างการเก็บน้ำส้มสายชู

วิธีผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็วนี้ นอกจากจะให้ผลเร็วกว่าวิธีผลิตแบบช้าแล้ว ยังมักให้ปริมาณกรดน้ำส้มสูงกว่าด้วย (11) การใช้วัตถุดิบที่มีค่า GK เป็น 10 และมีปริมาณเอทธานอล 4 เปอร์เซ็นต์จะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดถึง 85-95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหมักเป็นเวลา 4-5 วัน (5,42) น้ำส้มสายชูที่ได้จากการผลิตแบบเร็วจะมีคุณภาพดีและใสเนื่องจากมีการกรอง (6) อยู่แล้ว

[1/] GK (Ger. Gesammte Konzentration) = ผลรวมของความเข้มข้นของเอทธานอล (% โดยปริมาตร) และกรดน้ำส้ม (% น้ำหนักต่อปริมาตร)

3. การผลิตน้ำส้มสายชูแบบซับเมอร์ก (Submerged culture)

การผลิตน้ำส้มสายชูแบบซับเมอร์กไม่จำเป็นต้องใช้วัสดุตัวกลางเพื่อให้เชื้อน้ำส้มสายชูเกาะ แต่เชื้อจะอยู่ในสารละลายแอลกอฮอล์โดยตรง มีการให้อากาศหรือออกซิเจนเข้าไปในลักษณะของฟองอากาศ มีเครื่องปั่นกวนให้เชื้อน้ำส้มสายชูและฟองอากาศกระจายไปทั่วถังหมัก การหมักวิธีนี้จึงจำเป็นต้องมีระบบการให้อากาศที่มีประสิทธิภาพดีและสม่ำเสมอ Hromatka และ Ebner (31) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณออกซิเจนสำหรับการผลิตน้ำส้มสายชูแบบซับเมอร์ก 2 วิธี คือวิธีแรกเป็นการเพิ่มปริมาณอากาศเพื่อพ่นลงในสารละลายแอลกอฮอล์ วิธีที่สองคือลดขนาดของฟองอากาศ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของออกซิเจนในการซึมผ่านสู่สารละลาย เขาได้พบว่าการลดขนาดฟองอากาศให้ผลดีกว่าการเพิ่มปริมาณอากาศ เพราะการเพิ่มปริมาณอากาศจะทำให้มีการสูญเสียแอลกอฮอล์และกรดน้ำส้มมากขึ้น

ถังหมักที่นิยมใช้ผลิตน้ำส้มสายชูแบบซับเมอร์ก ได้แก่

ก. ถังหมักแบบอะซิเตเตอร์ (acetator) ที่ผลิตโดยบริษัท Heinrich Frings ประเทศเยอรมนี (22) ถังหมักทำด้วย stainless steel ขนาดตั้งแต่ 750 - 12,000 ลิตร มีระบบการให้อากาศ (aeration) ที่มีประสิทธิภาพสูง มีเครื่องกวนของเหลว (agitator) อยู่บริเวณก้นถัง ตลอดจนมีระบบหล่อเย็น (cooling system) เพื่อควบคุมอุณหภูมิของถังหมักซึ่งทั่ว ๆไปมีค่าประมาณ 30 °ซ การผลิตน้ำส้มสายชูแบบซับเมอร์กมักมีปัญหาการเกิดฟอง (foam) ซึ่งจะทำให้สูญเสียของเหลวและทำให้การถ่ายเทอากาศสู่ภายนอกลดลง ทำให้อัตราการละลายออกซิเจนลดลงด้วย อาจแก้ไขได้โดยใช้สารกำจัดฟองบางชนิด เช่น ซิลิโคน (silicone) (5) หรือใช้เครื่องกำจัดฟอง (defoamer) โดยใช้แรงเหวี่ยง (centrifugal force) ติดอยู่ด้านบนตัวถัง (23) ทำลายฟองให้แตกเป็นของเหลวและแก๊ส

การผลิตน้ำส้มสายชูแบบซับเมอร์กที่ใช้อะซิเตเตอร์จะผลิตกรดได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงกว่าการผลิตน้ำส้มสายชูที่ใช้เจเนอเรเตอร์ประมาณ 10 เท่าในปริมาตรเท่ากัน (42) ตลอดจนควบคุมเครื่องมือได้ง่าย ใช้แรงงานคนและเนื้อที่น้อย แต่มีต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูงและต้องใช้พลังงานมาก นอกจากนี้ หากมีเหตุขัดข้องเกี่ยวกับระบบควบคุมอัตโนมัติก็จะได้รับความเสียหายสูง (5,42)น้ำส้มสายชูที่ได้จากการผลิตแบบซับเมอร์กจะมีความขุ่นมาก เนื่องจากมีเซลล์แบคทีเรีย และสารอื่น ๆ ที่ไม่ละลายแขวนลอยอยู่ จึงต้องมีขั้นตอนการทำให้ใสก่อน (6,42)

การผลิตน้ำส้มสายชูแบบชีบเมอร์กจะใช้น้ำส้มสายชูที่ยังไม่ได้ฆ่าเชื้อเป็นกล้าเชื้อ โดยเตรียมกล้าเชื้อในภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญตั้งแต่การให้อากาศ ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ตลอดจนสารอาหาร การเตรียมกล้าเชื้อใช้เวลาประมาณ 7-21 วัน การหมักในอะซิเตเตอร์ของบริษัท Heinrich Frings นั้น จะเตรียมกล้าเชื้อจากเชื้อไลโอฟิไลส์ (lyophilized culture) ที่คัดเลือกแล้วว่าสามารถผลิตกรดน้ำส้มได้ดี (42) ส่วนโรงงานผลิตน้ำส้มสายชูบางแห่งในประเทศไทยที่ใช้ถังหมักผลิตจาก บริษัท Heinrich Frings ประเทศเยอรมนี ทางบริษัทจะจำหน่ายถังหมักอะซิเตเตอร์พร้อมด้วยเชื้อน้ำส้มสายชูสายเชื้อที่ไม่เจริญบนอาหารแข็งธรรมดาและจำหน่ายสารอาหารที่เรียกว่าอะซิโตไซม์ (acetozyme) นำมาผสมกับสารละลายเอทธานอลเป็นวัตถุดิบ แบคทีเรียเชื้อน้ำส้มสายชูและส่วนประกอบของอะซิโตไซม์นี้ ยังไม่เป็นที่เปิดเผยในปัจจุบัน (3)

ข. ถังหมักแบบ Yeoman's Cavitator ผลิตโดยบริษัท Yeoman Brothers ประเทศสหรัฐอเมริกา (12,39) ลักษณะส่วนมากคล้ายอะซิเตเตอร์แต่ต่างกันที่ระบบให้อากาศ โดยของเหลวและอากาศจะถูกดูดลงมาทางท่อจากด้านบนสู่ส่วนกลางของถังอย่างต่อเนื่องและมีใบพัดกวนให้ของเหลวผสมกับอากาศอย่างทั่วถึงแล้วของเหลวจะไหลย้อนขึ้นไปเพื่อให้กระจายทั่วถังหมัก ถังหมักชนิดนี้ไม่นิยมใช้กันแพร่หลายนักแต่ยังคงมีใช้บ้างในประเทศสหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น (16,42)

ค. Bourgeois process วิธีการผลิตน้ำส้มสายชูแบบนี้ ใช้ในประเทศสเปนและอิตาลี (21,42) ประกอบด้วยถังหมัก 2 ใบ คือถังเตรียมกล้าเชื้อและถังหมัก กล้าเชื้อจะถูกถ่ายไปยังถังหมักและมีการให้อากาศ กระบวนการผลิตจะสิ้นสุดเมื่อเอทธานอลถูกใช้หมด บางครั้งอาจมีการเติมเอทธานอลปริมาณเล็กน้อยลงในน้ำส้มสายชูที่ได้เพื่อให้เกิดกลิ่นรสดีระหว่างการเก็บ วิธีผลิตแบบนี้ใช้เวลานาน เหมาะสำหรับการผลิตน้ำส้มสายชูที่มีปริมาณกรดต่ำเท่านั้น (42)

ง. Fardon process (52) วิธีนี้ใช้ในประเทศที่อยู่ในทวีปอัฟริกาใต้ที่ผลิตน้ำส้มสายชูจากข้าวมอลท์ (malt) โดยของเหลวจะถูกดูดจากถังผ่านที่พ่นอากาศ (venturi nozzle) แล้วไหลย้อนกลับลงสู่ถังหมักแบบระบบไหลวน (circulation system) วิธีนี้ผลิตได้ช้า มีประสิทธิภาพต่ำ ใช้เวลานานและใช้พลังงานสูง (42)

จ. Tower Fermentor ใช้ผลิตน้ำส้มสายชูในประเทศอังกฤษวิธีการหมักเป็นแบบระบบต่อเนื่อง ถังหมักมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 ฟุต สูง 20 ฟุตภายในมีแผ่น

พลาสติกเจาะรูหลายแผ่นวางคั่นตามแนวขวางของตัวถัง ผลิตน้ำส้มสายชูได้ทุกชนิด (42) ถังหมักชนิดนี้ให้ผลผลิตเท่ากับอะซิเดเตอร์ แต่ราคาถูกกว่าครึ่งหนึ่ง แต่ในระดับอุตสาหกรรมยังไม่นิยมใช้กันมากนัก (16)

ฉ. Vinegator ผลิตโดยบริษัท Swiss Company Chemap มีทั้งเครื่องกวนอากาศและเครื่องอัดอากาศที่ควบคุมด้วย polarographic oxygen electrode ซึ่งจะทำงานเมื่อปริมาณออกซิเจนในสารละลายลดต่ำลงกว่าที่กำหนด จึงเป็นวิธีการใช้พลังงานอย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำลง (41)

น้ำส้มสายชูที่ได้จากการผลิตด้วยวิธีต่าง ๆ ดังกล่าวนี้จะมีปริมาณกรดน้ำส้มประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ บางครั้งอาจมีการนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นเพื่อสะดวกในการเก็บและขนส่งหรือนำไปดองอาหารที่มีความชื้นสูง การทำให้น้ำส้มสายชูเข้มข้นขึ้นมีหลายวิธี เช่น การกลั่นตามลำดับส่วน จะทำให้น้ำส้มสายชูที่ได้มีความเข้มข้นของกรดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ จากความเข้มข้นเดิม 10 เปอร์เซ็นต์หรือใช้วิธีแช่แข็ง (freezing) แล้วแยกเอาผลึกน้ำแข็งออก จะได้กรดน้ำส้มที่มีความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ จากความเข้มข้นเดิม 12 เปอร์เซ็นต์ หรือใช้วิธีผสมน้ำส้มสายชูกับ Trichlorofluoromethane ที่อุณหภูมิต่ำ แล้วกลั่นจะได้น้ำส้มสายชูมีความเข้มข้นสูงถึง 87 เปอร์เซ็นต์ (5)

แบคทีเรียกรดแอซีติก

แบคทีเรียกรดแอซีติกเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ (aerobic) ในการเจริญเติบโต และสามารถออกซิไดส์เอทธานอลไปเป็นกรดน้ำส้ม (acetic acid) เซลล์มีรูปร่างตั้งแต่กลม รี จนถึงเป็นท่อนตรง ๆ หรือเป็นท่อนโค้งเล็กน้อย ขนาดของเซลล์มีตั้งแต่ 0.6-0.8 x 1.0-4.0 ไมโครเมตร การเรียงตัวของเซลล์มีหลายลักษณะ อาจพบเซลล์อยู่เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือเรียงตัวเป็นสายยาว ๆ หรือสั้น ๆ แตกต่างกันแล้วแต่ชนิด (species) ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ย้อมติดสีแกรมลบ (Gram-negative) แต่เซลล์ที่อายุมากอาจย้อมติดสีแกรมบวก (Gram-positive) (13,18,19) เซลล์สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดน้ำส้มตั้งแต่ 2-11 เปอร์เซ็นต์ (45,49) แบคทีเรียกรดแอซิติกแบ่งออกเป็น 2 สกุล (genus) คือ Acetobacter และ Gluconobacter แต่เดิมเรียก Gluconobacter เป็น Acetomonas (18,19) แบคทีเรียทั้งสองสกุลนี้มีคุณสมบัติเหมือนกันหลายประการ และมักพบอยู่ปะปนกันในถังหมักน้ำส้มสายชูตามธรรมชาติ แต่ Gluconobacter

เจริญในซับสเตรต (substrate) ที่มีเอทธานอลได้ต่ำ มีความสามารถออกซิไดส์เอทธานอลเป็นกรดแอซีติกค่อนข้างต่ำ (7,27) ดังนั้นการผลิตน้ำส้มสายชูจึงมักใช้ Acetobacter ออกซิไดส์เอทธานอลเป็นกรดแอซีติก แต่ Acetobacter แต่ละสายเชื้อ (strain) ก็มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแอซีติกแตกต่างกัน การผลิตน้ำส้มสายชูจะเลือกใช้สายเชื้อที่ให้กรดแอซีติกสูงกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และเรียกแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูนี้ว่าเชื้อน้ำส้มสายชู

จากการที่แบคทีเรียสกุล Acetobacter และ Gluconobacter มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกันหลายประการ และยังมีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรียสกุล Pseudomonas ทำให้มีปัญหาในการจำแนกเชื้อทั้งสามสกุลนี้ De Ley และ Frateur (18) ได้รวบรวมลักษณะที่แตกต่างกันของแบคทีเรียทั้งสามสกุลดังแสดงในตารางที่ 1

Acetobacter และ Gluconobacter มักเจริญปะปนกันเพราะสามารถเจริญได้ดีในภาวะแวดล้อมที่คล้ายคลึงกัน ดังนั้นการแยก Acetobacter spp. ออกจาก Gluconobacter spp. จะใช้คุณสมบัติที่แตกต่างกันบางอย่างของแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือใช้คุณสมบัติความสามารถออกซิไดส์กรดแอซีติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำในภาวะที่ขาดเอทธานอลของ Acetobacter spp. คุณสมบัตินี้เรียกว่าการเกิด overoxidation ซึ่งถือเป็นการออกซิไดส์ที่สมบูรณ์ แต่ Gluconobacter spp. จะขาดคุณสมบัติดังกล่าว (43) หรือใช้ความสามารถออกซิไดส์แลกเตต (lactate) เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ของ Acetobacter spp. ที่จัดเป็นพวกแลกตาไฟล์ (lactaphile) คือเจริญได้ดีเมื่อใช้แลกเตตเป็นแหล่งคาร์บอน(15) ส่วน Gluconobacter spp.จัดเป็นพวกไกลโคไฟล์ (glycophile) คือเจริญได้ดีในกลูโคส แต่ไม่สามารถเจริญในแลกเตตได้ Gluconobacter spp. สามารถผลิตกรดกลูโคนิก (gluconic acid) จากกลูโคสได้ดี (7) ไม่สามารถสร้างแผ่นฝ้า (film) ได้ในอาหารเหลว และเจริญได้ไม่ดีในอาหารที่มีเอทธานอลเป็นองค์ประกอบ

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของแบคทีเรียสกุล Gluconobacter, Acetobacter และ Pseudomonas

คุณสมบัติ	Gluconobacter	Acetobacter	Pseudomonas
Flagellation	Polar or none	Peritrichous or none	Polar
Growth at pH 4.5	+	+	-
Oxidation of:			
Ethanol to acetic acid at pH 4.5	+ (M)[1/]	+ (S)	-
Acetic acid to CO_2	-	+	d
Lactate to CO_2	-	+	+
Glucose to gluconate	+	d	d
Amino acid by resting cells	-	+	+
Krebs cycle	-	+	+
Production of			
5-ketogluconate	+	d	-
Ketogenesis	+	d	-
Quinones Q_{10}	+	-	
Q_9	-	+	
Hydrolysis of:			
Lactose and starch	-	-	d
Gelatin	-/W	-	d
Greenish and/or fluorescent pigments	-	-	d

[1/] M = moderate; S = strong; W = weak ; d = 11-89% strains positive

ที่มา : De Ley and Frateur (18)

คุณสมบัติทั่วไปของ Acetobacter spp.

