

การผลิตลูกแป้งยเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นกล้ำหมักน้ำส้มสายชู

Production of Dry Inoculum for Vinegar Fermentation

บรรจงจิต มหินทรเทพ¹, รสสุคนธ์ เหล่าไพบูลย์² และ นภา โล่ห์ทอง³

Banjongjit Mahintratep¹, Rossukon Laopaiboon² and Napha Lotong³

ABSTRACT

Attempts were made to produce vinegar dry inoculum (loogpang) using pure culture of acetic acid bacteria. Basing on its capability in producing high acid, toleration to high temperature and having good longevity, *Acetobacter sp. 249-1* was employed in this study. Inhibitory effect of 29 medicinal plants was tested against the selected strain and microorganisms normally found contaminated during the preparation of the dry inoculum. Mixture of 3% white pepper, 3% mace and 1% nutmeg was found the most appropriate preservative. While having no inhibitory effect on *Acetobacter spp.*, the mixture was very effective against other microorganisms tested. Comparison of several preparation procedures, indicated that good dry inoculum was obtained by mixing the mentioned spice mixture with 100 g rice flour, 80-85 ml coconut water and ca. 10^4 cells/g *Acetobacter sp. 249-1* and incubated at room temperature for 48 hours. In terms of viability and longevity of the microorganism, oven dry of the dough at 40° C for 24 hours was found superior over sun dry for 6 hours. The so prepared inoculum remained active upon storage at room temperature for 3 months, or in the refrigerator for at least six months. Inoculum obtained by addition of 0.2% propionic acid had shorter shelf life at room temperature. However, in the presence of the acid, dough mixing could be made with less care. Vinegar containing 6.5-7% acid was obtained when 0.2% dry inoculum was inoculated in alcoholic mash containing 8% ethanol.

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตลูกแป้งยเชื้อบริสุทธิ์โดยใช้เชื้อ *Acetobacter sp. 249-1* ซึ่งได้คัดเลือกแล้วว่ามีความสามารถในการผลิตกรด ทนอุณหภูมิสูงและมีชีวิตการอยู่รอดนานจากการทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพร 29 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้เตรียมลูกแป้งและจุลินทรีย์ที่มักพบปนเปื้อนในลูกแป้ง พบว่าส่วนผสมของสมุนไพรที่เหมาะสมที่สุดในการใช้ปั้นลูกแป้งได้แก่ พริกไทยขาวและดอกจันทร์อย่างละ 3% และลูกจันทร์ 1% ลูกแป้งที่ปั้นโดยใช้เชื้อเริ่มต้น 10^4 เซลล์/กรัม ต่อแป้ง 100 กรัม และน้ำมะพร้าว 80-85 มิลลิลิตร ผสมสมุนไพรตามอัตรา

ส่วนดังกล่าวป่นที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง แล้วอบที่ 40° C. 24 ชั่วโมง จะมีประสิทธิภาพดีและเก็บได้นานที่สุด การทำให้แห้งโดยการตากแดด 6 ชั่วโมง จะทำให้เชื้อลดลงประมาณ 1 log cycle ลูกแป้งที่เตรียมได้จะคงประสิทธิภาพเป็นเวลอย่างน้อย 6 เดือน เมื่อเก็บในตู้เย็น และ 3 เดือนเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง การเติมกรดโปรปิโอนิก 0.2% ในส่วนผสม ทำให้สามารถปั้นลูกแป้งได้โดยไม่ต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของเชื้อรา แต่ลูกแป้งจะมีอายุการเก็บสั้นเมื่อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อใช้ลูกแป้งปริมาณ 0.2% เป็นกล้ำเชื้อในวัสดุหมักที่มีแอลกอฮอล์ 8% จะหมักได้น้ำส้มสายชูที่มีกรดเข้มข้น 6-7%

1. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
Thailand Institute of Scientific and Technological Research.
2. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล บางแสน
Institute of Marine Science Bangsan.
3. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Dept. of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart Univ.

คำนำ

ลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเก็บในสภาพแห้ง ลูกแป้งที่รู้จักกันทั่วไป และมีเอกสารข้อมูลเกี่ยวกับการผลิต ได้แก่ ลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า (ขุนทดนามาวิสิฐ, 2490 ; วรชิน, 2492 ; Lotong, 1985) ส่วนกรรมวิธีการผลิตลูกแป้งน้ำส้มสายชูนั้น เป็นความลับที่ถ่ายทอดกันเฉพาะในครัวเรือนของผู้ผลิต ซึ่งส่วนใหญ่ได้ขาดการถ่ายทอดอย่างต่อเนื่อง ทำให้ไม่ปรากฏข้อมูลเป็นเอกสาร จากการสอบถามผู้ที่ยังผลิตอยู่น้อยรายในปัจจุบัน ไม่สามารถทราบถึงกรรมวิธีและสูตรที่แน่นอน โดยเฉพาะชนิดและปริมาณของสมุนไพรในลูกแป้ง ซึ่งสมุนไพรแต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ต่างกัน (บัญญัติและนภา, 2521; พุทธรินทร์, 2527; Anderson *et.al.*, 1953) การนำสูตรและวิธีการผลิตลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้ามาใช้ในการผลิตลูกแป้งน้ำส้มสายชูนั้นย่อมเป็นไปได้ เนื่องจากเชื้อน้ำส้มสายชูเป็นแบคทีเรีย ซึ่งจะตอบสนองการยับยั้งการเจริญต่างจากเชื้อราและยีสต์ นอกจากนี้เชื้อน้ำส้มสายชูยังเป็นจุลินทรีย์ที่เลี้ยงยาก และมีชีวิตการอยู่รอดสั้นกว่าแบคทีเรียอื่น ๆ หรือราและยีสต์มาก (Nickol, 1979) การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อน้ำส้มสายชูซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตกรดดี ทนอุณหภูมิสูงและมีชีวิตการอยู่รอดนานเพื่อใช้ในการผลิตลูกแป้ง พร้อมทั้งศึกษาสูตร กรรมวิธีการผลิตและการเก็บเพื่อให้ได้ลูกแป้งที่มีคุณภาพดีมาตรฐานคงที่ เหมาะต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาการเจริญในที่อุณหภูมิสูงและระยะเวลาการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Acetobacter* spp.

นำเชื้อที่ได้คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตกรดดีได้รวมทั้งสิ้น 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. acetii* 104, *A. acetii* I, *A. rancens* I และ *Acetobacter* sp. รหัส 281-1, 65-1, 88-1, 170-1 และ 249-1 (รสสุคนธ์ เหล่าไพบูลย์ และนภา โล่ห์ทอง, 2527) มาทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูง และศึกษาระยะเวลาการมีชีวิตรอดของเชื้อ

1.1 ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิระดับต่าง ๆ โดยปลูกเชื้อปริมาณ 1 รูป ลงในน้ำมะพร้าวที่มีเอทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37, 40, 42 และ 45 °C. ตรวจสอบผลโดยสังเกตการเจริญที่ผิวหน้าของอาหาร

1.2 ศึกษาระยะเวลาการมีชีวิตรอดที่อุณหภูมิห้อง โดยปลูกเชื้อลงบน slant อาหารน้ำมะพร้าวที่มีเอทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาทดสอบการมีชีวิตรอด โดยถ่ายเชื้อจากหลอดที่เก็บไว้เป็นระยะเวลาต่าง ๆ ลงบนอาหารชนิดเดียวกัน สังเกตการเจริญ

