บทที่ 5

วิจารณ์และผลการทดลอง

จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้ทำมาตั้งแต่เริ่มแรกในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์สับปะรด ดังรายละเอียดที่แสดงไว้ในผลการทดลอง โดยได้ดำเนินการทดลองตามขั้นตอนที่กล่าวไว้ในบทที่ 4 เพื่อให้ได้ผลตามเป้าหมายที่วางไว้ จึงพอจะสรุปผลของแต่ละการทดลองได้ดังนี้

ในเรื่องของอัตราส่วนที่เหมาะสมของเอทานอล และกรดอะซิติกเริ่มต้นในการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์สับปะรด ได้ทำการทดลองที่อัตราส่วนต่าง ๆ กันดังนี้ อัตราส่วนของเอทานอลต่อกรดอะซิติก 6 : 0.4, 7 : 0.4, 8 : 0.4, 6 : 1, 7 : 1, 8 : 1, 6 : 2, 7 : 2, 8 : 2 ตามลำดับ โดยใช้เครื่องหมักแบบคอลัมน์ดังรูปที่ 1 จากผลการทดลองในรูปที่ 4 เมื่อใช้อัตราส่วนของเอทานอล 6, 7, 8 ต่อกรดอะซิติก 0.4 จะให้ผลที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน แต่ถ้าจะทำการหมักโดยใช้อัตราส่วนของกรดอะซิติก 0.4 นี้จะเห็นได้ว่า อัตราส่วนของเอทานอลต่อกรดอะซิติก 7 : 0.4 จะเหมาะสมที่สุด และเมื่ออัตราส่วนของเอทานอลต่อกรดอะซิติลดลง ดังที่แสดงในรูปกราฟที่ 5 พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมจะกลายเป็น 7 : 1 ซึ่งมีแนวโน้มมาจากรูปที่ 4 และในรูปกราฟที่ 6 ก็เช่นเดียวกัน จะเห็นว่าที่อัตราส่วนของเอทานอลต่อกรดอะซิติกที่เหมาะสมจะเป็น 7 : 2 ซึ่งก็มีแนวโน้มมาจากรูปกราฟที่ 4 และ ที่ 5 และจากผลการทดลองดังที่แสดงในกราฟรูปที่ 4, 5, 6 นั้น จะเห็นได้ชัดว่า ที่อัตราส่วน 7 : 1 จะเหมาะสมที่สุด ซึ่งในปี ค.ศ. 1869 **Pasteure** (21) ได้กล่าวไว้ว่าเชื้อ **A. aceti** จะเจริญได้ดีในเอทานอล ต้องมีกรดอะซิติกอยู่ด้วย และ **U.S. Patent** (12) ได้รายงานไว้ว่าในการหมักน้ำส้มสายชูด้วยวิธีการแบบ **Submerged** นั้น ความเข้มข้นทั้งหมด ความเข้มข้นของเอทานอลและกรดอะซิติก มีผลต่ออัตราการเพิ่มขึ้นของ **Acetobacter** ดังนั้นในการหมักขั้นตอนต่อไปจึงใช้อัตราส่วนของเอทานอลต่อกรดอะซิติกเริ่มต้น 7 : 1

