

การหมักน้ำส้มสายชูมั่งคุดโดยเทคนิคการหมักร่วมระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5279
และ *Gluconobacter oxydans* TRBC 4013

นินสา แซ่หลี่

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161

snisa@wu.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูมั่งคุดโดยใช้วิธีการหมักร่วมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013 เมื่อทำการหมักโดยใช้น้ำมั่งคุดเริ่มต้น 10 องศาบริกซ์ พบว่าเทคนิคการหมักน้ำส้มสายชูมั่งคุดด้วยวิธีการหมักร่วมแบบขั้นตอนเดียว โดยใช้สัดส่วนหัวเชื้อระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 : *G. oxydans* TRBC 4013 เท่ากับ 3:1 ค่า pH เริ่มต้น 6.0 จะให้ประสิทธิภาพการหมักที่ดี มีกรดแอซิดิกสูงสุด 58.6 ± 0.05 g/l ผลได้กรดแอซิดิก ($Y_{p/s}$) 0.49 g/g อัตราการผลิตกรดแอซิดิก 0.17 g/l/h ที่ระยะเวลา 14 วัน น้ำส้มสายชูมั่งคุดที่ผลิตได้มีค่า pH 2.91 ค่า Turbidity เท่ากับ 19.11 ± 0.14 NTU มีค่า TPCs เท่ากับ $1,135.72$ mg GAE/l ค่า TFCs มีค่าเท่ากับ 90.69 ± 0.003 mg/l และ DPPH scavenging activity มีค่าเท่ากับ $17.5 \pm 1.63\%$

คำสำคัญ: น้ำส้มสายชูหมัก, มั่งคุด, *Gluconobacter oxydans* *Saccharomyces cerevisiae*

บทนำ

น้ำส้มสายชูหมัก (Fermented vinegar) นิยมใช้เป็นสารเสริมแต่งในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ และอุตสาหกรรมอื่นๆ เนื่องจากมีผลดีต่อสุขภาพ ช่วยลดค่าช่วยลดระดับการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลกลูโคสและอินซูลิน (Johnston et al. 2004) ทำให้ความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวานลดลง ช่วยยับยั้งการขยายตัวของเซลล์มะเร็งและการขยายของเนื้องอก (Nanda et al. 2004) น้ำส้มสายชูหมักจัดเป็นสารปรุงแต่งอาหาร (Food additive) ที่มีคุณค่าเหนือกว่าน้ำส้มสายชูที่ปรุง เนื่องจากประกอบด้วยองค์ประกอบหลักคือกรดแอซิดิก และองค์ประกอบอื่นๆ เช่น Tartaric acid, Citric acid, Calcium, Iron, Magnesium, Phosphorous, Potassium, Sodium, Tannins, Polyphenols น้ำตาล และกรดแอมิโน (Patil, 2013) ทำให้มีรสชาติและคุณสมบัติแตกต่างกันตามชนิดวัตถุดิบและกรรมวิธีการหมักที่ใช้ โดยทั่วไปน้ำส้มสายชูหมักประกอบด้วยกรดแอซิดิก 3.9-9.0% กรดแอซิดิกจะมีบทบาทหลักในการให้รสชาติและเป็นสารต้านจุลินทรีย์หลัก

การหมักน้ำส้มสายชูเกิดจากการกระบวนการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์โดยยีสต์ตามด้วยการออกซิเดชันแอลกอฮอล์ให้เกิดกรดแอซิดิกโดยแอซิดิกแอซิกแบคทีเรีย (Acetic Acid Bacteria : ABB) ยีสต์ที่นิยมใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูหมักเป็นยีสต์ทั่วไปที่นิยมใช้ในการหมักไวน์ เบียร์ เช่น *S. cerevisiae* (Wang et al. 2013) สำหรับขั้นตอนการออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดแอซิดิกในอุตสาหกรรมนิยมใช้แอซิดิกแอซิกแบคทีเรียซึ่งแตกต่างกันออกไปขึ้นกับความเข้มข้นของกรดแอซิดิกที่ต้องการ เช่น น้ำส้มสายชูชนิดกรดแอซิดิกสูง (>6%) มักนิยมใช้ *Gluconobacter* spp. น้ำส้มสายชูชนิดกรดแอซิดิกต่ำ ($\leq 6\%$) นิยมใช้ *Acetobacter* spp. หรืออาจใช้ *Gluconobacter* spp. ก็ได้ (Gullo et al. 2014) โดยสปีชีส์ที่นิยม เช่น *Acetobacter aceti*, *Acetobacter malorum*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter pomorum*, *Komagataeibacter europaeus*, *Komagataeibacter hansenii*, *Komagataeibacter intermedius*, *Komagataeibacter oboediens*, *Gluconobacter xylinus* (Gullo et al. 2014; Yetiman & Kesmen, 2015)