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพรต่อการเจริญของจุลินทรีย์

สมุนไพรที่ใช้ทดสอบได้แก่

กระเทียม (*Allium sativum*)
 จิงอ้อน (*Zingiber officinale*)
 ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*)
 ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*)
 ใบมะกรูด (*Citrus hystrix*)
 ใบโหระพา (*Ocimum basilicum*)
 พริกขี้หนู (*Capsicum minimum*)
 หอมแดง (*Allium ascalonicum*)
 กานพลู (*Eugenia aromatica*)
 ชะเอม (*Glycyrrhiza glabra*)
 ดีปลี (*Piper chaba*)
 พริกไทยขาว (*Piper nigrum*)
 ยี่ห่วย (*Cuminum cyminum*)
 ลูกจันทน์ (*Myristica fragrans*)
 อบเชย (*Cinnamomum verum*)
 จ่า (*Alpinia galanga*)
 จิงแก่ (*Zingiber officinale*)
 ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*)
 ใบกะเพรา (*Ocimum sanctum*)
 ใบสะระแหน่ (*Mentha arvensis*)
 ผิวมะกรูด (*Citrus hystrix*)
 พริกขี้เผือก (*Capsicum frutescens*)
 หอมใหญ่ (*Allium cepa*)
 เจตมูลเพลิง (*Plumbago indica*)
 ดอกจันทน์ (*Myristica fragrans*)
 เทียนขาว (*Lawsonia inermis*)
 ฟ้าลั่น (*Zingiber casswmmunar*)

ลูกกระวาน (*Electtaria carbamonum*)

ลูกผักชี (*Coriandrum sativum*)

เตรียมอาหารทดสอบโดยบดสมุนไพรแต่ละชนิดให้ละเอียด ผสมใน Potato Dextrose Agar (PDA) สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพต่อเชื้อราและยีสต์ หรือผสมในอาหารนํ้ามะพร้าว (นํ้ามะพร้าวเติมวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับทดสอบประสิทธิภาพต่อแบคทีเรีย) ในอาหารเพื่อฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ. เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารที่ไม่ได้เติมสมุนไพรลงในจานเพาะเชื้อเมื่อวุ้นแข็งตัวแล้ว แะอาหารออกครึ่งหนึ่งของจาน เทอาหารที่ผสมสมุนไพรลงในจานเพาะเชื้อโดยให้ผิวหน้าของอาหารทั้งสองส่วนเสมอกัน ใช้รูปและ suspension ของเชื้อ ลากให้เป็นเส้นเดียวกันบนอาหารทั้งสองส่วน สำหรับแบคทีเรียและยีสต์บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเดียวกันเป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในอาหารทั้งสองส่วน (นภา โล่ห์ทอง, 2515)

3. การผลิตลูกแป้งนํ้าส้มสายชู

3.1 แป้งที่ใช้ศึกษาการบ่มลูกแป้ง ได้แก่ แป้งข้าวเจ้าตราโม้ และแป้งที่บดจากข้าวสาร โดยนำข้าวสารเจ้าที่แช่ไว้ค้างคืนม้ผึ่งพอหมาด บดให้ละเอียด แล้วนำไปตากจนแห้งและร่อนให้เป็นผง

3.2 เตรียมกล้าเชื้อโดยปลูกเชื้อ ($OD = 0.5$) ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ในนํ้ามะพร้าวที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิเมตร เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดความขุ่น (OD) เพื่อคำนวณหาปริมาณเซลล์ที่จะใช้ในการบ่มลูกแป้ง

3.3 บ่มลูกแป้งโดยผสมแป้ง สารยับยั้งการเจริญที่ทดสอบแล้วว่าไม่ประสิทธิภาพดี suspension ของเชื้อ *Acetobacter* sp. 249-1 และนํ้าหรือนํ้ามะพร้าวต้มเดือดและทิ้งให้เย็น นวดจนเข้ากัน แล้วบ่มเป็นก้อนกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร กดให้แบนลงเล็กน้อย เรียงลงในตะกร้าที่ปูด้วยแผ่นพลาสติก คลุมตะกร้าด้วยผ้าขาวบาง บ่มไว้ในที่ร่มแล้วจึงนำไปทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 40° และ 45° หรือตากแดดด้วยระยะเวลาต่าง ๆ

4. การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์

4.1 ตรวจนับปริมาณ *Acetobacter* sp ด้วยวิธี spread plate บนอาหารซึ่งประกอบด้วยนํ้ามะพร้าว

ผสมยีสต์เอกซแทรกค์ 0.3% $CaCO_3$ 0.2% Brom-cresol purple 0.004% และวุ้น 1.5% หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเติมเอทานอลที่ปลอดเชื้อ (กรองด้วยแผ่นกรองแบคทีเรีย) 4% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีที่มีโซนใสสีเหลือง

4.2 ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนด้วยวิธี spread plate ในอาหารวุ้นนํ้ามะพร้าว

5. การศึกษาประสิทธิภาพของลูกแป้งในการหมักนํ้าส้มสายชู

ศึกษาประสิทธิภาพการหมักนํ้าส้มสายชูของลูกแป้งทั้งที่ผลิตเสร็จใหม่ ๆ และลูกแป้งที่เก็บไว้เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยใช้นํ้ามะพร้าวเติมแอลกอฮอล์ 8% และไว้นํ้ามะพร้าวที่มีแอลกอฮอล์ 8% เป็นวัตถุดิบ หมักในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร แต่ละพลาสติกบรรจุวัตถุดิบ 100 มิลลิลิตร ศึกษาเปรียบเทียบการหมัก โดยใช้ลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อโดยตรง ซึ่งใช้กล้าเชื้อปริมาณ 2, 0.2, 0.02 และ 0.002% ของวัตถุดิบ และการหมักด้วย starter ซึ่งเตรียมโดยใช้ลูกแป้งปริมาณ 1 กรัม เติมนํ้ามะพร้าว 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ starter ปริมาณ 0.2, 0.02 และ 0.002 มิลลิลิตร ต่อวัตถุดิบ 100 มิลลิลิตร ใดเตรทหาปริมาณกรดในนํ้าส้มสายชูกับสารละลาย NaOH มาตรฐานเข้มข้น 0.1 N โดยใช้ฟีนอล์ฟธาลีนเป็นสารตรวจสี

ผลและวิจารณ์

การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อนํ้าส้มสายชูที่เหมาะสมต่อการเตรียมลูกแป้ง

การเตรียมลูกแป้งมีความจำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการทำให้แห้ง ซึ่งจะต้องใช้ความร้อนในระดับอุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิห้อง ดังนั้นเชื้อที่คัดเลือกเพื่อใช้ในการนี้จึงควรเป็นเชื้อที่ทนอุณหภูมิสูงได้ดี ในการศึกษานี้ได้เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Acetobacter* spp ที่ได้คัดเลือกแล้วว่าไม่ประสิทธิภาพในการผลิตกรดสูงรวมทั้งสิ้น 8 สายพันธุ์ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°, 40°, 42° และ 45° พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาเจริญได้เล็กน้อยที่อุณหภูมิ 42° แต่ตรวจไม่พบการเจริญที่อุณหภูมิ 45° (ตารางที่ 1) ซึ่งทำให้แน่ใจว่าเชื้อจะทนอุณหภูมิได้สูงถึง 42°

