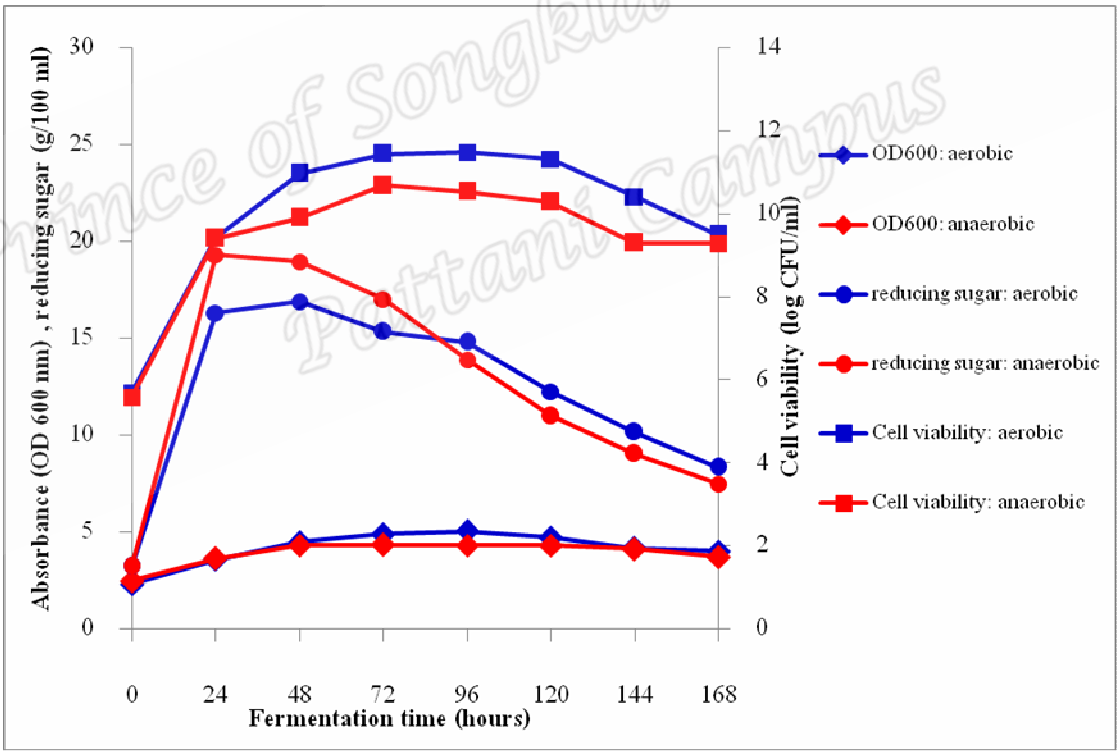
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตเอทานอลของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049 ในน้ำตาลโตนด

ทำการหมักน้ำตาลโตนดด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR5049 ที่อุณหภูมิห้อง (27±1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้สภาวะการหมักแบบมีอากาศ โดยปิดฝาภาชนะหมักด้วยจุกสำลีซึ่งอากาศสามารถผ่านเข้าออกภาชนะหมักได้ และสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศ โดยปิดฝาภาชนะปิดสนิทมีสายยางถ่ายเทแก๊สที่เกิดขึ้นออกนอกภาชนะหมัก พบว่า การเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 2 วัน (รูปที่ 5) เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5049 ในสภาวะการหมักแบบมีอากาศ มีการเจริญเติบโต (OD_{600}) เท่ากับ 4.5 และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับ $9.8x10^{10}$ CFU/ml สูงกว่าปริมาณเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5049 ในสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศ มีการเจริญเติบโต (OD_{600}) เท่ากับ 4.3 และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับ $9.1x10^{9}$ CFU/ml โดยตลอดระยะเวลาการหมัก *S. cerevisiae* TISTR 5049 จะมีการเจริญเติบโตในสภาวะการหมักแบบมีอากาศสูงกว่าการหมักแบบไม่มีอากาศอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 7 วัน เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5049 ในสภาวะการหมักแบบมีอากาศ มีการเจริญเติบโต (OD_{600}) เท่ากับ 4.0 และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับ $5.0x10^{9}$ CFU/ml ซึ่งสูงกว่าปริมาณเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5049 ในสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศ มีการเจริญเติบโต (OD_{600}) เท่ากับ 3.7 และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับ $2.9x10^{9}$ CFU/ml สอดคล้องกับการเจริญเติบโตของยีสต์ *Candida stellata* DBVPG 3827 และ *S. cerevisiae* DBVPG 6663 ที่เลี้ยงในน้ำองุ่นสังเคราะห์ในสภาวะการหมักแบบมีอากาศ (aerobic) จะมีการเจริญเติบโตของยีสต์ที่สูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะแบบไม่มีอากาศ (anaerobic) (Ciani *et al*., 2000) และการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* CBS 8066 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ยีสต์จะเจริญเติบโตในสภาวะที่มีอากาศได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ผลผลิตมวลเซลล์เท่ากับ 108 และ 87 มิลลิกรัมต่อกรัม (Modig *et al*.,2007) เนื่องจากในสภาวะที่มีอากาศ NAD^{+} จะถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการหายใจ ซึ่งจำเป็นต่อชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) (Ciani *et al*., 2000)

การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวซ์ในสภาวะการหมักทั้ง 2 แบบ พบว่า ในวันที่ 1 ของการหมัก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสภาวะการหมักแบบมีอากาศ มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 3.22 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เพิ่มเป็น 16.33 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และในสภาวะการหมักแบบไม่มี

อากาศ มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 3.38 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เพิ่มเป็น 19.34 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งสองสภาวะจะลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก 7 วัน โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ 8.36 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในสภาวะการหมักแบบมีอากาศ และ 7.51 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศ ดังในรูปที่ 5 ผลการทดลองเป็นไปได้ว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นในช่วงการหมักวันที่ 1 เกิดจากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถย่อยน้ำตาลซูโครสที่ใช้ในการปรับความหวานของน้ำตาลโตนดก่อนการหมัก เป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสได้ด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Horiuchi *et al.* (2000) ที่รายงานไว้ว่า ในช่วงการหมักไวน์เพื่อผลิตน้ำส้มสายชูจากหอมใหญ่ ด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* IR-2 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสจะเพิ่มขึ้นในช่วงการหมัก 0-24 ชั่วโมง ก่อนจะลดลงตามระยะเวลาการหมัก เนื่องจากยีสต์ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส ซึ่งเอนไซม์นี้ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนซูโครสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส



รูปที่ 5 ผลของสภาวะการหมักไวน์น้ำตาลโตนดแบบมีอากาศและไม่มีอากาศต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5049 (OD_{600}) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/100 ml) และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (log CFU/ml)

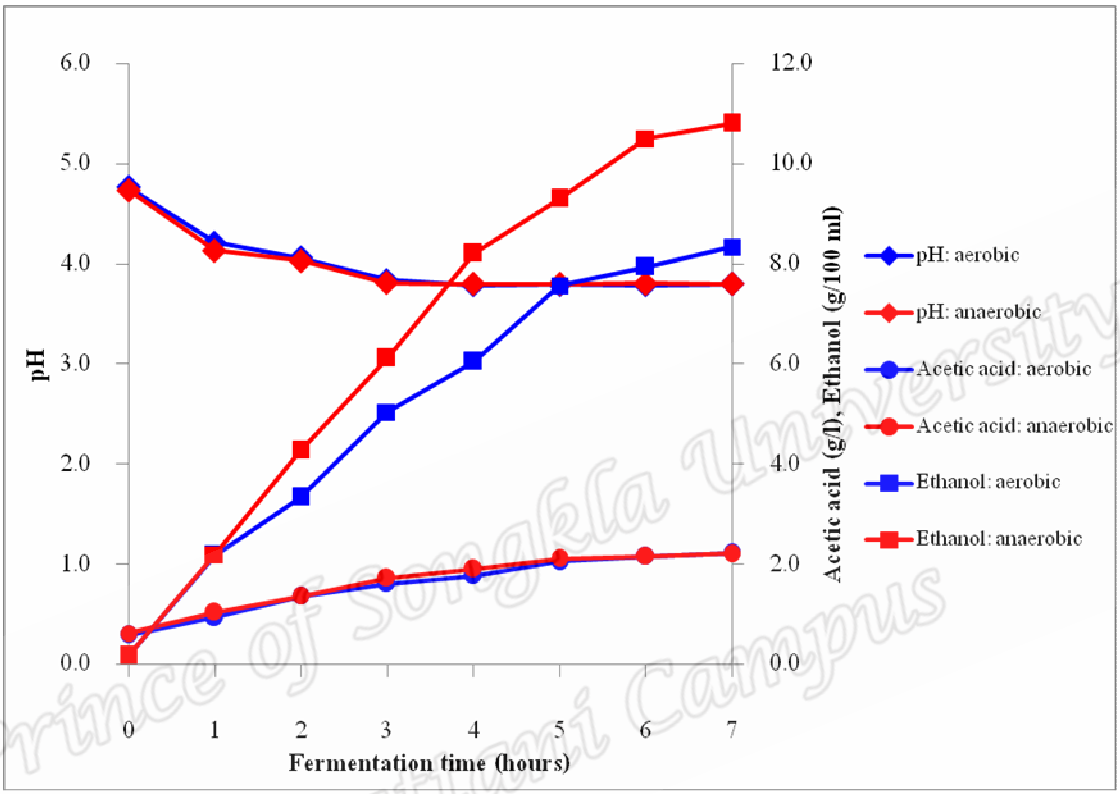
Prince of Songkla University Pattani Campus

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดอะซิติกในระหว่างการหมัก (รูปที่ 6) พบว่า ทั้ง 2 สภาวะการหมักมีการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชใกล้เคียงกัน โดยจะลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งคงที่ที่เวลาการหมักวันที่ 4 และเมื่อสิ้นสุดการหมัก 7 วัน มีค่าพีเอชเท่ากับ 3.80 ส่วนปริมาณกรดอะซิติกในสภาวะการหมักทั้ง 2 แบบ มีปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก ในสภาวะการหมักแบบมีอากาศจากเริ่มต้น มีปริมาณกรดอะซิติกเท่ากับ 0.60 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการหมัก มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 2.23 กรัมต่อลิตร และในสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศจากเริ่มต้นมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.63 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการหมัก มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 2.22 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองเป็นไปได้ว่าปริมาณกรดอะซิติกเป็นผลผลิตที่ยีสต์ผลิตขึ้นเกิดจากกระบวนการเอมบ์เดนเมเยอร์ฮอฟพาร์นาส โดยการเปลี่ยน glucose-6-phoshate ไปเป็นไพรูเวท (pyruvate) จากนั้นไพรูเวทส่วนที่ไม่ได้เข้าสู่วัฏจักรของกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) จะถูกเมตาบอไลท์ต่อไปเป็นกรดอะซิติก กระบวนการที่เกิดขึ้นนี้จะเกิดบริเวณด้านนอกของไมโตคอนเดรีย ในขณะที่เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* DBVPG 6663 ในน้ำอุ่นสังเคราะห์ ในสภาวะการหมักแบบมีอากาศจะมีปริมาณกรดอะซิติกเมื่อสิ้นสุดการหมัก 3.63 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะแบบไม่มีอากาศที่มีปริมาณกรดอะซิติก 0.8 กรัมต่อลิตร (Ciani *et al*., 2000)

การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมัก (รูปที่ 6) พบว่า ตั้งแต่ระยะเวลาการหมักวันที่ 2 การหมักในสภาวะแบบไม่มีอากาศจะให้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 4.28 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าการหมักในสภาวะแบบมีอากาศที่มีปริมาณเอทานอล 3.35 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และจะเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการหมัก โดยในสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศ ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลร้อยละ 6 ได้ในเวลาการหมัก 3 วัน และผลิตเอทานอลร้อยละ 8 ได้ในเวลาการหมัก 4 วัน ในขณะที่การหมักในสภาวะแบบมีอากาศ ยีสต์ผลิตเอทานอลร้อยละ 6 ได้ในระยะเวลาการหมัก 4 วัน และผลิตเอทานอลร้อยละ 8 ได้ในระยะเวลาการหมัก 6 วัน เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก (7 วัน) มีปริมาณเอทานอล 10.82 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศ และ 8.35 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในสภาวะการหมักแบบมีอากาศ เนื่องจากในสภาวะแบบไม่มีอากาศยีสต์จะเปลี่ยนไพรูเวทเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ในขณะที่ในสภาวะการหมักแบบมีอากาศ ยีสต์จะใช้ไพรูเวทในการสร้างพลังงานในรูปของ ATP ในวัฏจักรของกรดไตรคาร์บอกซิลิก เช่นเดียวกับ Ciani *et al*. (2000) ศึกษาการหมักไวน์โดยใช้น้ำอุ่นสังเคราะห์ ในสภาวะแบบไม่มีอากาศเชื้อยีสต์ *S cerevisiae* DBVPG 6663 จะผลิตปริมาณเอทานอลสูงกว่าสภาวะที่มีอากาศ ไวน์ที่ได้มีปริมาณเอทานอล 105.9 และ 50.7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลอง ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5049 ในสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศ

Prince of Songkla University Pattani Campus

สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่าในสภาวะการหมักแบบมีอากาศ ดังนั้นจึงเลือกการผลิตไวน์น้ำตาลโตนดในสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศ และใช้ระยะเวลาในการหมัก 3 และ 4 วัน เพื่อให้ได้ไวน์น้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 ตามลำดับ ในการศึกษาต่อไป



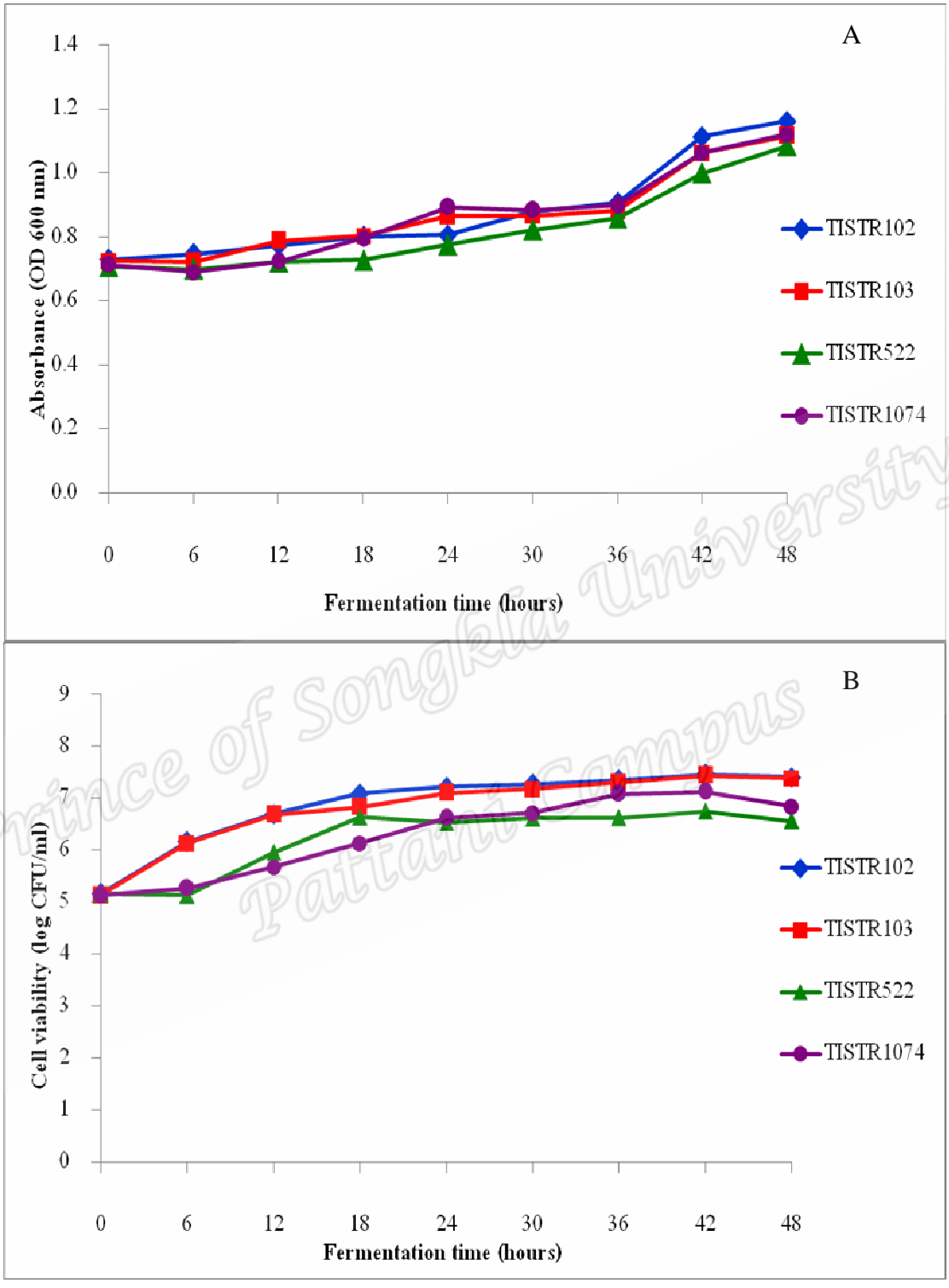
รูปที่ 6 ผลของสภาวะการหมักไวน์น้ำตาลโตนดแบบมีอากาศและไม่มีอากาศต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ปริมาณกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) และปริมาณเอทานอล (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Acetobacter aceti* ในน้ำตาลโตนด