การหมักน้ำส้มสายชูในอุตสาหกรรม ทำได้ทั้งแบบ Slow process culture fermentation และ แบบ Fast submerged fermentation ในหลายประเทศการหมักน้ำส้มสายชูเป็นการหมักแบบ Slow process culture fermentation หรืออาจเรียกว่าการหมักน้ำส้มสายชูแบบพื้นบ้าน (Traditional vinegar fermentation) โดยที่การหมักแบบนี้จะไม่ทราบชนิดและปริมาณสายพันธุ์ที่ชัดเจนของ

เชื้อที่ใช้ในการหมัก ทำให้ใช้ระยะเวลาการหมักนาน ประมาณ 2-3 เดือน ส่งผลต่อคุณภาพและการคงคุณภาพโดยการหมักซ้ำ (Reproduction) ที่มักประสบปัญหาเรื่องประสิทธิภาพการผลิต เทคนิคการหมักน้ำส้มสายชูสามารถทำได้หลายวิธี เพื่อให้ได้ปริมาณกรดแอซิดที่สูงและใช้ระยะเวลานั้น เทคนิคการหมักร่วม (Mixed culture systems) เป็นการรวมขั้นตอนการหมักเอทานอลและการออกซิเดชันให้เกิดกรดแอซิดิกไว้ในขั้นตอนเดียว ทำให้ประหยัดเวลา เทคนิคที่ใช้ไม่ยุ่งยากและช่วยลดต้นทุน และช่วยให้การสังเคราะห์สารเสริมรส กรดอินทรีย์ต่างๆ กรดแอมิโนต่างๆ รวมทั้งสารระเหยแตกต่างกันไป (Xu et al. 2011) ทำให้น้ำส้มสายชูหมักมีกลิ่นรสชาติและคุณสมบัติที่มีเอกลักษณ์มากยิ่งขึ้น นอกเหนือจากขึ้นกับวัตถุดิบที่ใช้ อย่างไรก็ตามการหมักโดยวิธีการหมักร่วมต้องตระหนักว่าเชื้อหลากหลายชนิดต้องการสภาวะที่เหมาะสม เช่น pH อุณหภูมิ ความเข้มข้นออกซิเจน สารอาหาร ในการเจริญแตกต่างกันไป เนื่องจากสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อชนิดหนึ่งอาจยับยั้งการเจริญของเชื้ออีกหลายชนิด (Wang et al. 2013) ทำให้ยากต่อการควบคุม เทคนิคการหมักหมักร่วม จึงยังมีการศึกษากันไม่มากนัก อย่างไรก็ตามการใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ สามารถคัดเลือกชนิดของเชื้อที่ให้กลิ่นและรสชาติที่ดีได้ ใช้ระยะเวลาในการหมักไม่นาน ให้ผลผลิตสูง ใช้เทคนิคง่าย ๆ ไม่ยุ่งยากในการหมัก และการลงทุนต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหมักร่วมที่ไม่ใช่เชื้อบริสุทธิ์

การนำมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) ซึ่งเป็นผลไม้ที่มีศักยภาพสูงในการส่งออกและเป็นที่ยอมรับในและต่างประเทศ ประกอบด้วยสารที่มีคุณค่าทางอาหารสูง เช่น น้ำตาล โปรตีน สารเยื่อใย วิตามินซี ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม สารประกอบฟีนอลิก เช่น Xanthones, Tannins และ ntcyanins (Zadernowski et al. 2013) ทำให้ช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระ สามารถช่วยต้านมะเร็ง (Li et al. 2014) ดังนั้น งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำส้มสายชูหมักด้วยวิธีการหมักร่วมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ทดสอบเทคนิคการหมักร่วมแบบขั้นตอนเดียว (One step fermentation) เทคนิคการหมักร่วมแบบลำดับ (Sequential fermentation) ระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013

โดยนำมังคุดสุก มาคั้นน้ำแยกส่วนเมล็ดออก เก็บส่วนน้ำมังคุดมาผ่านการกรอง ปรับความเข้มข้นเริ่มต้น 10 องศาบริกซ์ ปรับค่า pH 6.0 ทำการฆ่าเชื้อด้วยการพาสเจอร์ไรส์ ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปใช้สำหรับการทดลอง

การเตรียมหัวเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5279 โดยนำเชื้อดังกล่าวจาก Stock culture ถ่ายลง YM broth (Yeast extract 0.3%, Peptone 0.5%, Malt extract 0.3%, Glucose 1%) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน การเตรียมหัวเชื้อ *G. oxydans* TRBC 4013 โดยนำเชื้อดังกล่าวจาก Stock culture ถ่ายลง Seed medium ประกอบด้วย Glucose 20 g/l, Peptone 12 g/l, Yeast extract 3 g/l บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของหัวเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าเริ่มต้นเท่ากับ 1