เป็นที่ทราบกันดีว่า *Acetobacter spp* โดยทั่ว ๆ ไป มีอายุการอยู่รอดในสภาพปกติสั้นมาก (สายชล และนา โสภัททอง, 2527) ซึ่งลูกแบ่งที่มีคุณสมบัติที่ดีจำเป็นต้องมีอายุการเก็บได้นาน ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อที่มีอายุการอยู่รอดนาน จึงเป็นสิ่งจำเป็นในการใช้เชื้อบริสุทธิ์เตรียมลูกแบ่ง จากการศึกษาเปรียบเทียบการมีชีวิตรอดของเชื้อในอาหารน้ำมะพร้าวเติมเอทานอล 1% ปรากฏว่า *Acetobacter sp.* 249-1 มีชีวิตอยู่รอดเป็นเวลานานกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ คือมีชีวิตรอดที่อุณหภูมิห้อง 40 วัน (ตารางที่ 1) ดังนั้นเชื้อสายพันธุ์นี้จึงเหมาะสมที่จะนำมาเตรียมลูกแบ่งนำเลี้ยงสายสุ

ประสิทธิภาพของสมุนไพรรและกรดโปรปิโอนิก
ต่อการเจริญของจุลินทรีย์

การทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากสมุนไพรร 29 ชนิดที่นำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อราเส้นสายหูกและจุลินทรีย์ที่เคยมียารักษาว่า ปนเปื้อนในลูกแป้งโดยทั่ว ๆ ไป (พุทธรินทร์, 2527 ; บรรจงจิต, 2529) พบว่ากานพลู 5% และอบเชย 10% สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทุกชนิดได้อย่างสมบูรณ์

ผิวมะกรูด 30% สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น *Penicillium sp.* และที่ความเข้มข้น 5% สามารถยับยั้งการเจริญ *Bacillus sp.* *A. aceti* I และ *A. rancens* I ได้อย่างสมบูรณ์ แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น จึงอ่อน จึงแก่ ขมื่นชัน และพริกขี้หนู ที่ความเข้มข้น 30% และชะอม ที่ความเข้มข้น 5 และ 10% สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus sp.* ได้อย่างสมบูรณ์ สมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี ได้แก่ ดอกจันทร์ ดีปลี พริกไทยขาว และลูกจันทร์ นอกจากนี้ยังพบว่าดอกจันทร์และลูกจันทร์ที่ความเข้มข้น 5 และ 10% สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus sp.* ได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับผลของสมุนไพรต่อยีสต์พบว่า ดอกจันทร์ที่ความเข้มข้น 5 และ 10% สามารถยับยั้งการเจริญได้บ้าง (ตารางที่ 2)

เมื่อناسมนไพรที่มีแนวโน้มว่ามีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี ได้แก่ กานพลู ดอกจันทร์ ดีปลี พริกไทยขาว ลูกจันทร์ และอบเชย มาทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นต่ำ พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสมุนไพรรที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้

Table 1 Growth of *Acetobacter* spp. at various temperatures and their longevity at room temperature

Acetobacter spp.	Growth				Incubity (days)							
	37	40	42	45	5	10	15	20	25	30	35	40
<i>A. aceti</i> 103	3	2	1	0	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. aceti</i> 104	3	2	1	0	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. strains</i> 1	3	2	1	0	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. strains</i> 1	3	1	1	0	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acetobacter</i> sp. 20-1	3	2	1	0	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acetobacter</i> sp. 85-1	3	2	1	0	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acetobacter</i> sp. 107-1	3	2	1	0	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acetobacter</i> sp. 249-1	3	2	1	0	+	+	+	+	+	+	+	+

0 : no growth ; 1-3 : scanty to maximal growth
+ : viable ; - : nonviable

Table 2 Inhibitory effect of various spices on growth of microorganisms

[illegible]

Table 2. continue

Microorganisms	Spices and their concentration									
	(Ocimum basilicum)	(Citrus hirtex)	(Capsicum minimum)	(Capsicum frutescens)	(Allium ascalonicum)	(Allium cepa)	(Eugenia aromatica)	(Plumbago indica)	(Glycyrrhiza glabra)	(Myristica fragrans)
	5%30%	5%30%	5%30%	5%30%	5%30%	5%30%	5%10%	5%10%	5%10%	5%10%
<i>Acetobacter aceti</i> I	4	4	4	4	4	4	0	0	4	4
<i>Acetobacter rancens</i> I	4	4	0	0	4	4	4	4	4	4
<i>Acetobacter</i> sp. 170-1	4	4	4	2	4	4	4	4	4	4
<i>Acetobacter</i> sp. 249-1	4	4	4	2	4	4	4	4	4	4
<i>Bacillus</i> sp.	4	4	0	0	4	0	4	2	4	4
<i>Debaryomyces hansenii</i>	4	4	4	2	4	4	4	4	4	4
<i>Endomycopsis fibuligera</i>	4	4	4	0	4	4	4	4	4	4
<i>Hansenula anomala</i>	4	4	4	0	4	4	4	4	4	2
<i>Hansenula subpelliculosa</i>	4	4	4	0	4	4	4	4	4	1
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	4	4	4	0	4	4	4	4	4	2
<i>Pichia kluyveri</i>	4	4	4	2	4	4	4	4	4	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	4	4	1	4	4	4	4	4	4
<i>Amylomyces rouxii</i> 1	4	4	4	1	4	4	4	4	4	1
<i>Amylomyces rouxii</i> 2	4	4	4	2	4	4	4	4	4	1
<i>Aspergillus niger</i>	4	4	4	2	4	4	4	4	4	2
<i>Aspergillus oryzae</i>	4	4	4	0	4	4	4	4	4	1
<i>Mucor hiemalis</i>	4	4	4	0	4	4	4	4	4	0
<i>Mucor indicus</i>	4	4	4	0	4	4	4	4	4	1
<i>Penicillium</i> sp. 1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2
<i>Penicillium</i> sp. 2	4	4	4	2	4	4	4	4	4	3
<i>Penicillium</i> sp. 3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3
<i>Penicillium</i> sp. 4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3
<i>Rhizopus oligosporus</i>	4	4	4	0	4	4	4	4	4	1

Microorganisms	Spices and their concentration									
	(Piper chaba)	(Lawsonia inermis)	(Piper nigrum)	(Zingiber cassumunar)	(Cumimum cyminum)	(Eleteria cardamomum)	(Myristica fragrans)	(Coriandrum sativum)	(Cinnamomum verum)	
	5%10%	5%10%	5%10%	5%10%	5%10%	5%10%	5%10%	5%10%	5%10%	
<i>Acetobacter aceti</i> I	4	4	4	4	4	4	4	2	4	1
<i>Acetobacter rancens</i> I	4	4	4	4	4	4	4	3	4	1
<i>Acetobacter</i> sp. 170-1	4	4	4	4	4	4	4	3	4	1
<i>Acetobacter</i> sp. 249-1	4	4	4	4	4	4	4	3	4	1
<i>Eacillus</i> sp.	4	3	4	4	4	4	4	0	4	0
<i>Debaryomyces hansenii</i>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0
<i>Endomycopsis fibuligera</i>	2	2	4	4	2	1	4	4	4	0
<i>Hansenula anomala</i>	4	3	4	4	4	4	4	4	4	1
<i>Hansenula subpelliculosa</i>	4	2	4	4	4	4	4	4	4	1
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	4	2	4	4	4	4	4	4	4	0
<i>Pichia kluyveri</i>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0
<i>Amylomyces rouxii</i> 1	2	2	4	4	1	0	4	4	4	1
<i>Amylomyces rouxii</i> 2	2	2	4	4	0	0	4	4	4	2
<i>Aspergillus niger</i>	2	2	4	4	1	1	3	3	4	1
<i>Aspergillus oryzae</i>	2	2	4	4	1	1	4	4	4	1
<i>Mucor hiemalis</i>	0	0	4	4	0	0	3	3	4	0
<i>Mucor indicus</i>	1	1	4	4	0	0	3	3	4	0
<i>Penicillium</i> sp. 1	1	1	4	4	2	2	3	3	4	1
<i>Penicillium</i> sp. 2	3	3	4	4	3	3	4	4	4	2
<i>Penicillium</i> sp. 3	3	3	4	4	3	3	4	4	4	2
<i>Penicillium</i> sp. 4	2	2	4	4	3	3	4	4	4	1
<i>Rhizopus oligosporus</i>	0	0	4	4	0	0	4	4	4	1