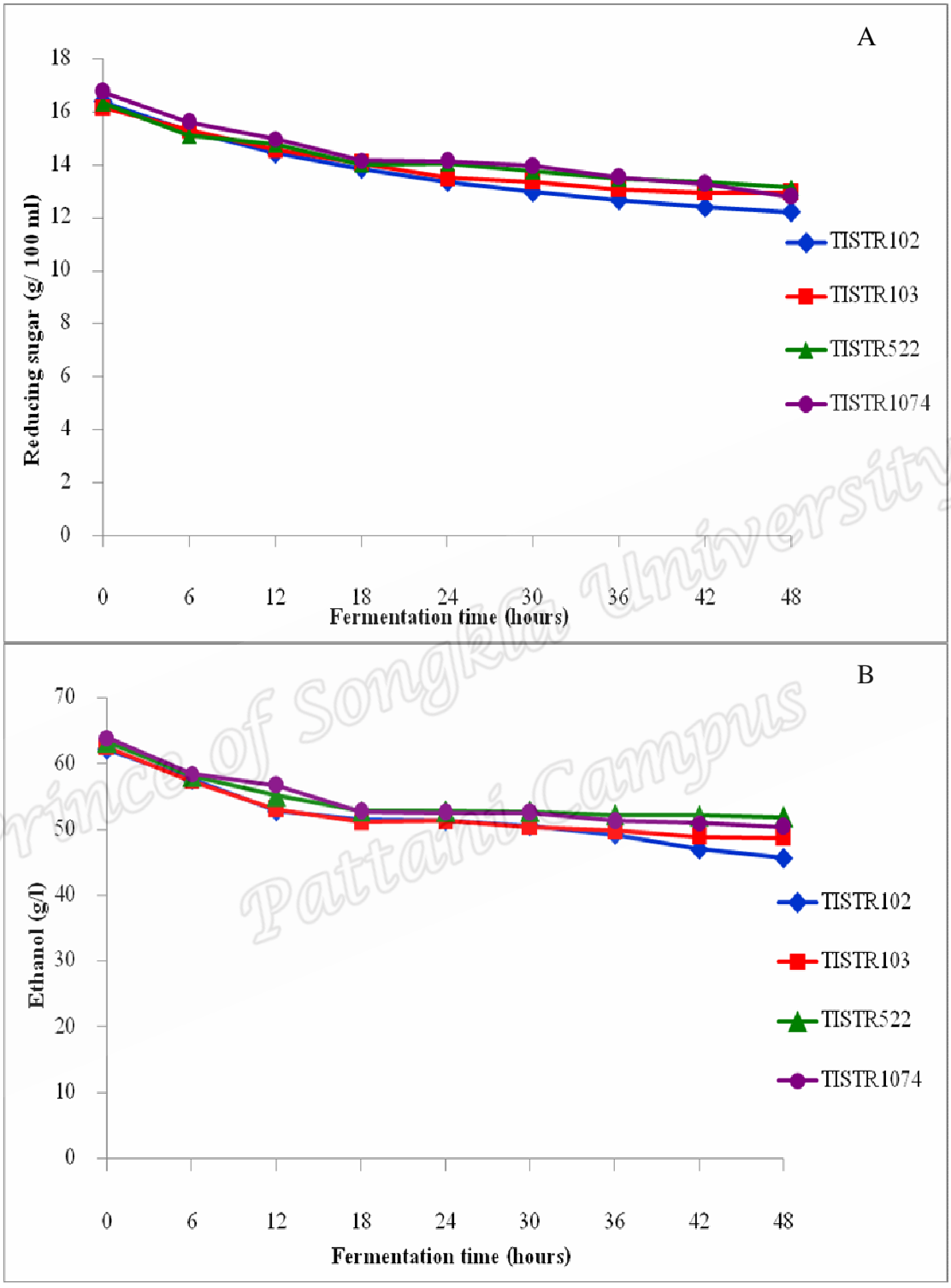
4.2.1 ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกล้าเชื้อบริสุทธิ์ *A. aceti* สายพันธุ์ต่างๆ

ในการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* สายพันธุ์ต่างๆ ในไวน์น้ำตาลโตนด ได้แก่ เชื้อ *A. aceti* TISTR 102, *A. aceti* TISTR 103, *A. aceti* TISTR 522 และ *A. aceti* TISTR 1074 ในไวน์น้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 พบว่า เชื้อ *A. aceti* ทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโตได้ดี (รูปที่ 7A และ 7B) โดยเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 และ *A. aceti* TISTR 103 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่าเชื้อ *A. aceti* TISTR 522 และ *A. aceti* TISTR 1074 ตั้งแต่การหมักชั่วโมงที่ 6 และมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงขึ้นตามระยะเวลาการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 18 โดยเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $1.0x10^7$ CFU/ml, *A. aceti* TISTR 103 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $8.4x10^6$ CFU/ml, *A. aceti* TISTR 522 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $6.4x10^6$ CFU/ml และ *A. aceti* TISTR 1074 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $1.4x10^6$ CFU/ml ก่อนจะมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตคงที่จนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก (48 ชั่วโมง) เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่า *A. aceti* TISTR 103 อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $4.1x10^7$ และ $3.9x10^7$ CFU/ml ตามลำดับ และมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่าเชื้อ *A. aceti* TISTR 522 ($5.6x10^6$ CFU/ml) และ *A. aceti* TISTR 1074 ($8.5x10^6$ CFU/ml) ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงเรื่อยๆไม่แตกต่างกันทั้ง 4 สายพันธุ์ (รูปที่ 8A) และจะมีปริมาณเอทานอลลดลงใกล้เคียงกัน ดังรูปที่ 8B การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดอะซิติกในไวน์น้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 (รูปที่ 9A และ 9B) พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงใกล้เคียงกันจนถึงระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 และ *A. aceti* TISTR 103 ทำให้ไวน์น้ำตาลโตนดมีค่าพีเอชต่ำกว่าเชื้อ *A. aceti* TISTR 522 และ *A. aceti* TISTR 1074 จนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกับปริมาณกรดอะซิติก หลังจากการหมักชั่วโมงที่ 24 เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 และ *A. aceti* TISTR 103 ทำให้ไวน์น้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 มีปริมาณกรดอะซิติกสูงกว่าเชื้อ *A. aceti* TISTR 522 และ *A. aceti* TISTR 1074 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง (ปริมาณกรดอะซิติกเท่ากับ 4.22, 4.02, 2.07 และ 2.43 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ)



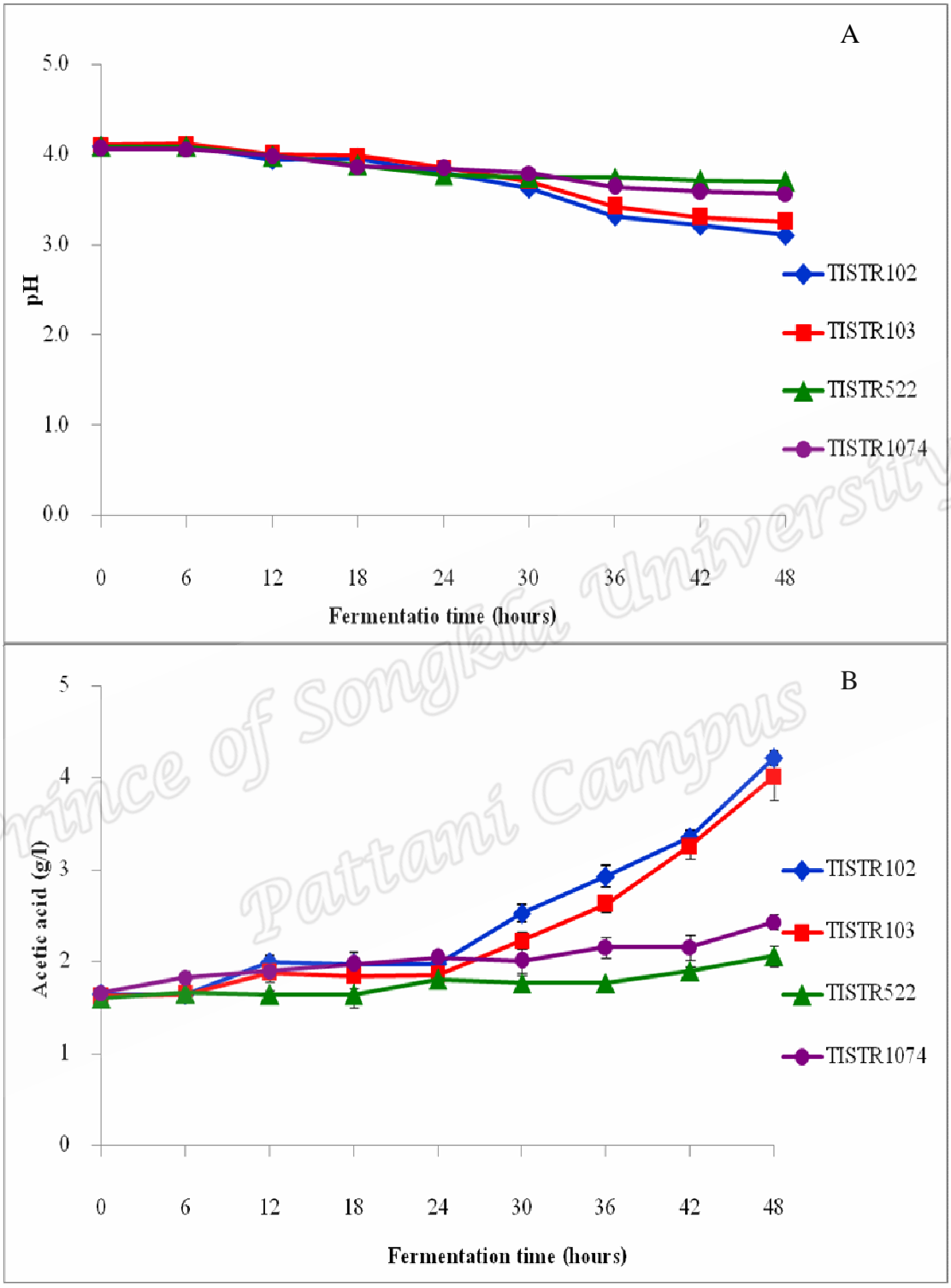
รูปที่ 7 การเจริญเติบโต (OD_{600}) (A) และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (log CFU/ml) (B) ของเชื้อ *A. aceti* สายพันธุ์ต่างๆ ในน้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/100 ml) (A) และปริมาณเอทานอล (g/l) (B) ของเชื้อ *A. aceti* สายพันธุ์ต่างๆ ในน้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช (A) และปริมาณกรดอะซิติก (g/l) (B) ของเชื้อ *A. aceti* สายพันธุ์ต่างๆ ในน้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6

Prince of Songkla University Pattani Campus

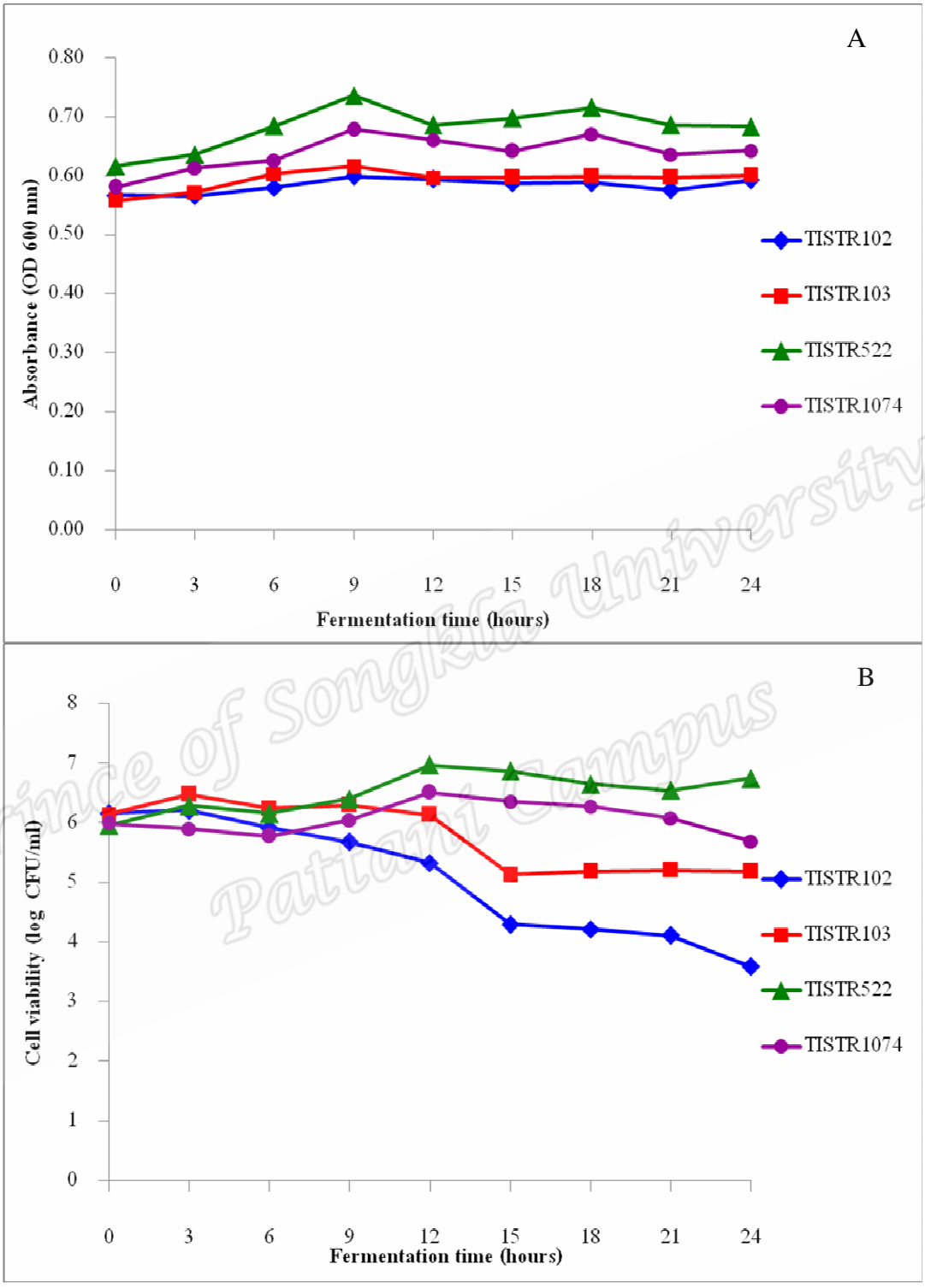
ในขณะที่เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. aceti* ทั้ง 4 สายพันธุ์ในไวน์น้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 8 พบว่า เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 และ *A. aceti* TISTR 103 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (รูปที่ 10A และ 10B) ปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตจะลดลงเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการหมัก (24 ชั่วโมง) จากเริ่มต้นมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับ $1.6x10^6$ และ $1.5x10^6$ CFU/ml ลดลงเป็น $5.9x10^3$ และ $1.9x10^5$ CFU/ml ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ *A. aceti* TISTR 522 และ *A. aceti* TISTR 1074 สามารถเจริญ เติบโตได้เล็กน้อย จากเริ่มต้นมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับ $9.6x10^5$ และ $9.9x10^5$ CFU/ml ลดลงเป็น $7.5x10^6$ และ $6.9x10^5$ CFU/ml ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงเรื่อยๆไม่แตกต่างกันทั้ง 4 สายพันธุ์ (รูปที่ 11A) แต่ในไวน์น้ำตาลโตนดที่เลี้ยงเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 และ *A. aceti* TISTR 103 จะมีปริมาณเอทานอลลดลงใกล้เคียงกัน ดังรูปที่ 11B ซึ่งลดลงมากกว่าในไวน์น้ำตาลโตนดที่เลี้ยงเชื้อ *A. aceti* TISTR 522 และ *A. aceti* TISTR 1074 เมื่อสิ้นสุดการหมัก 24 ชั่วโมง มีปริมาณเอทานอล เท่ากับ 50.7, 53.8, 71.8 และ 70.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะเดียวกันตลอดระยะเวลาการหมัก ค่าพีเอชจะลดลงไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 12A) ในไวน์น้ำตาลโตนดที่เลี้ยงเชื้อ *A. aceti* TISTR 102, *A. aceti* TISTR 103 และ *A. aceti* TISTR 1074 มีปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มสูงขึ้นใกล้เคียงกัน และมากกว่าในไวน์น้ำตาลโตนดที่เลี้ยงเชื้อ *A. aceti* TISTR 522 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง มีปริมาณกรดอะซิติกเท่ากับ 2.34, 2.33, 2.29 และ 2.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 12B) แม้ว่าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 และ *A. aceti* TISTR103 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงกว่าเชื้อ *A. aceti* TISTR522 และ *A. aceti* TISTR1074 ในไวน์น้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 8 ในการหมัก 24 ชั่วโมง แต่เนื่องจากการรอดชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 และ *A. aceti* TISTR 103 ลดลง และเชื้อ *A. aceti* TISTR 522 และ *A. aceti* TISTR 1074 สามารถเจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อย ชี้ให้เห็นว่าไวน์น้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอล ร้อยละ 6 มีความเหมาะสมกว่าไวน์น้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 8 เช่นเดียวกับการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* ที่คัดแยกจากเชอรี่ในประเทศอิหร่าน ในระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง เชื้อจะเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิติกได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเอทานอล ร้อยละ 4-6 แต่จะไม่มีการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเอทานอลร้อย 8-10 และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการหมักเป็น 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 4-6 มีการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิติกที่สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 8-10 (Maal and Shafiee, 2009) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Krisch and Szajani (1997) พบว่าความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อ *A. aceti* จะลดลง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของปริมาณเอทานอลเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียอะซิติกที่แยกจากน้ำส้มสายชูพื้นบ้านในอาหารเลี้ยงเชื้อ SM broth แบคทีเรียกรดอะซิติกสามารถเจริญได้ดีในช่วงความเข้มข้น

Prince of Songkla University Pattani Campus

ของเอทานอล ร้อยละ 2–5 แต่เมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้น การเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดอะซิติกจะลดลง โดยมีการรอดชีวิตลดลงจากร้อยละ 90 เป็นร้อยละ 70 (Gullo *et al.,* 2006)