ทำการหมักในฟลาสขนาด 500 มิลลิลิตร บรรจุปริมาตรตัวอย่าง 200 มิลลิลิตร ทำการเติมหัวเชื้อผสม โดยทำการหมัก 1) การหมักร่วมแบบขั้นตอนเดียว ที่เติมหัวเชื้อผสมทั้งสองที่เวลาเริ่มต้นการหมักอัตราส่วน 1:1 และ 2) การหมักร่วมแบบลำดับ ที่เติมหัวเชื้อโดยเติมเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5279 ที่เวลาเริ่มต้นการหมัก ทำการหมักโดยเขย่าให้อากาศ 80 rpm ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จึงเติมหัวเชื้อ *G. oxydans* TRBC 4013 ทำการหมักต่อโดยเขย่าให้อากาศ 200 rpm ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 14 วัน วิเคราะห์ปริมาณ กรดแอซิดิก ปริมาณเอทานอล (Ethanol) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugars) ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ Animex HPX87H และ เฟสเคลื่อนที่ใช้กรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.005 นอร์มัล อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ 50 องศาเซลเซียส ปริมาณ *S. cerevisiae* TISTR 5279 ทดสอบโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อใน YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน ปริมาณ *G. oxydans* TRBC 4013 ทดสอบโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อใน GECA agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน

2. ทดสอบปริมาณสัดส่วนหัวเชื้อผสมที่เหมาะสมในการหมักร่วมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013

โดยนำสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้างต้นมาทำการทดสอบหมักน้ำส้มสายชูหมักในฟลาสขนาด 1 ลิตร บรรจุปริมาตรตัวอย่าง 400 มิลลิลิตร ทำการหมักแบบขั้นตอนเดียว เติมหหัวเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 : *G. oxydans* TRBC 4013 ในอัตรา 0:4, 2:2, 1:3 และ 3:1 เขย่าให้อากาศ 200 rpm ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณ กรดแอซติก ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น

3. ทดสอบหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยปรับค่า pH เริ่มต้นของน้ำหมัก

นำสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้างต้นมาทำการทดสอบหมักน้ำส้มสายชูหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ออกแบบให้มีระบบให้อากาศ บรรจุปริมาตรตัวอย่าง 3.0 ลิตร ทดสอบการหมักโดยทดสอบปรับค่า pH เริ่มต้นของน้ำหมักเท่ากับ 6.0 และ 3.5 เติมหหัวเชื้อผสมที่มีอัตราส่วนระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 : *G. oxydans* TRBC 4013 ในอัตรา 3:1 ให้อากาศ 0.5 vvm อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างวิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น ผลได้กรดแอซติก ($Y_{P/S}$) และ อัตราการผลิตกรดแอซติก (Q_P) คำนวณตามสูตร ดังนี้

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P_{ac}}{\Delta S_{total}} = \frac{P_{ac}^f - P_{ac}^i}{S_{total}^i - S_{total}^f}$$

$$Q_P = \frac{\Delta P_{ac}}{t} = \frac{P_{ac}^f - P_{ac}^i}{t}$$

เมื่อ P_{ac}^f คือความเข้มข้นสุดท้ายของกรดแอซติก (g/l) P_{ac}^i คือความเข้มข้นสุดท้ายของกรดแอซติกเมื่อเริ่มต้น (g/l) S_{total}^i คือปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเมื่อเริ่มต้น (g/l) S_{total}^f คือปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเมื่อสิ้นสุดการหมัก (g/l) และ t คือระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (h)

4. การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมัก

โดยทดสอบค่า Total soluble solid โดยใช้ Refractometer การวัดค่า Turbidity โดยใช้ Turbidimeter การวัดค่าสี ปริมาณ Total phenolic content (TPC) และปริมาณ Total flavonoid content (TFC)

ผลและอภิปรายผล

1. การหมักน้ำส้มสายชูหมักโดยการหมักร่วมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013 ด้วยเทคนิคการหมักแบบขั้นตอนเดียวและเทคนิคการหมักแบบลำดับ

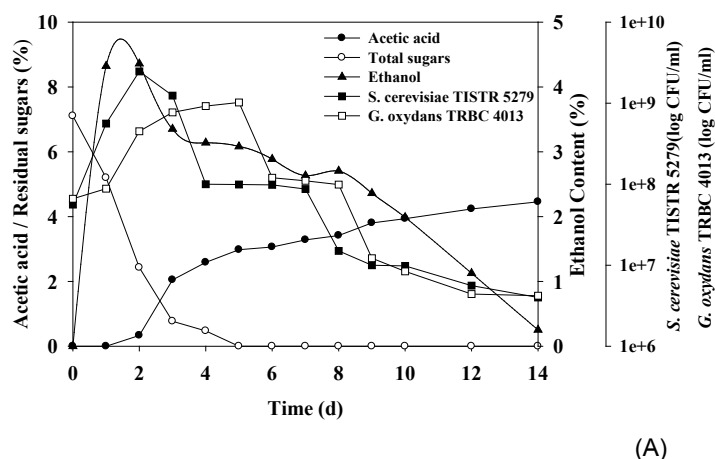
การทดสอบการหมักน้ำส้มสายชูหมักในฟลาสและเขย่าเพื่อให้อากาศ เมื่อทำการหมักน้ำส้มสายชูหมักแบบขั้นตอนเดียว โดยเติมหหัวเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 : *G. oxydans* TRBC 4013 ในอัตรา 1:1 พบว่าปริมาณกรดแอซติกจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และให้ค่าสูงสุดเท่ากับ $4.46 \pm 2.85\%$ ในวันที่ 14 ซึ่งเป็นสุดท้ายที่ทดสอบ ส่วนปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 4.36 ± 0 % ที่ระยะเวลา 2 วัน จากนั้นจะลดลงเรื่อยๆ จนมีค่า $0.25 \pm 0.89\%$ ในวันที่ 14 สัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ลดลงอย่างรวดเร็ว จนมีค่า $0.77 \pm 0.42\%$ ในวันที่ 3 ของการหมัก อย่างไรก็ตามการผลิตเอทานอลอาจไม่สูงมาก เนื่องจากคาดว่ามีการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแอซติกโดยเชื้อ *G. oxydans* TRBC 4013 ในระหว่างการหมักร่วม โดยปริมาณเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5279 จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 2 ให้ค่าเท่ากับ 2.46×10^9 cfu/ml จากนั้นปริมาณจะลดลงเนื่องจากสภาวะกรดที่ผลิตขึ้น โดยปริมาณเชื้อ *G. oxydans* TRBC 4013 จะเพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 ให้ค่าเท่ากับ 1.02×10^9 cfu/ml แสดงดังรูปที่

