กรรมวิธีการผลิตกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมักแบบพร้อมใช้

Production Methods of Ready-to-Use Fermented Vinegar Starter Culture

เขมพัษ ตรีสุวรรณ* กนกวรรณ ยอดอินทร์ และ กัญญรัตน์ กัญญาคำ

Khemmapas Treesuwan*, Kanokwan Yodin and Kanyarat Kanyakum

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University

**E-mail: ifrkpt@ku.ac.th Tel: 029428629*

บทคัดย่อ

เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีส่วนช่วยบำรุงและปรับสมดุลของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น ลดความดันโลหิต ลดการสะสมของไขมันในหลอดเลือด ป้องกันการติดเชื้อและป้องกันเชื้อไวรัส ซึ่งในกระบวนการผลิตมีขั้นตอนที่ค่อนข้างซับซ้อนและต้องทำในห้องปฏิบัติการเท่านั้น จึงได้มีการศึกษาและพัฒนากล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมักแบบแห้งที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูเพื่อให้ง่ายต่อการผลิต การขนส่ง และช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตกล้าเชื้อระหว่างแป้งข้าวเจ้า กากสับปะรด รำข้าว และปลายข้าว ศึกษาส่วนผสมที่ช่วยลดการปนเปื้อน ในกระบวนการผลิตกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูแบบแห้ง นอกจากนี้ยังศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมและอายุการเก็บรักษากล้าเชื้อที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการหมักน้ำส้มสายชู โดยใช้เชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง พบว่าปลายข้าว ผสมกับ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และกรดโปรปิโอนิก 0.2 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถลดการปนเปื้อนและเก็บรักษาได้นานถึง 5 สัปดาห์ โดยตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 และ 5 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.08 เปอร์เซ็นต์ และ 4.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกัน ($p < 0.05$)

คำสำคัญ : กล้าเชื้อ น้ำส้มสายชูหมัก อายุการเก็บรักษา

Abstract

Fermented vinegars are popular as healthy drinks due to their high nutritional value and ability to balance the various systems in the body. For example, reduces blood pressure, decreases the risk of cardiovascular disease, and prevents infection and antivirus. However, the fermentation processes are complicated, and the procedures can take place only in the laboratories. Therefore, this study aimed to develop a ready-to-use vinegar starter culture for vinegar fermentation and convenient transportation. The study was conducted to develop a dry starter culture for vinegar fermentation to facilitate production, transportation, and to reduce microbial contamination. Raw materials were compared to the suitability of four substrates (rice flour, pineapple pulp, rice bran, and rice bran) for starter culture production. The additives that could reduce contamination in the production of dry starter culture for vinegar fermentation were also investigated. Moreover, the study investigated the optimum temperature and storage period for starter culture that could affect the efficiency of vinegar fermentation. Acetobacter aceti TISTR 354 was used in a semi-continuous fermentation process. The results showed that rice bran mixed with 95% ethanol and 0.2% propionic acid stored at 4 ℃ could reduce contamination and be stored for up to 5 weeks. From week 1 to 5, the average acetic acid production was 6.08% and 4.50%, respectively, which were significantly different ($p < 0.05$).

Keywords : starter culture, vinegar fermentation, shelf-life

1. บทนำ

การผลิตน้ำส้มสายชูของประเทศไทยตั้งแต่ดั้งเดิมนั้นจะผลิตกันในระดับครัวเรือนและเป็นวิธีการผลิตแบบช้า คือจะเป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยที่น้ำผลไม้จะมีความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่พอสมควรและจะถูกปล่อยให้เกิดการหมักโดยเชื้อยีสต์ที่ปะปนมากับผลไม้ เกิดการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์จากนั้นเชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียที่อยู่ตามธรรมชาติจะไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติกอีกครั้ง (Gullo & Paolo, 2008) วิธีการดังกล่าวจะต้องใช้ระยะเวลาในกระบวนการหมักนานประมาณ 2-3 เดือน ตลอดจนประสิทธิภาพของเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมักและคุณภาพของผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูที่ได้ไม่สม่ำเสมอ กล่าวคือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณกรดอะซิติกสูงไปหรือต่ำไปหรืออาจจะมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นในระหว่างการหมักเป็นผลทำให้กลิ่นรสของผลิตภัฑ์เปลี่ยนไปและไม่ชวนรับประทาน ในการผลิตผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักมีความจำเป็นที่ต้องใช้กล้าเชื้อน้ำส้มสายชูเพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้มีความสม่ำเสมอ ดังนั้นคุณภาพของเชื้อน้ำส้มสายชูที่นำมาใช้จะต้องมีความเหมาะสมในการผลิต เช่น สามารถเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกได้ สามารถสร้างกลิ่นรสที่น่าพอใจให้แก่ผลิตภัณฑ์และมีคุณภาพสม่ำเสมอ มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ในเวลาที่รวดเร็ว ในการเลี้ยงเชื้อที่จะนำมาผลิตกล้าเชื้อจึงมีความสำคัญเนื่องจากจะนำมาทำการขยายให้ได้ปริมาณมาก ๆ (bulk starter) ต้องมีจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เป็นจำนวนมาก ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่อาจก่อให้เกิดโรคหรือทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Escherichia coli*, coliform, ยีสต์หรือรา เป็นต้น และต้องมีกิจกรรมภายใต้กระบวนการหมักที่ดี สิ่งที่สำคัญในการผลิตกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูอันเนื่องมาจากการต่อเชื้อ (sub culture) สามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะและคุณสมบัติของกล้าเชื้อได้ ปัจจุบันการผลิตน้ำส้มสายชูหมักสามารถเลือกใช้กล้าเชื้อชนิดเหลว (liquid starter) ซึ่งเป็นชนิดที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย สามารถเก็บรักษาหรือผลิตในปริมาณที่เพียงพอต่อการใช้งานสำหรับการผลิตแต่ละครั้งได้ ข้อดีของการใช้กล้าเชื้อชนิดนี้คือ สามารถปรับคุณภาพและตรวจสอบได้ก่อนใช้งานทุกครั้งเพื่อให้ได้กลิ่นและรสของผลิตภัณฑ์ที่ดี นอกจากนี้ยังง่ายต่อการนำไปใช้ในกระบวนการหมัก ในขณะที่การใช้กล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมักชนิดเหลวยังมีข้อจำกัดเรื่องของการขนส่งกรณีที่ผู้ประกอบการบางรายมีการสั่งซื้อกล้าเชื้อทางไปรษณีย์ อาจมีการหกเลอะเทอะ ก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนได้ง่าย ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมักที่มีความสามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมักได้ทันทีและง่ายต่อการขนส่ง คือไม่เกิดการหกเลอะเทอะจนเกิดปัญหาการปนเปื้อน ในระหว่างกระบวนการขนส่งจนเกิดการปนเปื้อนได้ ตลอดจนมีการศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ การอยู่รอดของเชื้อน้ำส้มสายชูและความสามารถในการหมักน้ำส้มสายชู เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมักต้นแบบพร้อมถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่เชิงพาณิชย์ได้ต่อไป

เชื้ออะซิติกแอซิดแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 2 จีนัส คือ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* มีคุณสมบัติในการหมักได้กรดน้ำส้ม โดย *Acetobacter* สามารถออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคสในการสร้างกรดน้ำส้ม ในขณะที่ *Gluconobacter* มีความสามารถในการออกซิไดส์น้ำตาลกลูโคสได้ดีกว่าแอลกอฮอล์ อย่างไรก็ตามพบว่า *Acetobacter aceti* เป็นแบคทีเรียกลุ่มอะซิติกแอซิดที่นิยมนำมาใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูมากที่สุดในอุตสาหกรรม แต่มีรายงานการนำ *Gluconobacter oxydans* subsp. *Sphaerricus* มาใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูในกรณีที่วัตถุดิบเหล่านั้นมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสในปริมาณสูง เนื่องจากเชื้อ *Gluconobacter oxydans* สามารถใช้กลูโคสได้ดีกว่า *Acetobacter aceti* แบคทีเรีย *Acetobacter* sp. เจริญได้ดีที่พีเอชค่อนข้างต่ำประมาณ 4.0-4.5 และสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่พีเอช 5.4-6.3 ในขณะที่พีเอชที่ 7-8 มีการเจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Lotong, 1991) แบคทีเรีย *Acetobacter* sp. จะถูกทำลายเมื่อการหมักเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จนกระทั่งปริมาณแอลกอฮอล์ในกระบวนการหมักถูกเปลี่ยนไปจนหมดซึ่งมีผลในการทำลายเซลล์ของ *Acetobacter* sp. เป็นผลจากความเข้มข้นของกรดแอซิติกในผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมัก (Krusong & Pongsawatmanit, 1989) การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่จะนำมาผลิตเป็นกล้าเชื้อควรมีการคัดเลือกเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ดี ซึ่งควรมีคุณสมบัติโดยทั่วไป (Lotong, 1991) คือ เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการหมัก ให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่น รส และเนื้อสัมผัสที่ดีและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคสามารถที่จะยับยั้งการเจริญของ

จุลินทรีย์ปนเปื้อนทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี สามารถเจริญและดำเนินกิจกรรมการหมักได้ดีในช่วง พีเอช กว้างและอุณหภูมิกว้าง เป็นสายพันธุ์ที่มีความถาวรทางพันธุกรรม ซึ่งในขั้นตอนของการผลิตกล้าเชื้อมีความจำเป็นต้องตรวจสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์อย่างสม่ำเสมอและควรเป็นสายพันธุ์ที่มีอายุการอยู่รอดนาน หรือมีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้อย่างดี

กล้าเชื้อที่ผลิตเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมักนั้นมีวิธีการผลิตที่แตกต่างกัน ซึ่งจำเป็นต้องมีคุณสมบัติ (Lotong, 1991) คือ อยู่ในรูปแบบที่ใช้ง่ายและเหมาะสมกับกิจกรรมวิธีการหมักแต่ละชนิด ควรมีอายุในการเก็บรักษานานพอสมควร โดยที่มีจุลินทรีย์ที่ยังมีประสิทธิภาพมากพอที่จะดำเนินกิจกรรมการหมักวัสดุที่ใช้เพาะเลี้ยงและผสมในกล้าเชื้อต้องไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นรสและคุณสมบัติอื่น ๆ ของอาหารหมัก กล้าเชื้อที่ผลิตขายเป็นอุตสาหกรรมจะต้องอยู่ในรูปที่ง่ายต่อการขนส่ง

กล้าเชื้อน้ำส้มสายชูในสมัยก่อนจะนิยมใช้เป็นลูกแป้งน้ำส้มสายชู และนอกจากนี้ลูกแป้งยังใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตเหล้า สาโท ข้าวหมาก ซึ่งลูกแป้งที่ดีจะโปร่งเบา สีขาวนวล ไม่มีรอยแตกร้าว ก้อนแป้งเป็นรูพรุน ที่เกิดจากการฟูของแป้งขณะบ่ม เมื่อขยี้จะยุ่ยเป็นผงละเอียด ไม่มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว โดยลูกแป้งจะเป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการผสมเชื้อรา ยีสต์ แบคทีเรีย ที่หมักแล้วให้ผลผลิตที่แตกต่างกันแต่การผลิตลูกแป้งน้ำส้มสายชูส่วนใหญ่มักใช้เชื้อ *Acetobacter* spp. การผลิตลูกแป้งเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านที่มีการผสมสมุนไพร เครื่องเทศ เช่น ข่า กระเทียม พริกไทย ดอกจันทน์ ลูกจันทน์ ซึ่งสมุนไพรเครื่องเทศเหล่านี้จะช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Lotong, 1991) และ Mahinthronthep (1986) พบว่าส่วนผสมของสมุนไพรที่เหมาะสมที่สุดในการปั้นลูกแป้งน้ำส้มสายชู ได้แก่ พริกไทยขาว และดอกจันทน์ อย่างละ 3 เปอร์เซ็นต์ และลูกจันทน์ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนผสมของสมุนไพรเหล่านี้จะไม่ยับยั้งการเจริญ *Acetobacter* spp. แต่จะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* spp. และ *Aspergillus niger* ได้ดีกว่าส่วนผสมอื่น ๆ การเติมกรดโปรปิโอนิกจะสามารถช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นได้ โดยกรรมวิธีการทำลูกแป้งในขั้นแรกจะต้องคัดเลือกเชื้อที่สามารถทนกระบวนการกรรมวิธีการผลิตที่มีอุณหภูมิสูง อายุการอยู่รอดสูงและสามารถทำให้มีอายุการเก็บได้นาน จากการศึกษาเปรียบเทียบการทำลูกแป้งให้แห้งโดยการตากแห้งและอบในตู้อบอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน จะพบว่าการลดความชื้นของลูกแป้งจาก 27.4 เปอร์เซ็นต์ ลงเหลือประมาณ 10-11 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นระดับความชื้นที่หยุดกิจกรรมของจุลินทรีย์ และจะต้องตากแดดประมาณ 6-8 ชั่วโมง โดยจุลินทรีย์จะลดลงเหลือประมาณ 10^7 cfu/g ซึ่งน้อยกว่าการอบที่ 45 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ประมาณหนึ่งเท่าตัว และน้อยกว่าการอบที่ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ประมาณ 10 เท่า (Lotong, 1991) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับกล้าเชื้อที่ใช้ในการหมักไวน์ข้าว ที่ระบุว่าสมุนไพรมีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียและยังช่วยลดการปนเปื้อนในกระบวนการหมักไวน์ที่อาจก่อให้เกิดการเน่าเสียได้ โดยพบว่ายี่หร่าและกานพลู สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญของยีสต์ โดยเฉพาะยี่หร่า จะช่วยกระตุ้นให้เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น (Dung *et al*., 2005)