โดยไม่มีผลต่อการเจริญของ *Acetobacter spp.* ได้แก่ ดอกจันทร์ ดีปลี และพริกไทยขาว ที่ความเข้มข้น 3% และลูกจันทน์ที่ความเข้มข้น 1% ส่วนกานพลูและอบเชยที่ระดับความเข้มข้นซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ จะมีผลยับยั้งการเจริญของ *Acetobacter spp.* ได้เช่นกัน (ตารางที่ 3) จึงไม่สามารถนำสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดหลังนี้มาใช้ในการผลิตลูกแป้งได้

Table 3. Effect of the selected spices at low concentration on growth of microorganisms

Microorganism	Concentration (%)											
	<i>Eugenia aromatica</i>		<i>Myristica fragrans</i> ¹		<i>Piper chaba</i>		<i>Piper nigrum</i>		<i>Myristica fragrans</i> ²		<i>Cinnamomum verum</i>	
	0.5	1.0	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3
<i>Acetobacter aceti</i> I	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3
<i>Acetobacter rancens</i> I	4	2	4	4	4	4	4	4	4	3	4	3
<i>Acetobacter sp. 170-1</i>	4	1	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3
<i>Acetobacter sp. 249-1</i>	4	2	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3
<i>Bacillus sp.</i>	3	0	0	4	4	4	4	0	0	3	2	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2
<i>Endomycopsis fibuligera</i>	3	1	4	4	2	2	2	2	3	3	3	3
<i>Hansenula anomala</i>	4	3	3	2	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Hansenula subpelliculosa</i>	4	2	2	1	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	4	1	3	2	4	4	4	4	4	4	4	2
<i>Pichia kluyveri</i>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2
<i>Amylomyces rouxii</i> 1	4	3	3	1	2	2	1	1	2	2	4	3
<i>Amylomyces rouxii</i> 2	3	1	3	1	3	2	1	0	3	2	4	3
<i>Aspergillus niger</i>	4	1	3	2	3	2	2	1	3	3	4	3
<i>Aspergillus oryzae</i>	4	2	2	1	2	2	3	1	3	3	4	3
<i>Mucor hiemalis</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	2
<i>Mucor indicus</i>	3	0	1	1	1	0	0	0	1	1	2	2
<i>Penicillium sp. 1</i>	3	0	2	2	2	1	3	2	3	3	4	3
<i>Penicillium sp. 2</i>	4	2	3	3	3	3	4	3	4	4	4	4
<i>Penicillium sp. 3</i>	4	2	3	3	4	3	4	3	3	3	4	4
<i>Penicillium sp. 4</i>	4	2	3	3	3	2	3	3	4	3	4	4
<i>Rhizopus oligosporus</i>	3	0	1	1	0	0	0	0	3	3	4	3

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพรผสมระหว่าง ดอกจันทร์ ดีปลี พริกไทยขาว และลูกจันทน์พบว่าส่วนผสมของสมุนไพรที่ให้ผลดีที่สุด คือ พริกไทยขาวและดอกจันทร์อย่างละ 3% และลูกจันทน์ 1% โดยที่นอกจากจะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้มากที่สุดแล้ว ยังยับยั้งการเจริญของ *Bacillus sp.* ได้อย่างสมบูรณ์ และยับยั้งการเจริญของ *A. niger* ได้บ้าง (ตารางที่ 4) ซึ่งจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้มักพบปนเปื้อนในลูกแป้งเสมอ อย่างไรก็ตามเพื่อให้ผลการยับยั้ง *A.niger* เป็นไปโดยสมบูรณ์ จึงได้ทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพรผสมกันกรดโปรปิโอนิก ซึ่งพบว่าการใช้สมุนไพรผสมกับกรดโปรปิโอนิกจะให้ผลดีกว่าการใช้สมุนไพรหรือกรดโปรปิโอนิกเพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่ง ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยที่ส่วนผสมที่ให้ผลดีที่สุดได้แก่ พริกไทยขาว และดอกจันทร์

อย่างละ 3% ลูกจันทน์ 1% และกรดโปรปิโอนิก 0.2% กล่าวคือ นอกจากจะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดแล้ว ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus sp.* และ *A.niger* ได้อย่างสมบูรณ์

Table 4. Effect of spice mixture on growth of microorganisms

Microorganism	Spice mixture											
	a+b+c+d	b+c+d	a+c+d	a+b+d	a+b+c	c+d	b+c	b+c	a+d	b+c	a+b	a+b
<i>Acetobacter aceti</i> I	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Acetobacter rancens</i> I	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Acetobacter sp. 170-1</i>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Acetobacter sp. 249-1</i>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Bacillus sp.</i>	3	1	0	1	4	0	1	4	0	4	4	4
<i>Debaryomyces hansenii</i>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Endomycopsis fibuligera</i>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0
<i>Hansenula anomala</i>	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Hansenula subpelliculosa</i>	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Pichia kluyveri</i>	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Amylomyces rouxii</i> 1	4	4	4	4	3	4	3	4	4	4	4	1
<i>Amylomyces rouxii</i> 2	4	4	4	4	4	3	4	3	4	4	4	1
<i>Aspergillus niger</i>	3	3	2	3	3	3	3	2	3	2	3	2
<i>Aspergillus oryzae</i>	4	4	3	3	4	3	3	3	4	3	3	2
<i>Mucor hiemalis</i>	1	0	0	0	1	0	2	0	2	0	0	0
<i>Mucor indicus</i>	2	1	1	2	2	1	3	1	3	1	1	1
<i>Penicillium sp. 1</i>	3	3	3	2	3	3	2	3	3	3	3	2
<i>Penicillium sp. 2</i>	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4
<i>Penicillium sp. 3</i>	4	3	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3
<i>Penicillium sp. 4</i>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>Rhizopus oligosporus</i>	2	1	1	2	1	1	3	1	3	1	0	0

0 : no growth, 1-4 scanty-good growth

a : 3% *Piper nigrum* (white pepper) c : 3% *Myristica fragrans* (mace)

b : 3% *piper chaba* (long pepper) d : 1% *Myristica fragrans* (nutmeg)