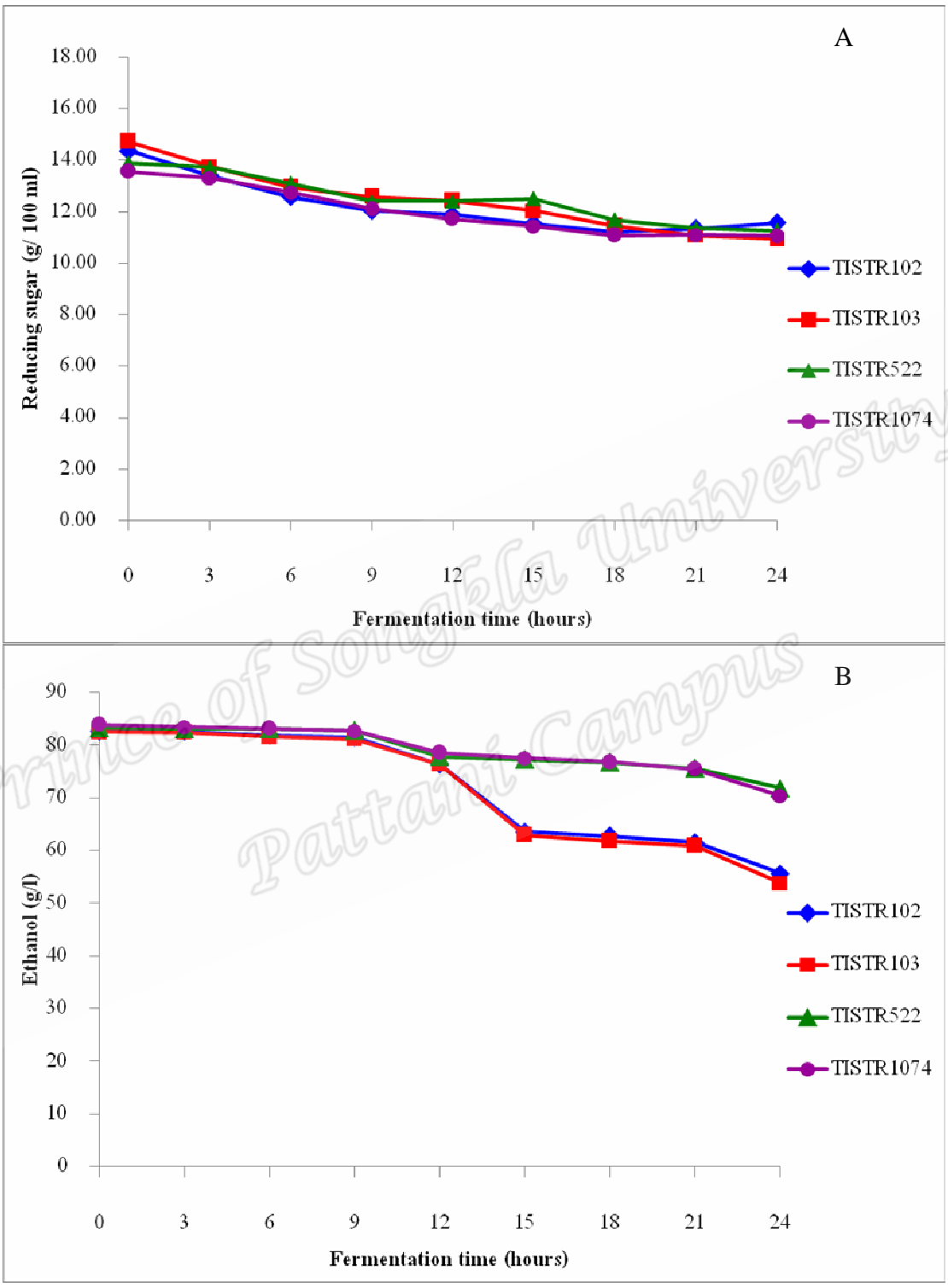
แม้ว่าเชื้อ *A. aceti* จะใช้เอทานอลเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดอะซิติก แต่เนื่องจากเอทานอลมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ด้วย ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้นจะส่งผลทำให้การรอดชีวิตของเชื้อ *A. aceti* จึงลดลง แม้ความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 และ *A. aceti* TISTR 103 จะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในการเลี้ยงในไวน์น้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 แต่เนื่องจากเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 มีการเจริญเติบโตและมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในการศึกษาต่อไป

Prince of Songkla University Pattani Campus



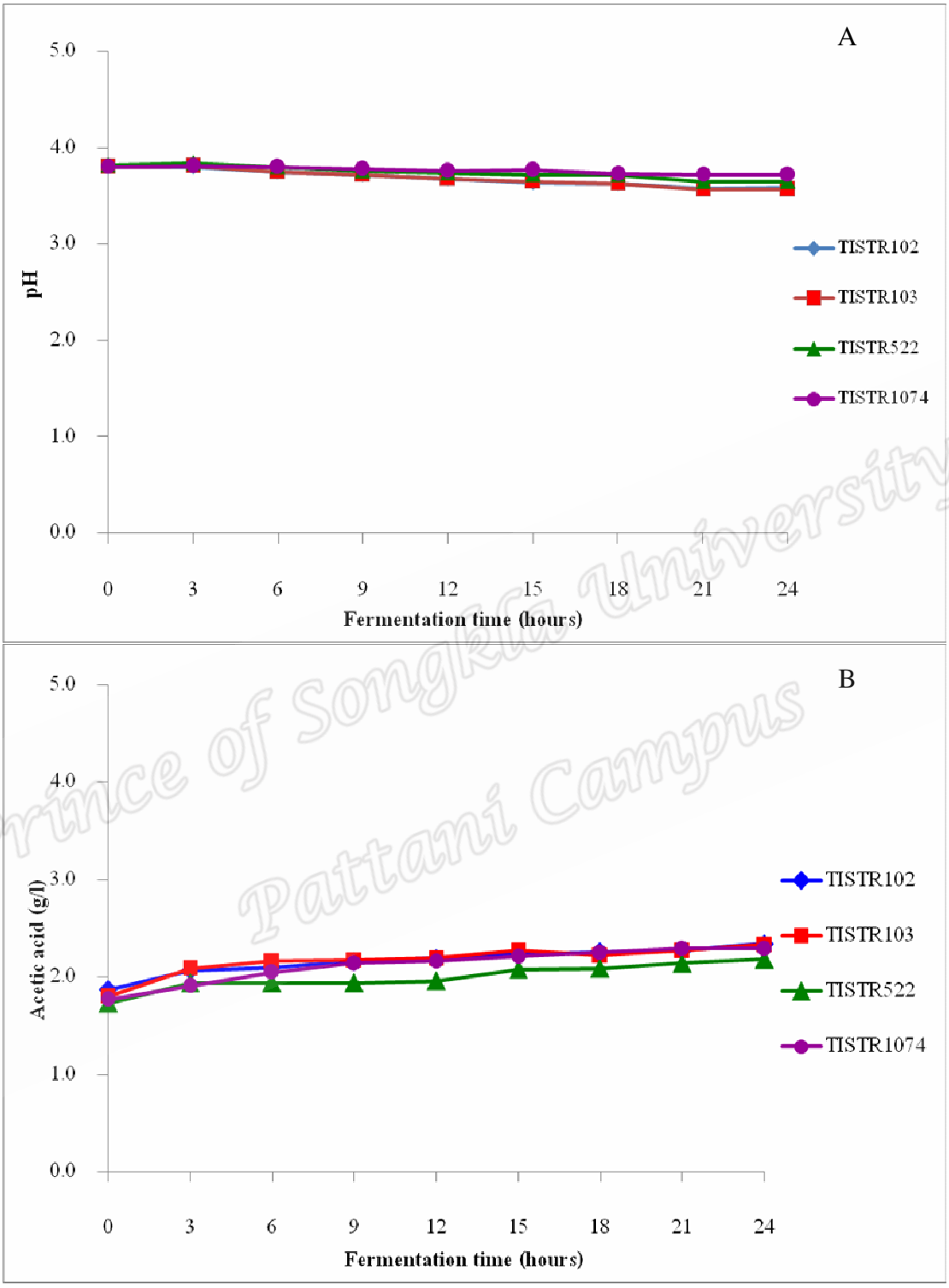
รูปที่ 10 การเจริญเติบโต (OD_{600}) (A) และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (log CFU/ml) (B) ของเชื้อ *A. aceti* สายพันธุ์ต่างๆ ในน้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 8

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/100 ml) (A) และปริมาณเอทานอล (g/l) (B) ของเชื้อ *A. aceti* สายพันธุ์ต่างๆ ในน้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 8

Prince of Songkla University Pattani Campus



Prince of Songkla University Pattani Campus

รูปที่ 12 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช (A) และปริมาณกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) (B) ของเชื้อ *A. aceti* สายพันธุ์ต่างๆ ในน้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 8

4.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนด

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเติบโตและผลิตกรดอะซิติกในไวน์น้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 ของเชื้อ *A. aceti* ทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่า *A. aceti* TISTR 102 มีความสามารถในการเจริญเติบโตและผลิตกรดอะซิติกได้ดีที่สุด จึงเลือกใช้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ซึ่งมีปัจจัยต่างๆ ดังนี้

4.2.2.1 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ผลของปริมาณน้ำตาลกลูโคส ได้แก่ ร้อยละ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 (w/v) ในการเลี้ยงเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดอะซิติก ที่ระยะเวลาการหมัก 10 วัน (ตารางที่ 1) พบว่า ในน้ำตาลโตนดที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5, 10 และ 15 (w/v) ที่ระยะเวลาการหมักตั้งแต่วันที่ 3 เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าการเลี้ยงในน้ำตาลโตนดที่มีปริมาณกลูโคสร้อยละ 20, 25 และ 30 (w/v) (รูปที่ 13) เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 10 วัน ในน้ำตาลโตนดที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 (w/v) เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $2.3x10^9$ CFU/ml คิดเป็นอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับ 0.0109 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาในสภาวะการเลี้ยงในน้ำตาลโตนดที่เติมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 (w/v) และไม่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $3.6x10^8$ และ $2.1x10^8$ CFU/ml คิดเป็นอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับ 0.0045 และ 0.0040 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 15, 20, 25 และ 30 (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นจะทำให้การรอดชีวิตของเชื้อลดลงตามระยะเวลาการหมัก แม้ว่าจุลินทรีย์จะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นอาหารและแหล่งพลังงาน แต่หากความเข้มข้นของน้ำตาลสูงทำให้ความสามารถในการหายใจถูกยับยั้งอย่างรุนแรง ทำให้การเจริญเติบโตลดลง (Stewart and Russell, 1983; Gancedo, 1986) อาจเนื่องจากแรงดันออสโมติก (osmotic effect) ทำให้เกิดสภาวะน้ำไหลออกนอกเซลล์ ในขณะที่การเติมน้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลโตนดจะทำให้มีปริมาณกรดอะซิติกสูงกว่าการไม่เติมน้ำตาลกลูโคสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (รูปที่ 14) แต่การเติมน้ำตาลกลูโคสที่ปริมาณต่างๆจะให้ปริมาณกรดอะซิติกที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) อัตราการผลิตกรดอะซิติกในน้ำตาลโตนดที่เติมน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 0.011-0.014 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ผลิตกรดอะซิติกจากการออกซิไดซ์เอทานอลเป็นแอซิตัลดิไฮด์ (acetaldehyde) โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcoholdehydrogenase) และเปลี่ยนแอซิตัลดิไฮด์เป็นกรดอะซิติก โดยเอนไซม์แอซิตัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (acetaldehyde dehydrogenase) โดยเอนไซม์ทั้งสองเกิดขึ้นที่เยื่อหุ้ม

เซลล์ และกรดอะซิติกอาจเกิดจากเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 สามารถเปลี่ยน glucose-6-phoshate ไปเป็นไพรูเวท (pyruvate) โดยวิถีไกลโคไลซิส (glycolytic parhway) จากนั้นไพรูเวทจะถูกเมตาบอไลท์ต่อไปเป็นกรดอะซิติก เช่นเดียวกับการเติมน้ำตาลกลูโคสในน้ำหัวหอมเพื่อผลิตน้ำส้มสายชูจะทำให้น้ำส้มสายชูที่ได้มีปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้น (Horiuchi *et al.,* 1999) แม้ว่าปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการเติมน้ำตาลกลูโคสที่ปริมาณต่างๆจะให้ปริมาณกรดอะซิติกที่ไม่แตกต่างกัน แต่การเติมน้ำตาลกลูโคสปริมาณร้อยละ 5 (w/v) ในน้ำตาลโตนดทำให้เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด ดังนั้นจึงเลือกการเติมปริมาณกลูโคสร้อยละ 5 (w/v) ในการศึกษาต่อไป

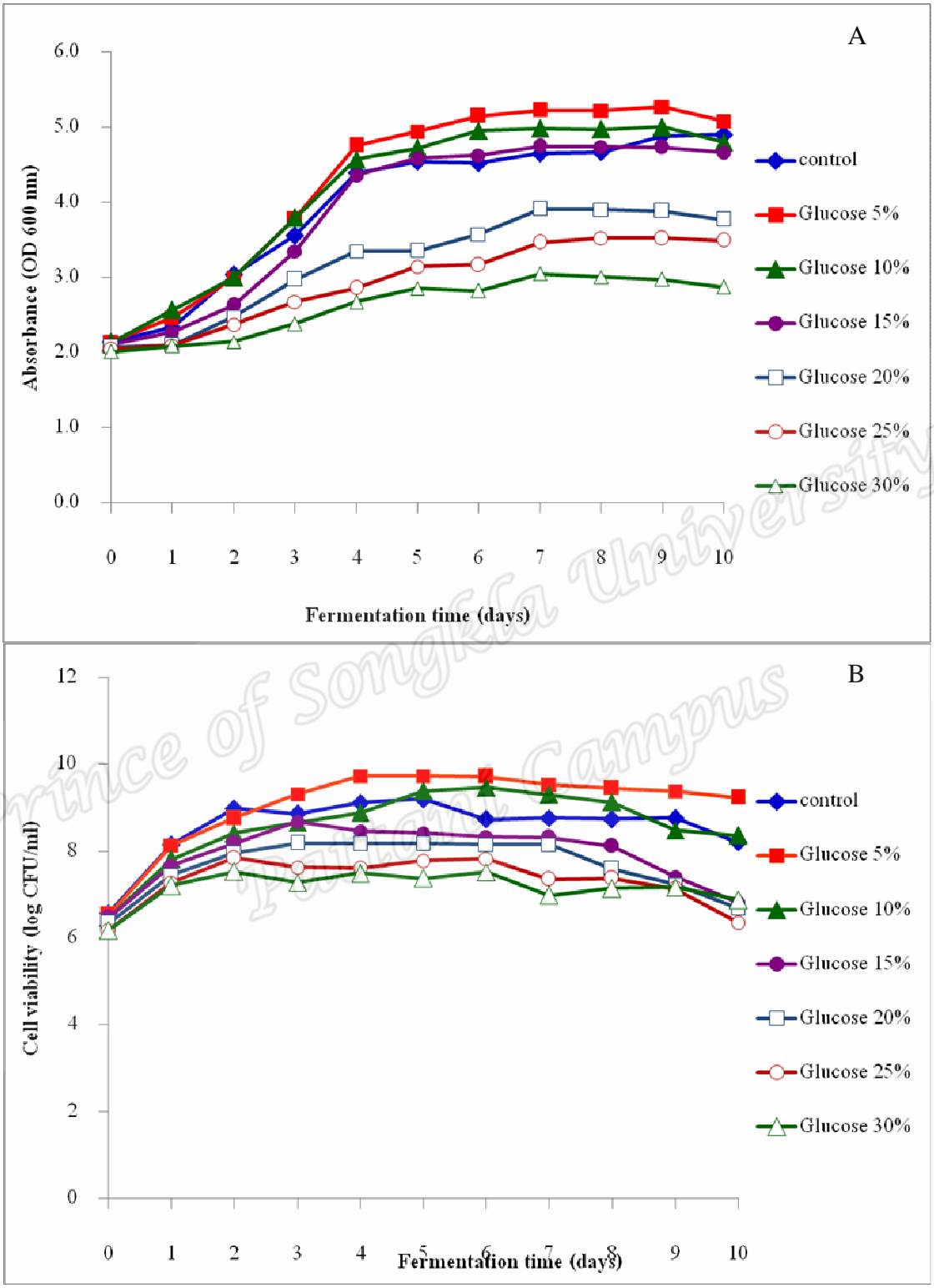
Prince of Songkla University
Pattani Campus

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่มีปริมาณกลูโคส ที่ระดับต่างๆ ในระยะเวลาการหมัก 10 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

	วัน	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (ร้อยละ)						
		0	5	10	15	20	25	30
การเจริญเติบโต (OD_{600})	เริ่มต้น	2.15^{a}	2.15^{a}	2.14^{a}	2.11^{a}	2.07^{a}	2.04^{a}	2.01^{a}
	สุดท้าย	4.90^{a}	5.08^{a}	4.80^{a}	4.66^{a}	3.77^{b}	3.49^{b}	2.87^{c}
ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)	เริ่มต้น	5.8x10^{6a}	5.4 x10^{6a}	5.7x10^{6a}	5.8x10^{6a}	5.5x10^{6a}	5.8x10^{6a}	5.8x10^{6a}
	สุดท้าย	2.1x10^{8b}	2.3x10^{9a}	3.6x10^{8b}	8.2x10^{6c}	6.9x10^{6c}	3.6x10^{6d}	2.8x10^{6d}
ปริมาณกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	เริ่มต้น	0.63^{a}	0.63^{a}	0.63^{a}	0.63^{a}	0.63^{a}	0.63^{a}	0.63^{a}
	สุดท้าย	2.17^{b}	3.89^{a}	3.74^{a}	3.60^{a}	3.49^{a}	3.24^{a}	3.20^{a}
อัตราการเจริญเติบโต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	สุดท้าย	0.0040^{b}	0.0109^{a}	0.0045^{b}	0.0033^{c}	0.0033^{c}	0.0033^{c}	0.0031^{c}
อัตราการผลิตกรด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	สุดท้าย	0.006^{b}	0.014^{a}	0.013^{a}	0.012^{a}	0.012^{a}	0.011^{a}	0.011^{a}