อายุการเก็บลูกแป้ง ลูกแป้งที่เก็บไว้ได้นานจะต้องแห้ง จึงจะสามารถช่วยป้องกันการเจริญของเชื้อราปนเปื้อนบางชนิด และการเก็บลูกแป้งในตู้เย็นในภาชนะปิดสนิทจะลดปัญหาการถูกทำลายโดยแมลงและทำให้จุลินทรีย์ในลูกแป้งลดจำนวนช้าลง จากการศึกษาการมีชีวิตรอดของ *Acetobacter* spp. ในลูกแป้ง พบว่าลูกแป้งที่ปั้นโดยใช้ส่วนผสมของสมุนไพรที่ไม่เติมกรดโปรปิโอนิกจะเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 12 เดือน โดยปริมาณเชื้อลดลงจาก 6.2×10^7 cfu/g ในลูกแป้งใหม่ เหลือ 5.4×10^2 cfu/g ในขณะที่ลูกแป้งที่ผลิตโดยเติมกรดโปรปิโอนิกลงในส่วนผสมสมุนไพรจะเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นานเพียง 3 สัปดาห์ แต่จะเก็บในตู้เย็นได้นานถึง 24 เดือน โดยเชื้อจะลดลงจาก 1.1×10^8 cfu/g เหลือเพียง 4.7×10^4 cfu/g และลูกแป้งที่มีจุลินทรีย์เหลืออยู่นี้ จะมีประสิทธิภาพการสร้างกรดต่ำกว่าลูกแป้งใหม่เพียงเล็กน้อย ดังนั้นการเติมกรดโปรปิโอนิกร่วมกับสมุนไพรในการเตรียมลูกแป้ง จึงมีทั้งผลดีและผลเสีย คือ จะสามารถปั้นลูกแป้งได้โดยไม่ต้องระวังการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ส่วนการเตรียมลูกแป้งโดยใช้สมุนไพรนั้นจะต้องระวังเรื่องการปนเปื้อน แต่จะสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน เหมาะต่อการนำไปใช้ในแหล่งที่ไม่สามารถเก็บในตู้เย็นได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้น้ำมะพร้าวแทนน้ำ และ การอบในตู้แทนการตากแดดมีผลให้ลูกแป้งมีอายุการเก็บนานขึ้น (Lotong, 1991)

นอกจากนี้ยังพบว่าการเก็บรักษากล้าเชื้อที่ใช้ในการหมักไวน์โดยการเก็บรักษาในถุง polypropylene ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีการดูดความชื้นจะสามารถคงกิจกรรมการทำงานของจุลินทรีย์ในกล้าเชื้อแบบแห้งได้ดีกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสทำให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์สุทธิมากกว่า ซึ่งในระหว่างช่วงการเก็บรักษา อายุการเก็บจะเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อกิจกรรมการทำงานของจุลินทรีย์ (Dung *et al*., 2005).

ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนาการผลิตกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูแบบแห้งสำหรับกระบวนการน้ำส้มสายชู ซึ่งจะช่วยให้มีความสะดวกต่อการนำไปใช้ ง่ายต่อขั้นตอนการขนส่ง ช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อันก่อให้เกิดการเน่าเสียตลอดจนยืดอายุการเก็บรักษาได้ยาวนานขึ้น โดยวัตถุดิบที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ได้แก่ แป้งข้าวเจ้า กากสับปะรด รำข้าว และปลายข้าว โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเชื้อเริ่มต้นและการคัดเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับนำไปเป็นผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักที่มีคุณภาพ

2. วิธีการทดลอง

2.1 การผลิตกล้าเชื้อ

ในกระบวนการผลิตกล้าเชื้อจะเปรียบเทียบทั้งหมด 4 วัตถุดิบ คือ แป้งข้าวเจ้า กากสับปะรด รำข้าว และปลายข้าว ซึ่งแต่ละวัตถุดิบจะมีกระบวนการฆ่าเชื้อที่แตกต่างกันตามลักษณะทางกายภาพ ก่อนจะเข้าสู่กระบวนการผสมเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 และใส่ส่วนผสมตามสูตรต่าง ๆ เพื่อยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในขั้นตอนการผลิตและการเก็บรักษา ดังนี้

2.1.1 นำแป้งข้าวเจ้าและรำข้าว ปริมาณ 200 กรัม ไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

2.1.2 นำกากสับปะรด ปริมาณ 200 กรัม ไปล้างน้ำสะอาดและแช่ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เพื่อย่อยปริมาณน้ำตาลและฆ่าเชื้อ

2.1.3 นำปลายข้าว ปริมาณ 200 กรัม ล้างให้สะอาดแล้วฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) หลังจากนั้นเติมน้ำในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส แล้วเติมเอนไซม์ Termamyl SC 0.01 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักปลายข้าว และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์ Dextrozyme 0.1 เปอร์เซ็นต์ คนให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะวัดค่าความหวานได้ 30 องศาบริกซ์ขึ้นไป นำไปเติมน้ำในอัตราส่วน 1:2 (ปลายข้าว: น้ำ) ต้มให้เดือดและนำไปกรองน้ำออกในขณะที่ร้อน ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

นำวัตถุดิบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ไปทดลองผสมกับส่วนประกอบ 2 สูตร คือ

สูตรที่ 1 ผสมกับเครื่องเทศ ได้แก่ พริกไทยขาว ลูกจันทน์ ดอกจันทน์ และผสมกับ *Acetobacter aceti* TISTR 354

สูตรที่ 2 ผสมกับ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ กรดโปรปิโอนิค 0.2 เปอร์เซ็นต์และเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354

นำไปตากในตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air oven) ให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1-2 วัน แล้วบรรจุกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมักแบบแห้งในถุงอลูมิเนียมฟอยล์

2.2 การหมักน้ำส้มสายชูหมัก

2.2.1 การหมักน้ำไวน์จากน้ำสับปะรด

ทำการหมักไวน์ โดยใช้สับปะรด ปอกเปลือกหั่นเป็นชิ้นแล้วนำเข้าเครื่องปั่นแยกกาก และนำน้ำสับปะรดกรองด้วยผ้าขาวบาง วัดปริมาณน้ำตาลของน้ำสับปะรดด้วย refractometer คำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลที่ต้องการคือ 20 องศาบริกซ์ (มาลัย, 2556) โดยใช้สูตร Pearson square และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นพักไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องทำการถ่ายเชื้อ *Saccharomyces cereviseae* var. burgundy และ *Saccharomyces cereviseae* var. montache ลงในน้ำสับปะรด แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ หรือ

1 เดือน โดยประมาณ สังเกตความเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาการหมัก ตรวจสอบสี กลิ่น รวมทั้งวัดปริมาณแอลกอฮอล์ในแต่ละสัปดาห์ เมื่อปฏิกิริยาการหมักสิ้นสุดลง ทำการถ่ายกรองตะกอนด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ววิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่องอีบูลลิโอมิเตอร์ (Ebulliometer)

2.2.2 การหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์จากน้ำสับปะรด

การหมักน้ำส้มสายชูหมักเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตกรดแอซิติกของเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ที่อยู่ในรูปกล้าเชื้อแบบแห้ง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 1 เดือน เริ่มจากเตรียมน้ำสับปะรด ที่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อแล้ว (4-5 องศาบริกซ์ โดยประมาณ) ปริมาตร 700 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไวน์สับปะรด (10 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ โดยประมาณ) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร และ กล้าเชื้อน้ำส้มสายชูแบบแห้ง 100 กรัม ผสมไวน์สับปะรดน้ำสับปะรด และกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูแบบแห้ง ที่เตรียมไว้ลงในถาดสแตนเลสที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วคลุมด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรูเพื่อระบายอากาศ หลังจากนั้นที่ 48 ชั่วโมง ของการหมักเติมไวน์สับปะรด 1000 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ โดยประมาณ) โดยหมักทั้งสิ้นระยะเวลา 7 วัน (Muangnoi *et al*., 2013)

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตกล้าเชื้อแบบแห้ง

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ที่ทำการนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ คือ กระบวนการหลังจากผสมเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354, กระบวนการหลังจากผสมเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง และกระบวนการหลังจากนำกล้าเชื้อที่ได้ไปตากแห้ง ด้วยอาหาร MRS agar บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

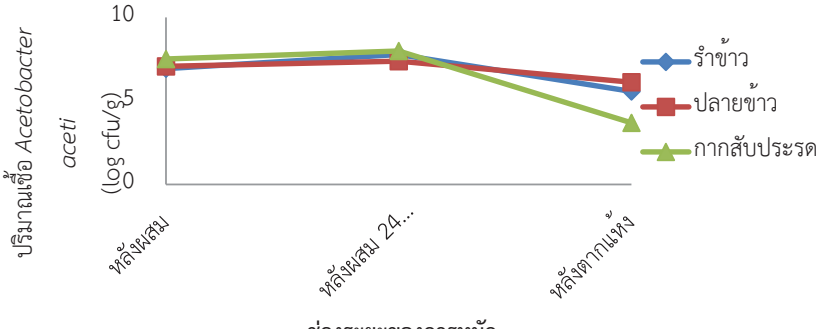
วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan’s new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95.0 เปอร์เซ็นต์ ($p< 0.05$) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows 16.0 ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 การศึกษาวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมัก

กระบวนการเปรียบเทียบวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกล้าเชื้อจะมีอัตราส่วนผสม 2 สูตร ที่ทำการเปรียบเทียบในการลดความปนเปื้อนจากกระบวนการผลิต จากผลการทดลองพบว่า สูตรที่ 1 ไม่สามารถยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างขั้นตอนการผลิต และในขั้นตอนการตากแห้ง ในวัตถุดิบทั้ง 4 ชนิด คือ แป้งข้าวเจ้า กากสับปะรด รำข้าว และปลายข้าว โดยพบการปนเปื้อนของเชื้อราจำนวนมาก แตกต่างจากงานวิจัยของ Mahinthronthep, (1986) ที่พบว่าส่วนผสมสมุนไพร พริกไทยขาว และดอกจันทน์ อย่างละ 3 เปอร์เซ็นต์ และลูกจันทน์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* spp. และ *A. niger* ได้ดี โดยที่ส่วนผสมของสมุนไพรเหล่านี้จะไม่ยับยั้งการเจริญ *Acetobacter* spp. ทั้งนี้เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกล้าเชื้อที่มีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกัน จึงทำให้ส่วนผสมสมุนไพรไม่สามารถยับยั้งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในวัตถุดิบได้ ซึ่งในการทดลองการผลิตกล้าเชื้อโดยใช้อัตราส่วนผสมจากสูตรที่ 2 นั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสูตรที่ 1 โดยเฉพาะกล้าเชื้อที่ผลิตจาก ปลายข้าว พบการปนเปื้อนน้อยที่สุดและมีการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์น้อยที่สุด เมื่อผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ในกระบวนการผลิตรองลงมาคือ รำข้าว กากสับปะรด และแป้งข้าวเจ้า ตามลำดับ (ภาพที่ 1) ต่างจากงานวิจัยของ Laopaiboon and Lotong (1988) ที่ศึกษากรรมวิธีในการผลิตเชื้อน้ำส้มสายชูในรูปผง พบว่า การผลิตโดยบรรจุรำละเอียด 10 กรัม ลงในถุงพลาสติกชนิดทนร้อน นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเติมน้ำมะพร้าวปลอดเชื้อที่มีเอทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ และกล้าเชื้อ *Acetobacter* sp. 249×10^3 cfu/g บ่มที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง ทำการลดความชื้นโดยการเติมรำละเอียดที่นึ่งฆ่าเชื้อผสมกรดโปรปิโอนิกจนได้ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ของส่วนผสม เชื้อผงที่ผลิตได้จะมีความชื้น 17-19 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 6 เดือน ปริมาณเซลล์จะลดลงเพียงประมาณ 1 log cfu/g