Acetobacter spp. มีรูปร่างของเซลล์ได้หลายลักษณะ (pleomorphic) โดยปกติจะพบรูปร่างค่อนข้างรีจนกระทั่งเป็นท่อนชัดเจน อาจพบเซลล์เดี่ยว ๆ จับกันเป็นคู่ หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ บางครั้งพบเซลล์ที่มีรูปร่างแปลกไปจากที่กล่าวมาแล้วเช่นรูปร่างกลมยืดยาวออก บวมหรือรูปกระบอง บางชนิดมีแส้เซลล์ (flagellum) แบบรอบเซลล์ (peritrichous) ทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้ (19) บางชนิดไม่สามารถเคลื่อนที่ได้และมีหลายชนิด (species) ที่สร้างแคปซูลได้ (44) Acetobacter spp.จะย้อมติดสีแกรมลบ แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะติดสี Gram variable ไม่พบการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุ (pigment) แต่เมื่อเซลล์อยู่รวมกันมาก ๆ อาจมีสีชมพูเนื่องจากอิทธิพลของสารพอร์ไฟริน (porphyrin) บางสายเชื้อสามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล (19) Acetobacter spp. เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (obligate aerobe) เพราะไม่สามารถใช้สารอื่นนอกจากออกซิเจนเป็นตัวรับไฮโดรเจนตัวสุดท้ายในกระบวนการเปลี่ยนอาหารให้เป็นพลังงาน (19) ในถังหมักน้ำส้มสายชูที่ไม่มีการพ่นอากาศเชื้อจะเจริญอยู่ที่ผิวหน้าของเหลวเป็นแผ่นฝ้า (5,16,54) เชื้อนี้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกันตามสายเชื้อ ส่วนมากจะเจริญได้ ณ อุณหภูมิระหว่าง 5-42 องศาเซลเซียส (°ซ) แต่จะเจริญได้ดี ณ อุณหภูมิ 30 °ซ (13) เชื้อเจริญได้ในที่มีความเป็นกรดด่าง (pH) ค่อนข้างต่ำ คือตั้งแต่ 4.0-4.5 แต่เจริญได้ดีที่ pH 5.4-6.3 และเจริญได้เล็กน้อยที่ pH 7-8 (19)

Acetobacter spp. แต่เดิมจะถูกจำแนกเป็นหลายชนิดตามคุณสมบัติต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งบางสายเชื้อไม่มีการนำมาใช้ผลิตน้ำส้มสายชู ต่อมา De ley และ Frateur (19) ได้รวบรวมลักษณะต่าง ๆ และจำแนกใหม่ ดังแสดงในตารางที่ 3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 คุณสมบัติที่จำแนกแบคทีเรียสกุล Acetobacter ออกเป็นชนิด

คุณสมบัติ	แบคทีเรีย[1/]							
	a	b	c	d	e	f	g	h
Overoxidation of ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	−	−
Growth in Hoyer's medium[2/]	+	−	−	+	−	−	+	−
Acid from glucose	+	+	+	+	+	−	−	−
Dihydroxyacetone from glycerol	+	+	+	−	−	−	−	−
Production of cellulose	−	+	−	−	−	−	−	−
Brown pigment	−	−	−	−	−	−	−	−

[1/] a = A. aceti
b = A. xylinum
c = A. mesoxydans
d = A. lovaniensis
e = A. rancens
f = A. ascendens
g = A. peroxydans
h = A. paradoxus

[2/] In Hoyer's medium : ethanol, 3% (v/v) ; $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% ; K_2HPO_4, 0.01% ; KH_2PO_4, 0.09% ; $MgSo_4 7H_2O$, 0.025% $FeCl_3$, 0.0005%

ที่มา : Gibbs and Shapton (27)

ตารางที่ 3 คุณสมบัติที่ใช้จำแนกแบคทีเรียสกุล Acetobacter เป็นชนิดและชนิดย่อย

คุณสมบัติ	A. aceti				A. pasteurianus					A. peroxydans
	1a	1b	1c	1d	2a	2b	2c	2d	2e	
Catalase	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	-
Ketogenesis in glycerol or erythritol	+[1]	+[1]	+[1]	+[1]	-[2]	-[2]	-[2]	-[2]	-	-
Formation of :										
5-ketogluconate	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-
2-ketogluconate	(+)	(+)	(+)	(+)	d	-	-	-	-	-
Gluconate	+	+	+	+	(+)	+	+	-	-	-
Growth on ethanol[3]	+	-	(-)	+	(-)	+	+	-	-	+
Produces :										
Cellulose	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
r-Pyrones	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Brown pigment	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
G + C, moles %	59-65	60-61	62-63	64	55-62		62		55-56	61-64

Subspecies : 1a = aceti 2a = pasteurianus

1b = orleanensis 2b = lovaniensis

1c = xylinum 2c = estunensis

1d = liquefaciens 2d = ascendens

2e = paradoxus

[1] Moderate to strong

[2] Negative or very week;( ) usually positive or negative

[3] In Hoyer-Frateur medium : ethanol, 3% (v/v); $(NH_4)_2SO_4$, 0.1%; K_2HPO_4, 0.01%; KH_2PO_4, 0.09%; $MgSO_4.7H_2O$, 0.025%; $FeCl_3$, 0.0005%

ที่มา : De Ley and Frateur (19)

การจำแนกชนิดของ Acetobacter spp. โดย De Ley และ Frateur (19) ในตารางที่ 3 ได้จำแนก Acetobacter spp. ออกเป็น 3 ชนิด (species) ได้แก่ A. aceti ประกอบด้วย 3 subspecies คือ aceti , orleanensis , xylinum และ liquefaciens A. pasterianus ประกอบด้วย 5 subspecies คือ pasterianus, lovaniensis , estunensis , ascendens และ paradoxus และ A. peroxydans ต่อมา Gillis และ De Ley (20,28) ได้จำแนก Acetobacter spp. ออกเป็น 4 ชนิด (species) ได้แก่ A. aceti , A. liquefaciens , A. pasteurianus และ A. hansenii ตามคุณสมบัติต่าง ๆ ที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4

แหล่งที่พบ Acetobacter spp.

เชื้อน้ำส้มสายชูเป็นแบคทีเรียที่เจริญในภาวะที่มีอากาศเท่านั้น มักพบเจริญร่วมกับยีสต์ตามผิวของพืชหลายชนิดโดยเฉพาะดอกไม้และผลไม้ เมื่อยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทธานอล แล้วเชื้อน้ำส้มสายชูจะออกซิไดส์เอทธานอลเป็นกรดน้ำส้ม (49) นอกจากนี้ ยังพบในน้ำส้มสายชูเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ในประเทศไทยมีผู้รายงานว่า พบเชื้อน้ำส้มสายชูในน้ำตาลสด น้ำตาลปี๊บ น้ำตาลเมา กระแช่ ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้า (1) และเหล้าขาว (2) พบเจริญเป็นแผ่นบาง ๆ ลอยอยู่ที่ผิวหน้าของสารละลายที่มีแอลกอฮอล์ เชื้อน้ำส้มสายชูบางชนิดสามารถสร้างเซลลูโลสได้ ทำให้เห็นเป็นแผ่นหนาเจริญร่วมกับยีสต์ในน้ำชาเดิมน้ำตาลที่เราเรียกว่าเบ็น เห็ดรัสเซีย (tea fungus) เพราะมีลักษณะคล้ายดอกเห็ด (30)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 คุณสมบัติที่ใช้จำแนกแบคทีเรียสกุล Acetobacter ออกเป็นชนิดต่าง ๆ

คุณสมบัติ	1. A. aceti	2. A. liquefaciens	3. A. pasteurianus	4. A. hansenii
Formation of:				
Water-soluble brown pigments on GYC[1/]	-	+	-	-
γ-Pyrones from D-glucose	-	d	-	-
γ-Pyrones from D-fructose	-	+	-	-
5-Ketogluconic acid from D-glucose	+	d	-	d
2,5-Diketogluconic acid from D-glucose	-	+	-	-
Ketogenesis from glycerol	+	+	-	+
Growth on carbon sources :				
Ethanol	+	+	d	-
Dulcitol	-	-	-	d
Na-Acetate	+	d	d	-
Growth on L-amino acids in the presence of D-mannitol as carbon source :				
L-Glycine, L-threonine, L-tryptophan	-	d	-	-
L-Asparagine, L-glutamine	d	+	-	+
Growth in the presence of 10 % ethanol	-	-	d	-
Mol% G+C (T_m)[2/]	55.9-59.5	62.3-64.6	52.8-62.5	58.1-62.6

1/ GYC, 5% D-glucose+1% yeast extract+3% $CaCO_3$+2.5% agar.

2/ Gillis and De Ley (28)

ที่มา : De Ley, Gillis and Swings (20)

ตารางที่ 4.1 คุณสมบัติอื่น ๆ ที่ใช้จำแนกแบคทีเรียสกุล Acetobacter ออกเป็นชนิดต่าง ๆ

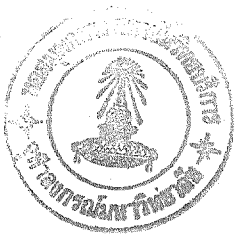
Characteristics	1. *A. aceti* (7 strains)	2. *A. liquefaciens* (10 strains)	3. *A. pasteurianus* (66 strains)	4. *A. hansenii* (12 strains)
Colony morphology after 10 days on GYC medium:[a]				
Moderate to abundant growth	57	100	83	83
Translucent colony	0	10	2	0
Pale color	100	40	98	100
Pink color	0	0	2	25
Water-soluble brown pigment	0	90	0	0
Diameter <3 mm	71	70	90	75
Flat profile	14	10	21	8
Regular edge	43	20	57	25
Cell morphology of 2- to 3-day-old cultures:				
Gram-negative cells	100	100	79	100
Gram-variable cells	0	0	21	0
Rods	86	100	64	92
Ovoids-coccoids	71	30	73	33
Tapered cells	71	10	24	33
Filaments	0	70	32	50
Chains	0	20	34	33
Curved cells	57	40	39	75
Cells in pairs	57	90	83	92
Enlarged irregular involution forms	14	10	21	25
Diameter ≥0.7 μm	57	40	53	75
Motile cells	14	30	17	0
Biochemical reactions:				
Catalase	100	100	94	100
Nitrate reduction	0	0	9	8
Ferric chloride reaction on:				
D-Glucose	0	80	0	0
D-Fructose	0	90	2	0
D-Galactose	0	30	0	0
Ketogenesis from:				
Glycerol	100	100	9	92
D-Mannitol	86	100	47	92
Sorbitol	100	90	36	92
Oxidation of Ca-D,L-lactate	100	100	91	100
Formation of acetylmethylcarbinol from Ca-D,L-lactate	14	20	56	58
Formation of 2-ketogluconic acid from D-glucose	100	90	65	92
Formation of 5-ketogluconic acid from D-glucose	100	40	9	66
Formation of 2,5-diketogluconic acid from D-glucose	0	90	0	0
Final pH lower than 4.5 on:				
D-Xylose	100	80	36	66
D-Glucose	100	100	82	100
D-Galactose	14	0	8	8
Final pH lower than 5.9 on:				
Ethanol	100	100	91	83
n-Propanol	100	100	95	92
n-Butanol	100	100	89	92
n-Amyl alcohol	0	30	48	25
Glycerol	0	50	2	42
meso-Erythritol	0	60	2	17
D-Mannitol	0	0	2	0
Sorbitol	0	0	0	8
Meso-Inositol	0	0	2	8
D-Arabinose	14	10	0	8
D-Ribose	57	80	9	50
D-Fructose	0	0	0	8
D-Mannose	100	100	59	92
Cellobiose	0	0	0	0
Lactose	0	0	0	0

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Characteristics	1. *A. aceti* (7 strains)	2. *A. liquefaciens* (10 strains)	3. *A. pasteurianus* (66 strains)	4. *A. hansenii* (12 strains)
Sucrose	0	10	2	33
Maltose	0	0	9	58
Dextrin	0	0	0	0
Starch	0	0	0	0
Growth on carbon sources:				
Methanol	0	0	11	0
Ethanol	100	100	79	0
n-Propanol	71	100	38	0
Ethanediol	14	80	3	0
meso-Erythritol	29	100	3	0
meso-Ribitol	14	60	2	0
L-Arabitol	14	30	0	0
meso-Xylitol	0	20	0	0
D-Mannitol	100	90	15	50
Sorbitol	43	60	9	0
meso-Inosaitol	14	20	8	17
Dulcitol	0	0	0	25
D-Ribose	14	80	9	0
D-Xylose	29	40	30	0
D-Lyxose	0	10	0	0
D-Fucose	0	10	15	0
L-Arabinose	29	40	8	0
D-Galactose	14	100	23	0
D-Fructose	57	100	30	58
D-Glucose	57	100	30	50
Ca-D,L-Gluconate	14	100	17	58
D-Mannose	14	30	6	0
L-Sorbose	0	0	2	0
Cellobiose	14	20	0	0
Sucrose	14	70	0	17
Maltose	29	50	18	17
Raffinose	0	10	0	0
Dextrin	14	20	0	0
Na-Acetate	100	80	58	0
Ca-D,L-Glycerate	43	100	35	17
Na-D,L-Lactate	100	100	62	25
Na-Malonate	0	0	2	0
Na-L-Malate	0	40	33	8
Na-Citrate	0	20	11	0
Growth on single L amino acids as sole source of nitrogen:				
L-Alanine	86	80	24	100
L-Arginine	0	60	0	17
L-Asparagine	14	90	5	100
L-Aspartic acid	29	70	2	75
L-Cysteine	0	70	2	17
L-Glutamine	29	90	9	100
L-Glutamic acid	57	90	15	100
L-Glycine	0	80	0	8
L-Histidine	0	30	0	8
L-Isoleucine	0	50	0	8
L-Leucine	0	40	0	17
L-Lysine	0	100	3	25
L-Methionine	0	60	0	8
L-Phenylalanine	0	50	0	17
L-Proline	86	100	27	42
L-Serine	0	0	0	8
L-Threonine	0	50	0	0
L-Tryptophan	0	70	0	0
L-Tyrosine	0	30	2	25
L-Valine	0	0	0	8
Growth on single L-amino acids as sole source of both carbon and nitrogen:				
L-Alanine	0	0	6	0