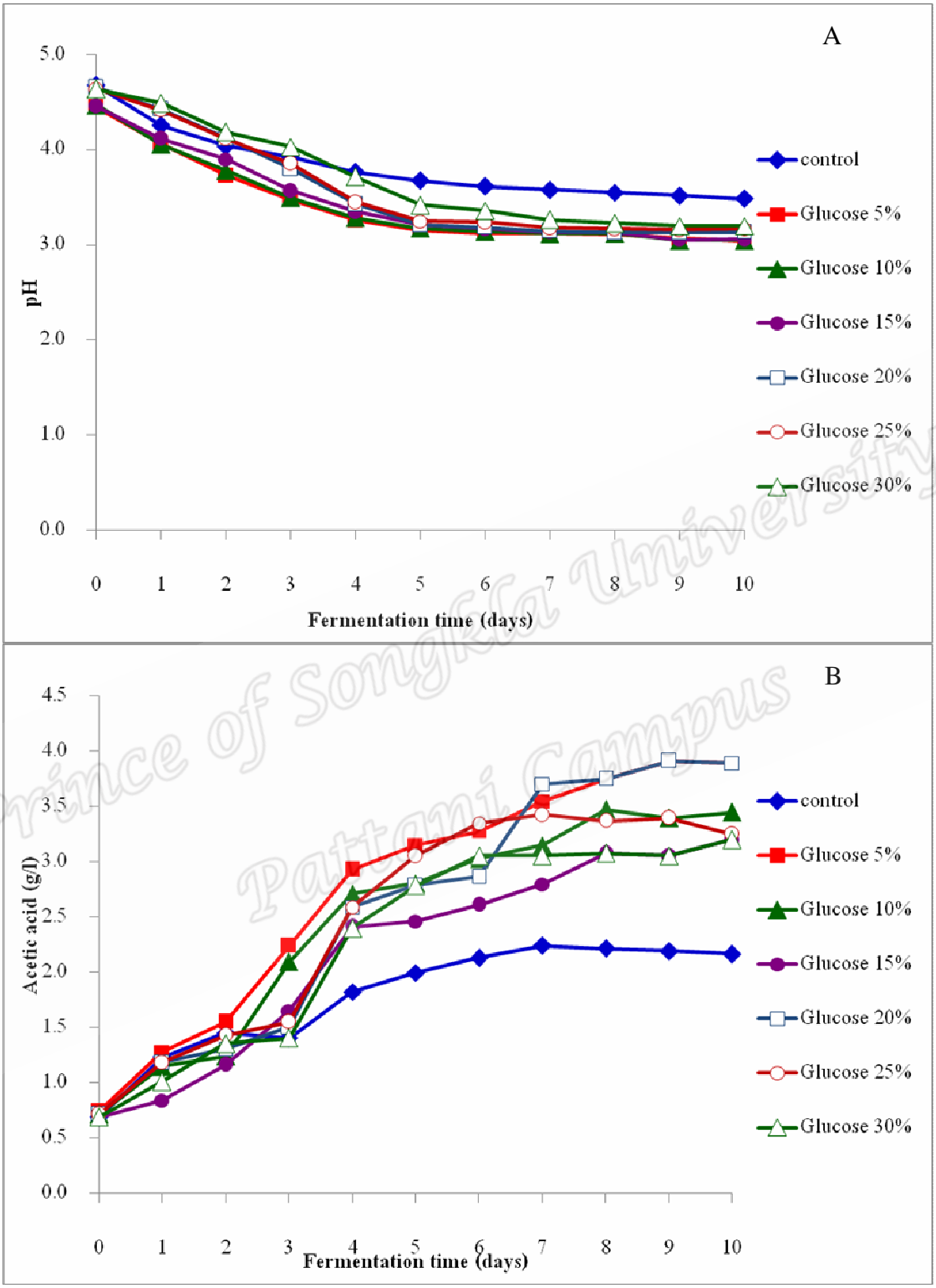
หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 13 การเจริญเติบโต (OD_{600}) (A) และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) (B) ของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสระดับต่างๆ

Prince of Songkla University Pattani Campus



Prince of Songkla University Pattani Campus

รูปที่ 14 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (A) และปริมาณกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) (B) จากการเลี้ยงเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสระดับต่างๆ

4.2.2.2 ชนิดและปริมาณไนโตรเจน

ผลของชนิดและปริมาณของไนโตรเจน ได้แก่ ยีสต์สกัด และแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณร้อยละ 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 (w/v) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 10 วัน พบว่า เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 จะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในน้ำตาลโตนดที่มีการเติมยีสต์สกัด ปริมาณร้อยละ 0.4 (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน เท่ากับ $1.0x10^{10}$ CFU/ml คิดเป็นอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับ 0.0099 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการเติมยีสต์สกัด ร้อยละ 0.2, 0.6, 0.8 (w/v) และการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (ตารางที่ 2) และการเติมแหล่งไนโตรเจนลงในน้ำตาลโตนดทำให้เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน (รูปที่ 15) ทั้งนี้เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 จะเจริญเติบโตในน้ำตาลโตนดที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนในรูปของสารอินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์สกัด ได้ดีกว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนในรูปของสารอนินทรีย์ (แอมโมเนียมซัลเฟต) โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน (สมใจ, 2550) และยีสต์สกัดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่นอกจากมีไนโตรเจน ยังประกอบด้วยองค์ประกอบอื่นๆ โดยยีสต์สกัด ประกอบด้วย ไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 11 (w/w) ฟอสเฟต ร้อยละ 3 (w/w) เถ้า ร้อยละ 12 (w/w) เกลือ ร้อยละ 1 และวิตามิน ได้แก่ กรดไนโคตินิก (nicotinic acid) และไรโบฟลาวิน (riboflavin) เป็นต้น (Hubalek, 2003) ซึ่งอาจเป็น growth factor ทำให้เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Gorret *et al.* (2001) พบว่า เชื้อ *Propionibacterium acidi-propionici* มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณยีสต์สกัดเพิ่มขึ้น (1-5 กรัมต่อลิตร) ส่วนปริมาณกรดอะซิติกในน้ำตาลโตนดที่มีการเติมยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเติมปริมาณร้อยละ 0.4, 0.6 และ 0.8 (w/v) จะให้ปริมาณกรดอะซิติกเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมักที่ 10 วัน สูงกว่าการเติมปริมาณร้อยละ 0.2 (w/v) และการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (รูปที่ 16) โดยมีอัตราการผลิตกรดอะซิติก เท่ากับ 0.035, 0.033 และ 0.035 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยมีค่าไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับการเลี้ยง *Acetobacter* sp. RKY4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมยีสต์สกัดจะทำให้ปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้น แต่การเติมยีสต์สกัด ร้อยละ 1-3 จะให้ปริมาณกรดอะซิติกไม่แตกต่างกัน ในขณะที่การเติมแอมโมเนียม-ซัลเฟตจะเพิ่มการผลิตกรดอะซิติกเพียงเล็กน้อย (Kim *et al.,* 2005) จากผลการทดลองการใช้ยีสต์-สกัดร้อยละ 0.4 (w/v) ให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณกรดอะซิติกสูงสุด จึงเลือกใช้ยีสต์สกัดปริมาณร้อยละ 0.4 (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนในการศึกษาต่อไป

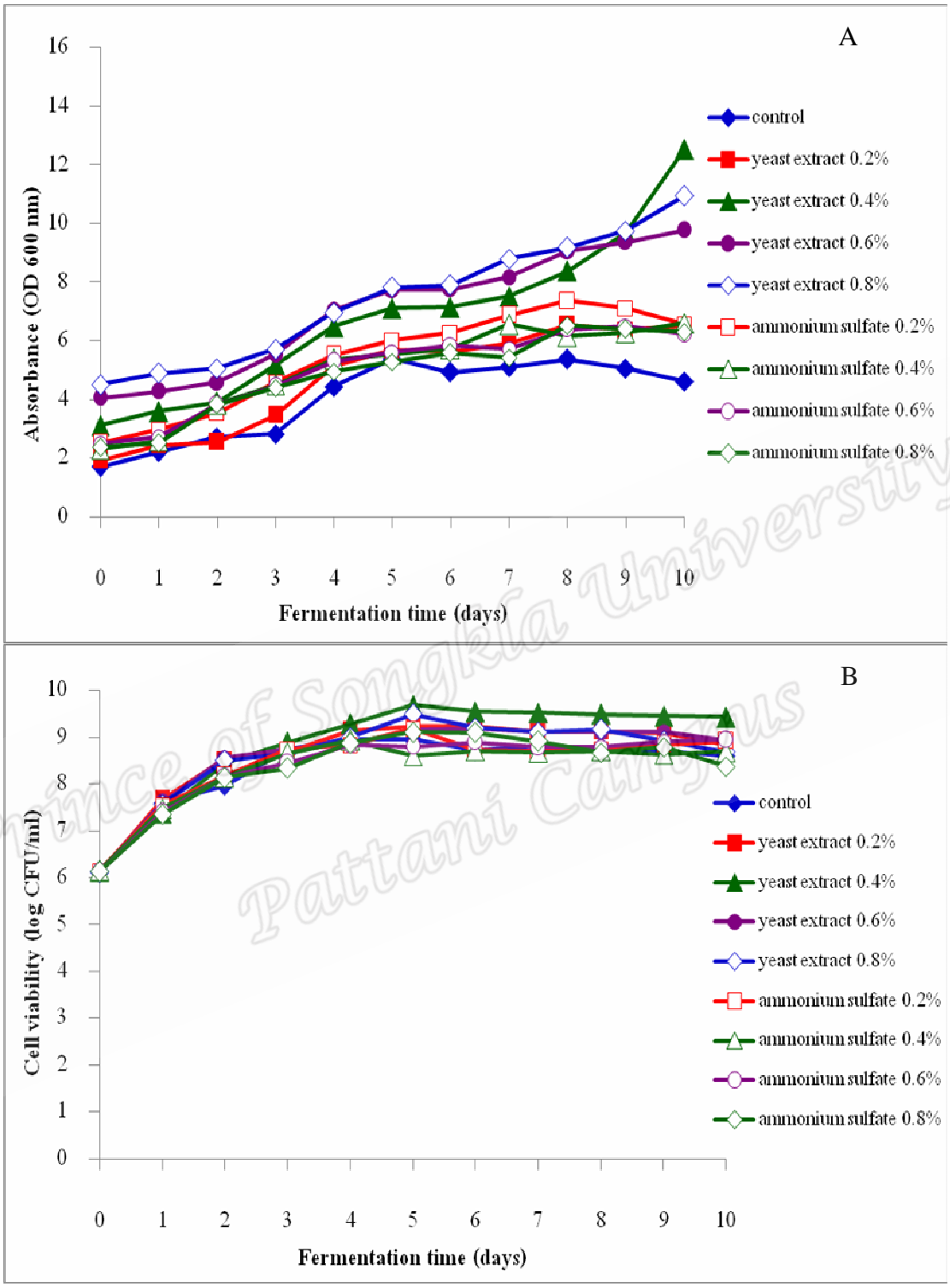
Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 2 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่มีชนิดและปริมาณไนโตรเจนที่ระดับต่างๆ ในระยะเวลาการหมัก 10 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

	วัน	ยีสต์สกัด (ร้อยละ)					แอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละ)				
		0	0.2	0.4	0.6	0.8	0	0.2	0.4	0.6	0.8
การเจริญเติบโต (OD_{600})	เริ่มต้น	1.70^{d}	1.92^{d}	3.11^{b}	4.06^{a}	4.51^{a}	1.70^{d}	2.51^{c}	2.30^{c}	2.50^{c}	2.38^{c}
	สุดท้าย	4.63^{d}	6.52^{c}	13.53^{a}	10.78^{b}	10.95^{b}	4.63^{d}	6.57^{c}	6.61^{c}	6.24^{c}	6.31^{c}
ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)	เริ่มต้น	$5.1x10^{6a}$	$5.0x10^{6a}$	$5.3x10^{6a}$	$5.2x10^{6a}$	$5.3x10^{6a}$	$5.1x10^{6a}$	$5.4x10^{6a}$	$5.5x10^{6a}$	$5.3x10^{6a}$	$5.3x10^{6a}$
	สุดท้าย	$4.7x10^{8c}$	$7.8x10^{8b}$	$1.0x10^{10a}$	$2.3x10^{9b}$	$2.0x10^{9c}$	$4.7x10^{8c}$	$6.4x10^{8c}$	$6.9x10^{8c}$	$6.9x10^{8c}$	$6.8x10^{8c}$
ปริมาณกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	เริ่มต้น	0.63^{a}	0.63^{a}	0.63^{a}	0.63^{a}	0.63^{a}	0.63^{a}	0.63^{a}	0.63^{a}	0.63^{a}	6.3^{a}
	สุดท้าย	3.70^{c}	4.48^{b}	8.38^{a}	8.32^{a}	8.38^{a}	3.70^{c}	4.42^{b}	4.47^{b}	4.56^{b}	4.61^{b}
อัตราการเจริญเติบโต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	สุดท้าย	0.0036^{c}	0.0036^{c}	0.0099^{a}	0.0048^{b}	0.0046^{b}	0.0036^{c}	0.0036^{c}	0.0036^{c}	0.0036^{c}	0.0036^{c}
อัตราการผลิตกรด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	สุดท้าย	0.013^{c}	0.016^{b}	0.032^{a}	0.032^{a}	0.032^{a}	0.013^{c}	0.016^{b}	0.016^{b}	0.016^{b}	0.016^{b}

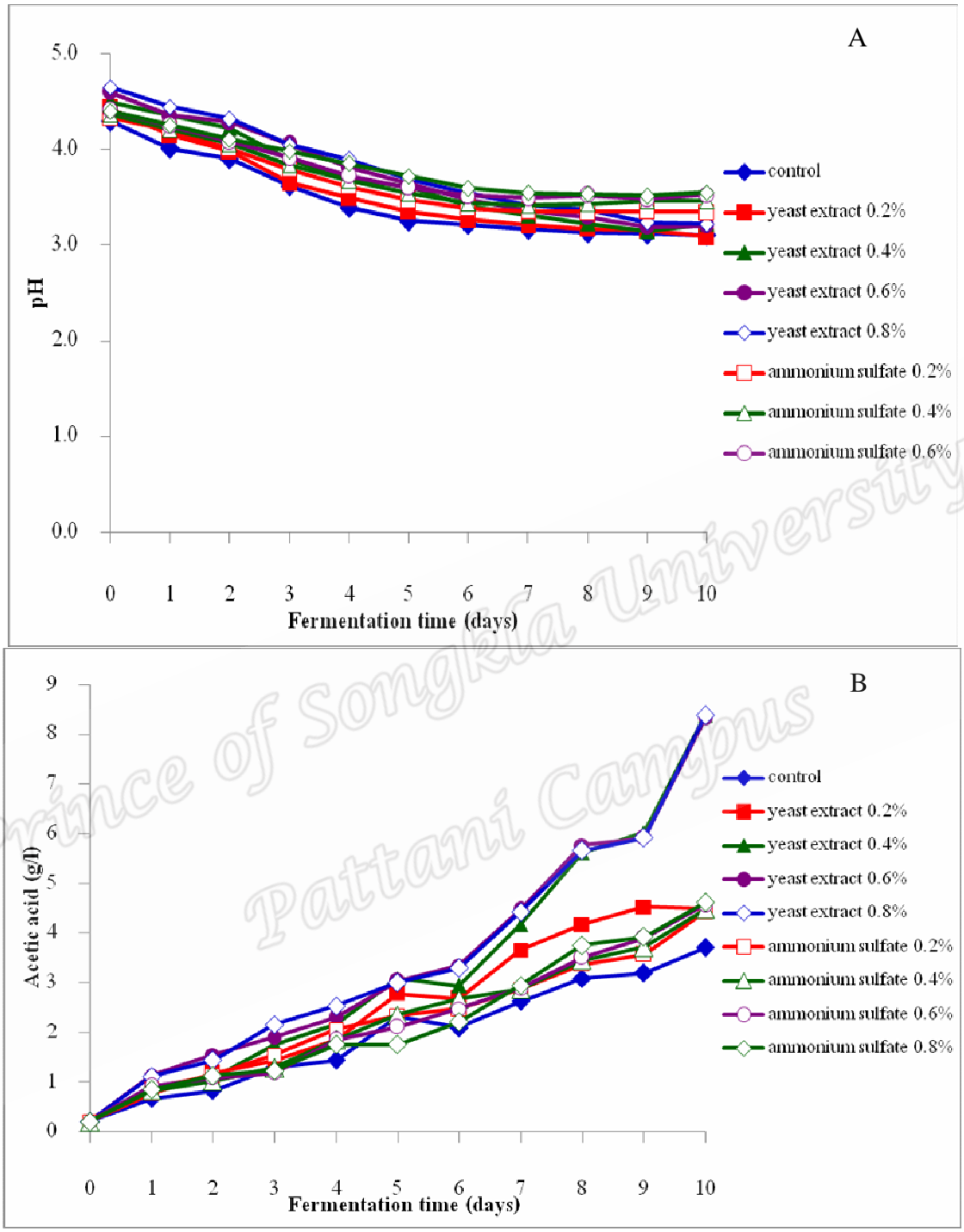
หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 15 การเจริญเติบโต (OD_{600}) (A) และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (B) ของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่มีชนิดและปริมาณไนโตรเจนระดับต่างๆ

Prince of Songkla University Pattani Campus



Prince of Songkla University Pattani Campus

รูปที่ 16 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (A) และปริมาณกรดอะซิติก (B) ของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่มีชนิดและปริมาณไนโตรเจนระดับต่างๆ