จากการศึกษาสารอาหารเสริมที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ A. aceti ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในบทที่ 4 พบว่ามีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ A. aceti และการผลิตน้ำส้มสายชูได้ช้าเร็วต่างกัน เช่น ได้ทำการทดลองศึกษาถึงความจำเป็นของแมนนิทอลในการผลิตน้ำส้มสายชูในปริมาณต่าง ๆ กันคือร้อยละ 0, 0.05, 0.1, 0.25 โดยน้ำหนักตามลำดับ ดังแสดงผลไว้ในกราฟรูปที่ 7 โดยที่ใส่ยีสต์แอกแทรคท์ เปปโตน และไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟทร้อยละ 0.05, 0.03, 0.5 ตามลำดับ พบว่าเมื่อใช้แมนนิทอลร้อยละ 0.05, 0.1, 0.25 นั้น ผลที่ได้เกือบจะไม่แตกต่างกันเลยในแง่ของการผลิตกรดอะซิติก ดังนั้นการเติมแมนนิทอลในปริมาณที่มากเกินไปจึงไม่จำเป็น จะเห็นว่าใส่ลงไปเพียงร้อยละ 0.05 ก็เป็นการเพียงพอแล้ว แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับกรณีที่ไม่ได้ใส่แมนนิทอล จะมีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งตรงกับข้อเสนอของ Berjerinek และ Hoyer (21) ที่ว่านอกจากเอทานอล กรดอะซิติก เกลือแอมโมเนียม กลูโคส ยีสต์แอกแทรคท์ แล้ว แมนนิทอลก็มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อ A. aceti เช่นกัน นอกจากนั้นแล้ว De Ley and Schell (1959)(20) ยังได้กล่าวไว้ว่า A. aceti สามารถออกซิไดซ์ แมนนิทอล แมนโนส เป็นแหล่งของคาร์บอนได้ แต่อย่างไรก็ตาม แมนนิทอลจะถูกใช้ไปในระยะเริ่มแรกของการหมักเท่านั้น แต่เมื่อการหมักดำเนินไปได้ระยะหนึ่ง ก็จะใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (21) คิดว่าแมนนิทอลน่าจะมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อ A. aceti เท่านั้น ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงเลือกใช้ประมาณแมนนิทอลร้อยละ 0.05

ศึกษาอิทธิพลของสารอาหารตัวอื่นที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งก็คือไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟท และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท ทั้งนี้เนื่องจากว่าสารอาหารทั้งสองตัวนี้เป็นแหล่งของฟอสเฟทที่มีส่วนสำคัญในขบวนการเมตาโบลิซึม (Metabolism) โดยที่ยังใช้ยีสต์แอกแทรคท์ เปปโตน ร้อยละ 0.05 และ 0.03 ตามลำดับ และในระยะเริ่มแรกได้ทดลองใช้ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟท ร้อยละ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามผลการทดลองของ สุภมาศ ภมรบุตร (3) แต่อย่างไรก็ตาม

จากผลการทดลองของ Hall et.all. (1953)(21) พบว่าเชื้อ A. aceti มีความสามารถในการใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทเป็นแหล่งของไนโตรเจนได้ ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนต่อมาจึงได้ใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเพื่อเปรียบเทียบผลในการเจริญเติบโตของเชื้อ A. aceti และการผลิตกรดอะซิติก ดังแสดงผลในรูปกราฟที่ 8 พบว่าในปริมาณที่เท่ากันทั้งไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟท และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทนั้น ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทจะให้ผลในการผลิตกรดอะซิติกได้ดีกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่า ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทจะเป็นแหล่งของฟอสเฟทแล้ว ยังเป็นแหล่งของไนโตรเจนอีกด้วย จากนั้นนำผลที่ได้ไปทดลองในขั้นตอนต่อมาโดยศึกษาถึงความจำเป็นของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทในปริมาณต่าง ๆ กันคือร้อยละ 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรตามลำดับ ดังผลที่แสดงในรูปกราฟที่ 9-10 พบว่าเมื่อใช้ในปริมาณร้อยละ 0.3, 0.5 และ 1 นั้น ผลที่ได้เกือบจะไม่แตกต่างกันเลย ในแง่ของการผลิตกรดอะซิติก แต่จะมีการแตกต่างจากปริมาณร้อยละ 0.1 อย่างเห็นได้ชัด ดังรูปกราฟที่ 9 ดังนั้นการเติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทในปริมาณมากจึงไม่จำเป็น และในรูปกราฟที่ 10 จะเห็นว่าเมื่อใช้ในปริมาณ ร้อยละ 0.3 จะให้ผลแตกต่างจากกรณีที่ไม่ใส่อย่างเห็นได้ชัด ในแง่ของการผลิตกรดอะซิติก ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนต่อมาจึงเลือกใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟทในปริมาณร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ทำการทดลองศึกษาตัวแปรต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับเครื่องหมักที่มีอิทธิพลต่อการหมักตัวแปรที่จะศึกษาในขั้นต้นคือ ความสูงของแพคเบด หรือปริมาณพื้นที่ผิวสัมผัส โดยใช้ไม้มะค่าทรงกลมเป็นแพคเบดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร (2) เพื่อให้ง่ายในการศึกษาจึงกำหนดให้ตัวแปรอื่น ๆ คงที่ เช่น อัตราการให้อากาศ 0.02 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที ตามข้อมูลที่ได้จาก U.S. Patent (12) อัตราส่วนของเอทานอลต่อกรดอะซิติกเริ่มต้น และสารอาหารเสริมที่เหมาะสม ตามผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.1 และ 4.2 นอกจากนั้นยังได้กำหนดอัตราการไหลเข้าของน้ำหมักค่าหนึ่งขึ้นมาด้วย ซึ่งจากผลการทดลองที่ระดับความสูงของแพคเบดต่าง ๆ กันคือ 0, 15, 22, 29 เซนติเมตร พบว่า อัตราการเกิดกรดอะซิติกจะเร็วขึ้นเมื่อปริมาณพื้นที่ผิวสัมผัสเพิ่มขึ้น ซึ่งจากหลักของการถ่ายเทมวลสาร (7) นั้น อัตราการถ่ายเทมวลสารจะแปรผันกับพื้นที่ผิวสัมผัส ดังแสดงในรูปกราฟที่ 11