การที่สมุนไพรผสมแต่ละสูตรให้ผลแตกต่างกัน และต่างจากการใช้สมุนไพรชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว นั้น พอจะอธิบายได้ว่า ในสมุนไพรแต่ละชนิดนอกจากจะประกอบด้วยสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แล้ว ยังอาจมีสารอื่นที่มีคุณสมบัติเสริมหรือกระตุ้นการเจริญหรือกิจกรรมของจุลินทรีย์ เช่น Kissinger และ Zaika (1978) พบว่าเครื่องเทศที่ใช้ศึกษา คือ พริกไทยดำ allspice และลูกจันทน์สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์กรดแลคติกของ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus cerevisiae* โดยเฉพาะเมื่อใช้เครื่องเทศทั้ง 3 ชนิดรวมกันจะให้ผลดีกว่าการใช้เครื่องเทศแต่ละชนิดโดยลำดับ และพุทธรินทร์ (2527) พบว่าอบเชย พริกไทยขาว ดีปลี และเครื่อง

เทศผสมที่ประกอบด้วยเครื่องเทศชนิดใดชนิดหนึ่งใน 3 ชนิดนี้ สามารถกระตุ้นการสร้างเส้นใยของ *A. niger* ได้ รายงานดังกล่าวแตกต่างจากผลของการศึกษานี้ ซึ่งพบว่าการผลิตเครื่องเทศอื่น ๆ ด้วยพริกไทยจะมีผลยับยั้งการเจริญของ *A. niger*

0 : no growth, 1-4 : scanty-good growth 1/: mace 2/: nutmeg

Table 5. Effect of spice mixture and propionic acid on growth of microorganisms

Microorganism	Spice and propionic acid mixture										n
	a+b+c+d+p	b+c+d+p	a+c+d+p	a+b+c+d+p	a+b+c+p	c+d+p	b+d+p	b+c+p	a+d+p	d+c+p	
<i>Acetobacter acetii</i> 1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Acetobacter rancens</i> 1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Acetobacter</i> sp. 170-1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Acetobacter</i> sp. 249-1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Bacillus</i> sp.	3	1	0	1	4	0	1	4	0	4	4
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1	1	1	0	1	1	2	1	1	1	4
<i>Endomycopsis fibuligera</i>	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	0
<i>Hansenula anomala</i>	1	1	1	1	1	1	1	3	1	2	1
<i>Hansenula subpelliculosa</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0
<i>Pichia kluyveri</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Amylomyces rouxii</i> 1	1	3	3	0	0	0	4	3	4	4	0
<i>Amylomyces rouxii</i> 2	1	3	2	0	0	0	4	3	4	4	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	2	0	0	0	1	2	0	0	0	0
<i>Aspergillus oryzae</i>	2	3	2	2	3	3	2	3	2	3	2
<i>Mucor hiemalis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	4
<i>Mucor indecuss</i>	0	1	0	2	0	0	1	1	1	0	0
<i>Penicillium</i> sp. 1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	2
<i>Penicillium</i> sp. 2	1	3	3	1	1	2	2	2	3	2	1
<i>Penicillium</i> sp. 3	2	3	3	2	2	3	2	3	3	3	3
<i>Penicillium</i> sp. 4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4
<i>Rhizopus oligosporus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3

0 : no growth, 1-4 scanty-good growth c : 3% *Myristica fragrans* (mace)
a : 3% *Piper nigrum* (white pepper) d : 1% *Myristica fragrans* (nutmeg)
b : 3% *Piper chaba* (long pepper) p : 0.2% propionic acid

การทดสอบในลูกแป้ง

จากการปั้นลูกแป้งโดยใช้ส่วนผสมของสมุนไพรที่คัดเลือกแล้วว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อซึ่งมักพบปนเปื้อนในลูกแป้งได้ดีกว่าส่วนผสมอื่น ๆ พบว่าจะมีการเจริญของเชื้อ *A. niger* ระหว่างการปมเป็นครั้งแรก โดยเฉพาะในช่วงที่อากาศชื้น ทำให้การระเหยของน้ำในขณะปมไม่ดี ลูกแป้งจะอยู่ในสภาพที่มีความชื้นสูงเป็นเวลานาน จึงเอื้ออำนวยให้เชื้อราซึ่งอาจจะปนเปื้อนในช่วงการปั้นหรือปมลูกแป้งมีโอกาสเจริญได้ ส่วนลูกแป้งที่ปั้นโดยเติมทั้งส่วนผสมของสมุนไพรและกรดโปรปิโอนิก 0.2% จะไม่พบการเจริญของเชื้อปนเปื้อนเลย

การผลิตลูกแป้งน้ำส้มสายชู

การศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ในแป้งที่เตรียมในห้องปฏิบัติการและแป้งสำเร็จรูป พบว่าแป้งที่เตรียมเอง มีเชื้อ *Bacillus* sp. ปนเปื้อนอยู่มากถึง 10^3 – 10^4 เซลล์ต่อกรัม ในขณะที่ตรวจไม่พบเชื้อใด ๆ เลยในแป้งสำเร็จ และจากการตรวจสอบลูกแป้งที่ปั้นโดยใช้แป้งทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว พบว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. 249-1 สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ปริมาณใกล้เคียงกัน จึงได้ใช้แป้งสำเร็จปั้นลูกแป้งในการศึกษานี้

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้น้ำและน้ำมะพร้าวในการปั้นลูกแป้ง โดยใช้ น้ำหรือ น้ำมะพร้าว 80 มิลลิเมตรต่อแป้ง 100 กรัม พบว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. 249-1 สามารถเจริญเพิ่มจำนวนในลูกแป้งที่ปั้นด้วยน้ำมะพร้าวได้ดีกว่าที่ปั้นด้วยน้ำเล็กน้อย คือเมื่อปมลูกแป้งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อเพิ่มจำนวนจาก 3.3×10^3 เป็น 2.7×10^7 เซลล์ต่อกรัม ในลูกแป้งที่ปั้นด้วยน้ำ และจาก 2.8×10^3 เป็น 5.1×10^7 เซลล์ต่อกรัมในลูกแป้งที่ปั้นด้วยน้ำมะพร้าว

จากการศึกษาอัตราส่วนระหว่างแป้งต่อน้ำมะพร้าวที่เหมาะสมต่อการปั้นลูกแป้ง พบว่าลูกแป้งที่ปั้นโดยใช้น้ำมะพร้าว 70 มิลลิลิตร ต่อแป้ง 100 กรัม ให้ปริมาณเซลล์ต่ำกว่าเมื่อใช้น้ำมะพร้าว 80 และ 90 มิลลิลิตร ซึ่งทั้ง 2 อัตราส่วนหลังนี้เชื้อจะเพิ่มจำนวนได้ปริมาณใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 6) แต่ลูกแป้งที่ปั้นโดยใช้น้ำ

0 : no growth, 1-4 scanty-good growth

a : 3% *Piper nigrum* (white pepper) c : 3% *Myristica fragrans* (mace)
b : 3% *Piper chaba* (long pepper) d : 1% *Myristica fragrans* (nutmeg)

Table 6. Effects of initial moisture of the dough on numbers of *Acetobacter* sp. 249-1.