การหมักร่วมแบบลำดับเป็นการหมักสองขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5279 เพื่อหมักให้เกิดเอทานอล โดยปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นและให้ค่าสูงสุดเท่ากับ $4.95 \pm 0.01\%$ ในวันที่ 5 ของการหมัก จากนั้นจะลดลงอย่างช้าๆ และคงเหลือ $2.24 \pm 0.05\%$ ในวันที่ 14 ของการหมัก ในขั้นตอนที่สองเป็นการหมักร่วมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013 เริ่มตั้งแต่วันที่ 4 ของการหมัก โดยปริมาณกรดแอซิกเริ่มตรวจพบในวันที่ 7 ของการหมัก และเพิ่มขึ้นช้าๆ และให้ค่าสูงสุดเท่ากับ $2.82 \pm 0.03\%$ ในวันที่ 14 ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็ว มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ตั้งแต่วันที่ 4 ของการหมัก ปริมาณเซลล์ *S. cerevisiae* TISTR 5279 ค่อยๆ เพิ่มขึ้นและสูงสุดในวันที่ 5 ของการหมัก มีจำนวน 1.44×10^{10} cfu/ml จากนั้นลดจำนวนลงเหลือ 3.8×10^6 cfu/ml ในวันที่ 14 ของการหมัก ส่วนเชื้อ *G. oxydans* TRBC 4013 เริ่มตรวจพบในวันที่ 4 ของการหมักเริ่มต้น 7.2×10^7 cfu/ml และเพิ่มจำนวนอย่างช้าๆ ให้ค่า 9.9×10^8 cfu/ml ในวันที่ 6 ของการหมัก จากนั้นลดจำนวนลงเหลือ 4.6×10^6 cfu/ml ในวันที่ 14 ของการหมัก เมื่อสิ้นสุดการหมักปริมาณเอทานอลคงเหลือ $2.82 \pm 0.03\%$ อาจเนื่องจากสภาวะไม่เหมาะสมและแอซิกแบคทีเรียถูกยับยั้งด้วยปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น แสดงดังรูปที่ 1B

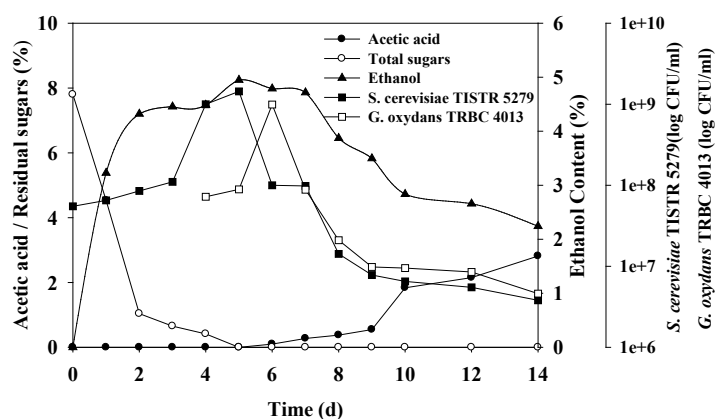
เมื่อเปรียบเทียบผลการหมักน้ำส้มสายชูหมักระหว่างการหมักร่วมแบบขั้นตอนเดียวและเทคนิคการหมักร่วมแบบลำดับโดยเชื้อผสม พบว่าที่เวลา 14 วัน ผลได้กรดแอซิก (Yp/s) ให้ค่าเท่ากับ 0.58 g/g และ 0.36 g/g และอัตราการผลิตกรดแอซิก (Qp) ให้ค่าเท่ากับ 0.13 และ 0.08 g/l/h ตามลำดับ ในการทดลองนี้การหมักน้ำส้มสายชูหมักแบบขั้นตอนเดียวจะให้ผลได้กรดแอซิกสูงกว่าการหมักแบบลำดับ อาจเนื่องจากสารอาหารและการให้อากาศที่มีบทบาทสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจาก *S. cerevisiae* TISTR 5279 เป็น Facultative anaerobe ในขณะที่ *G. oxydans* TRBC 4013 เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศ (Strict aerobe) ดังนั้นปริมาณอากาศที่เหมาะสมจึงสำคัญสำหรับการหมัก ดังนั้นการหมักแบบเชื้อผสม จำเป็นต้องทำการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ผลได้ดีขึ้น