ที่มา : De Ley , Gillis and Swings (20)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทที่ 2

แนวเหตุผล วัตถุประสงค์ และขอบเขตของการวิจัย

น้ำส้มสายชูเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองที่ได้จากการหมักสองกระบวนการคือ กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ที่ใช้ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (5,29) และต่อด้วยกระบวนการหมักน้ำส้มสายชู ที่ใช้เชื้อน้ำส้มสายชูเปลี่ยนแอลกอฮอล์ไปเป็นกรดน้ำส้มในภาวะที่มีออกซิเจน (6,16) โดยทั่วไปจะจำแนกน้ำส้มสายชูออกเป็น 3 ชนิด (4) ได้แก่ น้ำส้มสายชูหมัก น้ำส้มสายชูกลั่น และน้ำส้มสายชูเทียม สองชนิดแรกเป็นผลผลิตจากเชื้อน้ำส้มสายชูซึ่งได้ผลิตกันมาอย่างแพร่หลายทั่วโลกและในประเทศไทย ทั้งระดับอุตสาหกรรมและครัวเรือน เพราะเป็นน้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพดีทั้งกลิ่น สี และรสตลอดจนไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคตรงที่น้ำส้มสายชูเทียมมักมีการปลอมปนด้วยกรดกำมะถันหรือกรดแร่อื่น ๆ เพื่อลดต้นทุนการผลิต เดิมในประเทศไทยได้ผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำตาลเมาและกระแช่โดยใช้ลูกแป้งน้ำส้ม (1) จัดเป็นน้ำส้มสายชูหมักที่ผลิตแบบช้าขายกันในครัวเรือน จนเมื่อประมาณสามสิบปีที่ผ่านมานี้มีการผลิตน้ำส้มสายชูจากสับปะรดด้วยวิธีการแบบซับเมอร์ก (submerged culture) ที่ใช้ถังหมักแบบอะซิเตเตอร์ (acetator) แต่ในระยะนั้นได้มีน้ำส้มสายชูเทียม ซึ่งได้จากการนำกรดแอซีติกมาเจือจางจำหน่าย เป็นที่นิยมมากเพราะมีราคาถูก ต่อมามีการส่งเสริมให้ผลิตน้ำส้มสายชูในประเทศมากขึ้น จนประชาชนเริ่มหันมานิยมบริโภคน้ำส้มสายชูที่หมักโดยเชื้อน้ำส้มสายชู เนื่องจากให้กลิ่นรสดี และปลอดภัยกว่า (2) ในการผลิตน้ำส้มสายชูนั้นบางโรงงานจะใช้เชื้อที่เกิดขึ้นเองในถังหมักที่หมักตามธรรมชาติ ซึ่งจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดปะปนกัน ทำให้คุณภาพของกรดน้ำส้มไม่สม่ำเสมอ หรืออาจต้องใช้ระยะเวลาในการหมักนานมาก ดังนั้นการผลิตน้ำส้มสายชูหมักและกลั่นจะด้วยวิธีใดก็ตามมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องคัดเลือกเชื้อโดยเฉพาะเชื้อน้ำส้มสายชู (Acetobacter spp.) ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดน้ำส้มได้สูง และมีคุณสมบัติเหมาะสมในการผลิต เช่น การทนกรดของเชื้อ เป็นต้น

แหล่งที่พบเชื้อน้ำส้มสายชู ได้แก่ ผัก ผลไม้ น้ำผลไม้รสเปรี้ยว ดอกไม้ น้ำผึ้ง น้ำส้มสายชูหมัก และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์เป็นต้น (19) ในประเทศไทยมีผู้รายงานพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในน้ำตาลสด น้ำตาลปี๊บ น้ำตาลเมา กระแช่ ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้า และเหล้าขาว (1,2)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ และขอบเขตของการวิจัยครั้งนี้มุ่งที่จะ

1. แยกเชื้อน้ำส้มสายชูจากวัสดุธรรมชาติ เช่นผัก ผลไม้ ดอกไม้ เป็นต้น โดยนำตัวอย่างมาแยกเชื้อในภาวะ shaking culture และ stationary culture

2. เมื่อได้เชื้อน้ำส้มสายชูแล้ว จะนำมาคัดเลือกสายเชื้อ (strain) ที่มีคุณสมบัติในการสร้างกรดน้ำส้มสูง

3. นำเชื้อที่ได้มาศึกษาปัจจัยบางประการที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดน้ำส้ม เช่น ศึกษาปริมาณเอทธานอล ปริมาณกรด และระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตน้ำส้มสายชู

4. ตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อที่แยกและคัดเลือกได้

การวิจัยครั้งนี้คาดหวังว่าจะพบเชื้อน้ำส้มสายชูสายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการผลิตกรดน้ำส้ม เช่น ผลิตกรดน้ำส้มได้ปริมาณสูง เซลล์มีความทนทานต่อภาวะความเป็นกรด ตลอดจนสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง ๆ ได้เพื่อจะลดต้นทุนในการผลิตกรดน้ำส้มในแง่ระบบหล่อเย็น (cooling system) ของโรงงานอุตสาหกรรมที่ผลิตน้ำส้มสายชู

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วัสดุและวิธีการ

1. แหล่งของเชื้อและการแยกเชื้อน้ำส้มสายชู

1.1 เก็บตัวอย่างวัสดุธรรมชาติได้แก่ดอกไม้ ผัก ผลไม้ เป็นต้น แต่จะเน้นเก็บตัวอย่างผลไม้สุกงอม เพราะมีปริมาณน้ำตาลค่อนข้างสูงทำให้การหมักแอลกอฮอล์และน้ำส้มสายชูเกิดได้เองตามธรรมชาติ ตลอดจนผลไม้สุกงอมมักเป็นวัสดุเหลือทิ้งและหาได้ง่ายในประเทศไทย เก็บตัวอย่างจากตลาดสดทั่วไปในกรุงเทพมหานคร

1.2 แยกเชื้อน้ำส้มสายชูจากตัวอย่างที่เก็บได้ในภาวะให้อากาศ (shaking culture) และภาวะไม่ให้อากาศ (stationary culture) โดยนำตัวอย่างหนัก 1 กรัม ใส่ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร (มล.) ที่บรรจุอาหารเหลว Glucose-Ethanol-Yeast extract (8) ปริมาตร 120 มล. เพื่อเป็น enriched culture สูตรอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในภาคผนวก ก. ข้อ 1 นำตัวอย่างเข้าเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (°ซ) เป็นเวลา 3 วัน ตัวอย่างเดิมอีกส่วนหนึ่งนำไปแยกเชื้อ โดยไม่เข้าเครื่องเขย่าในภาวะแวดล้อมเดียวกัน

1.3 นำเชื้อที่เลี้ยงไว้แบบ shaking และ stationary culture มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็ง Glucose-Ethanol-Yeast extract (8) ที่ใส่แคลเซียมคาร์บอเนต สูตรอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในภาคผนวก ก. ข้อ 2 แยกเชื้อโดยใช้วิธี streak plate แล้วนำเข้าตู้เพาะเชื้อบ่ม ณ อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 2-3 วัน เชื้อที่สร้างกรดได้จะสลายแคลเซียมคาร์บอเนตในวุ้น ทำให้เห็นรอบ ๆ โคโลนีเป็นวงใส นำเชื้อนี้ไปแยกใหม่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วเก็บเชื้อไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมในหลอดทดลอง (slant) เพื่อศึกษาต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อน้ำส้มสายชูที่ผลิตกรดน้ำส้มปริมาณสูง

2.1 เชื้อที่ได้จากข้อ 1.3 อายุ 24 ชม. นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว Ethanol-Yeast extract (8) สูตรอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในภาคผนวก ก. ข้อ 3 บรรจุอาหาร 120 มล. ในฟลาสก์ขนาด 500 มล. เชื้อเริ่มต้นที่จะปลูกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องเท่ากันโดยทำเชื้อให้เป็นสารแขวนลอย (suspension) ในสารละลายน้ำเกลือ (0.85%) ที่ปราศจากเชื้อนำมาปรับปริมาณเชื้อโดยวัดความขุ่นเป็นค่า optical density (O.D.)

ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร จนได้ค่าเป็น 0.5 ใช้สารแขวนลอยเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำฟลาสก์เข้าเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture fluid) ที่บ่มไว้ในข้อ 2.1 นำมาวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์กรดที่เชื้อสร้างขึ้นโดยไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N มีฟีนอฟธาลีน (phenolphthalein) เป็นอินดิเคเตอร์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 มล. (9) วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดอยู่ในภาคผนวก ข. ข้อ 1

3. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสร้างกรดและในการเจริญของเชื้อ

3.1 ศึกษาปริมาณเอทธานอลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโดยนำเชื้อที่คัดเลือกแล้วในเชื้อ 2.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Ethanol-Yeast extract (ภาคผนวก ก. ข้อ 3) ที่มีปริมาณเอทธานอลเป็น 2,4,6 และ 8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรตามลำดับ ใช้ฟลาสก์ขนาด 500 มล.ที่มีอาหารเหลว 120 มล. เชื้อที่ใช้มีความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร มีค่า O.D.0.5 ใช้สารแขวนลอยเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเข้าเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 วัน วิเคราะห์ปริมาณกรดแอซีติกที่เชื้อสร้างขึ้นทุก ๆ วัน โดยวิธี titration method (ภาคผนวก ข. ข้อ 1)

3.2 ศึกษาปริมาณกรดเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของเชื้อโดยเตรียมอาหารเหลว Ethanol-Yeast extract ที่เติมเอทธานอลในปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดจากข้อ 3.1 ปลูกเชื้อน้ำส้มสายชูลงไป 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เช่นเดียวกับข้อ 3.1 แล้วเติมกรดแอซีติกเข้มข้น (Glacial acetic acid) ลงไป 0,0.5,1.0,1.5 และ 2.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่าเช่นเดียวกับข้อ 3.1 วิเคราะห์หาปริมาณกรดในระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด (ภาคผนวก ข. ข้อ 1)

3.3 ศึกษาอุณหภูมิสูงที่เหมาะสมในการผลิตกรดแอซีติกโดยเตรียมอาหารเหลว Ethanol-Yeast extract ที่มีปริมาณเอทธานอลและปริมาณกรดเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโดยใช้ข้อมูลจากข้อ 3.1 และ 3.2 วิธีการก็เช่นเดียวกับข้อ 3.1 แต่นำไปบ่ม ณ อุณหภูมิ 35 °ซ และ 40 °ซ เมื่อเชื้อเจริญในระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด จึงวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอซีติก (ภาคผนวก ข. ข้อ 1)

3.4 ศึกษาการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชูที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีปริมาณเอทธานอลต่าง ๆ กันดังในข้อ 3.1 ตรวจสอบการเจริญของเชื้อด้วยสายตาเป็นความขุ่นของเชื้อเปรียบเทียบกับอาหารเหลวที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

3.5 ศึกษาการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชูในภาวะกรดโดยการปลูกเชื้อ 1-2 ลูป (loop) ลงในอาหารเหลวเช่นเดียวกับข้อ 3.1 ที่มีปริมาณเอทธานอล 2 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอซีติกเข้มข้น 4,6,8 และ 10 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร สังเกตการเจริญของเชื้อด้วยตาเปล่าภายใน 3 และ 7 วัน เช่นเดียวกับข้อ 3.4

3.6 ศึกษาการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู ณ อุณหภูมิสูงระดับต่าง ๆ โดยการปลูกเชื้อ 1-2 ลูป ลงในอาหารเหลวเช่นเดียวกับข้อ 3.1 ที่มีการปรับปริมาณเอทธานอลและกรดแอซีติกเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดจากข้อมูลข้อ 3.1 และ 3.2 นำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 35 °ซ และ 40 °ซ ตรวจสอบการเจริญของเชื้อด้วยตาเปล่าเช่นเดียวกับข้อ 3.4

4. การตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อ ทำโดยอาศัยผลการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อดังต่อไปนี้

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา นำเชื้ออายุ 18-24 ชม. มาย้อมเซลล์โดยวิธีของ Gram (32) วิธีย้อมอยู่ในภาคผนวก ข. ข้อ 2 แล้วนำไปดูการติดสีของเซลล์ ลักษณะรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่าโดยใช้เลนส์วัตถุใช้น้ำมัน (oil immersion objective lens)

4.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อได้แก่

4.2.1 ลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ปลูกเชื้อน้ำส้มสายชูปริมาณ 1 ลูป ลงบนอาหารแข็งโดยวิธี streak plate บ่มให้เชื้อเจริญ ณ อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3,7 และ 10 วัน ตรวจผลโดยดูการเจริญของเชื้อด้วยสายตา ถ้าเป็นอาหารเหลวตรวจโดยดูความขุ่นของเชื้อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันที่ไม่ได้ปลูกเชื้อเป็น control อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ (ภาคผนวก ก.) มีดังนี้

Glucose-Yeast extract-$CaCO_3$ Agar ทดสอบการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลที่ละลายน้ำ (water-soluble brown pigment) ของเชื้อ (8,40,53)

Yeast extract-Ethanol-$CaCO_3$ Agar ทดสอบการสร้างกรดแอซีติกจากเอทธานอล (48,53) ตรวจผลโดยดูวงใสรอบโคโลนีของเชื้อที่เกิดจากกรดที่เชื้อสร้างขึ้นไปสลายตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนต

Calcium lactate Agar ทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของแลคเตตไปเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์โดยเชื้อน้ำส้มสายชู (24,34)

Sodium acetate Medium ทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของแอซีเตตไปเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์โดยเชื้อน้ำส้มสายชู (24,34) ผลคืออาหารเลี้ยงเชื้อจะมีความเป็นด่าง (alkaline)

Yeast extract-Mannitol-Peptone Medium ทดสอบการใช้แมนนิตอลในการเจริญของเชื้อ (8)