การเก็บเชื้อที่อุณหภูมิห้องที่ 30 องศาเซลเซียส 6 สัปดาห์ และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 4 สัปดาห์ เชื้อจะลดลงประมาณ 2 log cfu/g ส่วนเชื้อผงที่ผลิตจากแป้งข้าวเจ้าสามารถเก็บในอุณหภูมิห้องได้นานถึง 8 สัปดาห์ โดยพบการปนเปื้อนของจุลินทรีอื่นต่ำมาก แต่ในการทดลองนี้พบว่า รำข้าวมีการปนเปื้อนของเชื้อราในปริมาณมาก โดยพบการปนเปื้อนตั้งแต่กระบวนการผลิต และกระบวนการตากแห้ง เนื่องจากมีอัตราส่วนผสมที่ช่วยลดการปนเปื้อน และระยะเวลาในการบ่มกล้าเชื้อที่แตกต่างกัน นอกจากนี้วัตถุดิบที่ผลิตจากแป้งข้าวเจ้าจะพบการปนเปื้อนมากที่สุด เพราะแป้งข้าวเจ้า เป็นวัตถุดิบที่มีเนื้อสัมผัสที่ละเอียด และง่ายต่อการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ จึงส่งผลให้ไม่สามารถบันทึกผลการทดลอง หรือ นับปริมาณเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ได้

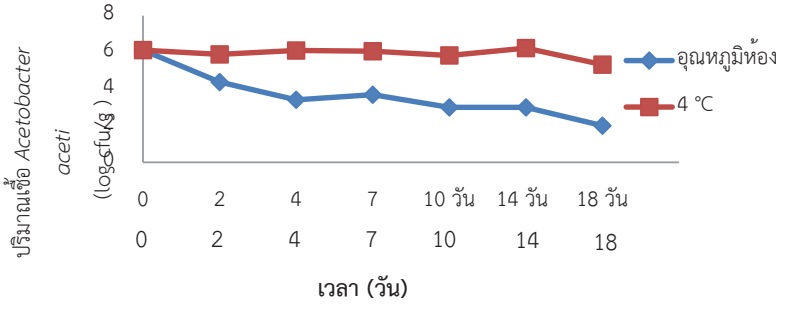


ภาพที่ 1 ปริมาณเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ที่มีการเจริญเติบโตในแต่ละช่วงการผลิตของปลายข้าว รำข้าว กากสับปะรด โดยใช้อัตราส่วนผสมในสูตร 2

จากภาพที่ 1 จะเห็นว่า เมื่อผ่านกระบวนการผลิตทั้งสามขั้นตอน ปลายข้าว จะมีปริมาณเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ลดลงน้อยที่สุด คือ 6.12 log cfu/g ต่างจาก กากสับปะรด ที่มีปริมาณเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ลดลงมากสุดถึง 3.69 log cfu/g เนื่องมาจาก ปลายข้าว เมื่อผ่านกระบวนการย่อยแป้งให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลแล้ว จะมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จำพวกแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งวิตามิน และแหล่งเกลือแร่ จึงเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตกล้าเชื้อมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุดิบอื่น ๆ

3.2 การศึกษาอายุการเก็บรักษาและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษากล้าเชื้อน้ำส้มสายชูแบบแห้ง

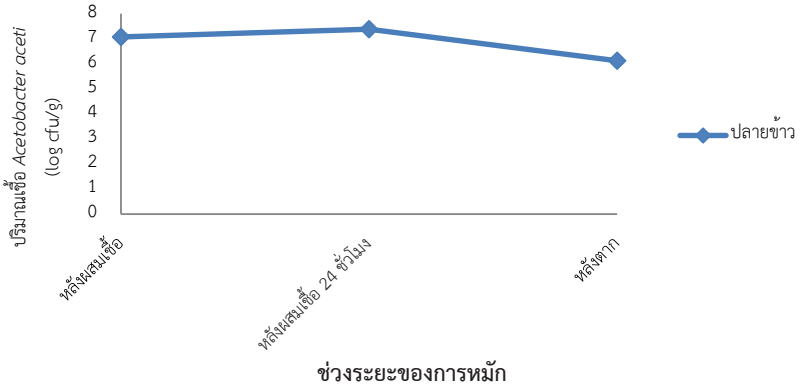
ในกระบวนการศึกษาอายุการเก็บรักษากล้าเชื้อน้ำส้มสายชูแบบแห้ง จะทำการเปรียบเทียบกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูแบบแห้งที่ผลิตจากปลายข้าว ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยจะมีระยะเวลาที่ทำการศึกษาทั้งหมด 18 วัน



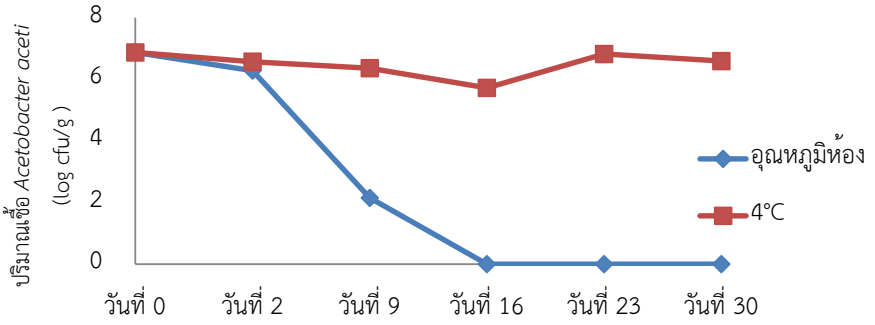
ภาพที่ 2 ปริมาณเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ที่มีการเจริญเติบโตในแต่ละช่วงเวลาของปลายข้าวที่อุณหภูมิห้องและที่ 4 องศาเซลเซียส