Coconut water 1/ (ml)	Incubation time (hours)	moisture (%)	cells/g
70	0	43.4	3.90×10^3
	24	36.0	1.51×10^6
	48	26.1	1.73×10^7
80	0	45.8	3.05×10^3
	24	38.9	2.45×10^6
	48	28.7	4.85×10^7
90	0	48.4	2.55×10^3
	24	42.6	3.85×10^6
	48	30.9	4.70×10^7

มะพร้าว 90 มิลลิลิตร จะมีลักษณะค่อนข้างเหลว ยกต่อการทำให้แห้ง ดังนั้นในการปั้นลูกแป้งเพื่อศึกษา

ในขั้นต่อไป จึงใช้แป้ง 100 กรัม ต่อน้ำมะพร้าว 80-85 มิลลิลิตร ทั้งนี้ขึ้นกับความชื้นของอากาศขณะที่ยีสต์และบ่มลูกแป้งอย่างไรก็ตามลูกแป้งที่เพิ่งขึ้นเสร็จใหม่ ๆ ควรจะมีความชื้นประมาณ 45-46% ซึ่งจากสูตรส่วนผสมของการบ่มลูกแป้งข้าวหมาก และลูกแป้งเหล้า เท่าที่ปรากฏเป็นเอกสาร (ขุนกฤษฎาภิบาล, 2490; วรชิน, 2492) ตลอดจนผลจากการศึกษา (พิไลวรรณ, 2523 ; พุทธิรินทร์, 2527) ไม่มีรายงานปรากฏแน่ชัดถึงปริมาณน้ำหรือความชื้นที่เหมาะสมผลจากการที่ 6 นี้ยังแสดงให้เห็นว่าในระยะ 24 ชั่วโมงแรกของการบ่ม เชื้อจะเจริญอย่างรวดเร็ว เพิ่มจำนวนขึ้นถึง 3 log cycle และเมื่อบ่มลูกแป้งต่อไป อัตราการเจริญจะช้าลง ทำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เพียง 1 log cycle ใน 24 ชั่วโมงหลังของการบ่ม การเจริญของเชื้อในสภาพลูกแป้งนี้จะช้ากว่าการเจริญในอาหารเหลว ซึ่งจะได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเมื่อบ่มได้ 24 ชั่วโมง (บรรจงจิตร, 2529)

การเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ในลูกแป้งซึ่งขึ้นโดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาณต่าง ๆ กัน พบว่าเมื่อบ่มได้ 48 ชั่วโมง ลูกแป้งซึ่งผลิตโดยใช้กล้าเชื้อ 10^4 และ 10^5 เซลล์ต่อกรัมจะมีปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกันคือ 1.9×10^8 และ 2.0×10^8 เซลล์ต่อกรัมตามลำดับ ซึ่งจะมากกว่าปริมาณในลูกแป้งที่ขึ้นโดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้น 10^3 เซลล์ต่อกรัมอยู่ 1 log cycle

การศึกษาวิธีการทำลูกแป้งให้แห้งด้วยการตากแดดและการอบที่อุณหภูมิ 40° และ 45° ซ. พบว่าการอบลูกแป้งที่อุณหภูมิ 45° ซ. จะทำให้ลูกแป้งมีความชื้นต่ำกว่าการอบที่อุณหภูมิ 40° ซ. เล็กน้อย แต่ปริมาณเซลล์ ในลูกแป้งจะลดลงประมาณ 1 log cycle เมื่อใช้เวลารอบเท่า ๆ กัน ส่วนวิธีทำให้แห้งด้วยการตากแดดนั้นพบว่า การตากแดด 6-8 ชั่วโมง จะทำให้ลูกแป้งมีความชื้นใกล้เคียงกับการอบที่อุณหภูมิ 40° ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คือประมาณ 11% ซึ่งเป็นระดับความชื้นที่จะเก็บลูกแป้งได้โดยไม่มีการเจริญของเชื้อรา การตากแดดจะทำให้ลูกแป้งมีปริมาณเซลล์น้อยกว่าการอบประมาณ 1 log cycle (ตารางที่ 7) ซึ่งอาจเป็นผลจากแสงอุลตราไวโอเลต ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองของ Maceda และ Palo (1967) ที่พบว่าเชื้อน้ำส้มสายชูจะมีชีวิตรอดน้อยลงเมื่อได้รับแสงแดด

Table 7. Effects of methods used for drying the inocula on cell viability

Dough incubation (hours)	Drying methods	Drying time (hours)	Moisture ¹ (%)	cells/g
0	-	-	45.3	3.80×10^4
48	-	-	27.4	2.22×10^8
	oven dry, 40°C	24	11.2	1.28×10^8
		36	9.8	9.60×10^7
	oven dry, 45°C	24	10.9	2.05×10^7
		36	9.5	5.40×10^6
	Sun dry	6-8	11.1	1.13×10^7
		12-16	10.6	3.10×10^6

^{1/} Dough was prepared using 100 g rice flour and 80 ml coconut water

ประสิทธิภาพของลูกแป้งในการหมักน้ำส้มสายชู

การหมักน้ำส้มสายชูโดยใช้น้ำมะพร้าวเดิมเอทานอล 8% เป็นวัตถุดิบ พบว่าเมื่อใช้ลูกแป้ง หรือ starter ที่เตรียมจากลูกแป้งปริมาณ 0.2% และ 2% จะได้ปริมาณกรดสูงสุดใกล้เคียงกัน คือได้กรด 7% ในวันที่ 10 แต่เมื่อใช้กล้าเชื้อปริมาณน้อยกว่านี้ประสิทธิภาพการผลิตจะลดลง ซึ่งจากการตรวจนับปริมาณเชื้อพบว่าในลูกแป้งที่ศึกษามีเชื้อประมาณ 10^8 เซลล์ต่อกรัม ดังนั้นลูกแป้งที่ใช้เป็นกล้าเชื้อปริมาณ 0.2 และ 2% จึงมีเชื้ออยู่ประมาณ 2×10^7 และ 2×10^8 เซลล์ ตามลำดับ

ภาพที่ 1 แสดงให้เห็นว่าการหมักน้ำส้มโดยใช้น้ำมะพร้าวซึ่งมีแอลกอฮอล์ 8% เป็นวัตถุดิบนั้นเมื่อใช้ลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อโดยตรงในปริมาณ 0.2% จะไม่มีกรดเกิดขึ้นเลยตลอดระยะเวลาการหมัก 12 วัน ในขณะที่การหมักโดยใช้ starter ในปริมาณเท่ากัน จะได้ผลดี ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์ในลูกแป้งอยู่ในสภาพที่ active (Lotong, 1983)

การหมักน้ำส้มในไวน์น้ำมะพร้าวนั้นนอกจากจะทำได้โดยการนำลูกแป้งมาเตรียม starter แล้วยังสามารถใช้ลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อโดยตรงโดยเติมน้ำมะพร้าวลงในไวน์ก่อนเติมลูกแป้ง ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าการเติมน้ำมะพร้าว 20% จะให้ผลเช่นเดียวกับการใช้ starter และการเติมในระดับ 10% จะได้ปริมาณกรดพอ ๆ กับเมื่อเติม 20% แต่การเกิดกรดจะช้ากว่า (ภาพที่ 1)

Table 8. Effects of propionic acid on cell viability upon storage of the dry inocula

storage time (week)	Cells/g		without propionic acid room temperature
	with propionic acid refrigerated	room temperature	
0	1.1×10^8	3.8×10^7	6.2×10^7
1	-	5.3×10^6	7.2×10^6
2	-	2.4×10^5	8.4×10^5
3	5.3×10^6	5.4×10^3	2.8×10^5
4	-	0	9.2×10^4
5	-	0	7.4×10^4
6	5.3×10^5	-	5.7×10^4
8	-	-	3.1×10^4
10	-	-	5.4×10^3
12	-	-	8.1×10^2
24	4.7×10^4	-	-

— : no study made; 0 : no viable cell

อายุการเก็บลูกแป้งและการต่อเชื้อจากลูกแป้ง

ผลจากตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่าลูกแป้งซึ่งเตรียมโดยใช้ส่วนผสมของสมุนไพรซึ่งประกอบด้วยพริกไทยขาว และดอกจันทน์อย่างละ 3% และลูกจันทน์ 1% โดยไม่เติมกรดโปรปิโอนิก เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 สัปดาห์ เชื้อจะลดลงจาก 6.2×10^7 เซลล์ต่อกรัม เหลือ 5.4×10^2 เซลล์ต่อกรัม ในขณะที่ลูกแป้งที่เตรียมโดยใช้สมุนไพรผสมกรดโปรปิโอนิก 0.2% เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง 3 สัปดาห์ เชื้อจะลดลงจาก 3.8×10^7 เซลล์ต่อกรัม เหลือ 5.4×10^3 เซลล์ต่อกรัม แต่เมื่อเก็บลูกแป้งต่ออีก 1 สัปดาห์ เชื้อจะลดจำนวนลงจนไม่สามารถตรวจนับได้ ส่วนการเก็บในตู้เย็นนั้นพบว่าเชื้อในลูกแป้งที่เตรียมโดยเติมกรดโปรปิโอนิกจะลดลงประมาณ 5 log cycle ในระยะเวลา 24 สัปดาห์ ผลการตรวจนับเชื้อในลูกแป้งนี้จะสอดคล้องกับการทดสอบประสิทธิภาพการหมัก (ภาพที่ 2) ซึ่งพบว่าการหมักน้ำส้มโดยใช้ลูกแป้งที่เติมกรดโปรปิโอนิกและเก็บที่อุณหภูมิห้องเกิน 3 สัปดาห์จะไม่มีกรดเกิดขึ้นเลย แต่ลูกแป้งชนิดเดียวกันนี้เมื่อเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 24 สัปดาห์ ประสิทธิภาพการสร้างกรดจะต่ำกว่าลูกแป้งใหม่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ดังนั้นการใช้กรดโปรปิโอนิกร่วมกับสมุนไพรในการเตรียมลูกแป้ง จึงมีทั้งผลดีและผลเสีย กล่าวคือการเติมกรดนี้จะทำให้สามารถปั่นลูกแป้งได้โดยไม่ต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งในกรณีที่ผลิตลูกแป้งเพื่อใช้ในระยะเวลาไม่นานนัก

หรือสามารถเก็บลูกแป้งในตู้เย็นได้ วิธีนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งส่วนการเตรียมลูกแป้งโดยใช้เฉพาะสมุนไพรนั้น ยังจำเป็นต้องระมัดระวังเรื่องการปนเปื้อน ซึ่งสามารถทำได้โดยการจัดที่ทางสำหรับการนี้โดยเฉพาะ ลูกแป้งที่ปั่นโดยวิธีหลังนี้จะเก็บในอุณหภูมิห้องได้นาน เหมาะต่อการนำไปใช้ในแหล่งที่ไม่สามารถเก็บในตู้เย็นได้

จากการศึกษาประสิทธิภาพการหมักโดยใช้ลูกแป้งซึ่งได้จากการผสมสมุนไพรกับกรดโปรปิโอนิก ซึ่งเตรียมในลักษณะต่างกัน 4 วิธี คือ 1) ปั่นด้วยน้ำ และทำให้แห้งด้วยการตากแดด 2) ปั่นด้วยน้ำและทำให้แห้งด้วยการอบ 3) ปั่นด้วยน้ำมะพร้าวและทำให้แห้งด้วยการตากแดด 4) ปั่นด้วยน้ำมะพร้าวและทำให้แห้งด้วยการอบ ปรากฏว่าลูกแป้งซึ่งปั่นด้วยน้ำมะพร้าวและทำให้แห้งด้วยการอบ ที่อุณหภูมิ 40° ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในปริมาณเชื้อหลังการอบและเมื่อเก็บในระยะเวลาเท่ากันมากที่สุด และสามารถหมักให้เกิดกรดได้ดีที่สุด (ตารางที่ 9, ภาพที่ 2)

Table 9. Numbers of *Acetobacter* 249-1 in the dry inocula produced by various methods at different storage times

Storage conditions	Preparation ¹ methods	cells/g storage time (weeks)				
		0	3	6	12	24
room temperature	WS	5.95×10^6	50	0	0	0
	WO	6.45×10^7	2.80×10^3	0	0	0
	CS	7.90×10^6	1.52×10^2	0	0	0
	CO	1.10×10^8	1.03×10^4	0	0	0
refrigerated	WS	-	2.90×10^5	1.15×10^5	1.34×10^5	1.16×10^4
	WO	-	6.10×10^5	5.25×10^5	6.75×10^5	3.60×10^4
	CS	-	5.10×10^5	3.40×10^5	1.48×10^5	1.51×10^4
	CO	-	5.35×10^6	5.30×10^5	7.45×10^5	4.70×10^4

¹/ WS : dough mixing with water, sun dry 6-8 hrs

WO : dough mixing with water, oven dry 40°C, 24 hrs

CS : dough mixing with coconut water, sun dry 6-8 hrs

CO : dough mixing with coconut water, oven dry 40°C, 24 hrs

เมื่อนำลูกแป้งซึ่งเตรียมโดยใช้สมุนไพรผสมกรดโปรปิโอนิกซึ่งเก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 6 สัปดาห์ มาเตรียม starter แล้วนำ starter นั้นไปเป็นกล้าเชื้อเพื่อปั่นลูกแป้ง พบว่าลูกแป้งที่ผลิตได้จะมีการเพิ่มปริมาณเซลล์พอ ๆ กับการใช้เชื้อซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ กล่าวคือเมื่อปั่นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อจะเพิ่มขึ้นประมาณ 4 log cycle

การเก็บกล้าเชื้อในรูปลูกแป้งนี้ เชื้อจะมีชีวิตรอดนานและคงไว้ซึ่งประสิทธิภาพมากกว่าเชื้อสดที่

จุลินทรีย์ยังดำเนินการกิจกรรมทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ผลจากการศึกษานี้ทำให้ได้ข้อมูล และกรรมวิธีการผลิตลูกแป้งน้ำส้ม ซึ่งมีได้มีการบันทึกเป็นเอกสารมาก่อน และขาดการถ่ายทอดอย่างต่อเนื่อง นอกจากนั้นยังได้ปรับปรุงกรรมวิธีการผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ซึ่งได้คัดเลือกแล้ว อันจะทำให้ลูกแป้งที่ผลิตได้มีคุณภาพดีและมาตรฐานคงที่มากกว่าการใช้จุลินทรีย์จากธรรมชาติ จึงเป็นที่คาดหวังว่าผลของการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรม การหมักน้ำส้มสายชู โดยเฉพาะอุตสาหกรรมระดับเล็กและระดับหมู่บ้านสหกรณ์ และยังเป็นการสืบทอดเทคโนโลยีที่มีอยู่แล้วแต่โบราณมิให้สูญหายไป