Mannitol Agar ทดสอบการใช้แมนนิตอลในการเจริญ ถ้าเชื้อเจริญให้ถ่ายเชื้อปลูกในอาหารใหม่อีกครั้งหนึ่ง (8)

Glucose-Mannitol-Yeast extract Agar ทดสอบการเจริญของเชื้อ(8)

4.2.2 การสร้างเอนไซม์แคทาเลส (catalase)เนื่องจากแคทาเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความสัมพันธ์กับความสามารถของเชื้อในการใช้ออกซิเจน จะไม่พบเอนไซม์ชนิดนี้ในจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ หรือจุลินทรีย์บางชนิดที่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ การทดสอบเอนไซม์แคทาเลสใช้ปฏิกิริยาดังนี้ (33)

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

การเกิดฟองของแก๊สออกซิเจนแสดงว่าการทดสอบให้ผลบวก ในการทดสอบหยด 3% H_2O_2 1-2 หยด ลงบนโคโลนีเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่เลือดหรือในอาหารเหลวหรือเชี่ยโคโลนีเชื้อวางบนสไลด์ ไม่ควรทดสอบในเชื้อที่อายุมากกว่า 24 ชม. เพราะเอนไซม์นี้จะพบเฉพาะในเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่เท่านั้น การทดสอบในเชื้อที่อายุมากอาจได้ผลเป็น false negative

4.2.3 ความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ของเชื้อน้ำส้มสายชู แหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบได้แก่ L-Arabinose , D-Cellobiose , Esculin D-Fructose , D-Galactose , D-Glucose , Glycerol , D-Mannitol Maltose , D-Mannose , Melezitose , Melibiose , Raffinose , Rhamnose D-Ribose , Salicin , L-Sorbose , Trehalose , D-xylose , Starch และ Ethanol

ปลูกเชื้อ 1-2 ลูปลงในอาหารสำหรับทดสอบการสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ (ภาคผนวก ก. ข้อ 11) บ่มเชื้อ ณ อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 10 วัน ตรวจผลโดยดูการสร้างกรดของเชื้อจากอินดิเคเตอร์สีม่วงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนเป็น

สีเหลืองในภาวะกรด โดยใช้อาหารที่มีกลูโคสเป็น positive control และ basal medium เป็น negative control (8)

4.2.4 การทดสอบการสร้างเมือก ปลูกเชื้อปริมาณ 1-2 ลูปลงในอาหารเหลว Glucose-Ethanol-Yeast extract (ภาคผนวก ก. ข้อ 1) ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มให้เชื้อเจริญ ณ อุณหภูมิ 30 °ซ สังเกตการสร้างเมือกโดยจะเห็นเป็นแผ่นฝ้าหนาอยู่ที่ผิวหน้าอาหารเหลวภายใน 10 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การแยกและคัดเลือกเชื้อน้ำส้มสายชูที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดสูง

จากวัสดุธรรมชาติชนิดต่าง ๆ 156 ตัวอย่าง ได้นำมาแยกเชื้อน้ำส้มสายชูในภาวะ shaking culture และ stationary culture ณ อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วันโดย ภาวะ shaking culture แยกเชื้อที่สร้างกรดน้ำส้มได้ 82 ไอโซเลต (isolate) และ ภาวะ stationary culture แยกเชื้อได้ 72 ไอโซเลต รวมแยกเชื้อได้ทั้งสิ้น 154 ไอโซเลต เชื้อที่แยกได้แต่ละไอโซเลตได้ตั้งรหัสเชื้อไว้ต่าง ๆ กัน ดังผลการทดลองตารางที่ 5 และตาราง ที่ 6 โดยเชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่จะแยกได้จากผลไม้ ส่วนผักและดอกไม้จะไม่ค่อยพบเชื้อน้ำส้มสายชู

เชื้อน้ำส้มสายชูที่แยกได้ 154 ไอโซเลต นำมาหาประสิทธิภาพในการผลิตกรดโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. ข้อ 3) ที่มีเอทธานอล 2 เปอร์เซ็นต์ ในภาวะให้อากาศ (shaking culture) ณ อุณหภูมิ 30 °ซ พบว่าแต่ละไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดได้แตกต่างกันดังผลการทดลองตารางที่ 7 คัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดน้ำส้มปริมาณสูงไว้ 11 ไอโซเลตได้แก่รหัสเชื้อ NS 05 แยกจากส้มเช้ง NS 08 จากลางสาด NS 17 จากเงาะ NS 50S จากลิ้นจี่ NS 63 จากมะม่วงสุก NS 64S-1 จากกล้วยน้ำว้า NS 67S จากมะเขือเทศ NS 91 จากมะละกอ NS 109 จากมะไฟ NS 119S-1 จากแตงโม และ NS 132S จากชานอ้อย

2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสร้างกรดน้ำส้มและในการเจริญของเชื้อ

ผลการทดลองหาปริมาณเอทธานอลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของเชื้อที่คัดเลือกไว้ 11 ไอโซเลต แสดงไว้ในภาพที่ 1-1.2 จะเห็นได้ว่ามีเชื้อ 5 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดน้ำส้มได้สูง ได้แก่รหัสเชื้อ NS 05, NS 64S-1, NS 67S, NS 91 และ NS 132S โดยผลิตกรดจากเอทธานอล 4 เปอร์เซ็นต์ได้ 2.9, 3.3, 2.8, 3.8 และ 3.6 เปอร์เซ็นต์ภายใน 5 วันตามลำดับส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทธานอล 2,6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ เชื้อเหล่านี้จะผลิตกรดน้ำส้มได้ต่ำกว่า ทั้งนี้เป็นเพราะในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจขาดสารอาหารที่จำเป็นบางอย่างต่อการเจริญของเชื้อและการทดสอบในระยะเริ่มต้นยังมิได้ปรับภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ เช่นปริมาณกล้าเชื้อ ปริมาณกรดเริ่มต้นตลอดจนสารเร่งการเจริญต่าง ๆ เป็นต้น

ผลการทดลองหาปริมาณกรดเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของเชื้อเมื่อนำเชื้อที่คัดเลือกไว้ 5 ไอโซเลตมาทดลองผลิตกรดในอาหารเหลว Ethanol-Yeast extract ที่มี

ตารางที่ 5 การผลิตกรดโดยเชื้อน้ำส้มสายชูที่แยกได้จากผลไม้ชนิดต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานคร โดยวิธี Shaking Culture

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	วัสดุที่นำมาแยกเชื้อ
NS 11S-1	มะไฟ
NS 11S-2	มะไฟ
NS 12S-1	องุ่น
NS 12S-2	องุ่น
NS 12S-3	องุ่น
NS 18S-1	ส้มเขียวหวาน
NS 18S-2	ส้มเขียวหวาน
NS 18S-3	ส้มเขียวหวาน
NS 23S-1	ละมุด
NS 30S	มะม่วง
NS 31S	มะม่วง
NS 32S	ชมพู่
NS 33S	ฝรั่ง
NS 35S	กล้วยน้ำว้า
NS 38S-1	สับปะรด
NS 38S-2	สับปะรด
NS 38S-3	สับปะรด
NS 38S-4	สับปะรด
NS 39S	เปลือกสับปะรด
NS 40S	ชานอ้อย
NS 41S	เปลือกสับปะรด
NS 44S	ส้มเขียวหวาน
NS 45S	มะละกอ
NS 46S	ละมุด
NS 48S	องุ่น
NS 49S	ผลตาลสด
NS 52S	ส้มเขียวหวาน

ตารางที่ 5 (ต่อ)

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	วัสดุที่นำมาแยกเชื้อ
NS 54S	ฝรั่ง
NS 55S	สับปะรด
NS 56S	ลิ้นจี่
NS 57S-1	กล้วยน้ำว้า
NS 57S-2	กล้วยน้ำว้า
NS 61S	มะม่วง
NS 62S-1	ส้มเขียวหวาน
NS 62S-2	ส้มเขียวหวาน
NS 64S-1	กล้วยน้ำว้า
NS 64S-2	กล้วยน้ำว้า
NS 65S	มะม่วง
NS 66S	มะละกอ
NS 67S	มะเขือเทศสีดา
NS 69S	มะม่วง
NS 70S	มะม่วง
NS 71S	ขนุน
NS 72S	ส้มเขียวหวาน
NS 73S	ส้มเขียวหวาน
NS 75S	แตงโม
NS 76S	ส้มเขียวหวาน
NS 78S	ขนุน
NS 79S	สับปะรด
NS 80S	มะละกอ
NS 81S	ส้มเขียวหวาน
NS 83S	ส้มเขียวหวาน
NS 86S	จำปะดะ
NS 87S	แตงโม
NS 88S	มะม่วง
NS 89S	มะม่วง
NS 90S	สับปะรด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 (ต่อ)

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	วัสดุที่นำมาแยกเชื้อ
NS 93S	สับปะรด
NS 94S	แอปเปิ้ล
NS 96S	ระกำ
NS 97S	มะไฟ
NS 98S	ลิ้นจี่
NS 102S	ส้มเขียวหวาน
NS 103S	ชมพู่
NS 105S	มะไฟ
NS 107S	องุ่น
NS 108S-1	มะยม
NS 108S-2	มะยม
NS 109S-1	มะไฟ
NS 109S-2	มะไฟ
NS 110S	สับปะรด
NS 111S	ลิ้นจี่
NS 113S	ส้มเขียวหวาน
NS 115S	กล้วยหอม
NS 116S	กล้วยน้ำว้า
NS 117S-2	สับปะรด
NS 118S	แตงโม
NS 119S-1	แตงโม
NS 119S-2	แตงโม
NS 128S	องุ่น
NS 129S	องุ่น
NS 132S	ชานอ้อย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 การผลิตกรดโดยเชื้อน้ำส้มสายชูที่แยกได้จากผลไม้ชนิดต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานคร โดยวิธี Stationary Culture

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	วัสดุที่นำมาแยกเชื้อ
NS 01	ส้มเขียวหวาน
NS 02	ส้มเขียวหวาน
NS 03	เงาะ
NS 04	เงาะ
NS 05	ส้มเช้ง
NS 06	ส้มเช้ง
NS 07	ลางสาด
NS 08	ลางสาด
NS 09	ลางสาด
NS 10	ลางสาด
NS 10-1	มะเขือเทศ
NS 10-2	มะเขือเทศ
NS 13	ลางสาด
NS 14	ลางสาด
NS 15	ลางสาด
NS 15-1	มะม่วง
NS 15-2	มะม่วง
NS 16	ลางสาด
NS 17	ลางสาด
NS 18	ลางสาด
NS 18-1	ส้มเขียวหวาน
NS 18-2	ส้มเขียวหวาน
NS 18-3	ส้มเขียวหวาน
NS 26-2	ลูกแป้งข้าวหมาก
NS 31-1	มะม่วง
NS 31-2	มะม่วง
NS 31-3	มะม่วง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	วัสดุที่นำมาแยกเชื้อ
NS 32	ชมพู่
NS 36-1	ชนุน
NS 36-2	ชนุน
NS 40	ชานอ้อย
NS 41	เปลือกสับปะรด
NS 48	องุ่น
NS 50	ลิ้นจี่
NS 53	ส้มเขียวหวาน
NS 54	ผรั่ง
NS 55	สับปะรด
NS 56	ลิ้นจี่
NS 57	กล้วยน้ำว้า
NS 61	มะม่วง
NS 62	ส้มเขียวหวาน
NS 63	มะม่วง
NS 67	มะเขือเทศสีดา
NS 72	ส้มเขียวหวาน
NS 73	ส้มเขียวหวาน
NS 75	แตงโม
NS 79	สับปะรด
NS 81-1	ส้มเขียวหวาน
NS 81-2	ส้มเขียวหวาน
NS 86	จำปะดะ
NS 87	แตงโม
NS 88	มะม่วง
NS 89	มะม่วง
NS 90	สับปะรด
NS 91	มะละกอ
NS 94	แอปเปิ้ล
NS 98	ลิ้นจี่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	วัสดุที่นำมาแยกเชื้อ
NS 103	ชมพู่
NS 105	มะไฟ
NS 109	มะไฟ
NS 110	สับปะรด
NS 111	ลิ้นจี่
NS 112	มะไฟ
NS 113	ส้มเขียวหวาน
NS 114	ทุเรียน
NS 117	สับปะรด
NS 119-1	แตงโม
NS 119-2	แตงโม
NS 125	องุ่น
NS 129	องุ่น
NS 130	มะยม
NS 131	ระกำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 การผลิตกรดโดยเชื้อน้ำส้มสายชูที่แยกได้

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	ปริมาณกรด (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) (3 วัน)
NS 01	1.0
NS 02	1.5
NS 03	1.0
NS 04	1.1
NS 05	1.8
NS 06	1.3
NS 07	1.2
NS 08	1.7
NS 09	1.5
NS 10	1.5
NS 10-1	0.97
NS 10-2	0.94
NS 11S-1	0.21
NS 11S-2	0.86
NS 12S-1	0.87
NS 12S-2	0
NS 12S-3	1.20
NS 13	0.3
NS 14	0.8
NS 15	0.06
NS 15-1	1.15
NS 15-2	1.26
NS 16	0.2
NS 17	1.8
NS 18	1.2
NS 18-1	0.24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 (ต่อ)

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	ปริมาณกรด (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) (3 วัน)
NS 18-2	0
NS 18-3	0.01
NS 18S-1	0.55
NS 18S-2	0.52
NS 18S-3	0
NS 23S-1	1.39
NS 26-2	1.36
NS 30S	0.80
NS 31-1	1.61
NS 31-2	1.24
NS 31-3	1.44
NS 31S	1.34
NS 32	0.80
NS 32S	0.80
NS 33S	1.27
NS 35S	1.27
NS 36-1	0.99
NS 36-2	0.87
NS 38S-1	0.01
NS 38S-2	0
NS 38S-3	0.43
NS 38S-4	0.43
NS 39S	0.12
NS 40	1.58
NS 40S	1.79
NS 41	0.01

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

074544 I15845848.

ตารางที่ 7 (ต่อ)

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	ปริมาณกรด (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) (3 วัน)
NS 41S	0.01
NS 44S	0.66
NS 45S	0.78
NS 46S	1.39
NS 48	1.26
NS 48S	0.01
NS 49S	0.77
NS 50S	1.85
NS 52S	1.16
NS 53	0.66
NS 54	1.18
NS 54S	1.26
NS 55	0.75
NS 55S	1.73
NS 56	1.55
NS 56S	1.03
NS 57	1.53
NS 57S-1	1.54
NS 57S-2	1.56
NS 61	1.19
NS 61S	1.03
NS 62	1.35
NS 62S-1	0.89
NS 62S-2	1.24
NS 63	1.80
NS 64S-1	1.85

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 (ต่อ)