จากภาพที่ 2 พบว่า ปลายข้าว ที่มีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีปริมาณเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ลดลงเพียงเล็กน้อย คือ 2.14 × 10^5 cfu/g ซึ่งต่างจากการเก็บที่อุณหภูมิห้อง ที่มีปริมาณเชื้อลดลงถึงปริมาณ 10^2 cfu/g ในระยะเวลา 18 วัน เนื่องจากการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยเชื้อจะปรับตัวและเข้าสู่ระยะ stationary phase ทำให้มีปริมาณเชื้อคงที่ สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Mahinthronthep *et al*., 1987) จากการศึกษาการมีชีวิตรอดของ *Acetobacter* spp. ในลูกแป้งที่เตรียมด้วยเชื้อบริสุทธิ์ พบว่าลูกแป้งที่ใช้โดยใช้ส่วนผสมของสมุนไพรที่ไม่เติมกรดโปรปิโอนิกจะเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 12 เดือน โดยปริมาณเชื้อลดลงจาก 6.2 x 10^7 cfu/g ในลูกแป้งใหม่ เหลือ 5.2 x 10^2 cfu/g ในขณะที่ลูกแป้งที่ผลิตโดยเติมกรดโปรปิโอนิกลงในส่วนผสมสมุนไพรจะเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นานเพียง 3 สัปดาห์ แต่จะเก็บในตู้เย็นได้นานถึง 24 เดือน โดยเชื้อจะลดลงจาก 1.1 x 10^8 cfu/g เหลือ 4.7 x 10^4 cfu/g และลูกแป้งที่ยังมีจุลินทรีย์เหลืออยู่ จะมีประสิทธิภาพการสร้างกรดต่ำกว่าลูกแป้งใหม่เพียงเล็กน้อย ดังนั้นการใช้กรดโปรปิโอนิกร่วมกับสมุนไพรในการเตรียมลูกแป้ง จะมีทั้งผลดีและผลเสียคือ การเติมกรดโปรปิโอนิกจะทำให้สามารถปั้นลูกแป้งได้ โดยไม่ต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ส่วนการเตรียมลูกแป้งโดยใช้เฉพาะสมุนไพรนั้น ยังจำเป็นต้องระมัดระวังเรื่องการปนเปื้อน นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้น้ำมะพร้าวแทนน้ำและการอบในตู้อบแทนการตากแดดมีผลให้ลูกแป้งมีอายุการเก็บนานขึ้น นอกจากนี้ในกระบวนการเก็บรักษาปลายข้าว ที่อุณหภูมิห้อง จะมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นโดยเฉลี่ย 6.05 เปอร์เซ็นต์ และการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นโดยเฉลี่ย 5.37 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Mahinthronthep *et al*., 1987) ที่ศึกษาเปรียบเทียบการทำให้ลูกแป้งแห้งโดยตากแดด และอบในตู้อบอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน พบว่า การลดความชื้นของลูกแป้งจาก 27.4 เปอร์เซ็นต์ลงให้เหลือประมาณ 10-11 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับความชื้นที่หยุดกิจกรรมของจุลินทรีย์ จะต้องตากแดดประมาณ 6-8 ชั่วโมง โดยจุลินทรีย์จะลดลงเหลือปริมาณ 10^7 cfu/g ซึ่งน้อยกว่าการอบที่ 45 องศาเซลเซียส ประมาณเท่าตัว และน้อยกว่าการอบที่ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ประมาณ 10 เท่า โดยลูกแป้งเชื้อบริสุทธิ์ที่ผลิตได้ เมื่อใช้เป็นกล้าเชื้อด้วยปริมาณ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในวัสดุหมักที่มีแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ จะหมักได้น้ำส้มสายชูที่มีกรดเข้มข้น 6-7 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองซ้ำโดยใช้กล้าเชื้อแบบแห้งที่ผลิตจากปลายข้าว เพื่อศึกษาระยะเวลาในการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น พบว่า มีการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์เพียงเล็กน้อยตั้งแต่กระบวนการผลิตทั้ง 3 ขั้นตอน คือ การผสมเชื้อ หลังผสมเชื้อ 24 ชั่วโมง หลังตาก และกระบวนการเก็บรักษา โดยมีปริมาณเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ถึง 6.59±0.07 log cfu/ml เมื่อเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 30 วัน ซึ่งเป็นปริมาณเชื้อที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักน้ำส้มสายชู (ภาพที่ 3 และ 4)



ภาพที่ 3 ปริมาณเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ที่มีการเจริญเติบโตในแต่ละช่วงการผลิตของปลายข้าว



ภาพที่ 4 ปริมาณเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ที่มีการเจริญเติบโตในแต่ละช่วงเวลาของปลายข้าว ที่อุณหภูมิห้องและที่ 4 องศาเซลเซียส

3.3 ปริมาณการผลิตกรดแอซิติกที่ได้จากการหมักน้ำส้มสายชูโดยใช้กล้าเชื้อแบบแห้ง

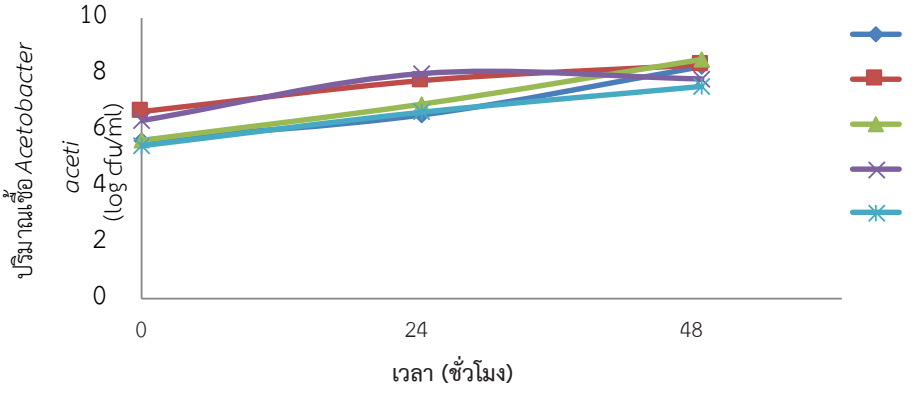
จากผลการทดลอง การหมักน้ำส้มสายชูโดยใช้กล้าเชื้อแบบแห้ง ที่มีอายุการเก็บรักษาแตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์ เพื่อดูประสิทธิภาพการผลิตกรดแอซิติกของเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ที่อยู่ในรูปกล้าเชื้อแบบแห้ง ศึกษาเป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์พบว่าสัปดาห์ที่ 1 ถึง สัปดาห์ที่ 4 มีปริมาณเปอร์เซ็นต์กรดแอซิติกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และในสัปดาห์ที่ 5 ปริมาณเปอร์เซ็นต์กรดแอซิติกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เป็นผลมาจากช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา ทำให้มีการลดลงของปริมาณเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 จึงเป็นผลให้มีความสามารถในการผลิตกรดแอซิติกได้น้อยลง (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับงานวิจัยของ เขมพัษ และคณะ (2555) ที่ทำการศึกษาการผลิตกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมักชนิดเหลวเพื่อใช้ในการทำน้ำส้มสายชู โดยพบว่า กล้าเชื้อน้ำส้มสายชูชนิดเหลวอายุการเก็บรักษา 0 สัปดาห์ (48 ชั่วโมงหลังจากผสมเชื้อน้ำส้ม) สามารถหมักน้ำส้มสายชูด้วยกล้าเชื้อ สูตรที่ 1 และ 2 ในวันที่ 5 ได้เพียง 8.6 และ 7.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกล้าเชื้อน้ำส้มสายชนิดเหลวที่มีอายุการเก็บรักษาในสัปดาห์ที่ 3-8 ยังคงสามารถหมักและผลิตกรดแอซิติกได้ดี แต่เมื่อเก็บรักษากล้าเชื้อน้ำส้มสายชูชนิดเหลวเป็นเวลานาน 10 สัปดาห์ พบว่าปริมาณลดลง 3.3×10^4 และ 2.1×10^4 cfu/ml ซึ่งเป็นผลทำให้ใช้ระยะเวลามากกว่า 48 ชั่วโมงในการผลิต Starter ก่อนจะนำมาหมักน้ำส้มสายชู ทั้งนี้เนื่องจากในกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูชนิดเหลวอาจมีปริมาณเซลล์น้อย เป็นผลมาจากสารอาหารอาจมีในปริมาณไม่เพียงพอกับการใช้สำหรับกระบวนการดำรงค์ชีวิตของเชื้อ ประกอบกับเชื้อจุลินทรีย์มีอายุค่อนข้างนานอาจมีการผลิตสารที่เป็นพิษกับเซลล์เอง จึงมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์ลดปริมาณลงได้

ตารางที่ 1 ตารางการหมักน้ำส้มสายชูโดยใช้กล้าเชื้อแบบแห้ง ที่มีอายุการเก็บรักษาแตกต่างกัน ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 5 ในช่วงเวลา 7 วัน

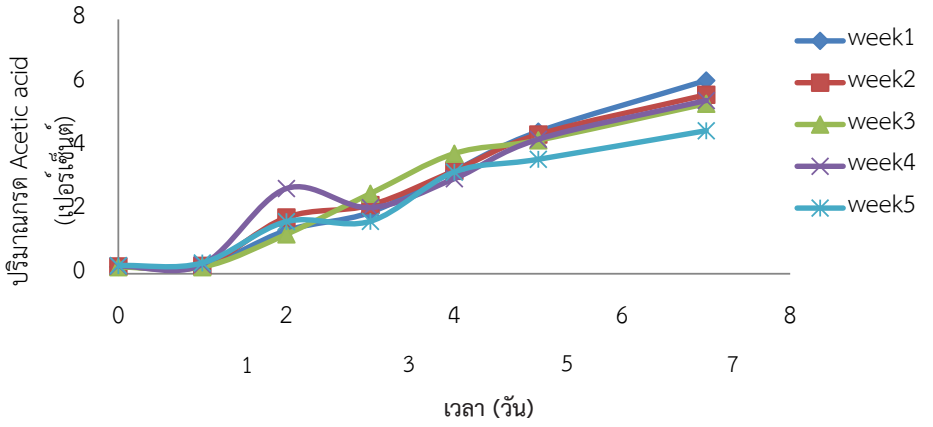
ระยะเวลาการเก็บกล้าเชื้อแบบแห้ง (week)	ระยะเริ่มต้นของการหมัก		ระยะสุดท้ายของการหมัก
	ปริมาณเชื้อ *A. aceti* (log cfu/ml)	ปริมาณกรดทั้งหมด (% กรดอะซิติก)	ปริมาณกรดทั้งหมด (% กรดอะซิติก)
1	$6.57^{c} \pm 0.02$	$0.22^{ab} \pm 0.00$	$6.08^{b} \pm 0.04$
2	$6.36^{b} \pm 0.05$	$0.23^{b} \pm 0.07$	$5.63^{b} \pm 0.74$
3	$5.72^{a} \pm 0.05$	$0.21^{a} \pm 0.00$	$5.35^{b} \pm 0.28$
4	$6.82^{d} \pm 0.06$	$0.24^{c} \pm 0.00$	$5.45^{b} \pm 0.42$
5	$6.59^{c} \pm 0.07$	$0.26^{b} \pm 0.01$	$3.60^{a} \pm 0.21$

หมายเหตุ ตัวเลขค่าเฉลี่ย (Mean ± SD) ในคอลัมน์เดียวกันกำกับด้วยตัวอักษรต่างชนิดกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความต่างแบบ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากภาพที่ 5 ช่วง 0, 24 และ48 ชั่วโมง ของการหมักน้ำส้มสายชู จะมีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่เพิ่มสูงขึ้น ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึง สัปดาห์ที่ 5 แสดงถึง การเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการหมักก่อนการเติมไวน์สับปะรดซึ่งจะส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแอซิติกได้สูงขึ้น เช่นเดียวกันกับภาพที่ 6 ที่เริ่มมีการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์กรดแอซิติกในช่วงวันที่ 0, 1 และ 2 ของการหมักน้ำส้มสายชู ขณะที่มีการเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่สูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ontoum *et al*., (2012) ที่ทำการศึกษาการผลิตกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมักชนิดเหลวเพื่อใช้ในการทำน้ำส้มสายชู โดยพบว่ามีสูตรกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมักชนิดเหลวจำนวน 2 สูตร ที่สามารถทำให้เชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 มีการเจริญเติบโตและสร้างกรดได้ปริมาณสูง คือ กล้าเชื้อที่มีปริมาณความหวานจากน้ำสับปะรดเข้มข้น 1 องศาบริกซ์ ผสมกับ แอลกอฮอล์ 3 เปอร์เซ็นต์ เชื้อน้ำส้มมีการเจริญเติบโตเท่ากับ 8.28 log cfu/ml และผลิตกรดแอซิติกได้เท่ากับ 1.29 เปอร์เซ็นต์ และสูตรที่มีปริมาณความหวานจากน้ำสับปะรดเข้มข้น 5 องศาบริกซ์ ผสมกับแอลกอฮอล์ 3 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมีการเจริญเติบโตเท่ากับ 7.92 log cfu/ml เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งผลการศึกษาปริมาณการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตกรดได้ในปริมาณสูงนั้นสามารถเป็นตัวชี้วัดได้ว่า สูตรกล้าเชื้อชนิดเหลวนั้นมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับนำไปหมักน้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพดีได้ โดยเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการหมักน้ำส้มสายชูโดยใช้กล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมักชนิดแห้ง และกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมักชนิดเหลว พบว่ากล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมักชนิดเหลวสามารถหมักน้ำส้มสายชูและผลิตกรดแอซิตกได้สูงกว่ากล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมักชนิดแห้ง เนื่องจากสูตรกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูชนิดเหลว มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่มากเพียงพอและมีความสามารถในการผลิตกรดได้สูงเมื่อนำไปหมักน้ำส้มสายชู นอกจากนี้ยังมีปริมาณสารอาหารที่เพียงพอกับการเจริญของเชื้อได้ในระยะเวลาที่ไม่สั้นจนเกินไป แต่อย่างไรก็ตามกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมักชนิดแห้ง ก็ยังสามารถผลิตกรดแอซิติกได้ในปริมาณที่เหมาะสม สะดวกต่อในการนำไปใช้งาน ง่ายต่อกระบวนการขนส่ง และช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตได้



ภาพที่ 5 ปริมาณเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ของกล้าเชื้อแบบแห้งที่มีอายุการเก็บรักษาแตกต่างกันตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 5 หลังจากหมัก 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 6 เปอร์เซ็นต์การผลิตกรดอะซิติกของกล้าเชื้อแบบแห้ง ที่มีอายุการเก็บรักษาแตกต่างกัน ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 5 ในช่วงเวลา 7 วัน

จากการศึกษาวิธีการผลิตกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูที่มีความเหมาะสมกับนำไปผลิตเป็นน้ำส้มสายชูหมักนั้น คุณสมบัติของกล้าเชื้อควรมีปริมาณของเชื้อที่มากเพียงพอและมีความสารมารถในการผลิตกรดได้สูงเมื่อนำไปหมักน้ำส้มสายชู ดังนั้นสูตรของกล้าเชื้อจึงจำเป็นต้องมีสารอาหารในปริมาณที่เพียงพอสำหรับการเจริญของเชื้อได้ในระยะเวลาที่ไม่สั้นจนเกินไป จากผลการทดลองในขั้นต้นแสดงให้เห็นว่ากล้าเชื้อที่ผลิตจากปลายข้าวหักโดยการเก็บรักษาที่อุณภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีความสามารถนำมาเป็นกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูแบบแห้งได้ แต่อย่างไรก็ดีควรที่จะมีการศึกษาอายุการเก็บรักษาและความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกสำหรับการหมักน้ำส้มสายชูด้วยต่อไป

4. สรุป

ปลายข้าว เป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูหมัก โดยเมื่อผ่านกระบวนการผลิตในขั้นตอนต่าง ๆ มีปริมาณเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ลดลงน้อยที่สุดและพบการปนเปื้อนน้อยที่สุด เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และกรดโปรปิโอนิค 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นอัตราส่วนผสมในกระบวนการผลิตกล้าเชื้อน้ำส้มสายชู ที่สามารถลดการปนเปื้อน และช่วยยืดอายุการเก็บรักษากล้าเชื้อน้ำส้มสายชูแบบแห้ง การเก็บกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูแบบแห้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษากล้าเชื้อ มากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง โดยเมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 วัน ยังคงมีปริมาณเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 354 ถึง 6.59±0.07 log cfu/g ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเชื้อกล้าเชื้อน้ำส้มสายชูแบบแห้งได้อย่างมีประสิทธิภาพจะอยู่ในช่วง 1-4 สัปดาห์แรกของการเก็บรักษา โดยสามารถหมักน้ำส้มสายชูได้กรดอะซิติกสูงสุดถึง 6.08±0.04 เปอร์เซ็นต์

5. เอกสารอ้างอิง

Dung, N.T.P., Rombouts, F.M., & Nout, M.J.R. (2005). Development of defined mixed-culture fungal fermentation starter granulate for controlled production of rice wine. **Innovative Food Science & Emerging Technologies, 6**, 429-441.

Gullo Maria and Paolo Giudici. (2008). Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. **International Journal of Food Microbiology, 125**, 46-53.

Krusong, W., & Pongsawatmanit, R. (1989). **Fermentation Technology**. Bangkok: O.S. Printing House. (in Thai)

Laopaiboon, R., & Lotong, N. (1988). Production of vinegar starter culture in powder form. **Proceedings of the 26th Kasetsart University Annual Conference** (pp. 103-111). Bangkok: Kasetsart University. (in Thai)

Lotong, N. (1991). **Fermented Strater Cultures and Production Technology**. Bangkok: Funny Publishing Limited Partnership. (in Thai)

Mahinthronthep, B. (1986). **Production of Vinegar Strater and the Influence of Herbs on the Microorganisms in Loog-Pang** (Master Thesis). Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

Mahinthronthep, B., Laopaiboon, R., & Lotong, N. (1987). Production of Starter Cultures Using pure cultures for use in vinegar fermentation. **Kasetsart Journal (Science), 21**, 278-288. (in Thai)

Muangnoi. M., Ontoum, K., & Phothisuk, P. (2013). **Production of fermented vinegar and ready-to-drink vinegar** (Handout for Training). Bangkok: Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University. (in Thai)

Ontoum, K., Saithong, P., & Muangnoi. M. (2012). **Production of Liquid Vinegar Strater Culture for Use in Vinegar Production**. Bangkok: Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University. (in Thai)

(Received: 22/Dec/2023, Revised: 24/Jun/2024, Accepted: 26/Jun/2024)