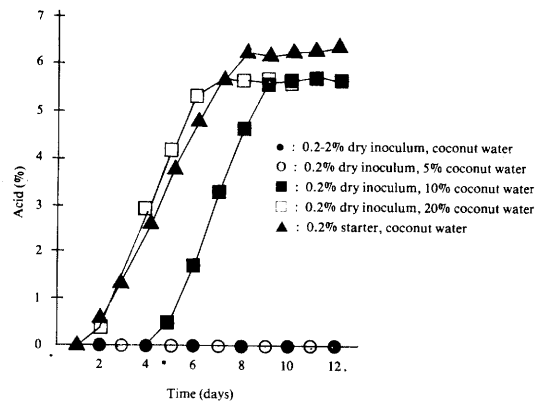


Figure 1. Acid producing efficiency of the inocula using coconut water wine as raw material

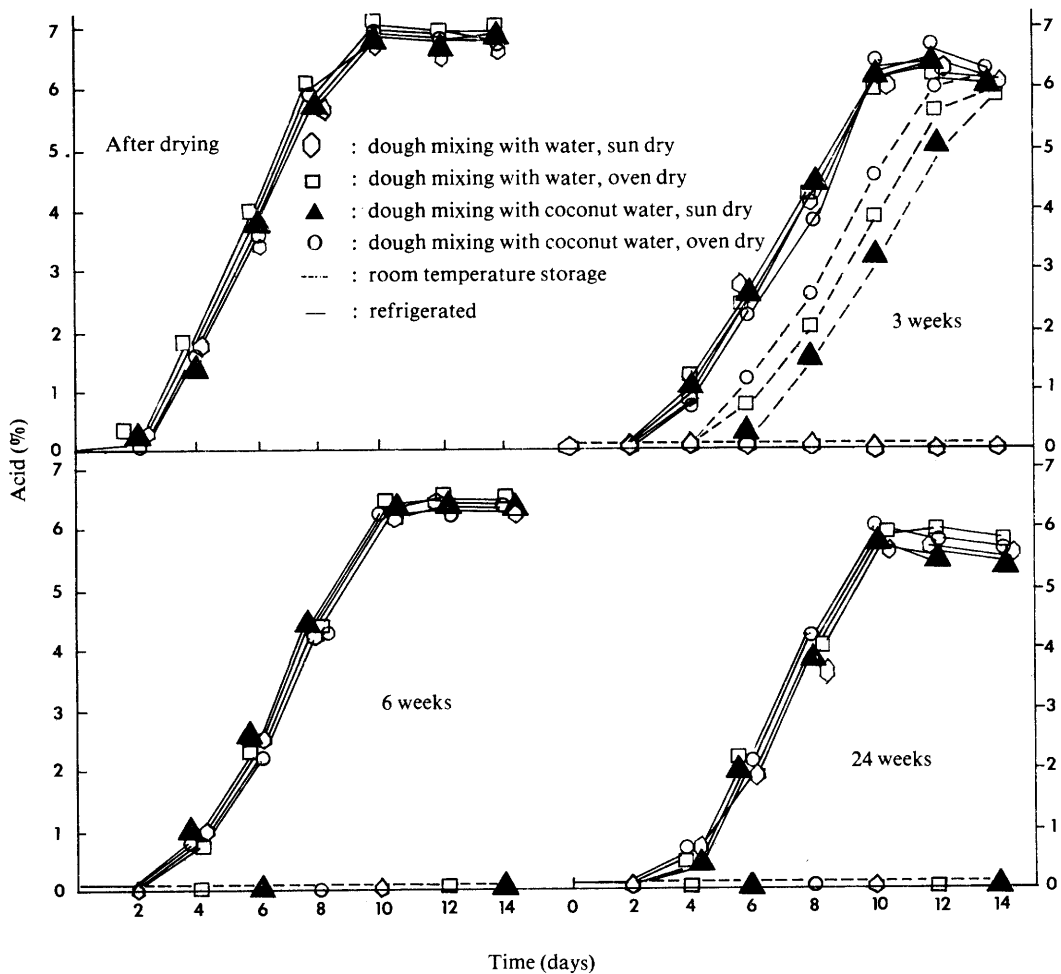


Figure 2. Acid producing efficiency of the dry inocula obtained through various preparation methods at different storage times

เอกสารอ้างอิง

- ขุนกฤษฎา มาวิสิฐ. 2490. การทำสุรา. สามัคคีสาร 3 (5):33-42.
- นภา โล่ห์ทอง. 2515. บทปฏิบัติการวิชาจุลชีววิทยาทางอาหาร. เอกสารประกอบการศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 50 หน้า
- บัญญัติ สุขศรีงาม และนภา โล่ห์ทอง. 2521. ประสิทธิภาพของเครื่องเทศบางชนิดในการยับยั้งจุลินทรีย์เรืองแสงในการประชุมวิชาการ สาขาพืช ครั้งที่ 16, วันที่ 5-8 กุมภาพันธ์ 2521. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- บรรจงจิต มหิทธิเทพ. 2529. การผลิตลูกแป้งน้ำส้มสายชูและอิทธิพลของสมุนไพรต่อจุลินทรีย์ในลูกแป้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- พัชร เลหาคุณรังษี และสมจิตต์ มณีพิระกุล. 2520. อานาจในการต่อต้านจุลินทรีย์ของหอมหัวเล็ก. โครงการพิเศษปริญญาเกษตรศาสตรบัณฑิต. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ
- พิไลวรรณ พงษ์พล. 2523. การศึกษาชีววิทยาของลูกแป้งข้าวหมาก. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ. 49 หน้า
- พุทธรินทร์ วรรณิสสร. 2527. ผลของเครื่องเทศต่อชนิดของจุลินทรีย์ในลูกแป้งข้าวหมาก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- รสสุคนธ์ เหล่าไพบูลย์ และนภา โล่ห์ทอง. 2527. การคัดเลือกเชื้อน้ำส้มสายชูซึ่งเหมาะสมต่อกรรมวิธีการหมักแบบต่าง ๆ. บทคัดย่อ การประชุมวิชาการสาขาวิทยาศาสตร์ ครั้งที่ 22, วันที่ 30 มกราคม-3 กุมภาพันธ์ 2527 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- วรชิน สติณนิมานการ. 2492. การผลิตสุราจากแอลกอฮอล์และข้าว. วิทยาศาสตร์ 3 (7) : 320-324
- สายชล ชีวปรีชา และนภา โล่ห์ทอง. 2517. การใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงและเก็บเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกและกรดน้ำส้ม. รวมเรื่องย่อการประชุมวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยา สาขาพืชครั้งที่ 13 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- Anderson, E.E., W.B. Esselen and A.R. Handleman. 1953. The effect of essential oils on the inhibition and thermal resistance of microorganisms in acid food products. Food Res. 18 : 39-47.
- Kissinger, J.C. and L.L. Zaika. 1978. Effect of major spices in Lebanon bologna an acid production by starter culture organisms. J. Food Prot. 41 (6) : 420-431.
- Lotong, N. 1983. Thai coconut vinegar, pp. 413-414. In K.H. Stinkraus (ed). Handbook of Indigenous Fermented Foods. Vol. 9 Marcel Dekker, Inc., New York.
- 1985. Koji, pp. 237-270. In B.J.B. Wood (ed.). Microbiology of Fermentend Foods Vol. 2. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Maceda, L.M. and M.A. Palo. 1967. A study on an acetic acid forming bacterial isolae and factors influenizing its growth and production of acetic acid or vinegar from alcohol medium. Philippines J. Sci. 96 (2) : 111-128.
- Nickol, G.B. 1979. Vinegar, pp. 155-172. In H.J. Pepple and D. Perlman (eds.). Microbial Technology. Vol. 2. Academic Press, New York.