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	ปริมาณกรด (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) (3 วัน)
NS 64S-2	1.78
NS 65S	1.27
NS 66S	0.96
NS 67	0.62
NS 67S	1.87
NS 69S	1.56
NS 70S	0
NS 71S	0.63
NS 72	1.59
NS 72S	0.90
NS 73	1.39
NS 73S	1.31
NS 75	1.00
NS 75S	0.23
NS 76S	1.40
NS 78S	1.53
NS 79	0.99
NS 79S	1.49
NS 80S	1.01
NS 81-1	0.57
NS 81-2	1.76
NS 81S	0.96
NS 83S	1.55
NS 86	0.01
NS 86S	0.70
NS 87	0.45

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 (ต่อ)

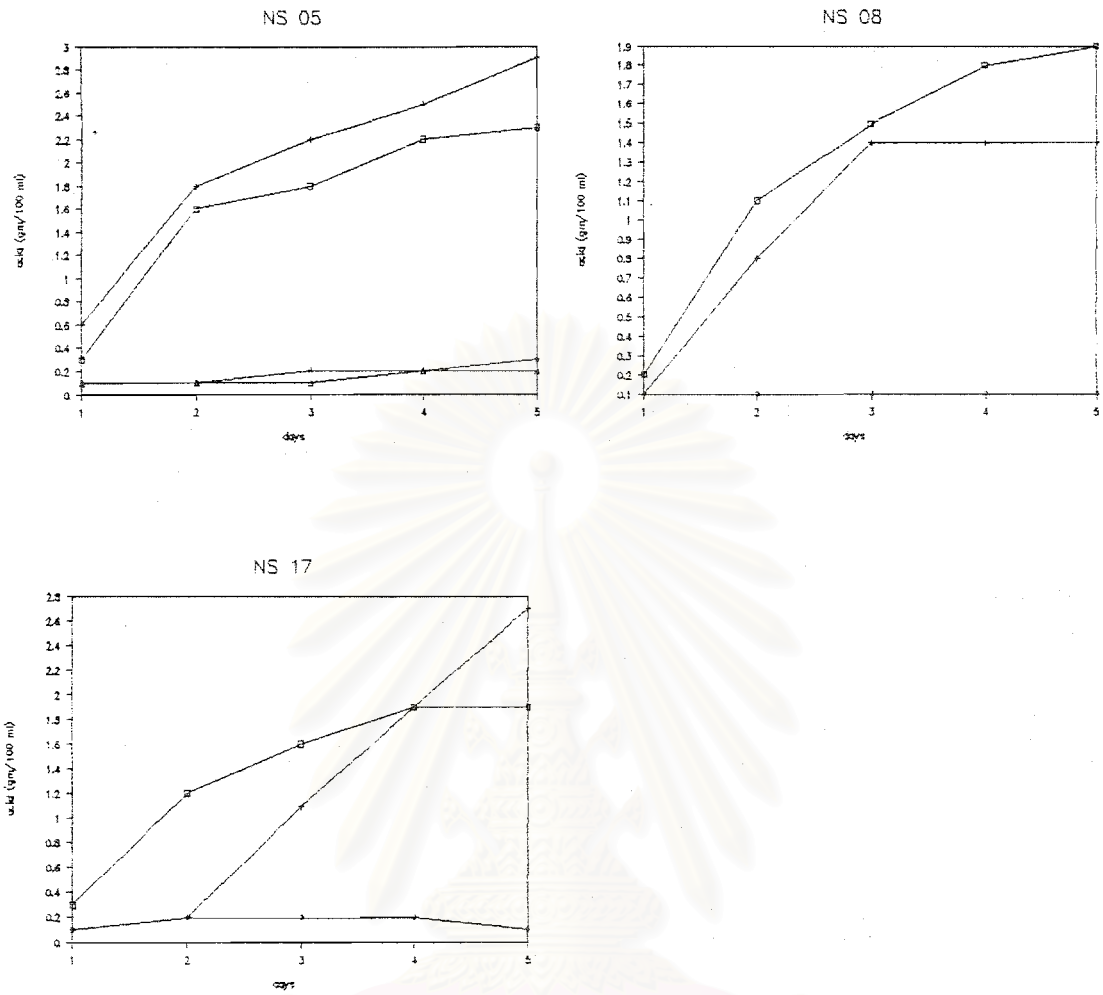
รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	ปริมาณกรด (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) (3 วัน)
NS 87S	0.48
NS 88	1.80
NS 88S	0.69
NS 89	0.82
NS 89S	0.63
NS 90	1.51
NS 90S	1.58
NS 91	1.81
NS 93S	1.51
NS 94	1.01
NS 94S	1.51
NS 96S	1.68
NS 97S	0.16
NS 98	1.18
NS 98S	1.55
NS 102S	1.39
NS 103	1.07
NS 103S	1.66
NS 105	1.17
NS 105S	0.68
NS 107S	0
NS 108S-1	1.46
NS 108S-2	0.99
NS 109	1.86
NS 109S-1	0
NS 109S-2	1.24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 (ต่อ)

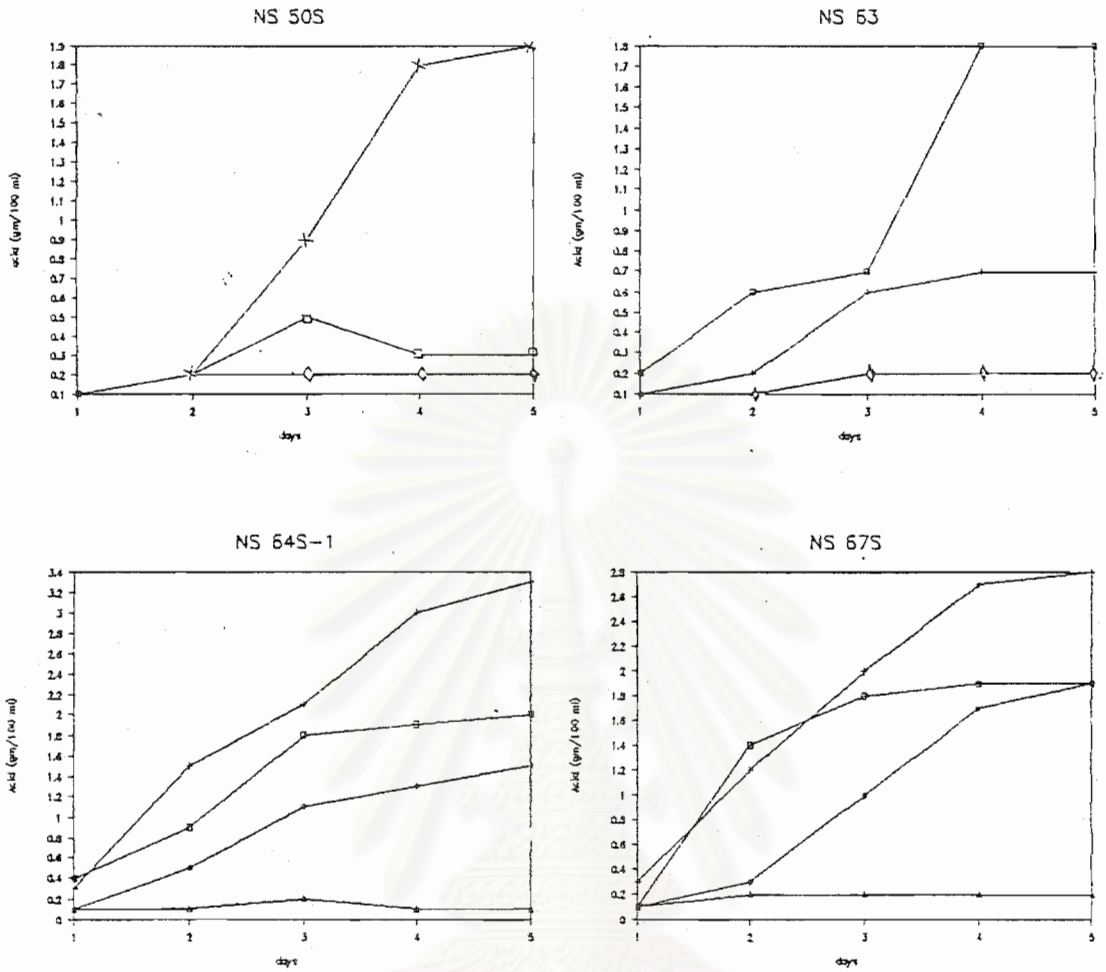
รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	ปริมาณกรด (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) (3 วัน)
NS 110	1.21
NS 110S	0.91
NS 111	1.06
NS 111S	0.36
NS 112	0.87
NS 113	1.00
NS 113S	0.07
NS 114	1.05
NS 115S	1.24
NS 116S	1.46
NS 117	0.96
NS 117S-2	1.25
NS 118S	1.23
NS 119-1	1.00
NS 119-2	1.42
NS 119S-1	1.81
NS 119S-2	1.30
NS 125	1.05
NS 128S	0.89
NS 129	1.40
NS 129S	0.92
NS 130	1.39
NS 131	1.32
NS 132S	2.20

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แทนปริมาณเอทธานอล 2%
แทนปริมาณเอทธานอล 4%
แทนปริมาณเอทธานอล 6%
แทนปริมาณเอทธานอล 8%

ภาพที่ 1 การผลิตกรดในอาหารเหลวที่มีเอทธานอลปริมาณต่าง ๆ



แทนปริมาณเอทธานอล 2%

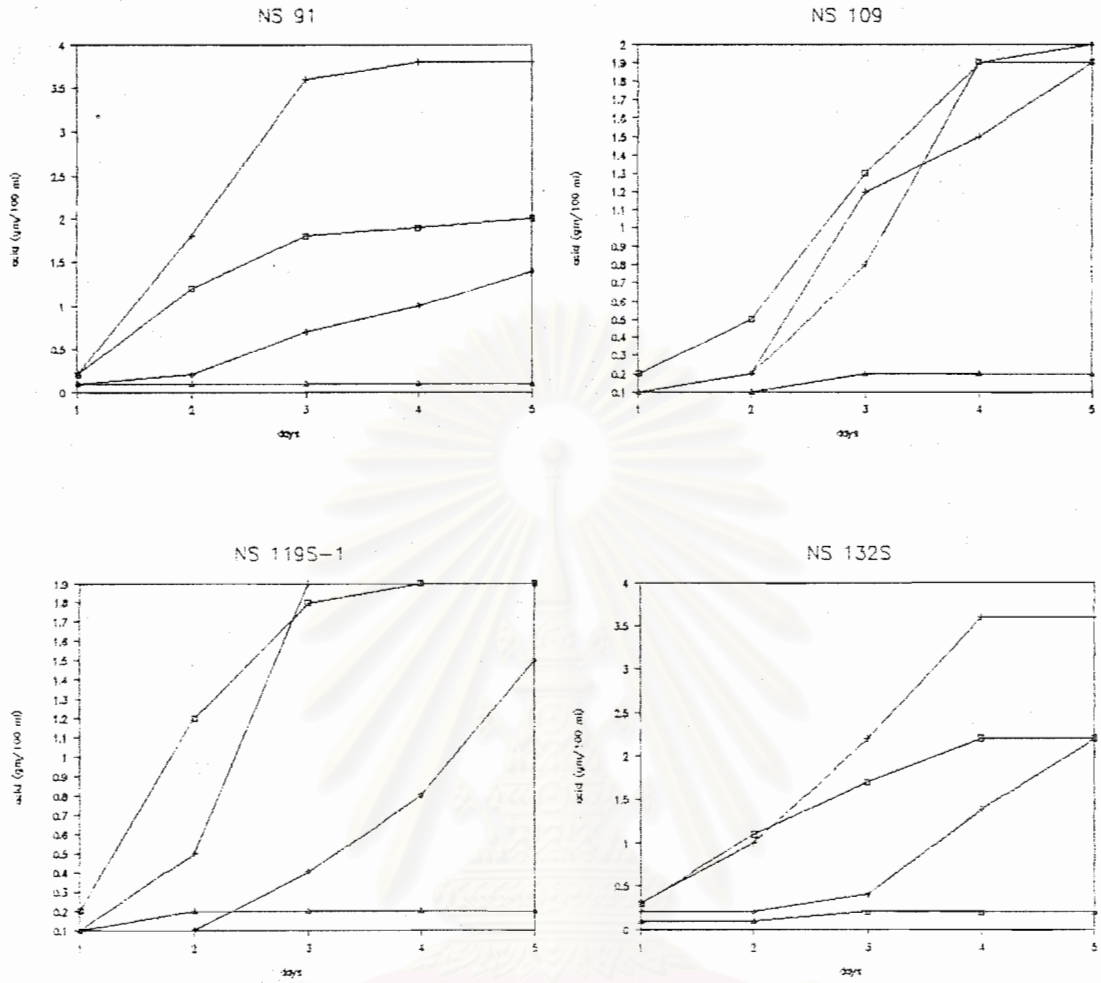
แทนปริมาณเอทธานอล 4%

แทนปริมาณเอทธานอล 6%

แทนปริมาณเอทธานอล 8%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 1.1 การผลิตกรดในอาหารเหลวที่มีเอทธานอลปริมาณต่าง ๆ



ภาพที่ 1.2 การผลิตกรดในอาหารเหลวที่มีเอทธานอลปริมาณต่าง ๆ

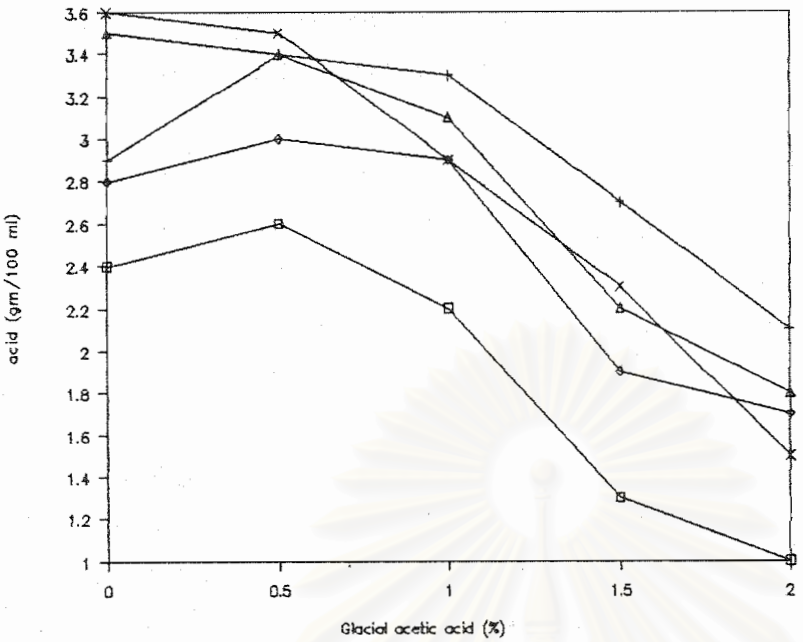
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอทธานอล 4 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณกรดเริ่มต้นเป็น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และวิเคราะห์ปริมาณกรดในการหมักวันที่ 4 ได้ผลดังภาพที่ 2 โดยจะเห็นว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถผลิตกรดได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดแอซีติกเข้มข้นระหว่าง 0-1.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร โดยรหัสเชื้อ NS 05, NS 91 และ NS 132S ผลิตกรดได้สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรด 0.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ส่วน NS 64S-1 และ NS 67S ผลิตกรดได้สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรด 1.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เชื้อกลุ่มหลังน่าสนใจในการผลิตน้ำส้มสายชู เพราะการหมักน้ำส้มสายชูโดยทั่วไปไม่สามารถทำให้เกิดภาวะการหมักอย่างปลอดเชื้อได้ดังเช่นในห้องปฏิบัติการที่การทดลองทุกขั้นตอนจะอยู่ในสภาพปลอดเชื้อทุกประการ การหมักน้ำส้มสายชูนอกห้องทดลองจึงจำเป็นต้องมีการเติมกรดแอซีติกลงในวัตถุดิบ เพื่อยับยั้งการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ การหมักน้ำส้มสายชูแบบช้ามักเติมกรดแอซีติกประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์เมื่อเริ่มต้นการหมัก (5)