โดยที่ระดับความสูงของแพคเบด 29 เซนติเมตร จะให้ผลในการผลิตกรดอะซิติก ดีกว่าที่ความสูงของแพคเบด 22, 15, 0 เซนติเมตรตามลำดับ คือในชั่วโมงที่ 70 ที่ระดับความสูงของแพคเบด 29, 22, 15 เซนติเมตร อัตราการเกิดกรดอะซิติกจะมากกว่าที่ระดับความสูง 0 เซนติเมตร ประมาณร้อยละ 42, 29, 13 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากว่าแพคเบดนอกจากจะเป็นที่เกาะของเชื้อ A. aceti แล้วยังช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศที่ไหลสวนขึ้นไปและน้ำหมักที่ไหลลงมาอีกด้วย และในรูปกราฟที่ 12 นั้นพบว่า เมื่อความสูงของแพคเบดสูงขึ้นปริมาณการใช้เอทานอลและค่าสภาพการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตรก็สูงตามไปด้วย ดังแสดงในรูปกราฟที่ 13 ซึ่งค่าสภาพการดูดกลืนแสงก็เป็นหนทางหนึ่งที่จะใช้ติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อ A. aceti (25) ดังนั้นเมื่อปริมาณเชื้อมากขึ้นอัตราการใช้เอทานอลก็จะสูง การเกิดกรดอะซิติกก็สูงด้วย ตัวแปรอีกตัวหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการหมักคือ ระบบการไหลหมุนเวียนของน้ำหมัก

ตัวแปรอีกตัวหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการหมักคือ ระบบการไหลหมุนเวียนของน้ำหมัก โดยกำหนดให้ตัวแปรอื่น ๆ คงที่ คืออัตราการให้อากาศ 0.02 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที อัตราส่วนของเอทานอลต่อกรดอะซิติก และสารอาหารเสริมที่เหมาะสม ตามผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.1 และ 4.2 โดยทำการทดลองที่ความสูงของแพคเบด 15 และ 29 เซนติเมตร ดังผลที่แสดงในรูปกราฟที่ 14 และ 15 จะเห็นได้ว่าที่ระดับความสูงของแพคเบด 15 เซนติเมตร ไม่ค่อยมีความแตกต่างกันมากนัก แต่ที่ระดับความสูงของแพคเบด 29 เซนติเมตร จะเห็นความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดระหว่างที่มีระบบการไหลหมุนเวียน และไม่มีระบบการไหลหมุนเวียนของน้ำหมัก คือแตกต่างกันประมาณร้อยละ 30 ในชั่วโมงที่ 80 ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่า ในระบบการไหลหมุนเวียนของน้ำหมักนั้น เชื้อที่เกาะอยู่ตามผิวของแพคเบดได้รับสารอาหารซึ่งไหลหมุนเวียนอยู่ตลอดเวลา โอกาสที่เชื้อจะได้รับสารอาหารใหม่ ๆ ที่ใช้ในการผลิตกรดอะซิติกได้ดีตลอดเวลา เทียบกับในระบบที่ไม่มีการไหลหมุนเวียน โอกาสที่อาหารจะถูกถ่ายมายังเชื้อด้วยฟองอากาศที่ลอยตัวจากด้านล่างจะน้อยกว่า และยิ่งถ้าหมักนานขึ้นอาหารจะค่อยๆลดน้อยลงโอกาสที่เชื้อจะได้รับสารอาหารก็ยิ่งน้อยไปอีก ดังนั้นจะเห็นได้ว่าความสูงของแพคเบดและระบบการไหลหมุนเวียนของน้ำหมักมีส่วนช่วยให้การหมักรวดเร็วยิ่งขึ้น ดังผลที่แสดงในรูปกราฟที่ 11 และ 15

ตัวแปรอีกตัวหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการหมักคือ อัตราการให้อากาศโดยกำหนดให้ตัวแปรอื่น ๆ คงที่ คือความสูงของแพคเบด 29 เซนติเมตร อัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก 2.7 ลิตรต่อนาที อัตราส่วนของเอทานอลต่อกรดอะซิติกและสารอาหารเสริมที่เหมาะสมตามผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.1 และ 4.2

โดยทำการทดลองที่อัตราการให้อากาศต่าง ๆ กันคือ 0, 0.02, 0.05 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ Acetobacter ต้องการออกซิเจน ดังนั้นในการหมักจึงต้องมีการให้อากาศอย่างเพียงพอ เพื่อเปลี่ยนเอทานอลให้เป็นกรดอะซิติก (21) U.S. Patent (12) กล่าวไว้ว่า ในการหมักน้ำส้มสายชูควรให้อัตราการให้อากาศอยู่ในช่วง 0.02-0.05 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที ไม่ควรจะสูงหรือต่ำกว่านี้ ซึ่งจากผลการทดลองในรูปกราฟที่ 17 จะเห็นได้ว่า เมื่อไม่ให้อากาศเข้าทางหัวกระจายอากาศด้านล่างของคอลัมน์ แต่อากาศจะมีโอกาสเข้าทางรูเปิดในขณะที่น้ำหมักไหลลงสู่ถังเก็บโดยแรงดึงดูดของโลกนั้น จะเกิดกรดอะซิติกร้อยละ 4.3 และเมื่ออัตราการให้อากาศ 0.02, 0.05 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที จะเกิดกรดอะซิติกร้อยละ 5.2 และ 4.6 ตามลำดับในชั่วโมงที่ 80 และในรูปกราฟที่ 21 จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มปริมาณการให้อากาศ ปริมาณการลดลงของเอทานอลจะเป็นสัดส่วนกันคือในชั่วโมงที่ 40 เมื่ออัตราการให้อากาศ 0, 0.02, 0.05 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที จะมีเอทานอลเหลือร้อยละ 3.5, 2.3, 1.3 โดยปริมาตรตามลำดับ และในรูปกราฟที่ 18-20 เมื่อพิจารณาระหว่างการลดลงของเอทานอล และการเพิ่มขึ้นของกรดอะซิติก เมื่ออัตราการให้อากาศต่าง ๆ กันพบว่า เมื่ออัตราการให้อากาศสูง ๆ จะทำให้เอทานอล และกรดอะซิติกบางส่วนสูญเสียไปซึ่งตรงกับที่ U.S. Patent (12) และ Kreipe (18) ได้รายงานไว้ ดังนั้นเพื่อที่จะลดปัญหาการสูญเสียอันเนื่องมาจากอัตราการให้อากาศ ก็ควรจะให้ในอัตราที่พอดี ซึ่งจากสมการการเปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดอะซิติก พอที่จะคำนวณอากาศที่ต้องการในทางทฤษฎีได้ดังนี้คือ

$$2CH_3CH_2\text{-}OH + 2O_2 \longrightarrow 2CH_3COOH + 2H_2O$$

92 64 2×60

ในการวิจัยใช้น้ำหมักทั้งหมด 15 ลิตร มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 7 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีค่าเท่ากับร้อยละ 3.702 โดยน้ำหนักที่ 30 องศาเซลเซียส (Perry) และความหนาแน่นของเอทานอลร้อยละ 7 โดยปริมาตรที่ 30 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.9898 กรัม/ซม^3

นั่นคือน้ำหมัก 15 ลิตร จะมีเอทานอล = 0.03702 x 15000 x 0.9898

= 549.69 กรัมเอทานอล

จากสมการข้างบน เอทานอล 2x92 กรัมต้องการออกซิเจน = 2 x 64 กรัม

∴ เอทานอลทั้งหมด 549.69 กรัมต้องการ = $\frac{2 \times 64 \times 549.69}{92}$ กรัม O_2

= 382.393 กรัม O_2

= 11.949978 โมล O_2

1 โมล ของก๊าซใด ๆ ที่ STP = 22.4 ลิตร

= 22.4 x (11.94978) ลิตร O_2

= 267.675 ลิตร O_2

แต่ในอากาศมี $O_2 = \frac{1}{5}$

นั่นคือน้ำหมัก 15 ลิตร ต้องให้อากาศเข้าไป = 267.675 x 5 ลิตรอากาศ/15 ลิตรน้ำหมัก

= 1338.375 "

เวลาที่ใช้ในการหมักทั้งหมดเฉลี่ย 96 ชั่วโมง

∴ อัตราการให้อากาศจริง ๆ ตามทฤษฎี = $\frac{1338.375}{15 \times 96 \times 60}$

= 0.0155 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหมัก/นาที

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเมื่ออัตราการให้อากาศ 0.02, 0.05 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที เมื่อเทียบกับอัตราการให้อากาศที่พอดี ในทางทฤษฎีแล้วจะมากเกินพอถึงร้อยละ 29 และ 222 ตามลำดับ ซึ่งก็ตรงกับผลการทดลองในรูปกราฟที่ 21 คือมีเอทานอลและกรดอะซิติกบางส่วนสูญเสียไปอันเนื่องมาจากอัตราการให้อากาศที่มากเกินพอ นั่นก็คือในการทำการทดลองควรให้อัตราการให้อากาศที่มากเกินพอเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เพื่อที่จะให้ปฏิกริยาการเปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนต่อไปจึงเลือกใช้อัตราการให้อากาศ 0.02 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที

ตัวแปรอีกตัวหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการหมักคือ อัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก โดยกำหนดให้ตัวแปรอื่น ๆ คงที่ คือความสูงของแพคเบด อัตราการให้อากาศ 0.02 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที อัตราส่วนของเอทานอล ต่อกรดอะซีติก และสารอาหารเสริมที่เหมาะสมตามผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.1 และ 4.2 โดยทำการทดลองที่อัตราการไหลเข้าของน้ำหมักต่าง ๆ กันคือ 2, 2.7, 3.15 ลิตรต่อนาที ผลปรากฏว่าที่อัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก 2.7 ลิตรต่อนาที จะให้ผลดีคือ ในชั่วโมงที่ 66 ให้กรดอะซิติกสูงถึงร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในขณะที่อัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก 2 และ 3.15 ลิตร ต่อนาที ให้กรดอะซิติกร้อยละ 3.3 และ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรตามลำดับ ดังผลการทดลองในรูปกราฟที่ 23 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าที่อัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก 2 ลิตรต่อนาทีนั้น อากาศที่ได้รับก่อนที่จะไหลลงสู่ท่อป้อนย้อนกลับอาจจะได้รับอากาศในอัตราที่มากเกินพอ และมีเวลาในการสัมผัสนานเกินไป คือใน 1 รอบก่อนที่จะไหลลงสู่ท่อป้อนย้อนกลับใช้เวลา 1 นาที 53 วินาที ดังผลการทดลองในตารางที่ 24 โดยที่ในการทดลองกำหนดให้ระดับความสูงของท่อไหลป้อนย้อนกลับคงที่คือ สูง 35 เซนติเมตร นับจากฐานของคอลัมน์ ดังรูปที่ 2 ในขณะที่อัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก 3.15 ลิตรต่อนาที ระยะเวลาในการสัมผัสก่อนที่จะไหลลงสู่ท่อป้อนย้อนกลับน้อยกว่าที่ 2 ลิตรต่อนาทีคือ ใช้เวลา 1 นาที 4 วินาทีใน 1 รอบของการไหลป้อนย้อนกลับ นอกจากนั้นแล้วที่อัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก 3.15 ลิตรต่อนาทีนั้น การไหลเข้าของน้ำหมักแรงมาก ทำให้เกิดการท่วมของน้ำหมักเหนือแพคเบด (flooding) ซึ่งอาจจะมีผลทำให้อัตราการถ่ายเทมวลสารไม่ดีเท่าที่ควร (7) ทั้งนี้โดยหลักการที่แท้จริงแล้วเราต้องการให้มีการกระจายของน้ำหมักผ่านแพคเบดอย่างทั่วถึง และไหลเป็นฟิล์มบาง ๆ รอบแพคเบดเหล่านั้น โดยที่กล่าวมาตั้งแต่ต้นแล้วว่า วัตถุประสงค์สำคัญในการใส่แพคเบดลงในเครื่องหมักก็เพื่อที่จะให้เชื้อน้ำส้มเกาะ และเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศที่ไหลขึ้นไป และน้ำหมักที่ไหลลงมา โดยเชื้อ A. aceti จะได้รับสารอาหารและออกซิเจนในน้ำหมักด้วยวิธีการแพร่กระจายจากภายนอกเซลล์เข้าไปภายในเซลล์ และจะมีการแพร่กระจายของสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกมาในทิศทางตรงข้าม ซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วยหลักการถ่ายเทมวลสาร โดยที่ความหนาของฟิล์มก็มีผลต่ออัตราการถ่ายเทมวลสารด้วยคือ เป็นอัตราส่วนผกผัน ดังนั้นจึงมีผลทำให้อัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก 3.15 ลิตรต่อนาที ให้กรดอะซิติกน้อยกว่าที่ 2.7 ลิตรต่อนาที ในชั่วโมงที่เท่ากัน ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และในการทดลองขั้นตอนต่อไปจึงเลือกใช้อัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก 2.7 ลิตรต่อนาที

นอกจากนั้นยังได้ทำการทดลองเพื่อที่จะดูว่าวัสดุอื่นที่เคยมีผู้ทำการทดลองใช้แล้วจะมีคุณสมบัติในการเป็นแพคเบดและให้กรดอะซิติกดีกว่าไม้มะค่าหรือไม่ จึงได้ทำการทดลองใช้ซังข้าวโพด และพลาสติกเป็นแพคเบด ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ไม้มะค่า ซังข้าวโพด และพลาสติก เป็นแพคเบดจะให้กรดอะซิติกร้อยละ 5, 3.6 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรตามลำดับในชั่วโมงที่ 66 ดังผลการทดลองในรูปกราฟที่ 26 นอกจากนั้นแล้วการใช้ซังข้าวโพดยังทำให้เกิดปัญหาการอุดตันของหัวกระจายน้ำหมักอีกด้วย เพราะเมื่อใช้ไปนาน ๆ จะยุ่ย แต่ไม้มะค่าและพลาสติกไม่มีปัญหาในการอุดตันดังกล่าว ซึ่งเหตุที่เรานำมาเปรียบเทียบกันนี้ก็เนื่องจากได้มีผู้ทำการทดลองผลิตน้ำส้มสายชูโดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแพคเบด แต่ไม่มีรายงานในการวิจัย จึงทำให้เกิดความคิดที่ว่า ซังข้าวโพดเป็นวัสดุที่มีความพรุนในตัว และเมื่อเทียบในปริมาตรที่เท่ากันกับไม้มะค่าและพลาสติกแล้วซังข้าวโพดจะมีพื้นที่ผิวสัมผัสมากกว่า น่าจะให้ผลในการผลิตกรดอะซิติกได้รวดเร็วกว่า แต่จากผลการทดลองให้ผลตรงข้าม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าลักษณะของซังข้าวโพดไม่สามารถทำให้เป็นทรงกลมอย่างไม้มะค่าและพลาสติกได้ ประกอบกับซังข้าวโพดมีความยืดหยุ่นในตัว ดังนั้นเมื่อนำมาแพคโดยยึดเอาปริมาตรของไม้มะค่าเป็นเกณฑ์ เมื่อทำการทดลองไปซังข้าวโพดจะยุบตัวเข้าหากัน ซึ่งจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่จะทำให้ลดพื้นที่ผิวสัมผัสของตัวมันเอง และลดช่องว่างในการที่จะให้อากาศและน้ำหมักได้สัมผัสกันอีกด้วย นอกจากนั้นแล้วยังทำให้เกิดช่องทางตายตัวอันเนื่องมาจากเกิดการอุดตันในบางช่วง ทำให้อากาศกระจายผ่านแพคเบดได้ไม่สม่ำเสมอเท่ากันทุกจุด ส่วนกรณีที่ใช้พลาสติกเป็นแพคเบด เนื่องจากพลาสติกเบากว่าน้ำเพราะว่าข้างในกลวงจึงลอยอยู่เหนือระดับของน้ำหมักบางส่วน นอกจากนั้นแล้วผิวหน้าของพลาสติกค่อนข้างจะเรียบและมัน จึงทำให้เชื้อ A. aceti เกาะได้ไม่ดีเท่าที่ควรรวมทั้งในขณะที่มีการไหลสู่ท่อป้อนย้อนกลับของน้ำหมักพลาสติกจะเคลื่อนที่ขึ้นและลงตามจังหวะของการไหล ซึ่งเป็นการเขย่าไปในตัวทำให้พลาสติกเกิดการเสียดสีซึ่งกันและกัน อาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อ A. aceti ที่เกาะอยู่ที่ผิวหน้าหยุดออกและทำให้พลาสติกขาดคุณสมบัติในการเป็นแพคเบดที่ดี เมื่อเทียบกับไม้มะค่า

นอกจากนั้นยังได้ทำการศึกษาการหมักน้ำส้มสายชูแบบชนิดกึ่งต่อเนื่องเพื่อดูแนวโน้มที่จะเป็นไปได้โดยทำการถ่ายน้ำส้มสายชูออกร้อยละ 50 ของปริมาตรน้ำหมักทั้งหมด 15 ลิตร ทุก ๆ 50 ชั่วโมง แล้วทำการเติมไวน์ลงไปเท่ากับจำนวนที่ดึงออก โดยที่กำหนดให้ปริมาณเอทานอลรวมเท่ากับร้อยละ 7 (ตามการทดลองในหัวข้อที่ 4.1) ซึ่งจากผลการทดลองปรากฏว่าทุก ๆ ครั้ง

ที่มีการดึงน้ำส้มสายชูจำนวนหนึ่งจะมีการสะสมของกรดอะซิติกและเอทานอล ดังรูปกราฟที่ 28 และ 29 และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ หากทำการทดลองต่อไปอีกระยะหนึ่ง และคาดว่าเมื่อถึงจุดสุดท้าย การเปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกจะไม่เกิดขึ้น ทั้งนี้ก็ตรงกับผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.1 ที่ว่าจะต้องมีอัตราส่วนของเอทานอลต่อกรดอะซิติกที่เหมาะสมอัตราส่วนหนึ่ง ซึ่งจากรูปกราฟที่ 28 พอจะเห็นได้ว่าเมื่ออัตราส่วนของเอทานอลต่อกรดอะซิติกลดลง ปริมาณการเกิดกรดอะซิติกก็ลดลงตามไปด้วยโดยที่ความชันของเส้นกราฟจะค่อย ๆ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าความเข้มข้นรวมทั้งหมดเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อก็จะลดลงตามที่ U.S. Patent (12) ได้รายงานเอาไว้ แต่ในรูปกราฟที่ 30 จะเห็นได้ว่าทุก ๆ ครั้งที่ดึงเอาน้ำส้มสายชูออกจำนวนหนึ่งจะมีการเพิ่มขึ้นของค่าสภาพการดูดกลืนแสง โดยดูได้จากความชันของเส้นกราฟ คือจะค่อย ๆ ชันขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าค่าสภาพการดูดกลืนแสงส่วนหนึ่งมาจากการสะสมของกรดอะซิติกและเอทานอลมิใช่เกิดจากอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแต่เพียงอย่างเดียว โดยที่จริง ๆ แล้วอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อน่าจะลดลงตามเหตุผลที่กล่าวมาแล้วข้างต้น