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าจนผลศาสตร์การหมักกรดแอซิกจากน้ำมั่งคุดโดยการหมักร่วมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013 โดยเทคนิคการหมักร่วมแบบขั้นตอนเดียวและเทคนิคการหมักร่วมแบบลำดับ

พารามิเตอร์	การหมักร่วมแบบขั้นตอนเดียว	การหมักร่วมแบบลำดับ
Fermentation time (d)	14	14
Acetic acid (g/l)	44.6 ± 2.85	28.2 ± 1.32
$Y_{P/S}$ (g/g)	0.58	0.36
Q_p (g/l/h)	0.13	0.08
Residual sugars (g/l)	0	0



(A)



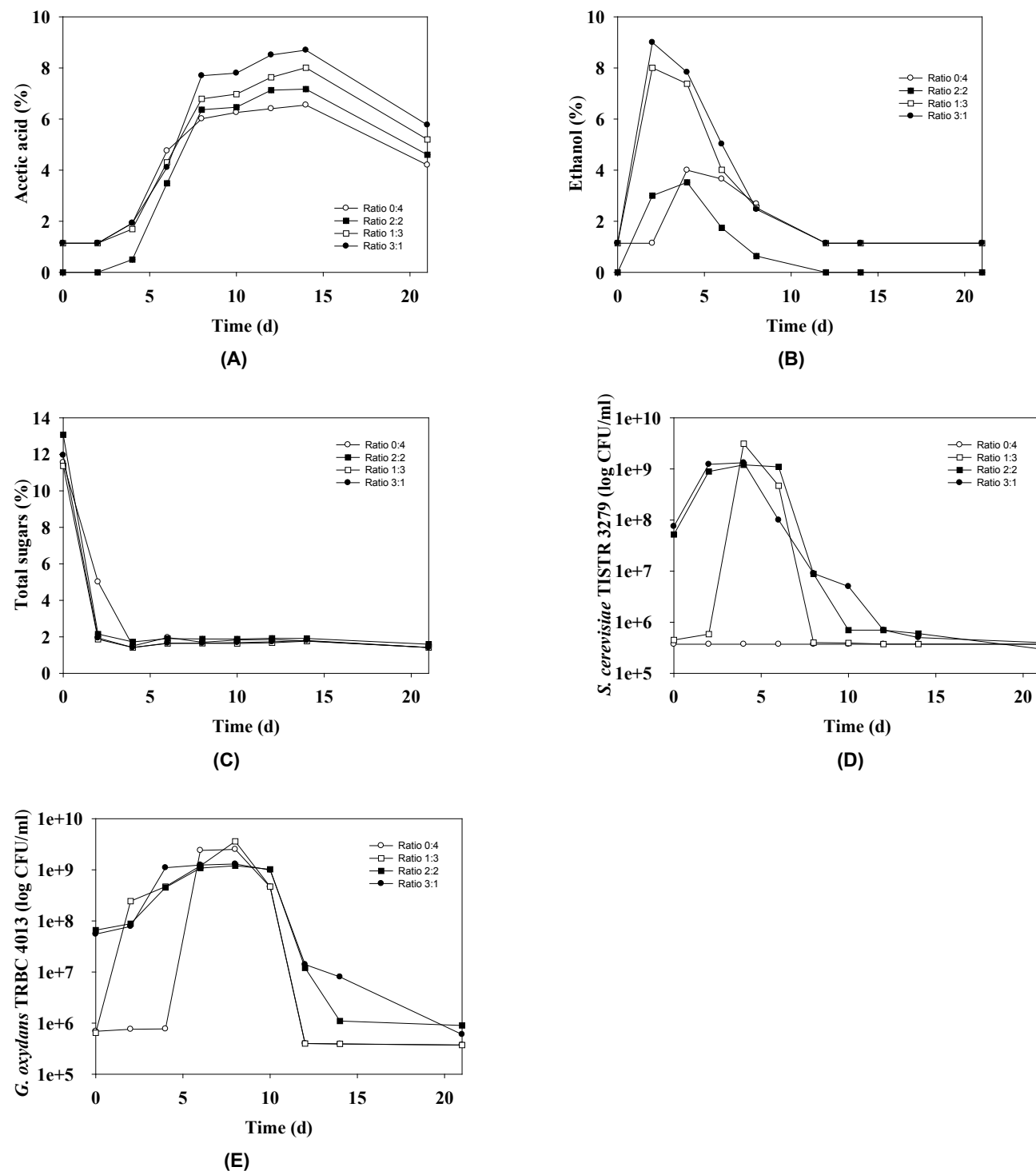
(B)

รูปที่ 1 การเปรียบเทียบการหมักน้ำส้มสายชูหมักด้วยเทคนิคการหมักแบบ (A) การหมักร่วมแบบขั้นตอนเดียว และ (B) การหมักร่วมแบบลำดับ ระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013; (●) Acetic acid (○) Total sugars (▲) Ethanol (■) *S. cerevisiae* TISTR 5279 (□) *G. oxydans* TRBC 4013

2. สัดส่วนหัวเชื้อผสมที่เหมาะสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013 ในการหมักน้ำส้มสายชูหมักในฟลาส 1 ลิตร

การหมักน้ำส้มสายชูหมักด้วยการหมักร่วม ระหว่าง เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013 โดยใช้สัดส่วนเริ่มต้น เท่ากับ 0:4, 2:2, 1:3, 3:1 พบว่าให้ผลกรดแอสติกและเอทานอล แสดงดังรูปที่ 2A และ 2B ตามลำดับ ปริมาณกรดแอสติกสูงสุด เมื่อใช้สัดส่วนเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013 เท่ากับ 3:1 ในวันที่ 14 ของการหมัก โดยมีค่าสูงสุด $5.97 \pm 0.13\%$ ในขณะที่ปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะต้นของการหมัก ประมาณวันที่ 2-4 โดยในหัวเชื้อผสมสัดส่วน 2:2, 1:3 และ 3:1 ตรวจพบปริมาณเซลล์ยีสต์สูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 1.20×10^9 cfu/ml, 1.24×10^9 cfu/ml และ 1.32×10^9 cfu/ml ตามลำดับ และจะลดลงเรื่อยๆ ในทุกสัดส่วนหัวเชื้อที่ใช้ ยกเว้นเมื่อใช้สัดส่วน *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013 เท่ากับ 0:4 ไม่พบปริมาณยีสต์ แต่ตรวจพบปริมาณเอทานอลแสดงว่า *G. oxydans* TRBC 4013 สามารถหมักน้ำตาลให้เกิดเอทานอลและกรดแอสติกได้โดยตรง โดยปริมาณเซลล์แอซิดิกแบคทีเรีย จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในทุกสัดส่วนหัวเชื้อที่ใช้ในการหมัก และจะให้ปริมาณสูงสุดในวันที่ 8 เท่ากับ 1.21×10^9 cfu/ml, 1.20×10^9 cfu/ml, 1.26×10^9 cfu/ml และ 1.30×10^9 cfu/ml แสดงดังรูปที่ 2D และ 2E เมื่อใช้สัดส่วนหัวเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 0:4, 2:2, 1:3 และ 3:1 ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าสัดส่วนหัวเชื้อมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตกรดแอสติกภายใต้สภาวะจำกัด เช่น อากาศ โดยปริมาณเชื้อที่ต่ำจะทำให้เชื้อถูกจำกัดการเจริญ และหากปริมาณเชื้อมาก

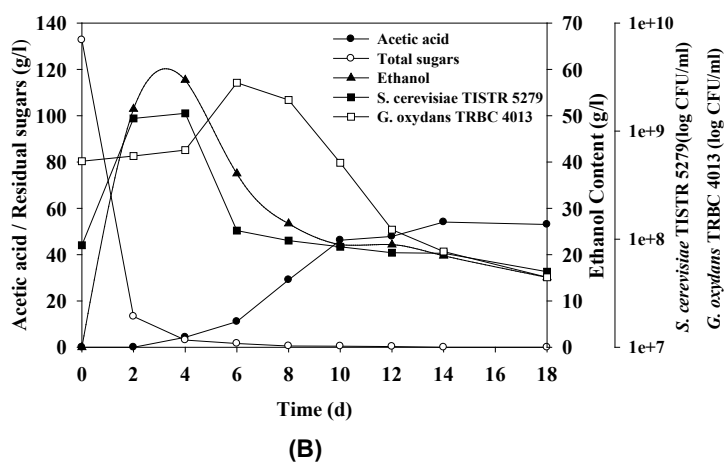
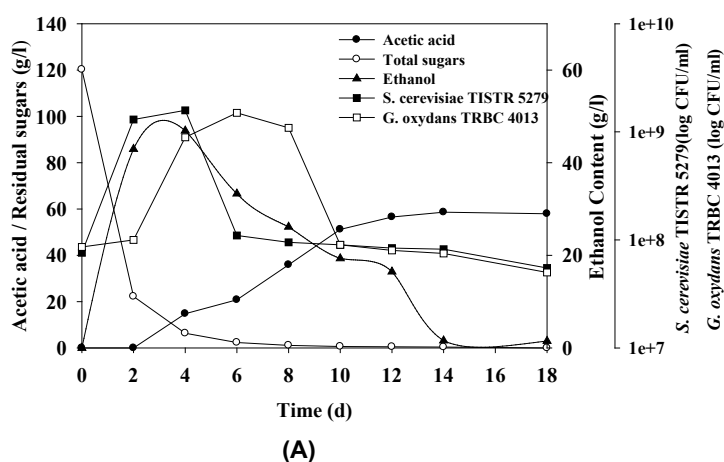
ไปจะทำให้เสริมเจริญส่งผลให้ปริมาณเอทานอลลดลง อย่างไรก็ตามเนื่องจากปริมาณน้ำตาลจำกัดในช่วงหลังของการหมักอาจส่งผลต่อผลได้การผลิตเอทานอลและกรดแอซติก รวมทั้งการยับยั้งเนื่องจากปริมาณกรดของเชื้อดังกล่าวซึ่งอาจแก้ไขโดยการหมักแบบ Fed batch (Wang et al. 2013) เมื่อเปรียบเทียบผลได้กรดแอซติกที่เวลา 14 ชั่วโมง พบว่าให้ค่า 0.34, 0.45, 0, 0.56 g/g เมื่อใช้สัดส่วนหัวเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 0:4, 2:2, 1:3 และ 3:1 ตามลำดับ โดยสัดส่วน 3:1 จะให้ผลได้แอซติกสูงสุด



รูปที่ 2 การเปรียบเทียบการหมักน้ำสัสมายชูมังกุดโดยใช้สัดส่วนหัวเชื้อผสมที่เหมาะสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013 สัดส่วนเริ่มต้น เท่ากับ 0:4, 2:2, 1:3, 3:1; (A) Acetic acid (B) Ethanol (C) Total sugars (D) *S. cerevisiae* TISTR 5279 (E) *G. oxydans* TRBC 4013

3. การหมักน้ำส้มสายชูหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เมื่อทำการขยายขนาดและทดสอบหมักน้ำส้มสายชูที่มีค่า pH เริ่มต้น 6.0 และ 3.5 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ติดตั้งระบบควบคุมการให้อากาศ เนื่องจาก pH ที่เหมาะสมในการเจริญร่วมกันของเชื้อมีผลต่อการเจริญและการหมักให้เกิดเอทานอลและกรดแอซิดิก การเจริญของเชื้อระหว่างการหมักร่วม การผลิตเอทานอลและกรดแอซิดิกแสดงดังรูปที่ 3 และค่าจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อสรุปดังตารางที่ 2 โดยการหมักเมื่อเริ่มต้นที่ค่า pH 6.0 และ 3.5 จะให้ผลได้กรดแอซิดิก เท่ากับ 0.49 และ 0.41 g/g ปริมาณกรดแอซิดิกสูงสุด เท่ากับ 58.6 ± 0.05 และ 54.1 ± 0.02 g/l ตามลำดับ การหมักที่ pH 6.0 ให้ผลได้สูงกว่า การหมักที่ค่า pH เริ่มต้นต่ำ เนื่องจากปริมาณเซลล์จะต่ำกว่า สาเหตุจากการเจริญของเชื้อถูกยับยั้ง อย่างไรก็ตามอัตราการผลิตกรดแอซิดิก ยังมีค่าต่ำ เท่ากับ 0.17 และ 0.16 g/l/h ตามลำดับ อย่างไรก็ตามน้ำส้มสายชูหมักที่ได้จากการหมักก็ให้ปริมาณกรดแอซิดิกอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการหมักน้ำส้มสายชูหมักมีกรดต่อไป



รูปที่ 3 การเปรียบเทียบการหมักน้ำส้มสายชูหมักด้วยการหมักร่วมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013 โดยใช้ น้ำส้มสายชูเริ่มต้นที่มีค่า (A) pH 6.0 และ (B) pH 3.5 (●) Acetic acid (○) Total sugars (▲) Ethanol (■) *S. cerevisiae* TISTR 5279 (□) *G. oxydans* TRBC 4013

ตารางที่ 2 แสดงค่าจลนพลศาสตร์การหมักกรดแอซิดิกจากน้ำมั่งคุดโดยการหมักร่วมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

พารามิเตอร์	ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำมั่งคุด เริ่มต้น	
	6.0	3.5
Fermentation time (d)	14	14
Acetic acid (g/l)	58.6±0.05	54.1±0.02
$Y_{P/S}$ (g/g)	0.49	0.41
Q_p (g/l/h)	0.17	0.16
Residual sugars (g/l)	0.37±	0

4. คุณสมบัติทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมักคุดหมัก

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมักคุดที่ได้จากการหมักร่วมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013 แสดงดังตารางที่ 3 ผลทดสอบพบว่าน้ำส้มสายชูหมักคุดหมัก มีค่า pH 2.91 ปริมาณของแข็งละลาย ในรูปค่า Brix value ก่อนข้างต่ำ มีค่าเท่ากับ 3.0 เนื่องจากปริมาณน้ำมั่งคุดถูกเจือจางจากการปรับความหวานเริ่มต้น และน้ำตาลเริ่มต้นถูกเปลี่ยนเป็นกรดและเอทานอล ทำให้ค่า Turbidity ก่อนข้างต่ำ คือมีค่าเท่ากับ 19.11±0.14 NTU ในขณะที่ค่า L^* มีค่าเท่ากับ 3.63 โดยน้ำส้มสายชูหมักคุดทั่วไปมักมีค่า L^* อยู่ระหว่าง 0.28-20.15 (Ozturk et al. 2015) ในขณะที่ค่า a^* b^* ก่อนข้างจะหลากหลายแตกต่างกันไปตามชนิดของวัตถุดิบและกรรมวิธี และเชื้อที่ใช้ในการหมัก เมื่อทดสอบชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (TPCs และ TFCs) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Antiradical activity) ของน้ำส้มสายชูหมักคุดที่ได้จากการหมักร่วมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013 ผลทดสอบพบว่าน้ำส้มสายชูหมักคุดหมัก มีค่า TPCs ก่อนข้างสูง เท่ากับ 1,135.72 mg GAE/l ในขณะที่ค่า TFCs มีค่าเท่ากับ 90.69±0.003mg/l และ DPPH scavenging activity มีค่าเท่ากับ 17.5±1.63 % ตามลำดับ

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมักคุดหมักที่ได้จากการหมักร่วมระหว่าง ระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013

คุณสมบัติ	น้ำส้มสายชูหมักคุดหมัก
pH	2.91
Brix°	3.0
Turbidity (NTU)	19.11±0.14
Colorant	
L^*	3.63
A^*	-0.59
B^*	1.32
TPC (mg GAE/l)	1,135.72±0.15
TFC (mg/l)	90.69±0.003
% ARA	17.5±1.63

สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาการหมักน้ำส้มสายชูหมักจากมังคุดน้ำส้มสายชูหมักด้วยเทคนิคการหมักร่วม ระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5279 และ *G. oxydans* TRBC 4013 ให้เกิดประสิทธิภาพการผลิตที่ดี ขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น เทคนิคการหมัก สัดส่วนหัวเชื้อ pH การให้อากาศ โดย การวิจัยนี้เป็นการศึกษาแนวทางเบื้องต้นในการใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักน้ำส้มสายชูหมักจาก มังคุด โดยการหมักเกิดขึ้นได้ดีพอสมควร อย่างไรก็ดี ควรพัฒนาต่อไปเพื่อให้อัตราการผลิตกรดแอซิติกมีค่าเพิ่มขึ้นและระยะเวลาการหมักสั้นลง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการ อุดมศึกษาที่สนับสนุนงบประมาณในการศึกษาวิจัย และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ที่สนับสนุนและอำนวยความสะดวก เกี่ยวกับอุปกรณ์ในการทำวิจัยในครั้งนี้

บรรณานุกรม

- Gullo, M., Verzelloni, E., & Canonico, M. (2014). Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. *Process Biochemistry*, 49, 1571-1579.
- Johnston, C., Kim, C., & Buller, A. (2004). Vinegar improves insulin sensitivity to a high carbohydrate meal in subjects with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 27, 281-282.
- Li, G., Petiwala, S.M., Nonn, L., & Johnson, J.J. (2014). Inhibition of CHOP accentuates the apoptotic effect of α -mangostin from the mangosteen fruit (*Garcinia mangostana*) in 22Rv1 prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(1), 75-80.
- Nanda, K., Miyoshi, N., & Nakamura, Y., Shimoji Y, Tamura Y, Nishikawa Y, Uenakai K, Kohno H, & Tanaka T. (2004). Extract of vinegar "Kurosu" from unpolished rice inhibits the proliferation of human cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 23(1), 69-75.
- Ozturk, I., Caliskan, O., Tormuk, F., Ozcan, N., Yalcin, H., Baslar, M., & Sagdic, O. (2015). Antioxidant, antimicrobial, mineral, volatile, physicochemical and microbiological characteristics of traditional home-made Turkish vinegars. *LWT-Food Science Technology*, 63(1), 144-151.
- Patil, K.R. (2013). Microbial production of vinegar (sour wine) by using various fruits. *Indian Journal of Applied Research* 3(8), 602-604.
- Seki, T., Morimura, S., Shigematsu, T., Maeda, H., & Kida, K. (2004). Antitumor activity of rice shochu post distillation slurry and vinegar produced from the post distillation slurry via oral administration in a mouse model. *Biofactors*, 22(1-4), 103-105.
- Wang, Z., Yan, M., Chen, Z., Li, D., Qin, L., Li, Z., Yao, J., & Liang, X. (2013). Mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter pasteurianus* for acetic acid production. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 41-45.
- Xu, W., Huang, Z., Zhang, X., Li, Q., Lu, Z., Shi, J., Xu, Z., & Ma, Y. (2011). Monitoring the microbial community during solid state acetic fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar. *Food Microbiology*, 28, 1175-1181.
- Yetiman, A.E., & Kesmen, Z. (2015). Identification of acetic acid bacteria in traditionally produced vinegar and mother of vinegar by using different molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 9-16.
- Zadernowski, R., Czaplicki, S., & Naczek, M. (2009). Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry*, 112(3), 685-689.