ผลการทดลองผลิตกรดแอซีติก ณ อุณหภูมิสูงจากเชื้อที่คัดเลือกไว้ 5 ไอโซเลต ได้ผลดังตารางที่ 8 จะเห็นว่าเมื่อใช้ปริมาณเอทธานอล 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นปริมาณที่เชื้อสามารถผลิตกรดได้สูง และใช้ปริมาณกรดเริ่มต้นของการหมักเป็น 0.5 และ 1.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร สำหรับรหัสเชื้อ NS 05, NS 91 และ NS 132S กับ NS 64S-1 และ NS 67S ตามลำดับแล้วเชื้อทุกไอโซเลตไม่สามารถผลิตกรดได้สูง ณ อุณหภูมิ 35 °ซ และ 40 °ซ โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 40 °ซ จะผลิตกรดได้ต่ำมาก แต่เชื้อทุกไอโซเลตจะผลิตกรดได้ดี ณ อุณหภูมิ 30 °ซ ดังผลการทดลองที่กล่าวมาแล้ว

ผลการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชูที่คัดเลือกไว้ 11 ไอโซเลตและเลี้ยงในอาหารเหลว Ethanol-Yeast extract ที่มีปริมาณเอทธานอลต่าง ๆ กันแสดงในตารางที่ 9 โดยพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทธานอล 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์นั้น เชื้อส่วนใหญ่จะเจริญได้ดี แต่หากอาหารเลี้ยงเชื้อมีเอทธานอล 6 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมักเจริญได้ปานกลางจนถึงเจริญได้น้อย หรือต้องใช้ระยะเวลาในการเจริญนานกว่า ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทธานอล 8 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมักจะเจริญได้น้อย

จากการที่เชื้อเจริญได้ดีในอาหารที่มีเอทธานอล 4 เปอร์เซ็นต์นั้น จะมีความสัมพันธ์กับความสามารถผลิตกรดน้ำส้มได้สูงดังผลการทดลองข้อ 2 ทั้งนี้เพราะเมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น จะทำให้มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดได้สูง แต่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเอทธานอลสูง ๆ เช่น 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์เซลล์จะเจริญได้ไม่ค่อยดีนัก ทำให้ประสิทธิภาพของการผลิตกรดก็ต่ำไปด้วย



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แทนปริมาณกรดที่ผลิตจากรหัสเชื้อ NS 05

แทนปริมาณกรดที่ผลิตจากรหัสเชื้อ NS 64S-1

แทนปริมาณกรดที่ผลิตจากรหัสเชื้อ NS 67S

แทนปริมาณกรดที่ผลิตจากรหัสเชื้อ NS 91

แทนปริมาณกรดที่ผลิตจากรหัสเชื้อ NS 132S

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 2 การผลิตกรดในอาหารเหลวที่มีเอทธานอล 4% และกรดแอซีติก ปริมาณต่าง ๆ ในเวลา 4 วัน

ตารางที่ 8 การผลิตกรดในอาหารเหลวที่มีเอทธานอล 4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่ม ณ อุณหภูมิ 35 °ซ และ 40 °ซเป็นเวลา 4 วัน

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	กรดแอซีติก (กรัม/100 มล.)	
	35 °ซ	40 °ซ
NS 05	1.0	0.6
NS 64S-1	1.1	0.7
NS 67S	1.2	0.6
NS 91	1.3	0.6
NS 132S	1.2	0.7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 การเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชูในอาหารเหลวที่มีเอทธานอลปริมาณต่าง ๆ

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	ระยะเวลา (วัน)	การเจริญที่เปอร์เซ็นต์เอทธานอลต่าง ๆ [1/]			
		2	4	6	8
NS 05	1	+++	+++	+	-
	2	+++	+++	+	-
	3	+++	+++	+	+
	4	+++	+++	++	+
	5	+++	+++	++	+
NS 08	1	+++	+	+	-
	2	+++	++	+	-
	3	+++	+++	+	+
	4	+++	+++	+	+
	5	+++	+++	+	+
NS 17	1	+++	+	+	-
	2	+++	+	+	-
	3	+++	++	+	+
	4	+++	+++	+	+
	5	+++	+++	+	+
NS 50S	1	+	+	+	-
	2	+	+	+	-
	3	++	++	+	+
	4	+++	++	++	+
	5	+++	++	++	+
NS 63	1	++	+	+	-
	2	+++	+	+	-
	3	+++	++	+	+
	4	+++	++	+	+
	5	+++	+++	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 (ต่อ)

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	ระยะเวลา (วัน)	การเจริญที่เปอร์เซ็นต์เอทธานอลต่าง ๆ [1/]			
		2	4	6	8
NS 64S-1	1	++	++	+	-
	2	+++	++	+	-
	3	+++	+++	++	+
	4	+++	+++	++	+
	5	+++	+++	++	+
NS 67S	1	++	+	-	-
	2	+++	++	+	-
	3	+++	+++	++	+
	4	+++	+++	+++	+
	5	+++	+++	+++	+
NS 91	1	++	+	+	-
	2	+++	++	+	-
	3	+++	+++	++	+
	4	+++	+++	++	+
	5	+++	+++	+++	+
NS 109	1	++	+	-	-
	2	+++	++	+	-
	3	+++	+++	++	+
	4	+++	+++	++	+
	5	+++	+++	+++	+
NS 119S-1	1	++	-	-	-
	2	+++	+++	+	-
	3	+++	+++	++	+
	4	+++	+++	++	+
	5	+++	+++	+++	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 (ต่อ)

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	ระยะเวลา (วัน)	การเจริญที่เปอร์เซ็นต์เอทธานอลต่าง ๆ 1/			
		2	4	6	8
NS 132S	1	++	+	+	-
	2	+++	+	+	-
	3	+++	+++	+	+
	4	+++	+++	++	+
	5	+++	+++	++	+

1/ +++ = การเจริญดี
++ = การเจริญปานกลาง
+ = การเจริญเล็กน้อย
- = ไม่พบการเจริญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชูในภาวะกรดที่มีเอทธานอล 2 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอซีติกเข้มข้น 2,4,6,8 และ 10 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่าเชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ในภาวะกรดสูงถึง 10 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ยกเว้นรหัสเชื้อ NS 50S, NS 64S-1 และ NS 67S ที่เซลล์ไม่สามารถทนกรดได้สูง การที่เชื้อสามารถทนกรดได้สูงจะเป็นที่ต้องการในระดับโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำส้มสายชู โดยเฉพาะการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็วและแบบซับเมอร์ก (submerged) การทนกรดของเซลล์จะขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจน หากเซลล์ขาดออกซิเจนจะทำให้ ATP (Adenosine triphosphate) ภายในเซลล์ลดลงทำให้กรดแอซีติกภายนอกเซลล์ซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ (21) ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดต่ำ ในการทดลองเราเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่า (shaker) ที่ออกซิเจนในอากาศมีโอกาสแทรกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้พอสมควร แต่หากจะเลี้ยงเชื้อในถังหมักจำเป็นต้องมีระบบการให้อากาศที่มีประสิทธิภาพสูง

ผลการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู ณ อุณหภูมิสูงที่ 35 °ซ และ 40 °ซ พบว่าเชื้อที่คัดเลือกไว้ 5 ไอโซเลตสามารถเจริญได้เล็กน้อย ณ อุณหภูมิ 35 °ซ แต่ไม่สามารถเจริญได้ ณ อุณหภูมิ 40 °ซ ดังตารางที่ 11 ในการผลิตน้ำส้มสายชูระดับอุตสาหกรรมจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ประมาณ 30 °ซ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเพียง 2-3 °ซ จะทำให้อัตราการผลิตกรดและผลผลิตลดลง เพราะการออกซิไดส์เอทธานอลไปเป็นกรดแอซีติกจะมีความร้อนเกิดขึ้นมาก ถังหมักขนาดใหญ่จึงต้องมีระบบหล่อเย็นช่วยในการปรับอุณหภูมิ ซึ่งจะทำให้เพิ่มต้นทุนการผลิต

3. การตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อได้แก่

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อน้ำส้มสายชูที่คัดเลือกไว้ 5 ไอโซเลตได้แก่รหัสเชื้อ NS 05, NS 64S-1, NS 67S, NS 91 และ NS 132S แสดงไว้ในตารางที่ 12 ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อทั้งหมดติดสีแกรมลบ (สีแดง) มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อนสั้น ๆ ค่อนข้างอ้วน ไม่มีเอนโดสปอร์ (endospore) และมีการเรียงตัวของเซลล์แบบเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เป็นคู่ เป็นสายโซ่หรือกลุ่มบ้างแตกต่างกัน ซึ่งตรงกับลักษณะการติดสีแกรมและรูปร่างการเรียงตัวของเซลล์ในเชื้อ Acetobacter spp. เชื้อน้ำส้มสายชูทั้ง 5 ไอโซเลตมีโคโลนีสีขาวหรือสีครีมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose-Yeast extract-$CaCO_3$

ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต แสดงไว้ในตารางที่ 13 และ 14 โดยจะเห็นว่าเชื้อไม่สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลที่ละลายได้ในน้ำ แต่สามารถผลิตกรดแอซีติกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทธานอล มีคุณสมบัติออกซิไดส์แลกเตตและแอซีเตตไปเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ที่เรียกว่าเกิดปฏิกิริยา overoxidation ของ Acetobacter spp. คุณสมบัตินี้สำคัญมากในการแยกแบคทีเรียกรดแอซีติกคือแบคทีเรียสกุล Acetobacter ออกจาก

ตารางที่ 10 การเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชูในภาวะกรด

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	ระยะเวลา (วัน)	การเจริญที่เปอร์เซ็นต์กรดต่าง ๆ [1/]				
		2	4	6	8	10
NS 05	3	+++	+++	+++	+++	++
	7	+++	+++	+++	+++	+++
NS 08	3	+++	+++	+++	++	++
	7	+++	+++	+++	+++	+++
NS 17	3	++	+++	+++	+++	+++
	7	+++	+++	+++	++	+++
NS 50S	3	++	+	-	-	-
	7	++	+	-	-	-
NS 63	3	+++	+++	+++	+++	+++
	7	+++	+++	+++	+++	+++
NS 64S-1	3	++	++	+	+	+
	7	+	+	+	+	+
NS 67S	3	++	++	+	+	+
	7	+	+	+	+	+
NS 91	3	+++	+++	+++	++	+
	7	++	++	++	+	+
NS 109	3	+++	++	++	++	++
	7	++	+	+	++	+
NS 119S-1	3	+	+	+	++	++
	7	+	++	++	++	+

ตารางที่ 10 (ต่อ)

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	ระยะเวลา (วัน)	การเจริญที่เปอร์เซ็นต์กรดต่าง ๆ [1/]				
		2	4	6	8	10
NS 132S	3	+++	+++	+++	+++	+++
	7	+++	+++	+++	+++	++

ตารางที่ 11 การเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู ณ อุณหภูมิ 35 °ซ และ 40 °ซ เป็นเวลา 4 วัน

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	การเจริญที่ระดับอุณหภูมิ[1/]	
	35 °ซ	40 °ซ
NS 05	+	-
NS 64S-1	+	-
NS 67S	+	-
NS 91	+	-
NS 132S	+	-

[1/]
+++ = การเจริญดี
++ = การเจริญปานกลาง
+ = การเจริญเล็กน้อย
- = ไม่พบการเจริญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Gluconobacter จากรายงานของ Stanier และคณะ (49) พบว่า Gluconobacter spp. เป็นพวกที่มีกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) แบบไม่มีวัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid cycle) และไม่สามารถออกซิไดส์แอซีเตต (acetate) ได้ จึงเรียกว่าเป็นพวก underoxidizer ดังนั้นเชื้อนี้จึงออกซิไดส์เอทธานอลและซับสเตรตอื่น ๆ ที่สามารถเปลี่ยนเป็นแอซีเตตแล้วสะสมสารนี้ ส่วน Acetobacter spp. เป็นพวกที่มีกระบวนการเมแทบอลิซึมแบบวัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิก จึงสามารถออกซิไดส์แอซีเตตไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อเชื้อเจริญในที่ที่มีเอทธานอลเพียงพอ เอทธานอลจะถูกเปลี่ยนให้เป็นแอซีเตตอย่างรวดเร็ว แล้วจะถูกออกซิไดส์ต่อไปอย่างช้า ๆ จนสมบูรณ์ จึงเรียกเชื้อพวกนี้ว่าเป็นพวก overoxidizer ดังนั้นเชื้อที่คัดเลือกไว้ 5 ไอโซเลตจึงจัดเป็น Acetobacter spp.