4.2.2.3 ค่าพีเอช

ผลของค่าพีเอชต่างๆ ได้แก่ 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 ในน้ำตาลโตนดที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 5 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และยีสต์สกัด ร้อยละ 0.4 (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ระยะเวลาการหมัก 10 วัน พบว่า น้ำตาลโตนดที่มีการปรับค่าพีเอชเป็น 6.0 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 10 วัน เท่ากับ $3.9x10^9$ CFU/ml มีการเจริญเติบโตสูงกว่าที่ค่าพีเอชระดับอื่น (4.0, 5.0 และ 7.0) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าที่ค่าพีเอชอื่นๆ ดังตารางที่ 3 น้ำตาลโตนดที่มีการปรับค่าพีเอชเป็น 5.0 และ 6.0 เชื้อจะเจริญเติบโตได้ดี (รูปที่ 17) ซึ่งค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดอะซิติกโดยทั่วไป คือ 5.0-6.5 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* เป็น 5.4-6.3 ขณะที่การผลิตกรดอะซิติกจะเกิดขึ้นได้ที่ประมาณค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 (De lay *et al.,* 1984 อ้างโดย Holt *et al.,* 1994; มัลลิกา และคณะ, 2550; Gullo and Giudici, 2008) การเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่ในน้ำตาลโตนดที่มีการปรับค่าพีเอชเท่ากับ 4.0 ต่ำที่สุด เนื่องจากการปรับค่าพีเอชด้วยกรดอะซิติกทำให้น้ำตาลโตนดมีปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นสูงกว่าในน้ำตาลโตนดที่ปรับค่าพีเอชอื่นๆ ซึ่งกรดอะซิติกที่เพิ่มขึ้นนี้มีผลทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ลดลงเนื่องจากเซลล์เกิดความเครียด (cell stress) จากปริมาณกรดอะซิติกที่สูงไปลดกิจกรรมแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase, ADH) อย่างรวดเร็ว (Gullo and Giudici, 2008) และระดับค่าพีเอชต่ำจากการเติมกรดอะซิติกมีผลทำให้เซลล์ทำงานหนักในการรักษาสมดุลภายในเซลล์ (สุมณฑา, 2545) ซึ่งความเข้มข้นของกรดอะซิติกในน้ำหมักที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญ (inhibition effect) คือที่ความเข้มข้นประมาณ 60 กรัมต่อลิตร (มัลลิกา และพัฒนา, 2549) ในน้ำตาลโตนดที่มีการปรับค่าพีเอช 5.0, 6.0 และ 7.0 จะผลิตกรดอะซิติก อย่างรวดเร็วในช่วงการหมักวันที่ 2-8 โดยเมื่อสิ้นสุดการหมัก 10 วัน (รูปที่ 18) ในน้ำตาลโตนดที่มีการปรับค่าพีเอช 6.0 และ 7.0 มีปริมาณกรดอะซิติกสูงที่สุด โดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เท่ากับ 6.12 และ 5.90 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการผลิตกรดอะซิติก เท่ากับ 0.025 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และให้ปริมาณกรดอะซิติกที่สูงกว่าที่ค่าพีเอชระดับอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) อย่างไรก็ตาม น้ำตาลโตนดที่มีการปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณกรดอะซิติกสูงสุด ดังนั้นจึงเลือกการปรับค่าพีเอช 6.0 ในการศึกษาต่อไป

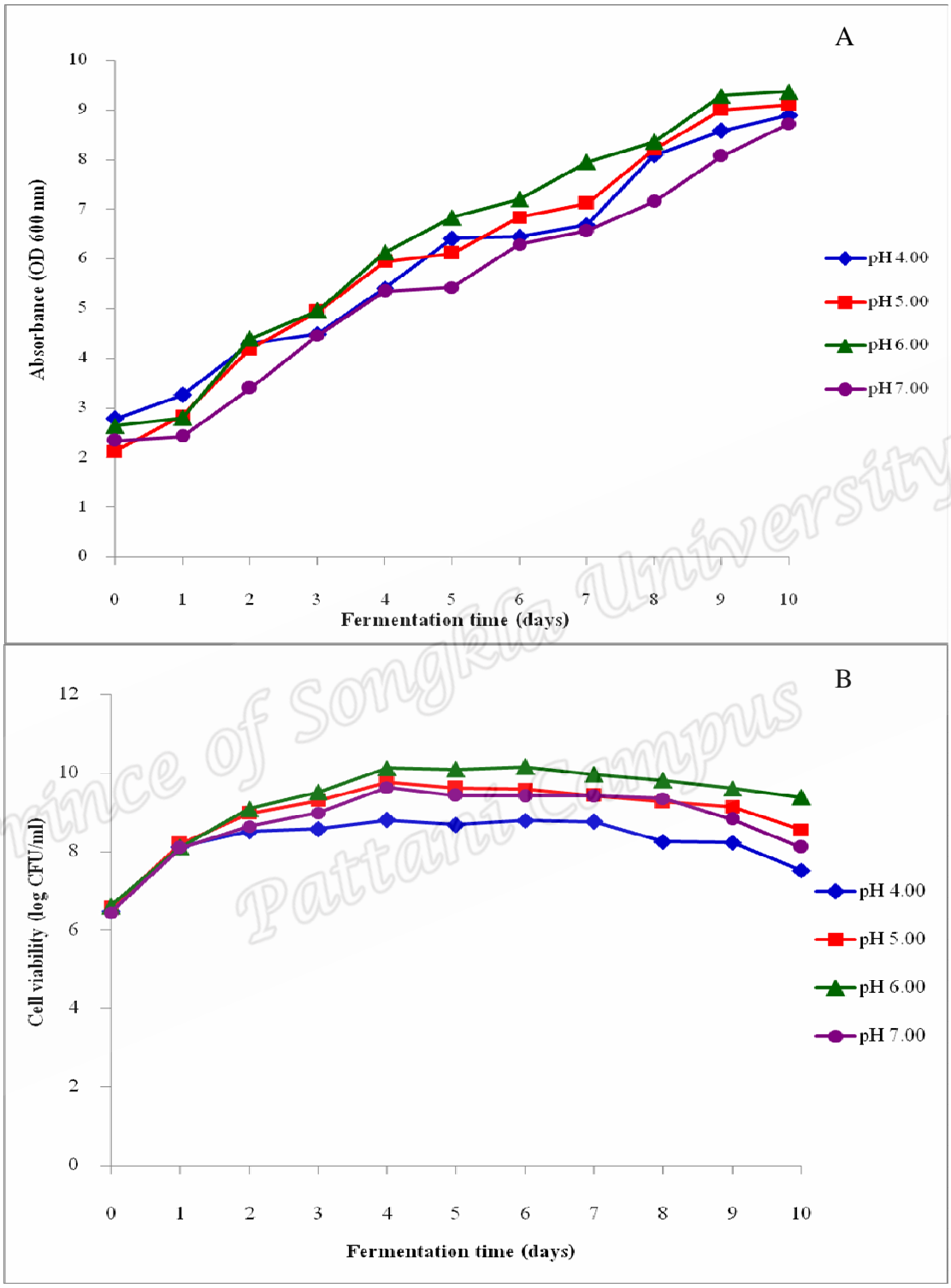
Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 3 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่มีค่าพีเอชต่างๆ ในระยะเวลาการหมัก 10 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

	วัน	ค่าพีเอช			
		4.0	5.0	6.0	7.0
การเจริญเติบโต (OD_{600})	เริ่มต้น	2.79^{a}	2.63^{a}	2.64^{a}	2.65^{a}
	สุดท้าย	9.06^{b}	9.01^{b}	9.37^{a}	8.93^{b}
ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)	เริ่มต้น	$5.4x10^{6a}$	$5.8x10^{6a}$	$5.6x10^{6a}$	$5.6x10^{6a}$
	สุดท้าย	$1.4x10^{9c}$	$1.6x10^{10b}$	$9.7x10^{10a}$	$4.9x10^{10c}$
ปริมาณกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	เริ่มต้น	2.91^{a}	0.38^{b}	0.21^{b}	0.00^{b}
	สุดท้าย	5.31^{b}	4.99^{b}	6.12^{a}	5.90^{a}
อัตราการเจริญเติบโต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	สุดท้าย	0.0037^{c}	0.0040^{b}	0.0046^{a}	0.0037^{c}
อัตราการผลิตกรด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	สุดท้าย	0.010^{c}	0.019^{b}	0.025^{a}	0.025^{a}

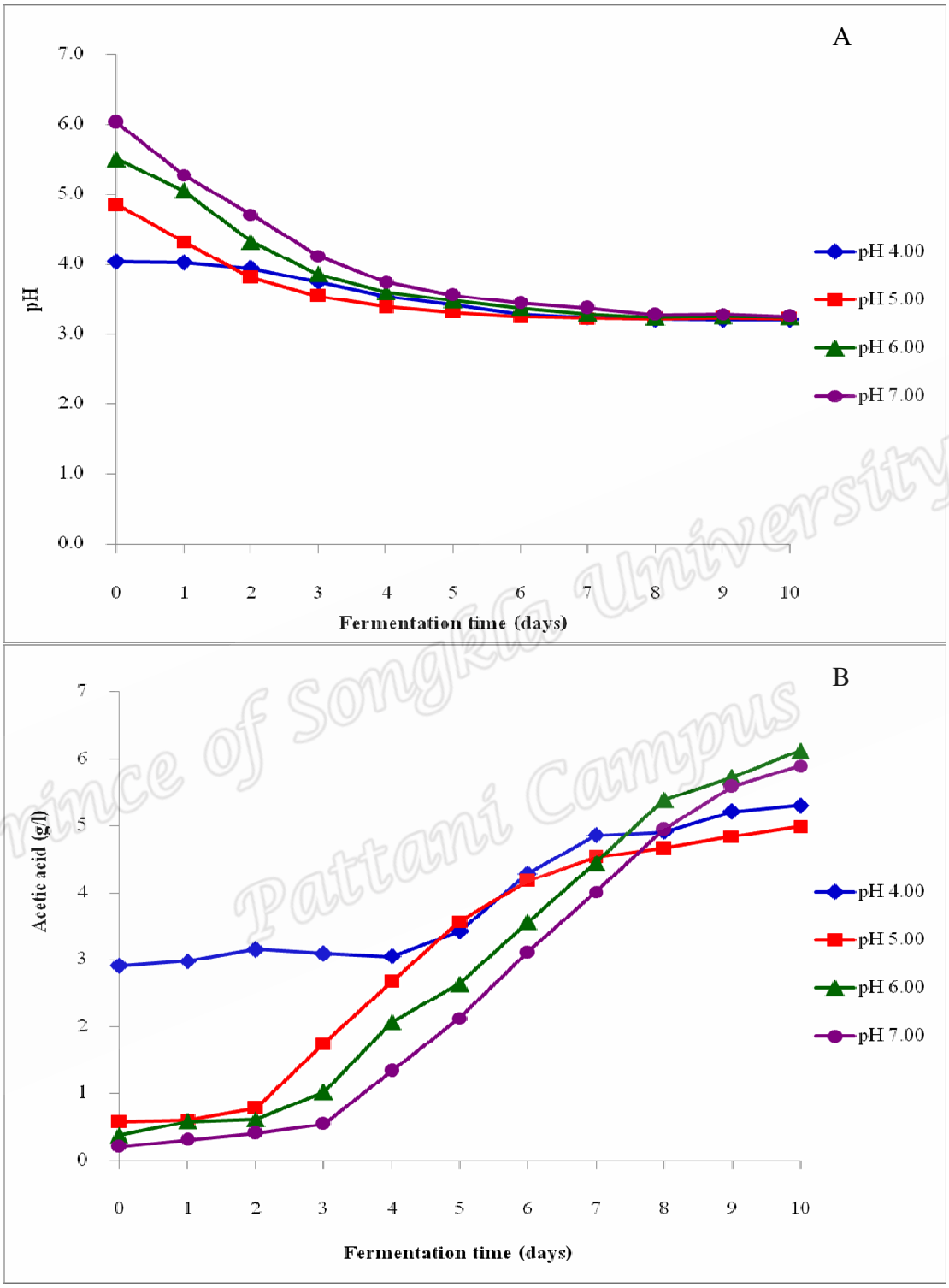
หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 17 การเจริญเติบโต (OD_{600}) (A) และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่มีค่าพีเอชระดับต่างๆ

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (A) และปริมาณกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) (B) ของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่มีค่าพีเอชระดับต่างๆ

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.2.2.4 อัตราการให้อากาศต่อการหมัก

ผลของการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่มีปริมาณกลูโคสร้อยละ 5 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัดร้อยละ 0.4 (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับค่าพีเอชเป็น 6.0 อัตราการให้อากาศต่อการหมักโดยการเขย่าที่ระดับต่างๆ ได้แก่ 100, 130 และ 180 รอบต่อนาที ที่ระยะเวลาการหมัก 10 วัน พบว่า อัตราการให้อากาศโดยการเขย่า 180 รอบต่อนาที เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 จะมีการเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่าการเขย่า 130 และ 100 รอบต่อนาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (ตารางที่ 4) โดยการเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักจนถึงวันที่ 5 อัตราการให้อากาศโดยการเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที จะมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต $6.9x10^{15}$ CFU/ml รองลงมาคืออัตราการให้อากาศโดยการเขย่าที่ 130 รอบต่อนาที ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต $2.3x10^{11}$ CFU/ml และอัตราการให้อากาศโดยการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต $1.2x10^{9}$ CFU/ml จากนั้นเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 จะมีการเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตค่อยๆคงที่จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก (รูปที่ 19) ซึ่งเมื่อให้อัตราการให้อากาศด้วยการเขย่าเพิ่มขึ้น จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต การเขย่าทำให้เกิดการกระจายตัวของออกซิเจนสู่เซลล์ได้มากขึ้น การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในช่วง 0-4 วัน อัตราการให้อากาศโดยการเขย่าที่ 100 และ 130 รอบต่อนาที ค่าพีเอชจะลดลงตามระยะเวลาการหมักไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะเดียวกันอัตราการให้อากาศโดยการเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที จะลดลงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 3 จากนั้นจะเริ่มลดลงตามระยะเวลาการหมัก แต่เมื่อถึงวันที่ 5 ค่าพีเอชจะลดลงตามระยะเวลาการหมักไม่แตกต่างกันจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก (รูปที่ 20) ในการผลิตกรดอะซิติกช่วงระยะเวลาการหมักจนถึงวันที่ 2 จะมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดที่ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อถึงระยะเวลาการหมักวันที่ 3 เมื่อให้อัตราการให้อากาศโดยการเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที จะมีการผลิตกรดอะซิติกอย่างรวดเร็วจนสิ้นสุดการหมักสูงกว่าการเขย่าที่ 130 และ 100 รอบต่อนาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อสิ้นสุดการหมักมีปริมาณกรดอะซิติก 10.08, 6.31 และ 5.93 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับการเลี้ยงเชื้อ *A. pasteurianus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการให้อากาศโดยการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที จะมีอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตกรดอะซิติกสูงกว่าการให้อากาศโดยการเขย่าที่ 130 รอบต่อนาที (Horiuchi *et al.,* 2002)

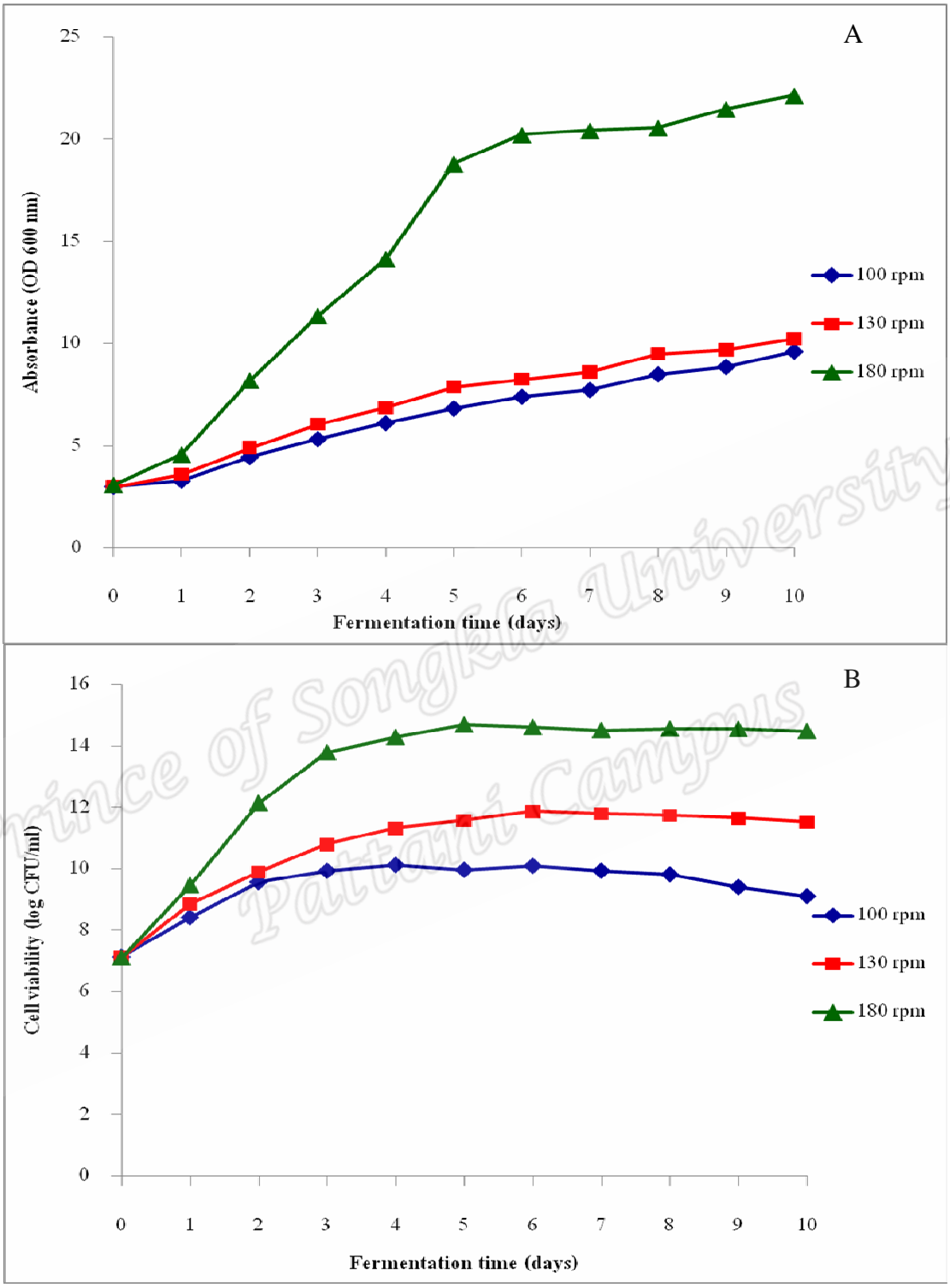
Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 4 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่มีอัตราการให้อากาศที่ระดับต่างๆ ในระยะเวลาการหมัก 10 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

	วัน	อัตราการให้อากาศโดยการเขย่า (รอบต่อนาที)		
		100	130	180
การเจริญเติบโต (OD_{600})	เริ่มต้น	3.01^{a}	2.98^{a}	3.10^{a}
	สุดท้าย	9.61^{b}	10.26^{b}	22.15^{a}
ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)	เริ่มต้น	$5.5x10^{6a}$	$5.3x10^{6a}$	$5.1x10^{6a}$
	สุดท้าย	$4.1x10^{10c}$	$2.3x10^{13b}$	$7.8x10^{14a}$
ปริมาณกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	เริ่มต้น	0.21^{a}	0.21^{a}	0.21^{a}
	สุดท้าย	5.93^{b}	6.31^{b}	10.08^{a}
อัตราการเจริญเติบโต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	สุดท้าย	0.0020^{c}	0.0126^{b}	0.0264^{a}
อัตราการผลิตกรด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	สุดท้าย	0.024^{b}	0.025^{b}	0.041^{a}

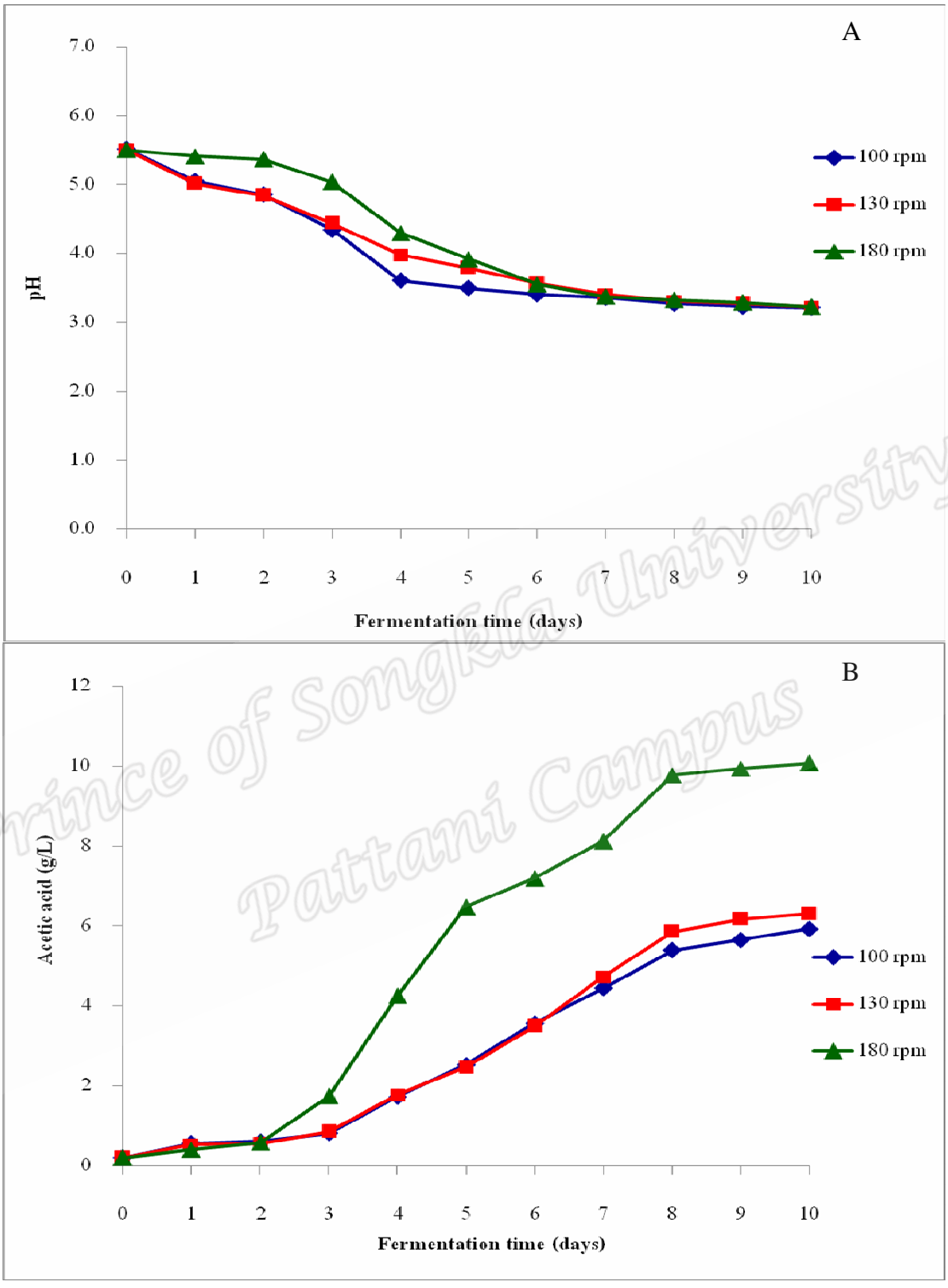
หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 19 การเจริญเติบโต (OD_{600}) (A) และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (B) ของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่มีการให้อัตราการให้อากาศความเร็วระดับต่างๆ

Prince of Songkla University Pattani Campus

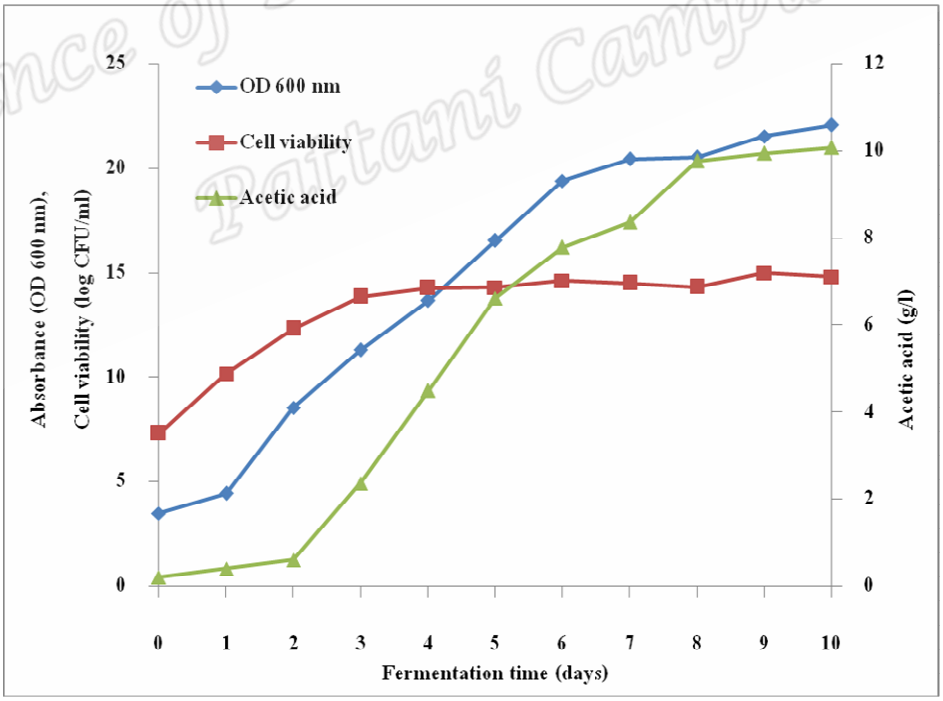


Prince of Songkla University Pattani Campus

รูปที่ 20 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (A) และปริมาณกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) (B) ของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่มีการให้อัตราการให้อากาศความเร็วระดับต่างๆ

4.2.3 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 102 ในสภาวะการหมักที่เหมาะสม

ผลของการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่มีปริมาณกลูโคสร้อยละ 5 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัดร้อยละ 0.4 (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าพีเอชเป็น 6.0 และมีอัตราการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ในระยะเวลาการหมัก 10 วัน พบว่า เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 จะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักจนถึงวันที่ 4 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต $2.7x10^{15}$ CFU/ml หลังจากนั้นเชื้อจะมีการเจริญเติบโตคงที่จนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต $8.2x10^{14}$ CFU/ml (รูปที่ 21) เช่นเดียวกับการเลี้ยงเชื้อ *A. aceti* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol broth จะมีการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (exponential phase) จนถึงเวลา 100 ชั่วโมง ก่อนที่จะมีการเจริญเติบโตเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) (EDE *et al*., 2004) โดยเซลล์จุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการนำมาผลิตกล้าเชื้อควรมีอายุอยู่ในช่วงระยะการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ เนื่องจากเซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์และมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด ซึ่งจะทำให้มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าเชื้อที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์อยู่ในระยะการแบ่งตัว ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในสภาวะการหมักที่เหมาะสมในน้ำตาลโตนดเป็นเวลา 4 วัน เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวเซลล์ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 21 การเจริญเติบโต (OD_{600}) ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) และปริมาณกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) ของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดในสภาวะที่เหมาะสม

Prince of Songkla University Pattani Campus

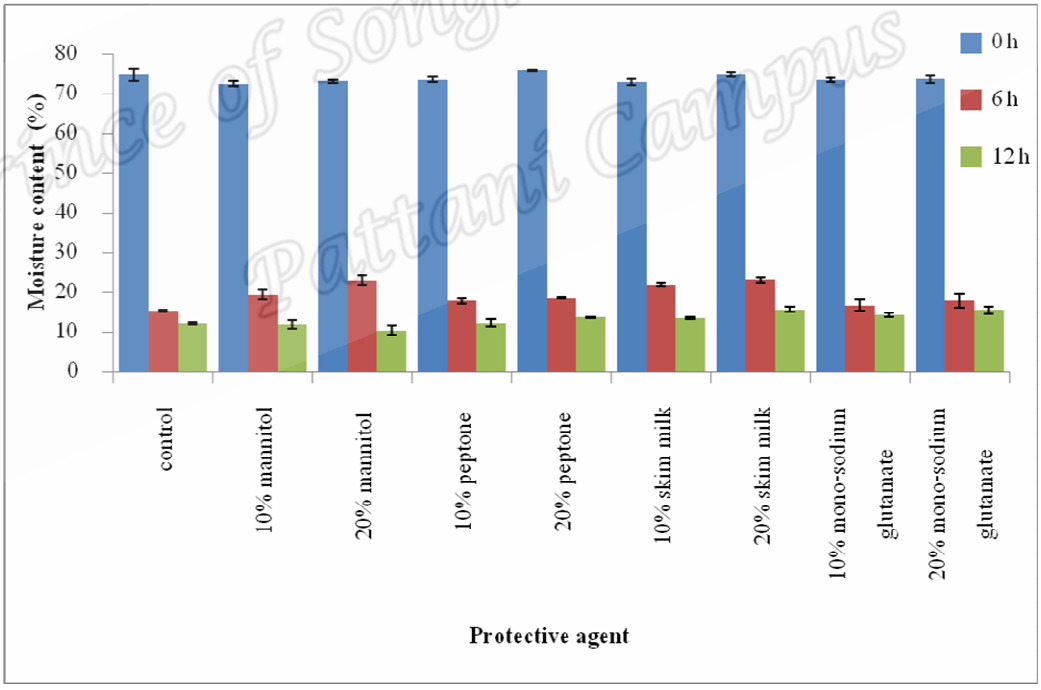
4.3 ศึกษาผลของสารปกป้องเซลล์ อุณหภูมิ และตัวพยุงต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 โดยการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำ

4.3.1 สารปกป้องเซลล์และอุณหภูมิในการทำแห้ง

ผลของสารปกป้องเซลล์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ แมนนิทอล เปปโตน นมพร่องไขมัน และโมโนโซเดียมกลูตาเมต ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 20 (w/v) เมื่อนำมาเคลือบเซลล์ของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ก่อนนำไปทำแห้งด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า ความชื้นจะลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 และเมื่อสิ้นสุดการทำแห้ง 12 ชั่วโมง เซลล์ของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่ทำแห้งด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (รูปที่ 22) มีค่าความชื้นสูงกว่าการทำแห้งด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส (รูปที่ 23 และ 24) เมื่อใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะทำให้เซลล์ที่เคลือบด้วยสารปกป้องเซลล์และที่ความเข้มข้นต่างๆ มีความชื้นลดลงต่ำกว่าร้อยละ 10 การรอดชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 เมื่อผ่านการทำแห้งด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่ใช้สารเคลือบเซลล์จะมีการรอดชีวิตสูงกว่าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่ไม่ใช้สารเคลือบเซลล์ อย่างนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่ไม่ใช้สารเคลือบเซลล์ มีการรอดชีวิตร้อยละ 3.22 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รอดชีวิตร้อยละ 2.56 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และรอดชีวิตร้อยละ 0.43 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในขณะที่เมื่อใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (รูปที่ 25) พบว่าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่เคลือบเซลล์ด้วยนมพร่องไขมัน ความเข้มข้นร้อยละ 10 จะมีการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ ร้อยละ 80.50 รองลงมา คือ การใช้แมนนิทอล ความเข้มข้นร้อยละ 20 และโมโนโซเดียมกลูตาเมต ความเข้มข้นร้อยละ 20 มีการรอดชีวิตร้อยละ 75.09 และ 71.20 ตามลำดับ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการทำแห้งเป็น 12 ชั่วโมง พบว่า การรอดชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 จะต่ำกว่าร้อยละ 50 ยกเว้นการเคลือบด้วยแมนนิทอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ซึ่งมีการรอดชีวิตสูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 53.44 เมื่อทำแห้งเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (รูปที่ 26) พบว่า การใช้นมพร่องไขมัน ความเข้มข้นร้อยละ 20 จะทำให้มีการรอดชีวิตสูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 80.22 รองลงมาคือ โมโนโซเดียมกลูตาเมต ความเข้มข้นร้อยละ 20 และแมนนิทอลความเข้มข้น ร้อยละ 20 มีการรอดชีวิตร้อยละ 66.35 และ 65.22 ตามลำดับ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการทำแห้งเป็น 12 ชั่วโมง พบว่า การรอดชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 จะต่ำกว่าร้อยละ 50 ยกเว้นการเคลือบด้วยแมนนิทอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ในขณะที่เมื่อใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในการทำแห้งเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่มีการเคลือบเซลล์ด้วยสารเคลือบเซลล์ต่างๆ จะมีการรอดชีวิตลดลงต่ำกว่า ร้อยละ 50 (รูปที่ 27) ซึ่งสารปกป้องเซลล์ควรมีโครงสร้างที่

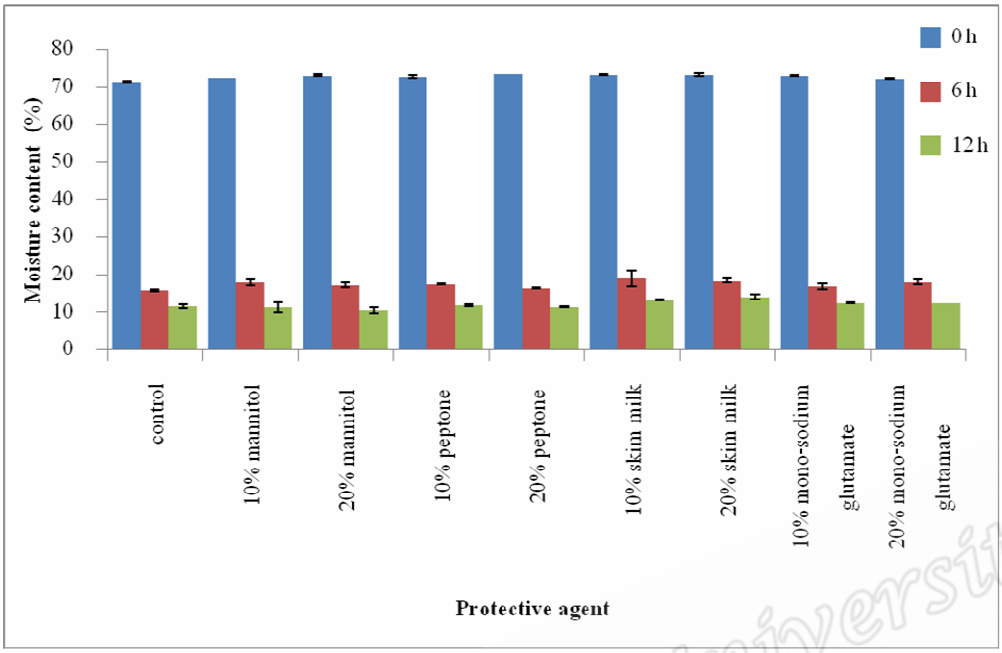
Prince of Songkla University Pattani Campus

คล้ายกับโครงสร้างของน้ำ เนื่องจากเซลล์จุลินทรีย์ที่ผ่านการทำแห้งจะเพิ่มแรงดันออสโมติก (osmotic stress) จากปริมาณน้ำอิสระที่ลดลง สารปกป้องเซลล์จึงเป็นตัวคงสมดุลของแรงดันออสโมติก ระหว่างความเข้มข้นสูงภายนอกเซลล์ (extracellular environment) และสภาวะภายในที่เจือจาง (intracellular environment) โดยสารปกป้องเซลล์สามารถช่วยให้โปรตีนและผนังเซลล์ไม่ได้รับความเสียหายจากการพับหรือบิดเกลียวของโปรตีนภายหลังจากกระบวนการทำแห้ง (Hubalek, 2003; Ndoye *et al.*, 2007) ทั้งนี้ประสิทธิภาพของสารปกป้องเซลล์ต่อสายพันธุ์จุลินทรีย์จะแตกต่างกันไป จากผลการทดลองพบว่าเซลล์จะมีการรอดชีวิตสูงที่สุดเมื่อใช้แมนนิทอลเป็นสารปกป้องเซลล์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากแมนนิทอลมีหมู่ไฮดรอกซิล (OH^-, hydroxyl group) จะไปจับกับหมู่ไฮโดรเจน (H^+) ของน้ำ ทำให้เมื่อผ่านการทำแห้งด้วยความร้อน เซลล์จึงสูญเสียน้ำภายในเซลล์ได้น้อยกว่าสารเคลือบเซลล์อื่นๆ ดังนั้นจากการทำแห้งเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่ความร้อนอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้แมนนิทอลความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นสารเคลือบเซลล์ทำให้เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 มีการรอดชีวิตที่สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกแมนนิทอลความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นสารปกป้องเซลล์ และทำแห้งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในการศึกษาต่อไป

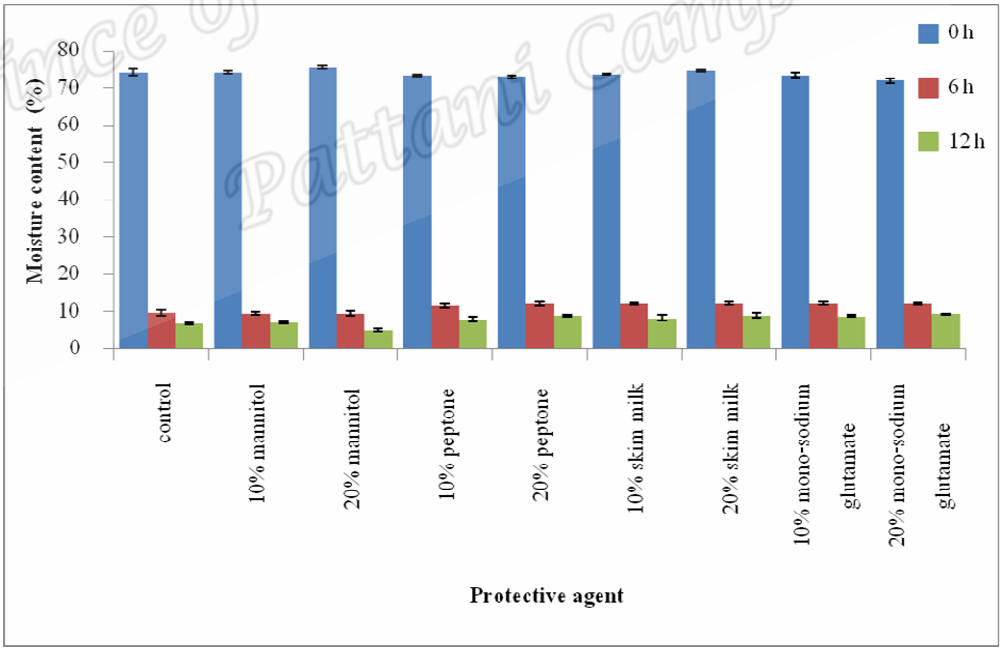


รูปที่ 22 ผลของสารเคลือบเซลล์ต่อความชื้นของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่เคลือบเซลล์ด้วยสารปกป้องเซลล์ชนิดต่างๆ ภายหลังจากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ

Prince of Songkla University Pattani Campus

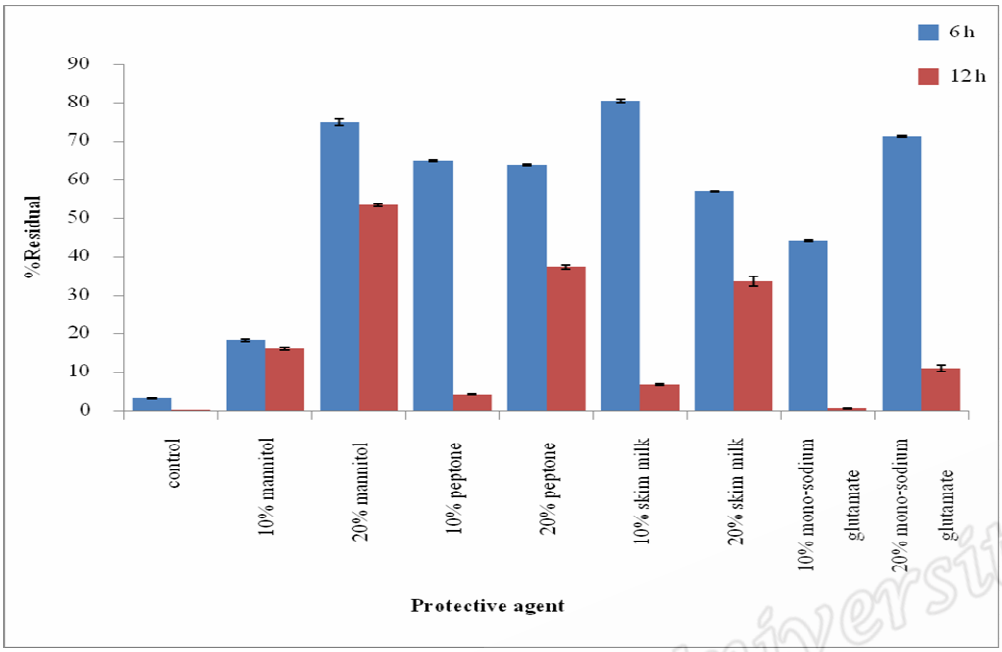


รูปที่ 23 ผลของสารเคลือบเซลล์ต่อความชื้นของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่เคลือบเซลล์ด้วยสารปกป้องเซลล์ชนิดต่างๆ ภายหลังจากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ

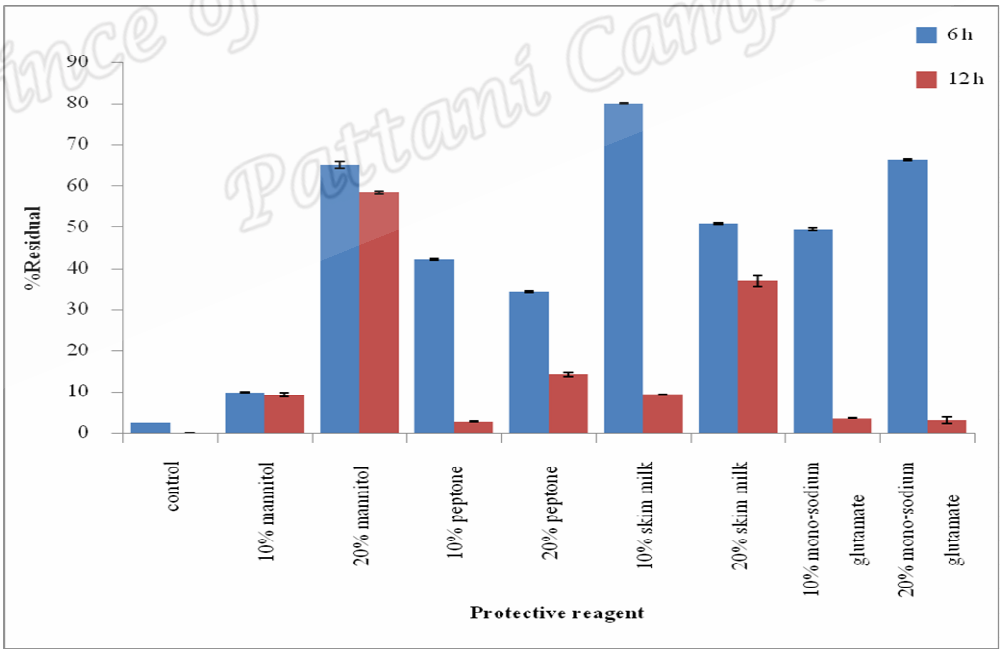


รูปที่ 24 ผลของสารเคลือบเซลล์ต่อความชื้นของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่เคลือบเซลล์ด้วยสารปกป้องเซลล์ชนิดต่างๆ ภายหลังจากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ

Prince of Songkla University Pattani Campus

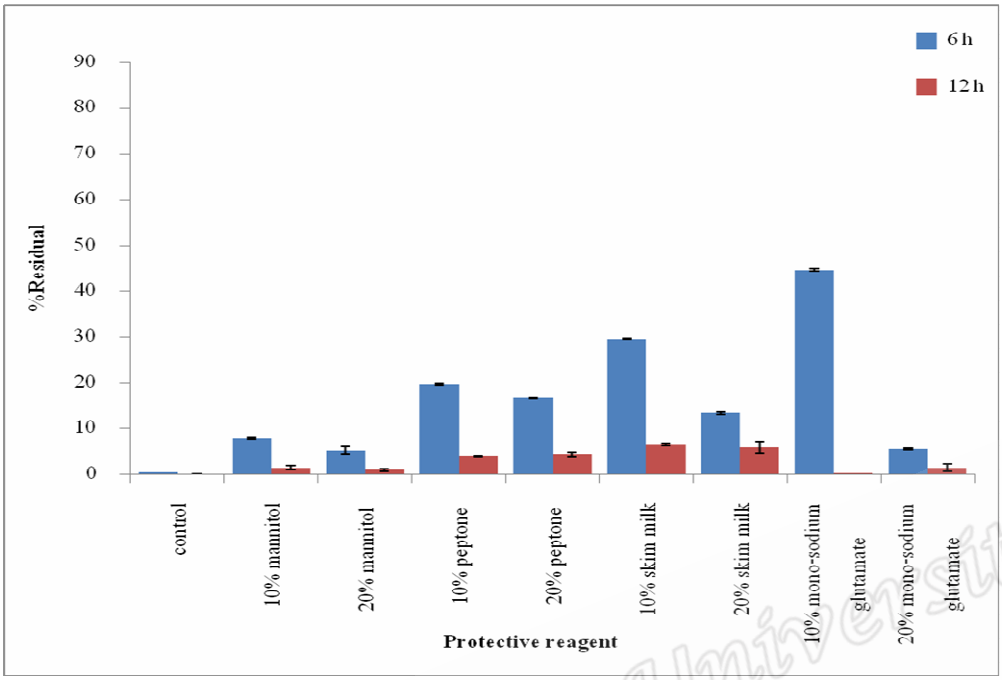


รูปที่ 25 ผลของสารเคลือบเซลล์ต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่เคลือบเซลล์ด้วยสารเคลือบเซลล์ชนิดต่างๆ ภายหลังจากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ



รูปที่ 26 ผลของสารเคลือบเซลล์ต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่เคลือบเซลล์ด้วยสารปกป้องเซลล์ชนิดต่างๆ ภายหลังจากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ

Prince of Songkla University Pattani Campus

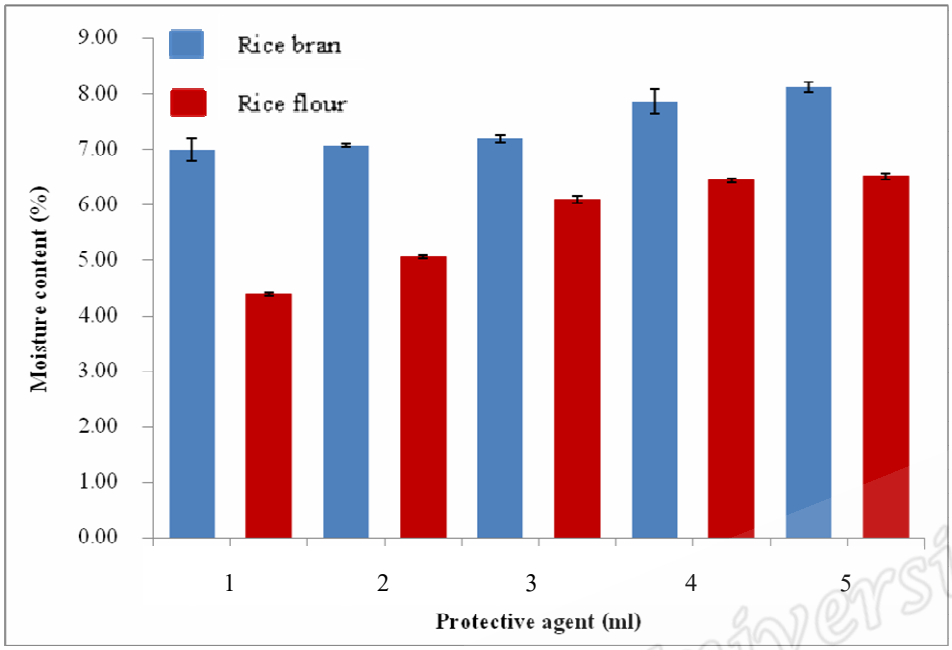


รูปที่ 27 ผลของสารเคลือบเซลล์ต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่เคลือบเซลล์ด้วยสารปกป้องเซลล์ชนิดต่างๆ ภายหลังจากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ

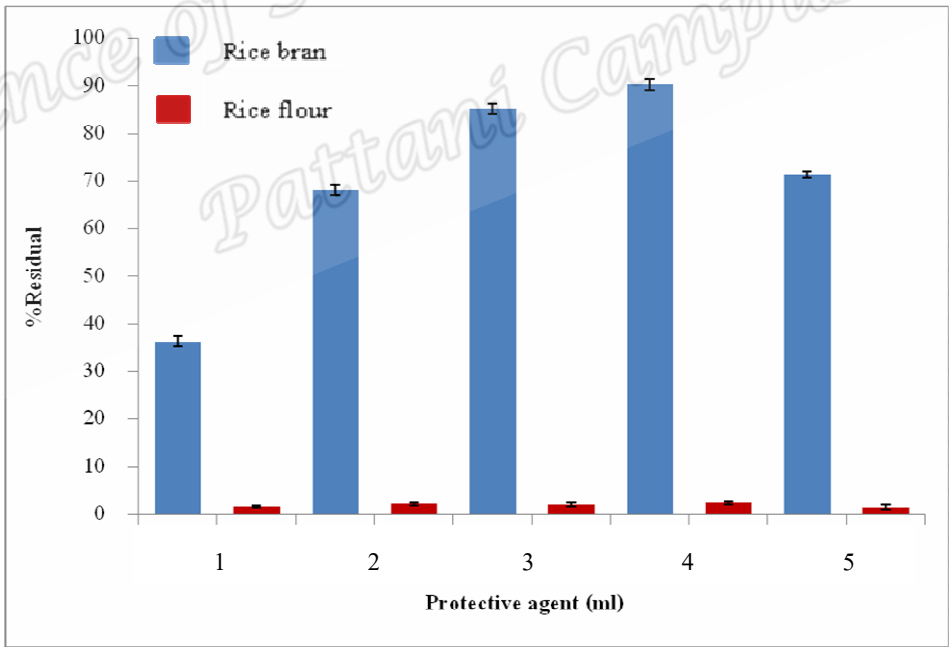
Prince of Songkla University Pattani Campus

4.3.2 ตัวพยุง

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในสภาวะที่เหมาะสมในน้ำตาลโตนด ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 5 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัด ร้อยละ 0.4 (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าพีเอช เป็น 6.0 และอัตราการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำไปเซนตริฟิวส์ก่อนนำมาเคลือบเซลล์ด้วยแมนนิทอลความเข้มข้นร้อยละ 20 (w/v) จะได้เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในสารปกป้องเซลล์ที่มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต $4.13x10^{14}$ CFU/ml จากนั้นนำสารปกป้องเซลล์ปริมาณ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ผสมกับตัวพยุง ได้แก่ รำละเอียด และแป้งข้าวเจ้า ปริมาณ 10 กรัม แล้วนำไปทำแห้งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (รูปที่ 28 และ 29) พบว่า กล้าเชื้อแบบผงที่ได้จากการใช้รำละเอียดและแป้งข้าวเจ้าจะมีความชื้นต่ำกว่า ร้อยละ 10 การใช้รำละเอียดเป็นตัวพยุงจะมีความชื้นหลังจากทำแห้งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ประมาณร้อยละ 7-8 ซึ่งสูงกว่าการใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นตัวพยุงมีความชื้นประมาณร้อยละ 4-6 (ตารางที่ 5) และการใช้ตัวพยุงทั้ง 2 ชนิด มีค่าปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ต่ำกว่า 0.6 ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากน้ำเป็นสิ่งจำเป็นในการดำเนินกิจกรรมต่างๆ ของเชื้อจุลินทรีย์และเป็นตัวกลางในการทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมี เมื่อปริมาณน้ำอิสระต่ำกว่า 0.6 ภายในไซโตพลาสมจะมีความเข้มข้นสูงมากและอาจเป็นไปได้ว่าโมเลกุลอินทรียสารขนาดใหญ่ (macromolecules) เช่น DNA เกิดการทำงานผิดปกติทำให้การเจริญเติบโตสิ้นสุดลง อย่างไรก็ตาม แม้กิจกรรมของการเจริญเติบโตจะไม่เกิดขึ้น แต่การรอดชีวิตจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้เมื่อเก็บรักษากล้าเชื้อในสภาวะนี้ (Adam and Moss, 2006) การใช้รำละเอียดเป็นตัวพยุงจะทำให้เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 มีการรอดชีวิตสูงกว่าการใช้แป้งข้าวเจ้า โดยการใช้รำละเอียด 10 กรัม ผสมสารปกป้องเซลล์ 4 มิลลิลิตร จะทำให้มีการรอดชีวิตสูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 90.40 โดยมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $1.82x10^{14}$ CFU/g รองลงมาคือ โดยการใช้รำละเอียด 10 กรัม ผสมสารปกป้องเซลล์ 3 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร มีการรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 85.26 และ 71.42 ตามลำดับ มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับ $1.22x10^{14}$ และ $1.80 x10^{14}$ CFU/g ตามลำดับ เนื่องจากการผลิตกล้าเชื้อแบบผงโดยใช้รำละเอียดเป็นตัวพยุงปริมาณ 10 กรัม ผสมเซลล์ในสารปกป้องเซลล์ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ทำแห้งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้กล้าเชื้อมีปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ที่เชื้อจุลินทรีย์อื่นๆไม่สามารถเจริญเติบโตได้ อีกทั้งทำให้เชื้อ *A. aceti* TISTR 102 มีการรอดชีวิตสูงที่สุด จึงเลือกรำละเอียดเป็นตัวพยุงในผลิตกล้าเชื้อแบบผง



รูปที่ 28 ผลของตัวพยุงต่อความชื้นของกล้าเชื้อแบบผงของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 จากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง



รูปที่ 29 ผลของตัวพยุงต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อแบบผงของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 จากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 5 ผลของปริมาณเซลล์และตัวพยุงต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 จากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ตัวพยุง	ปริมาณเซลล์ในสารปกป้องเซลล์ (มิลลิลิตร)	การรอดชีวิต (ร้อยละ)	ความชื้น (ร้อยละ)	ปริมาณน้ำอิสระ (a_w)
รำละเอียด	1	36.40±1.11^{e}	7.00±0.21^{b}	0.38±0.00^{a}
	2	68.17±1.03^{d}	7.97±0.16^{b}	0.39±0.00^{a}
	3	85.26±0.98^{b}	7.20±0.06^{b}	0.40±0.00^{a}
	4	90.40±1.14^{a}	7.87±0.22^{a}	0.40±0.00^{a}
	5	71.42±0.73^{c}	8.13±0.08^{a}	0.44±0.00^{a}
แป้งข้าวเจ้า	1	1.73±0.18^{f}	4.40±0.03^{f}	0.38±0.00^{a}
	2	2.30±0.37^{f}	5.07±0.02^{e}	0.408±0.00^{a}
	3	2.19±0.48^{f}	6.10±0.06^{d}	0.41±0.00^{a}
	4	2.50±0.30^{f}	6.45±0.03^{c}	0.41±0.00^{a}
	5	1.55±0.52^{f}	6.52±0.05^{c}	0.41±0.00^{a}

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการทำแห้งกล้าเชื้อแบบผงจากการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำกับวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในสภาวะการหมักที่เหมาะสมในน้ำตาลโตนดซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัด ร้อยละ 0.4 (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าพีเอชเป็น 6.0 และอัตราการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เมื่อนำมาเซนติฟิวส์ พบว่า เซลล์เปียก (wet cell) มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $2.44x10^{14}$ CFU/g และเมื่อผลิตกล้าเชื้อแบบผงด้วยวิธีการทำแห้งกล้าเชื้อโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำ โดยใช้รำละเอียดเป็นตัวพยุงปริมาณ 10 กรัม ผสมเซลล์ในสารปกป้องเซลล์ ได้แก่ แมนนิทอล ความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ทำแห้งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กล้าเชื้อมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $1.53x10^{14}$ CFU/g มีค่าปริมาณน้ำอิสระ (a_w) เท่ากับ 0.408 สำหรับกล้าเชื้อแบบผงจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้สารละลายแมนนิทอลร้อยละ 20 (w/v) เป็นสารปกป้องเซลล์ มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นก่อนทำแห้งเท่ากับ $5.01x10^{14}$ CFU/ml เมื่อผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่เคลือบด้วยสารละลายแมนนิทอลร้อยละ 20 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เมื่อผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะได้กล้าเชื้อแบบผงปริมาณ 2.5 กรัม และมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $2.73x10^{9}$ CFU/g มีค่าปริมาณน้ำอิสระ (a_w) เท่ากับ 0.413 กล้าเชื้อแบบผงจากการผลิตด้วยการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำ และกล้าเชื้อแบบผงจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีปริมาณน้ำอิสระต่ำกว่า 0.6 ซึ่งเป็นปริมาณที่เชื้อจุลินทรีย์ ยีสต์และรา ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Zapsalis and Beck, 1985) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการหมักน้ำส้มสายชูของกล้าเชื้อ ได้แก่ เซลล์เปียก กล้าเชื้อแบบผงจากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนอุณหภูมิต่ำ และกล้าเชื้อแบบผงจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่า กล้าเชื้อแบบผงจากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนอุณหภูมิต่ำมีความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกได้ใกล้เคียงกับเซลล์เปียก (ตารางที่ 6) เมื่อหมักเป็นเวลา 4 วัน การใช้เซลล์เปียกในการหมักจะมีปริมาณกรดอะซิติกสูงที่สุด เท่ากับ 4.40 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตกรดอะซิติก 0.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาคือ กล้าเชื้อแบบผงจากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนอุณหภูมิต่ำ และกล้าเชื้อแบบผงจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง มีปริมาณกรดอะซิติก เท่ากับ 3.99 และ 2.79 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตกรด อะซิติก 0.40 และ 0.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ กล้าเชื้อแบบผงจากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนอุณหภูมิต่ำมีประสิทธิภาพในการหมักน้ำส้มสายชูใกล้เคียงกับการใช้เซลล์เปียก ในขณะที่กล้าเชื้อแบบผงจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีประสิทธิภาพในการหมักน้ำส้มสายชูต่ำกว่าการใช้เซลล์เปียกและกล้าเชื้อแบบผงจากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนอุณหภูมิต่ำ อาจเกิดจากปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในกล้า

Prince of Songkla University Pattani Campus

เชื้อแบบผงจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่ำกว่า เนื่องจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งทำให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อลดลงสามารถเกิดขึ้นในระหว่างการทำแห้งหรือการแช่แข็ง การเกิดการทำลายเซลล์เป็นผลมาจากการเกิดผลึกน้ำแข็งและเพิ่มปริมาตรมีผลทำให้เซลล์แตก และเมื่อเกิดผลึกน้ำแข็งและความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นทั้งภายในและภายนอกเซลล์จะทำให้เกิดการสูญเสียน้ำซึ่งเป็นผลทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลาย (ภัทรียา, 2541)

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพในการหมักน้ำส้มสายชูของกล้าเชื้อแบบผง ได้แก่ เซลล์เปียก (wet cell) การทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำ และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

กล้าเชื้อ		ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/g)	ปริมาณกรดอะซิติก (กรัม/ 100 มิลลิลิตร)	
			2 วัน	4 วัน
เซลล์เปียก		$2.44x10^{14a}$	0.45^{a}	4.40^{a}
กล้าเชื้อแบบผง	ทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำ	$1.53x10^{14b}$	0.45^{a}	3.99^{b}
	ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง	$2.73x10^{9c}$	0.23^{b}	2.79^{c}

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

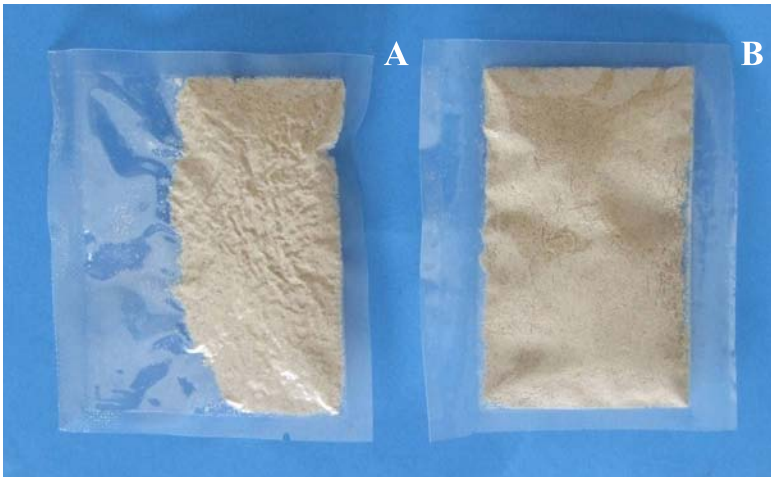
Prince of Songkla University Pattani Campus

4.5 ศึกษาสภาวะการเก็บรักษากล้าเชื้อแบบผงต่อความสามารถในการรอดชีวิตและประสิทธิภาพในการหมักน้ำส้มสายชู

ผลิตกล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผงจากการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำ โดยเลี้ยงเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในสภาวะการหมักที่เหมาะสมในน้ำตาลโตนด ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 5 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัด ร้อยละ 0.4 (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าพีเอช เป็น 6.0 และอัตราการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน นำมาเซนติฟิวส์เพื่อนำเซลล์ผลิตกล้าเชื้อแบบผงด้วยวิธีการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำ โดยใช้รำละเอียดเป็นตัวพยุงปริมาณ 10 กรัม ผสมเซลล์ในสารปกป้องเซลล์ ได้แก่ แมนนิทอล ความเข้มข้นร้อยละ 20 (w/v) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ทำแห้งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กล้าเชื้อมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 1.53×10^{14} CFU/g และบรรจุกล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผง ปริมาณ 10 กรัม ลงในซองพลาสติกใส (รูปที่ 30) และซองอะลูมิเนียมฟอยล์ลามิเนต (รูปที่ 31) ปิดผนึก 2 สภาวะ ได้แก่ สภาวะสุญญากาศ และสภาวะบรรยากาศ จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 1 เดือน การเก็บกล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผงที่อุณหภูมิห้องในทุกสภาวะการบรรจุจะทำให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของกล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผง ต่ำกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ในขณะที่การบรรจุในซองอะลูมิเนียมฟอยล์ลามิเนตและซองพลาสติกใสที่ปิดผนึกแบบสุญญากาศและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะทำให้กล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผง มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุด (รูปที่ 32) การเก็บรักษากล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า กล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผงที่บรรจุในซองอะลูมิเนียมฟอยล์ลามิเนตและซองพลาสติกใสที่ปิดผนึกแบบสุญญากาศ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับ 8.97×10^{13} และ 7.47×10^{13} CFU/g ตามลำดับ เมื่อนำกล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผงทดสอบประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชู เป็นเวลา 4 วัน พบว่า กล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผง ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (รูปที่ 33) กล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผง บรรจุในซองอะลูมิเนียมฟอยล์ลามิเนต ปิดผนึกแบบสุญญากาศ จะผลิตกรดอะซิติกได้สูงที่สุด เท่ากับ 4.28 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษากล้าเชื้อ พบว่า ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของกล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผงในทุกสภาวะการบรรจุที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องลดต่ำลงไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตประมาณ 1.53×10^{9}-9.93×10^{9} CFU/g เมื่อนำไป

ทดสอบประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูเป็นเวลา 4 วัน พบว่า ผลิตกรดอะซิติกได้เล็กน้อย ประมาณ 0.33-0.37 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในขณะที่การเก็บรักษากล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผงที่บรรจุในซองอะลูมิเนียมฟอยล์ลามิเนตและซองพลาสติกโดยปิดผนึกแบบสุญญากาศ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) เท่ากับ $1.30x10^{13}$ และ $1.10x10^{13}$ CFU/g ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูเป็นเวลา 4 วัน พบว่า กล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผงที่บรรจุในซองอะลูมิเนียมฟอยล์ลามิเนต ปิดผนึกแบบสุญญากาศ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผลิตกรดอะซิติกได้สูงที่สุด เท่ากับ 2.37 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (รูปที่ 32) ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของกล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผงจะลดลงอย่างรวดเร็วตลอดระยะ เวลาการหมัก (1 เดือน) โดยอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของกล้าเชื้อ นอกจากนี้กล้าเชื้อที่เก็บรักษาในสภาวะบรรยากาศซึ่งมีออกซิเจน จะมีอัตราการรอดชีวิตต่ำเพราะออกซิเจนสามารถซึมผ่านเซลล์ที่แห้งเข้าไปทำปฏิกิริยากับเซลล์ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ซึ่งออกซิเจนถือว่าเป็นอนุมูลอิสระสามารถสะสมแต่ไม่สามารถถูกเมแทบอไลท์หรือถูกกำจัดออกจากเซลล์ได้ ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาที่ผันกลับไม่ได้ (irreversible) ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายได้ (วรรณทิชา และศรีเวียง, 2549) นอกจากนี้การรอดชีวิตของกล้าเชื้อจะสอดคล้องกับประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชู

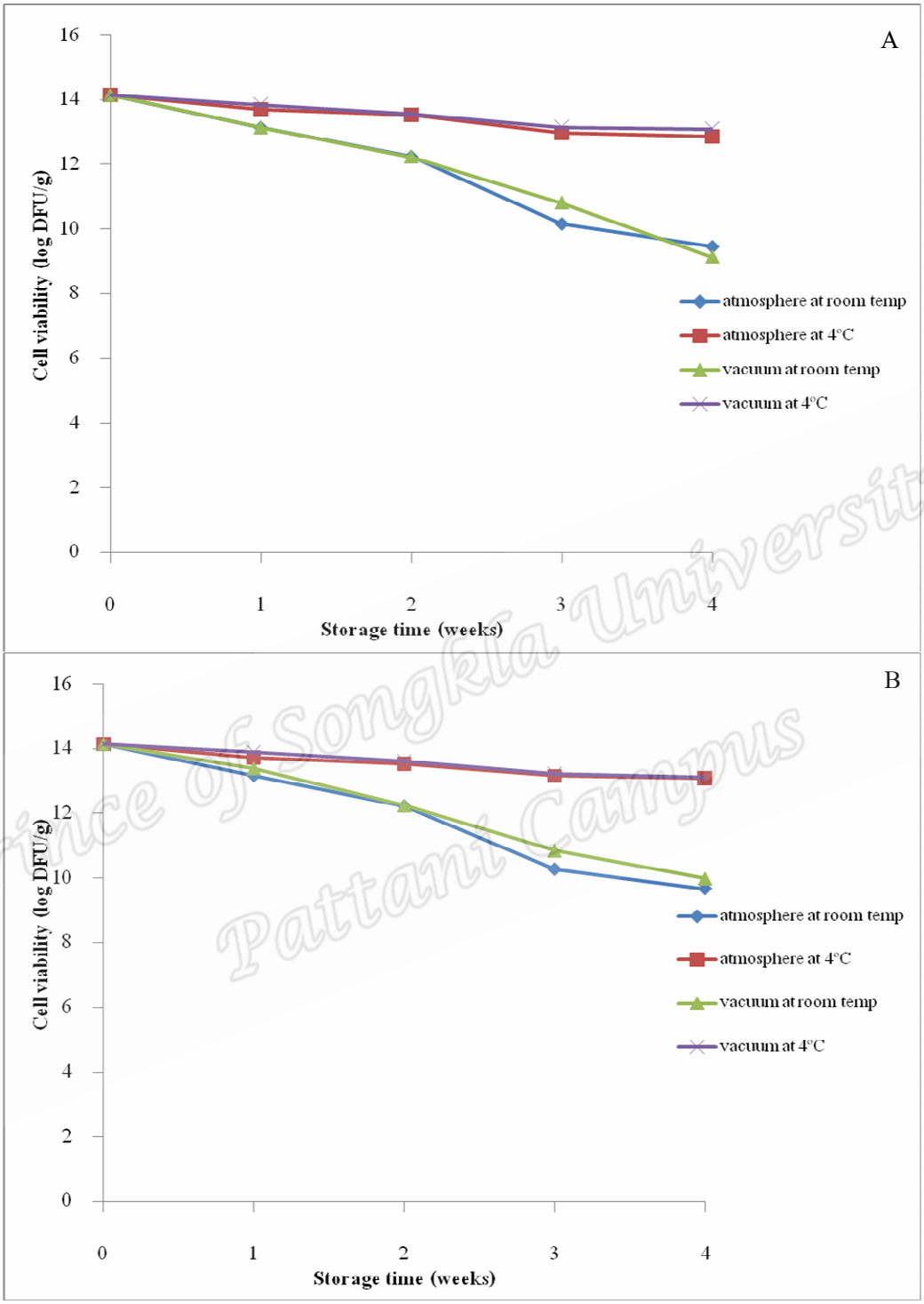
Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 30 กล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผงในซองพลาสติกใส
ปิดผนึกแบบสภาวะสุญญากาศ (A) และปิดผนึกแบบสภาวะบรรยากาศ (B)

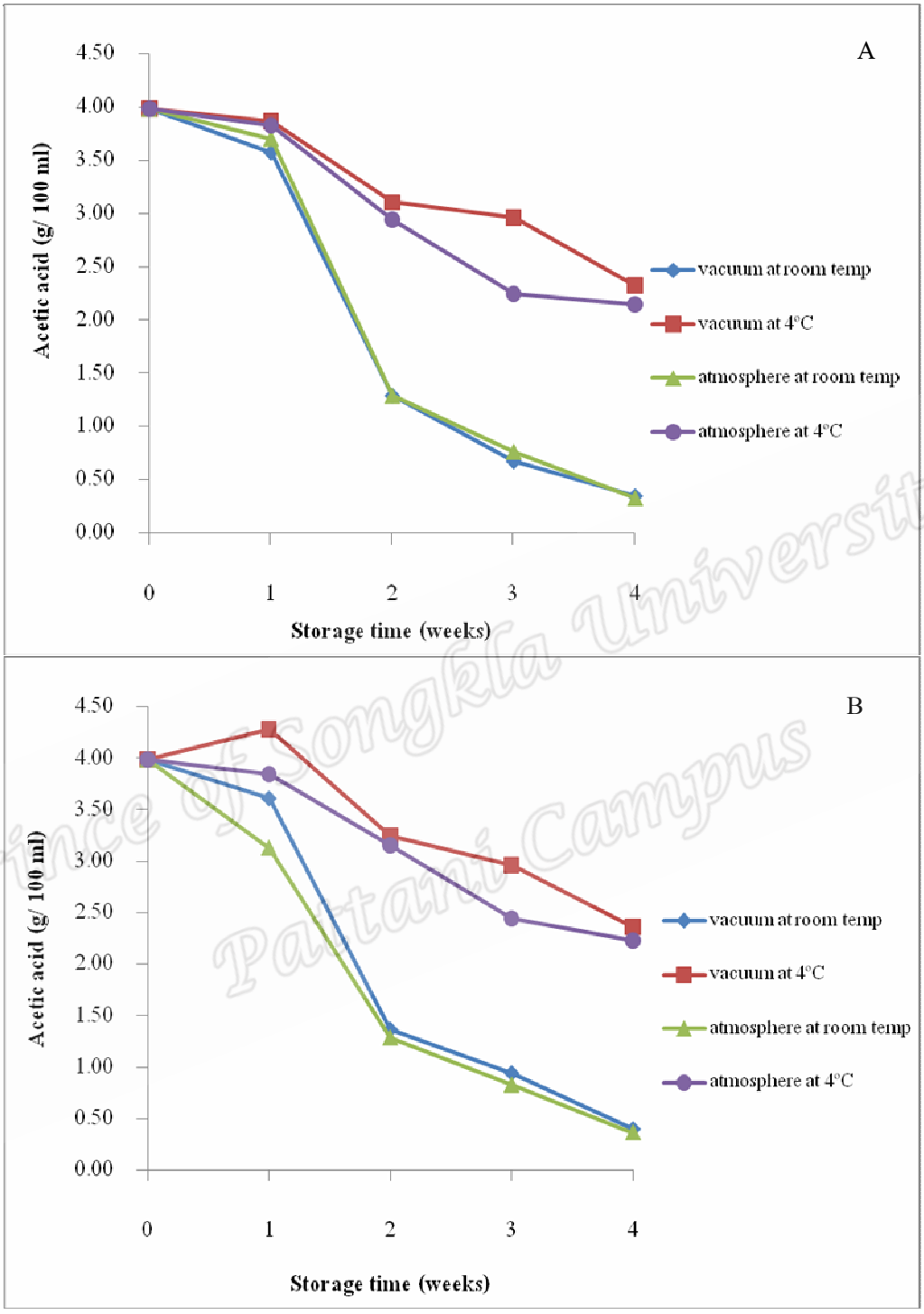
รูปที่ 31 กล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผงในซองอะลูมิเนียมฟอยล์ลามิเนต
ปิดผนึกแบบสภาวะสุญญากาศ (A) และปิดผนึกแบบสภาวะบรรยากาศ (B)

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 32 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของกล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผง ที่บรรจุในซองพลาสติกใส (A) และซองอะลูมิเนียมฟอยล์ลามิเนต (B) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ และแบบบรรยากาศ เก็บที่อุณหภูมิต่างๆ

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 33 ประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกของกล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผง ที่บรรจุในซองพลาสติกใส (A) และซองอะลูมิเนียมฟอยล์ลามิเนต (B) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ และแบบบรรยากาศเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ

Prince of Songkla University Pattani Campus