นอกจากนี้ยังใช้ลักษณะของแส้เซลล์ (flagellum) มาจำแนกแบคทีเรียสกุล Gluconobacter และ Acetobacter โดย Gluconobacter spp. มีแส้เซลล์ติดที่ขั้วเซลล์ (polar flagellum) ทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้ (motile) หรืออาจไม่มีแส้เซลล์ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (nonmotile) ส่วน Acetobacter spp. มีแส้เซลล์อยู่รอบ ๆ เซลล์ (peritrichous flagellum) สามารถเคลื่อนที่ได้ หรืออาจไม่มีแส้เซลล์ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เช่นเดียวกัน (20)

Acetobacter spp. มีกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส (catalase activity) บางชนิดสามารถสร้างเซลลูโลสได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่น A. xylinum , A. xylinoids และ A. acetigenum อย่างไรก็ตาม Acetobacter spp. จะสร้างเซลลูโลสในอาหารที่เหมาะสมเท่านั้นเช่นอาหารที่มีไพรูเวต (pyruvate) (44) เป็นต้น เชื้อน้ำส้มสายชูรหัส NS 05 สามารถสร้างเมือกลอยบริเวณผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose-Ethanol-Yeast extract ซึ่งอาจเป็นเซลลูโลสที่เซลล์สร้างขึ้น ส่วนเชื้ออีก 4 ไอโซเลตที่คัดเลือกไว้ไม่มีคุณสมบัตินี้ เชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่าเซลล์มีเอนไซม์แคทาเลสตลอดจนสามารถใช้แหล่งคาร์บอนบางชนิดในการเจริญได้แก่ L-Arabinose , D-Glucose , Glycerol , D-Mannitol , D-Mannose D-Xylose และ Ethanol แต่ D-Galactose จะมีเชื้อ 4 ไอโซเลต ได้แก่ NS 64S-1 NS 67S, NS 91 และ NS 132S ไม่สามารถใช้ได้ ผลการทดลองความสามารถสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 14

จากคุณสมบัติต่าง ๆ ดังกล่าวแล้ว เมื่อนำเชื้อน้ำส้มสายชูทั้ง 5 ไอโซเลตมาเปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ บางประการของ Acetobater spp. จากหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (19) และ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (20) จึงน่าที่จะจัดเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตเป็น Acetobacter

aceti แต่อาจเป็นสายเชื้อ (strain) ต่าง ๆ กัน 5 สายเชื้อ เนื่องจากยังมีลักษณะบางอย่างที่แตกต่างกันเล็กน้อย เช่นลักษณะโคโลนี รูปร่างของเซลล์ตลอดจนลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการที่มีรายละเอียดแตกต่างกันบ้าง นอกจากนี้ควรตรวจสอบคุณสมบัติอื่น ๆ ของเชื้อเพิ่มเติมเช่น ชนิดของแส้เซลล์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ความต้องการกรดอะมิโนและสารเร่งการเจริญชนิดต่าง ๆ ในการเจริญเป็นต้น

ตารางที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อน้ำส้มสายชู

รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู	การติดสีแกรม	รูปร่างของเซลล์	การเรียงตัวของเซลล์	เซลล์มีเอนโดสปอร์ (endospore)
NS 05	ลบ	ท่อนสั้น	1/	-4/
NS 64S-1	ลบ	ท่อนสั้น	2/	-
NS 67S	ลบ	ท่อนสั้น	3/	-
NS 91	ลบ	ท่อนสั้น	3/	-
NS 132S	ลบ	ท่อนสั้น	3/	-

1/ เรียงตัวเป็นคู่และเป็นกลุ่ม

2/ เรียงตัวเดี่ยว ๆ เป็นคู่ เป็นสายโซ่และเป็นกลุ่ม

3/ เรียงตัวเป็นสายโซ่และเป็นกลุ่ม

4/ ไม่มีเอนโดสปอร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อน้ำส้มสายชู

คุณสมบัติ	รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู				
	NS05	NS64S-1	NS67S	NS91	NS132S
Water-soluble brown pigment (Glucose-Yeast extract-$CaCO_3$ Agar)	-[2]	-	-	-	-
Production of acetic acid from ethanol (Yeast extract-Ethanol-$CaCO_3$ Agar)	+[1]	+	+	+	+
Oxidation of lactate to H_2O+CO_2 (Calcium lactate Agar)	+	+	+	+	+
Oxidation of acetate to H_2O+CO_2 (Sodium acetate Medium)	+	+	+	+	+
Growth on Mannitol Agar (Mannitol Agar)	+	+	+	+	+
Growth on Yeast extract-Mannitol-Peptone Medium or Glucose-Mannitol-Yeast extract Agar	+	+	+	+	+
Catalase test	+	+	+	+	+
การสร้างเมือก	+	-	-	-	-

[1] positive

[2] negative

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 ความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ของเชื้อน้ำส้มสายชู

แหล่งคาร์บอน	รหัสเชื้อน้ำส้มสายชู				
	NS05	NS64S-1	NS67S	NS91	NS132S
L-Arabinose	+[1]	+	+	+	+
D-Cellobiose	-[3]	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-	-
D-Fructose	-	-	-	-	-
D-Galactose	-	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+
Glycerol	±[2]	±	±	±	±
D-Mannitol	±	±	±	±	±
Maltose	-	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	+
Melezitose	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-
D-Xylose	+	+	+	+	+
Strach	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+

[1] positive

[2] weakly positive

[3] negative

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การแยกเชื้อน้ำส้มสายชูจากวัสดุธรรมชาติได้แก่ผัก ผลไม้ และดอกไม้ เป็นต้น จำนวน 156 ตัวอย่าง ได้นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว Glucose-Ethanol-Yeast extract ที่มีเอทธานอล 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อน้ำส้มสายชูที่มีอยู่ในตัวอย่างตามธรรมชาติ แยกเชื้อที่สร้างกรดบนอาหารแข็ง Glucose-Ethanol-Yeast extract-$CaCO_3$ ได้ 154 ไอโซเลต (isolate) ซึ่งเป็นเชื้อที่เลี้ยงในภาวะให้อากาศ (shaking culture) 82 ไอโซเลต และภาวะไม่ให้อากาศ (stationary culture) 72 ไอโซเลต นำเชื้อน้ำส้มสายชูที่แยกได้ทั้งหมดมาคัดเลือกสายเชื้อที่ผลิตกรดน้ำส้มได้ปริมาณสูงในอาหารเหลว Ethanol-Yeast extract ที่มีเอทธานอล 2 เปอร์เซ็นต์ ในภาวะให้อากาศ ณ อุณหภูมิ 30 °ซ สามารถคัดเลือกเชื้อน้ำส้มสายชูไว้ได้ 11 ไอโซเลตได้แก่รหัสเชื้อ NS 05, NS 08, NS 17, NS 50S NS 63, NS 64S-1, NS 67S, NS 91, NS 109, NS 119S-1 และ NS 132S เมื่อนำเชื้อน้ำส้มสายชูที่คัดเลือกไว้มาศึกษาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตน้ำส้มสายชูได้แก่ ปริมาณเอทธานอลเริ่มต้น ปริมาณกรดเริ่มต้น และอุณหภูมิสูงที่เหมาะสมในการผลิตกรดน้ำส้มและเหมาะสมในการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู เชื้อ 5 ไอโซเลตได้แก่ NS 05, NS 64S-1, NS 67S, NS 91 และ NS132S มีประสิทธิภาพผลิตกรดน้ำส้มได้สูงจากเอทธานอลเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์ เชื้อที่เหลือมีประสิทธิภาพผลิตกรดน้ำส้มได้สูงจากเอทธานอลเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ เชื้อทั้งหมดที่คัดเลือกไว้ไม่สามารถผลิตกรดได้สูงตลอดจนใช้ระยะเวลาในการผลิตกรดนานกว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอทธานอลเป็น 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อย่างไรก็ตามกล้าเชื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้อยู่ในสภาพสารแขวนลอยเชื้อในน้ำเกลือปลอดเชื้อและใช้เพียง 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หากมีการเตรียมกล้าเชื้อ (seedling) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 2-3 ครั้ง ครั้งละ 24 ชม. เพื่อให้เซลล์ปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมใหม่และเพิ่มปริมาณเซลล์ ตลอดจนใช้ปริมาณกล้าเชื้อมาก ๆ เพื่อให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นของการหมักสูง ๆ อาจทำให้เชื้อที่คัดเลือกไว้มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดน้ำส้มได้สูงจากเอทธานอลเริ่มต้นความเข้มข้นสูง ๆ มีรายงานว่า (2,3) ปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดน้ำส้มจากไวน์น้ำมะพร้าวคือ 10-50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรแล้วแต่สายเชื้อ จะเห็นว่าถ้าใช้เชื้อเริ่มต้นของการหมักปริมาณน้อยจะทำให้การผลิตกรดเกิดช้าและผลผลิตต่ำ ในการทดลองนี้เราผลิตกรดในภาวะปลอดเชื้อและใช้ปริมาณกล้าเชื้อน้อย เพื่อสะดวกและประหยัดเวลาในการเตรียมกล้าเชื้อ แต่การหมักน้ำส้มสายชูในระดับอุตสาหกรรมจะไม่สามารถจัดให้เกิดภาวะปลอดเชื้อโดยสมบูรณ์ได้ ดังนั้นจะใช้กล้าเชื้อในปริมาณสูงเพื่อให้เชื้อเจริญและผลิตกรดในระยะเวลาสั้นตลอดจนยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดลองครั้งนี้ก็อาจขาดสารอาหารบางอย่างที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อเช่น กรดอะมิโน (amino acid) หรือสารเร่งการเจริญ (vitamin) เป็นต้น

เมื่อนำเชื้อน้ำส้มสายชูที่คัดเลือกไว้ 5 ไอโซเลต และมีประสิทธิภาพผลิตกรดได้สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทธานอล 4 เปอร์เซ็นต์ มาทดลองผลิตกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดเริ่มต้นเป็น 0,0.5,1.0,1.5 และ 2.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร พบว่ามีเชื้อ 2 กลุ่มคือกลุ่มแรกผลิตกรดได้ดีเมื่อมีปริมาณกรดเริ่มต้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ได้แก่รหัสเชื้อ NS 05, NS 91 และ NS 132S กลุ่มที่ 2 ผลิตกรดได้ดีเมื่อมีปริมาณกรดเริ่มต้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่รหัสเชื้อ NS 64S-1 และ NS 67S เชื้อกลุ่มหลังน่าสนใจในการผลิตน้ำส้มสายชูเพราะการหมักน้ำส้มสายชูทั่ว ๆ ไปจะไม่สามารถทำให้เกิดภาวะปลอดเชื้อได้ จำเป็นต้องมีการเติมกรดน้ำส้มลงไปในวัตถุดิบเพื่อยับยั้งการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (5)

การผลิตน้ำส้มสายชูของเชื้อที่คัดเลือกไว้ 5 ไอโซเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทธานอล 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดเริ่มต้นเป็น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์แล้วแต่รหัสเชื้อดังข้อมูลในการทดลองข้างต้น ทำการหมัก ณ อุณหภูมิ 35 °ซ และ 40 °ซ พบว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตไม่สามารถผลิตกรดได้สูง โดยเฉพาะอุณหภูมิ 40 °ซ จะผลิตกรดได้ต่ำมาก

การเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชูที่คัดเลือกไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทธานอล 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่จะเจริญได้ดี ซึ่งจะสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการผลิตกรด แต่อาหารที่มีเอทธานอล 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ เชื้อจะเจริญได้ช้ากว่า ส่วนการเจริญในภาวะกรดหรือการทนกรดของเชื้อพบว่ามีเชื้อที่เจริญได้ในภาวะกรดที่สูงถึง 10 กรัมต่อ 100 มล. ได้แก่รหัสเชื้อ NS 05, NS 91 และ NS 132S ซึ่งเป็นที่ต้องการในระดับโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำส้มสายชู ในการที่เซลล์สามารถทนกรดได้สูง ๆ และการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู ณ อุณหภูมิ 35 °ซ และ 40 °ซ พบว่าเชื้อเจริญได้เล็กน้อย ณ อุณหภูมิ 35 °ซ แต่ไม่สามารถเจริญได้เลย ณ อุณหภูมิ 40 °ซ ซึ่งการผลิตน้ำส้มสายชูในระดับอุตสาหกรรมจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ประมาณ 30 °ซ โดยระบบหล่อเย็นเนื่องจากมีความร้อนเกิดขึ้นจากการออกซิไดส์เอทธานอลไปเป็นกรดแอซีติกของเชื้อน้ำส้มสายชู

เชื้อน้ำส้มสายชูที่คัดเลือกไว้ 5 ไอโซเลตได้นำมาตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี พบว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตติดสีแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น ๆ ไม่มีเอนโดสปอร์ มีโคโลนีสีขาวถึงสีครีมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลที่ละลายได้ในน้ำ มีคุณสมบัติออกซิไดส์แลกเตตและแอซีติกไปเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ เซลล์มีเอนไซม์แคทาเลส รหัสเชื้อ NS 05 สามารถสร้างเมือกบนผิวหน้าอาหารเหลว สามารถสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้แก่ L-Arabinose, D-Glucose, Glycerol D-Mannitol, D-Mannose, D-Xylose, Ethanol และ D-Galactose (เว้นรหัสเชื้อ NS 05 ที่ไม่สามารถใช้ D-Galactose ในการเจริญได้) จากคุณสมบัติต่าง ๆ ดังกล่าวแล้วน่าจะจัดเชื้อน้ำส้มสายชูที่แยกและคัดเลือกเพื่อผลิตกรดน้ำส้มทั้ง 5 ไอโซเลตนี้เป็น Acetobacter aceti ซึ่งเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตอาจเป็นคนละสายเชื้อ (strain) นอกจากนี้

บรรณานุกรม

1. นภา โล่ห์ทอง . 2520 . น้ำส้มสายชู . ข่าวสารเกษตรศาสตร์. 21 (4) : 70-75.
2. นันทพร วรวุฒิพงษ์ . 2517 . การคัดสายพันธุ์บักเตรีเพื่อใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
3. รสสุคนธ์ เหล่าไพบูลย์ . 2528 . การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อน้ำส้มสายชูที่เหมาะสมต่อวิธีการผลิตแบบต่าง ๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
4. ราชกิจจานุเบกษา . 2523 . เล่มที่ 97 ตอนที่ 38, หน้า 772.
5. Adams, M.R. 1985. Vinegar, p. 1-47. In Microbiology of Fermented Foods , Vol.1,ed. by B.J.B. Wood, Elsevier Applied Sciences Publishers, London.
6. Allgeier, R.J. and F.M. Hildebrandt. 1960. Newer developments in vinegar manufacture. Adv. Appl. Microbiol . 11:163-182.
7. Asai, T. 1968. Acetic Acid Bacteria. University of Tokyo Press, Tokyo. 343 p.
8. Asai, T. ; H. Iizuka and K. Komagata. 1964. The flagellation and taxonomy of genera Gluconobacter and Acetobacter with reference to the existence of intermediate strains. J. Gen. Appl. Microbiol . 10 (2) : 95-125.
9. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) . 1990 . Official Methods of Analysis. 15th ed. Vol.2 ed. by K. Helrich , Assosiation of Official Analytical Chemists, INC. , Arlington, Virginia.
10. Aurand, L.W. ; J.A. Singleton ; T.A. Bell and J.L. Etchells. 1966. Volatile components in the vapors of natural and distilled vinegar. Food Sci. 31 (2) : 172-177.
11. Banwart, G.J. 1979. Basic Food Microbiology. The AVI Publishing Co., Inc., Connecticut. 781 p.
12. Beaman, R.G. 1967. Vinegar fermentation, p. 344-376. In Microbial Technology. ed. by H.J. Peppler, Van Nostrand-Reinhold, New Jersey.

13. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. , The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1268 p.

14. Casida, L.E. 1968. Industrail Microbiology. John Wiley and Sons, Inc., New York. 460 p.

15. Cirigliano, M.C. 1982. A selective medium for the isolation and differentiation of Gluconobacter and Acetobacter. J. of Food Sci. 47 : 1038-1039.

16. Conner, H.A. and R.J. Allqeier. 1976. Vinegar : Its history and development. Adv. Appl. Microbiol. 20 : 81-133.

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

18. De Ley, J. and J. Frateur. 1974 a. The genus Gluconobacter. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. ed. by R.E. Buchanan and N.E. Gibbons, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

19. _____. 1974b. The genus Acetobacter. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed., ed. by R.E. Buchanan and N.E. Gibbons, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

20. De Ley, J.; M.Gillis and J. Swings. 1984. Acetobacteriaceae. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1, ed. by N.R. Krieg, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

21. Ebner, H. 1982. Vinegar., p. 802-834. In Prescott and Dunn's Industrial Microbiology. 4 th ed., ed. by G.Reed., AVI, Westport, Connecticut.

22. Ebner, H. and A. Enenkel. 1976. Ultrafiltration process and apparatus using low hydrostatic pressure to prevent concentration polarization. US Patent 3,974,068. 18 p.

23. Ebner, H. ; K.Pohl and A. Enenkel. 1967. Self-priming aerator and mechanical defoamer for microbiological processes. Biotech. Bioeng. 9 : 357-364.

24. Entani, E.; S. Ohmori ; H.Masai and K.Suzuki . 1985 . Acetobacter polyoxogenes SP. NOV., A New Species of an Acetic Acid Bacterium Useful for Producing Vinegar with High Acidity. J.Gen. Appl. Microbiol . 31 : 475-490.

25. 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 Philippines. Agr . Ital . (Pisa) . 69 (3) : 148-457.

26. Gibbs, H.D. 1911. The alcohol industry of the Philippines Islands I. Philippines J. Sci . 6 : 99-206.

27. Gibbs, B.M. and D.A. Shapton. 1968. Identification Method for Microbiologist. Part B., Academic Press, New York.

28. Gillis, M. and J. De Ley. 1980 . Intra-and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of Acetobacter and Gluconobacter. Int. J. Syst. Bacteriol. 30 : 7-27.

29. Greenshields, R.N. 1978. Acetic acid : vinegar, p.121-186. In Primary Products of Metabolism , Economic Microbiology . ed. by A.H. Rose, Academic Press, London.

30. Hesseltine, C.W. 1965. Industrial mycology. Mycologia . 57 : 177-179.

31. Hromatka, O. and H. Ebner. 1959. Vinegar by submerged oxidative fermentation . Ind. Eng. Chem. (Ind. ed.) . 51(10) : 1270-1280.

32. Hucker, G.J. and H.J. Conn. 1923. Tech. Bull. N.Y. St. Agric . Exp. Stn . , 93 :3.

33. Komagata, K. 1975. In Classification and Identification of Microorganisms , ed. by T. Hasegawa , Univ. of Tokyo Press, Tokyo, p. 203.

34. Leifson , E. 1954 . Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbial serol. 20 : 102.

35. Liaguno, C. 1971 . Spanish wine vinegar . Process Biochem . 6 (5) : 27-28 , 33.

36. Lotong, N. 1977. Coconut Juice as Substrate for Propagation of Vinegar Starter . Paper presented at the Symposium on Indigenous Fermented Foods (SIFF) , 21-27 November (Bangkok, Thailand). Marcel Dekker, Inc. New York.

37. Lotong, N. 1983 . Thai coconut vinegar, p. 413-414 . In Handbook of Indigenous Fermented Food . Vol. 9, ed. by K.H. Steinkraus, Marcel Dekker, Inc. New York.

38. Masai , H. 1980 . Recent technical developments on vinegar manufacture in Japan. p.24. In Microbiology of Fermented Foods. Vol.1, ed. by B.J.B. Wood (1985), Elsevier Applied Science Publishers, London.

39. Mayer , E. 1953. Historic and modern aspects of vinegar making (acetic fermentation). Food Tech. 17 : 582-584.

40. Minakami, H. ; E.Entani; K.Tayama; S.Fujiyama and H.Masai. 1984. Agric. Biol. Chem. 48 :2405.

41. Muller, F. 1978. A modern bioreactor for vinegar production. Process Biochem. 13 : 10-11.

42. Nickol, G.B. 1979. Vinegar, p. 155-172. In Microbial Technology. Vol.2, ed. by H.J. Pepple and D. Perlman, Academic Press, New York.

43. Norris, J.R. and D.W. Ribbons. 1970. Method in Microbiology. Academic Press, New York.

44. Rao, M.R.R. 1957. Acetic acid bacteria. Ann. Review of Microbiol. 11 : 317-337.

45. Rhodes, A. and D.L. Fletcher. 1966. Principles of Industrial Microbiology. Pergamon Press, New York.

46. Shimizu, H. ; K. Miyai ; H. Matsuhisa ; E. Iwasaka and M. Jomoyeda. 1977. Effect of ethanol on acetate oxidation by Acetobacter aceti . European J. Appl. Microbiol. 3 : 303 - 311.

47. Shimwell, J.L. 1954 . Pure culture vinegar production . J. Inst. Brewing. 60(2) : 136-141.

48. Shimwell, J.L. ; J.G. Carr and M.E. Rhodes. 1960. J.Gen. Microbiol . 23 : 283.

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

50. Vaughn, R.H. 1942. The acetic acid bacteria. Wallerstein Labs . Commun. 5: 5-26.

51. Wahid, M.A. and M.I.D. Chughtai. 1969. Studies in the chemical activities of microorganisms. VII : Acetic acid (vinegar) from indigenous raw materials. Pakistan J. Scientific Res . 21 (3,4) : 88-93.

52. White, J. 1970. Malt vinegar manufacture. Process Biochem . 5 (10) : 54-56.

53. Yamada, Y. : Y. Okada and K. Kondo . 1976. Isolation and Characterization of "Polarly Flagellated Intermediate Strains" in Acetic acid Bacteria. J.Gen. Appl. Microbiol. 22 : 237-245.

54. Yasui, Y. ; Y. Suneya and A. Mori. 1978 . Behavior of acetic acid bacteria grown in surface culture toward oxygen. J.Ferment. Technol. 56 : 266-272.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Glucose - Ethanol - Yeast extract Medium

Glucose	20.0	gm
Ethanol[1/]	50.0	ml
Yeast extract	5.0	gm
Distilled water	1,000	ml
pH 4.5		

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

[1/] เมื่ออาหารเย็นแล้วเติมเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีปราศจากเชื้อ (aseptic technique)

2. Glucose - Ethanol - Yeast extract - $CaCO_3$ Agar

Glucose	20.0	gm
Ethanol[2/]	50.0	ml
Yeast extract	5.0	gm
$CaCO_3$[3/]	20.0	gm
Agar	20.0	gm
Distilled water	1,000	ml

วิธีเตรียมเช่นเดียวกับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 1

[2/] เติมเอทธานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ก่อนเทเพลต (plate)

[3/] อบ $CaCO_3$ โดยใช้ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 160 °C เป็นเวลา 2 ชม. แล้วเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วยวิธีปราศจากเชื้อ

3. Ethanol - Yeast extract Medium

Ethanol	20.0	ml
Yeast extract	5.0	gm
Distilled water	1,000	ml
pH 6.8		

4. Glucose - Yeast extract - $CaCO_3$ Agar

Glucose	30.0	gm
Yeast extract	2.0	gm
Peptone	3.0	gm
$CaCO_3$ [3/]	20.0	gm
Agar	20.0	gm
Distilled water	1,000	ml

5. Yeast extract - Ethanol - $CaCO_3$ Agar

Yeast extract	10.0	gm
Ethanol [2/]	20.0	ml
$CaCO_3$ [3/]	20.0	gm
Agar	20.0	gm
Distilled water	1,000	ml

วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 3-5 เช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 1

[2/,3/] เช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. Calcium lactate Agar

Yeast extract	10.0	gm
Calcium lactate	10.0	gm
Agar	20.0	gm
Distilled water	1,000	ml
pH 7.0		

7. Sodium acetate Medium

Peptone	3.0	gm
Yeast extract	2.0	gm
Sodium acetate	2.0	gm
Distilled water	1,000	ml
Bromothymol blue	0.002	%
pH 6.4		

8. Yeast extract - Mannitol - Peptone Medium

Yeast extract	5.0	gm
Mannitol	25.0	gm
Peptone	3.0	gm
Distilled water	1,000	ml

9. Mannitol Agar

Mannitol	25.0	gm
Yeast extract	5.0	gm
Peptone	3.0	gm
Agar	20.0	gm
Distilled water	1,000	ml
pH 6.0		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. Glucose - Mannitol - Yeast extract Agar

Glucose	10.0	gm
Mannitol	20.0	gm
Yeast extract	5.0	gm
Agar	20.0	gm
Distilled water	1,000	ml

วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 6-10 เช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 1

11. Acid Formation Test Medium

Basal medium	:	Yeast extract	5	gm
		Carbon source[4/]	10	gm
		Bromocresol purple	0.002	%

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วรีบนำมาลดอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแช่ในน้ำเย็น

[4/] Carbon sources : L-Arabinose, D-Cellobiose, Esculin D-Frutose, D-Galactose, D-Glucose, Glycerol, D-Mannitol, Maltose D-Mannose, Melezitose, Melibiose, Raffinose, Rhamnose, D-Ribose Salicin, L-Sorbose, Trehalose, D-Xylose, Starch และ Ethanol

ภาคผนวก ข.

การวิเคราะห์เคมี การย้อมเชื้อ และการเตรียมสาร

1. ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acid) ปรับปรุงจาก AOAC (9)

สารเคมีได้แก่

1.1 น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เตรียมโดยนำน้ำกลั่นมาต้มเดือด 20 นาที เติม soda-lime เล็กน้อย

1.2 สารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH เตรียมจาก NaOH 4 กรัมที่เติมน้ำกลั่นปลอดคาร์บอนไดออกไซด์จนครบ 1 ลิตร เก็บในขวดแก้วที่กันคาร์บอนไดออกไซด์และเป็นแก้วทนด่าง ก่อนใช้นำมาหาความเข้มข้นมาตรฐานก่อน

การหาความเข้มข้นมาตรฐานของ 0.1 N NaOH ทำโดยชั่ง acid potassium phthalate (อบ 2 ชั่วโมงที่ 120 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง)อย่างละเอียดประมาณ 0.3 กรัม เติมลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 90-100 มิลลิลิตร เมื่อ acid potassium phthalate ($KHC_8H_4O_4$) ละลาย จึงเติมสารละลายฟีนอฟธาลีน (phenolphthalein) 3 หยดแล้วไทเทรตด้วยสารละลาย 0.1 N NaOH ความเข้มข้นมาตรฐานคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (N)} = \frac{\text{กรัม } KHC_8H_4O_4 \times 1{,}000}{\text{มิลลิลิตร NaOH} \times 204.229}$$

1.3 สารละลายฟีนอฟธาลีน (phenolphthalein) ชั่งฟีนอฟธาลีน 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.4 วิธีวิเคราะห์ นำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรเติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด แล้วไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึง end point เห็นเป็นสีชมพู คำนวณปริมาณกรดเป็นกรดแอซีติก ตามสูตรดังนี้

ปริมาณกรดทั้งหมด (กรัมต่อ 100 มล.) = $\frac{N \times V \times 60.1 \times 100}{1,000 \times 10}$

โดยกำหนดให้ N = ความเข้มข้นมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

2. การย้อมเชื้อ โดยวิธีแกรม (Gram's stain) ดัดแปลง โดย Hucker (32) มีวิธีการดังต่อไปนี้

2.1 เตรียมฟิล์มบาง ๆ (smear) ของเชื้อแบคทีเรียบนสไลด์ที่สะอาด

2.2 ตั้งทิ้งไว้ให้รอยฟิล์มนั้นแห้งในอากาศ

2.3 fix smear โดยใช้ความร้อน

2.4 ย้อมสีโดยวางสไลด์ที่มีฟิล์มของเชื้อบนแท่งแก้ววางสไลด์ที่พาดอยู่บนอ่างน้ำ หยดสี Gram's crystal violet ให้ท่วมรอยฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 นาที รินสีที่เหลือออก ล้างด้วยน้ำประปา

2.5 หยด Gram's iodine solution ให้ท่วมฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 นาที รินสีที่เหลือออก ล้างด้วยน้ำประปา

2.6 ล้างสีออก (decolorize) ด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างด้วยน้ำประปา

2.7 ย้อมทับด้วย Gram's safranin solution ทิ้งไว้ 10-20 วินาที รินสีที่เหลือออก ล้างด้วยน้ำประปา ทิ้งให้ฟิล์มแห้งเองในอากาศ

2.8 นำสไลด์ไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุใช้น้ำมัน (oil immersion objective lens)

ถ้าเชื้อติดสีของ crystal violet แสดงว่าเชื้อนั้นจัดเป็นพวกแกรมบวก (Gram-positive) แต่หากติดสีแดงของ safranin แสดงว่าเชื้อนั้นจัดเป็นพวกแกรมลบ (Gram-negative)

3. สีย้อมเชื้อตามวิธีของ Gram ดัดแปลง โดย Hucker (32)

3.1 Gram's crystal violet ประกอบด้วย

Solution A :	Crystal violet	2.0	gm
	Ethanol (95%)	20.0	ml
	ละลาย crytal violet ใน ethanol		

Solution B :	Ammonium oxalate	0.8	gm
	Distilled water	80.0	ml
	ละลาย ammonium oxalate ในน้ำกลั่น		
	ผสม Solution A และ Solution B เข้าด้วยกัน		

3.2 Gram's iodine (Lugol's solution) ประกอบด้วย

Iodine	1.0	gm
Potassium iodide	2.0	gm
Distilled water	300	ml
ผสม iodine และ potassium iodide ใน โกร่ง บดให้เข้ากัน ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นทีละน้อยจน ครบ 300 มล. แล้วผสมให้เข้ากัน		

3.3 Gram's safranin ประกอบด้วย

Safranin	0.25	gm
Ethanol (95%)	10.00	ml
Distilled water	100	ml
ละลาย safranin ใน ethanol เติมน้ำกลั่นแล้ว ผสมให้เข้ากัน กรองผ่านกระดาษกรอง		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (3%) ประกอบด้วย

H_2O_2	3.0	gm
Distilled water	100	ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บใส่ขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย