การตรวจเอกสาร

ส่วนประกอบของน้ำมะพร้าว

Child และผู้ร่วมงาน (9) ได้วิเคราะห์น้ำตาลในน้ำมะพร้าวอ่อนและน้ำมะพร้าวแก่ พบว่าในน้ำมะพร้าวอ่อน 100 มิลลิลิตร มีน้ำตาลซึ่งส่วนมากเป็น reducing sugar ประมาณ 5.5 กรัม ส่วนน้ำมะพร้าวแก่มีเพียง 2 กรัม และส่วนใหญ่เป็น sucrose แสดงว่าเมื่อผลมะพร้าวอ่อนเจริญเป็นมะพร้าวแก่ทั้งปริมาณและชนิดของน้ำตาลมีการเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย นอกจากนี้ยังพบอีกว่าความเข้มข้นของ total solid ก็เปลี่ยนแปลงด้วย แต่เป็นไปในลักษณะกลับกันกับปริมาณน้ำตาล กล่าวคือในน้ำมะพร้าวอ่อน 100 มิลลิลิตร จะมี total solid อยู่ประมาณ 2.5 กรัม และจะเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ เมื่อมะพร้าวแก่มากขึ้น เมื่อแก่จัดพบว่ามี total solid มากถึงประมาณ 6 กรัม

Child (8) รายงานว่า ในน้ำมะพร้าวแก่ 100 มิลลิลิตร มี ascorbic acid (วิตามินซี) อยู่ประมาณ 0.7-3.7 มิลลิกรัม และมีวิตามิน B complex เช่น nicotinic acid 0.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, pantothenic acid 0.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, biotin 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, riboflavin 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, folic acid 0.003 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังพบอีกว่ามี growth substance เช่น indolyl acetic acid, gibberellic acid, kinetin, วิตามิน และ inorganic salt ซึ่งส่งเสริมการเจริญของ flora bud ในห้องทดลอง

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมะพร้าว (11) พบว่า ในน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตร มีน้ำ 92.2 กรัม, น้ำตาล 4.9 กรัม, แป้ง 0 กรัม คาร์โบไฮเดรต 4.9 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Child (8) และ Child และ Nathanael (10) ได้วิเคราะห์น้ำมะพร้าวแก่ในขั้นต้นพบว่า ใน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย total solid 4.71 กรัม total sugar 2.08 กรัม, organic solid ที่ไม่ได้วิเคราะห์ 2.01 กรัม และจากการวิเคราะห์รายละเอียดปรากฏว่า ประกอบด้วย total solid 4.93 กรัม sucrose 1.14 กรัม, glucose 0.12 กรัม, fructose 0.83 กรัม, total sugar 3.09 กรัม, sulfate ash 0.64 กรัม

ส่วนประกอบของกากน้ำตาล (Molasses)

กากน้ำตาล (3) หมายถึงส่วนที่แยกได้ครั้งสุดท้ายมิได้นำกลับมาใช้ในกรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายอีกต่อไป มีประมาณ 4-6 % ของอ้อยที่ผลิต แบ่งออกเป็นชนิดต่าง ๆ เช่น first molasses (A-molasses), second molasses (B molasses) ส่วนกากน้ำตาลที่ไม่ใช้ในการทำน้ำตาลอีกต่อไป เราเรียกว่า final molasses หรือ exhausted molasses หรือ blackstrap molasses

จากการวิเคราะห์ (24) พบว่า กากน้ำตาลประกอบด้วยน้ำ 20 % sucrose 30 % invert sugar 32 % เถ้า (ash) 6 % และอินทรีย์สารซึ่งไม่ใช่น้ำตาล (organic non-sugar) 12 % กากน้ำตาลจัดเป็นแหล่งของพลังงาน และสารอาหารที่ใช้ในการขยายพันธุ์ของยีสต์ (19) ประกอบด้วยน้ำตาลประมาณ 55 % โดยที่ประมาณ 2 ใน 3 เป็น sucrose และ 1 ใน 3 เป็น glucose และ fructose นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุที่จำเป็นเช่น โปตัสเซียม, มักเนเซียม, ฟอสฟอรัส, สังกะสี, เหล็ก, ทองแดง, วิตามิน (biotin, pantothenic acid), inositol, pyredoxine, thiamine และ amino nitrogen เช่น asparagine, aspartic acid, alanine, glutamic acid, glycine แต่อย่างไรก็ตามสารอาหารที่มีอยู่ใน beet หรือ cane

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

molasses จะผันแปรไปบ้างตามพื้นที่เพาะปลูก, การปฏิบัติดูแลรักษา และประสิทธิภาพของเครื่องจักรของโรงงานน้ำตาล

วิธีการผลิตน้ำส้มสายชูโดยทั่ว ๆ ไป

น้ำส้มสายชูมีกรรมวิธีการผลิตได้แตกต่างกันอยู่หลายวิธี และมีชื่อเรียกแตกต่างกันตามกรรมวิธีในการผลิต โดยทั่ว ๆ ไปแล้วพอจะแบ่งน้ำส้มสายชูออกเป็น 3 ชนิดตามกรรมวิธีในการผลิต (1, 19, 28) คือ

1. น้ำส้มสายชูหมัก (fermented vinegar) ได้แก่น้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักธัญพืช, ผลไม้ หรือน้ำตาลเพื่อให้ได้น้ำส่าแล้วจึงนำมาหมักต่อด้วยเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีการผลิตตามธรรมชาติ

2. น้ำส้มสายชูกลั่น (distilled vinegar) ได้แก่น้ำส้มสายชูที่ได้จากการนำสุราขาวที่เจือจาง หรือแอลกอฮอล์เจือจางมาหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีผลิตตามธรรมชาติ

3. น้ำส้มสายชูเทียม (pseudo vinegar) ได้แก่น้ำส้มสายชูที่ได้จากการนำเอากรดน้ำส้มมาทำให้เจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

การผลิตน้ำส้มสายชูหมักมีขบวนการอยู่ 2 แบบด้วยกันคือ (28)

1. ขบวนการที่ปล่อยให้เกิดน้ำส้มสายชูอย่างช้า ๆ (slow process) หรือเรียกกันว่า Orlean process กรรมวิธีนี้รู้จักกันมาตั้งแต่สมัยก่อน โดยใช้เชื้อที่หมักในรุ่นก่อน ๆ เหลือไว้สำหรับเป็นเชื้อเริ่มต้น (starter) ประมาณหนึ่งในสามของถังหมัก แล้วเติมน้ำส่าที่เตรียมไว้ลงไป ทิ้งไว้ประมาณ 5 สัปดาห์ พบว่าเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำส้มสายชูจะเจริญเป็นฝ้า มีลักษณะเป็นเมือกหนาคลุมที่ผิวเราเรียกว่า mother of vinegar หลังจากหมักทิ้งไว้ประมาณ 5 สัปดาห์ แอลกอฮอล์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดน้ำส้ม จึงถ่ายเอาน้ำส้มสายชูออกมาแล้วเติมน้ำส่าลงไปอีก กระบวนการออกซิไดซ์จะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ และติดต่อกันไปเช่นนี้เรื่อย ๆ วิธีการนี้จะได้น้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพดี แต่ช้า ทำให้ราคาแพงทั้งยังต้องเสียเวลาในการคอยดูไม่ให้ฝ้าที่เกิดขึ้นถูกรบกวนอีกด้วย

Frazier (14) รายงานว่า วิธีผลิตน้ำส้มสายชูในครัวเรือนโดยปล่อยให้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติจะได้ผลผลิตต่ำ เนื่องมาจากแอลกอฮอล์ที่ได้จากการปล่อยให้เกิดขึ้นเองโดยยีสต์ในธรรมชาติจะน้อย ไม่มีการคัดสายพันธุ์เชื้อน้ำส้มสายชูที่ใช้ และบางครั้งก็มี film yeast และราอื่น ๆ ปะปนอยู่ ซึ่งจะทำลายแอลกอฮอล์และกรดน้ำส้ม บักเตรีอื่น ๆ ที่มีอยู่ยังทำให้กลิ่น และรสของน้ำส้มสายชูเสียไป

2. <u>การหมักแบบเร็ว (Quick process)</u> วิธีการหมักน้ำส้มสายชูแบบนี้ทำได้ 2 วิธีด้วยกันคือ (19)

2.1 <u>การหมักน้ำส้มสายชูโดยใช้ท่อหมัก (generator)</u>

โดยที่ภายในท่อหมักจะบรรจุเศษไม้ เพื่อเป็นที่เกาะของเชื้อน้ำส้มสายชูและเพิ่มพื้นที่ผิว การหมักน้ำส้มสายชูแบบนี้จะปล่อยให้น้ำส่าค่อย ๆ ไหลผ่านเศษไม้โดยมีการให้อากาศผ่านขึ้นมาจากด้านล่างของท่อหมัก ท่อหมักที่ใช้มีส่วนประกอบที่พอจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วนด้วยกันคือ

1. ส่วนบน เป็นส่วนที่ปล่อยให้น้ำส่าไหลผ่านลงมา และมีที่สำหรับให้อากาศออกจากท่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ส่วนกลาง เป็นส่วนที่บรรจุเศษไม้ หรือสิ่งอื่น ๆ เพื่อใช้เป็นที่เกาะของเชื้อน้ำส้มสายชู เราเรียกว่า packing

3. ส่วนล่าง เป็นส่วนที่มีท่อสำหรับให้อากาศขึ้นมา และท่อสำหรับให้น้ำส้มสายชูไหลลงสู่ถังเก็บ

ก่อนการหมักจะต้องล้างสิ่งที่บรรจุในท่อหมักให้สะอาด แล้วล้างด้วยน้ำส้มสายชูที่ยังไม่ได้ฆ่าเชื้อเพื่อให้เชื้อน้ำส้มสายชูได้เกาะตาม packing ในการหมักค่อย ๆ ปล่อยให้น้ำส่าไหลผ่าน packing ไปอย่างช้า และพ่นอากาศขึ้นมาตลอดเวลา เชื้อน้ำส้มสายชูจะเจริญอย่างรวดเร็วและออกซิไดซ์ น้ำส่าที่ผ่านให้เป็นกรดน้ำส้มไหลลงมายังถังเก็บที่ส่วนล่างของท่อหมัก

Allgeier และ Hildebrandt (5) รายงานว่า Hromatka และ Ebmer ได้ตรวจสอบหาประสิทธิภาพของเชื้อน้ำส้มสายชูใน beech wood shaving จากการผลิตน้ำส้มสายชูโดยใช้ท่อหมัก (generator) พบว่าปริมาณและวิธีการให้ออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้วิธีการนี้มีประสิทธิภาพหรือไม่ เชื้อน้ำส้มสายชูต้องการอากาศมาก จึงทำให้มีการศึกษาในเรื่องวิธีการให้อากาศซึ่งมีวิธีปฏิบัติทางฟิสิกส์ได้ 2 ทางคือ เพิ่มปริมาณอากาศที่พ่นเข้าไป หรือลดขนาดของฟองอากาศให้เล็กลงทำให้ผิวหน้าของฟองอากาศเพิ่มขึ้น ออกซิเจนละลายในอาหารได้มากขึ้น ประการแรกต้องทำให้ปริมาณอากาศน้อยลง เพื่อป้องกันการระเหยของแอลกอฮอล์และกรดน้ำส้มในขณะหมัก มีการทดลองแสดงให้เห็นว่าการลดขนาดของฟองอากาศลงทำให้ประสิทธิภาพสูงขึ้น การใช้ออกซิเจนของบักเตรีจะแปรผันตามระยะเวลาการหมัก เมื่อปริมาณออกซิเจนลดลงประสิทธิภาพในการหมักจะน้อย และการหมักจะหยุดชะงักเมื่อมีออกซิเจน 4.5 % เมตาโบลิซึมของบักเตรีจะหยุดชะงักเมื่อน้ำส่าหวม beech wood shaving ที่มีบักเตรีเกาะอยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Allgeier และ Hildebrandt (5) รายงานว่า Hromatka, Ebner และ Czoklich ได้ทำการทดลองหยุดให้อากาศแก่เวลาต่าง ๆ กันคือ ตั้งแต่เวลา 15 วินาทีจนถึง 2 นาที และใช้น้ำส่าที่มีความเข้มข้น (G.K.) ประมาณ 9.4 % (G.K. หมายถึง เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์บวกด้วยจำนวนกรัมของกรดใน 100 มิลลิลิตร เช่น G.K. เท่ากับ 9.11 เมื่อกรดน้ำส้มเท่ากับ 0.83 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และแอลกอฮอล์ 8.28 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) พบว่าเมื่อหยุดให้อากาศนาน 60 วินาที จะทำให้เซลบักเตรีตาย 100% แต่ถ้า G.K. ประมาณ 5 % การถูกทำลายจะน้อยลง การที่เซลถูกทำลายเนื่องจากแอลกอฮอล์และกรดน้ำส้มเป็นพิษ ส่วนสารละลายที่เจือจางมาก การหยุดให้อากาศนาน 20 ชั่วโมง 30 นาที เซลยังถูกทำลายไม่หมด ดังนั้นในการปลูกเชื้อจึงใช้อาหารที่มี G.K. ประมาณ 8 % และเพื่อป้องกันการสูญเสียสารระเหยในอุณหภูมิสูง จึงใช้อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมัก สำหรับการให้ออกซิเจนบริสุทธิ์ หรือผสมกับไนโตรเจนในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 ทำให้การหมักช้าลง เนื่องจากเกิด acetaldehyde มาก เกิดกรดน้ำส้มน้อยและการเจริญลดลงในที่สุดหยุดการเจริญ

2.2 การหมักน้ำส้มสายชูโดยวิธี Submerged process

การหมักวิธีนี้ถังหมักจะมีเครื่องปั่นกวนให้เชื้อกระจายทั่วไป และมีการอัดอากาศเข้าไปในลักษณะฟองอากาศ ขนาดของฟองอากาศยิ่งเล็กยิ่งได้ผลดี โดยวิธีนี้เชื้อจะอยู่จมอยู่ใน medium และการหมักจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมาก ใช้เชื้อเริ่มต้นประมาณหนึ่งในสามของถังหมัก

Allgeier และ Hildebrandt (5), Prescott และ Dunn (20) ได้รวบรวมการทดลองทำ น้ำส้มสายชูโดยวิธี submerged process ว่า ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่สองมีการค้นพบวิธีการผลิตเพนนิซิลินโดยวิธี submerged process ทำให้มีผู้ทำการทดลองใช้วิธีนี้ผลิตน้ำส้มสายชูและได้ผลดี จากรายงานเรื่องราวการใช้ continuous deep fermentation (20) โดยใช้เครื่องมือทำจากอเมริกา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สามารถผลิตน้ำส้มสายชูที่มีประสิทธิภาพสูงได้หลายชนิด ความก้าวหน้าที่สำคัญในการทำน้ำส้มสายชูคือ การใช้ submerged process แทนการใช้ generator method

Prescott และ Dunn (20) รายงานว่า Hromatka และ Ebner ได้ทำการทดลองผลิตน้ำส้มสายชูโดยวิธี submerged fermentation ในน้ำส่าที่มีปริมาณแอลกอฮอล์เท่าเดิม เปอร์เซ็นต์กรดน้ำส้มที่ได้สูงขึ้น ระยะเวลาในการหมักเร็วขึ้นประมาณ 30 เท่า

ประโยชน์ที่ได้จาก submerged process (20) คือ

1. ให้ผลผลิตสูงประมาณ 90-95 เปอร์เซ็นต์ โดยทฤษฎี
2. มีประสิทธิภาพสูง (ได้กรดน้ำส้ม 4-6 % หรือมากกว่าในเวลา 24 ชั่วโมง)
3. คุณภาพของน้ำส้มสายชูดี เพราะบักเตรีมากและปะปนอยู่กับน้ำส้มสายชูช่วยให้คุณภาพในระหว่างเก็บดีขึ้น
4. ใช้กับวัตถุดิบได้ง่ายโดยไม่จำเป็นต้องกรอง และทำให้ใสก่อน
5. ใช้กับวัตถุดิบที่มีเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ต่ำได้
6. ไม่สูญเสียกรดน้ำส้มไปในการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบ เนื่องจากไม่ต้องมี packing
7. มีการเปลี่ยนแปลงผลผลิตได้ง่าย
8. ใช้เนื้อที่น้อยและไม่ต้องใช้ packing
9. การถ่ายน้ำส้มสายชูทำได้สะดวกคือ สามารถถ่ายออกได้ทุกวันหรือทุก 2 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แต่ในการทำน้ำส้มสายชูแบบ submerged process จะต้องรักษาระดับแอลกอฮอล์ให้คงอยู่ 0.3 % เพื่อป้องกันการทำลายน้ำส้มสายชู

เนื่องจาก บักเตรีต้องการไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ และคาร์บอนจากแอลกอฮอล์ หรือสารคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ ในการเจริญขั้นต้น (21, 22) สารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจนมีอยู่หลายชนิดเช่น dibasic ammonium phosphate, urea, asparagine, peptone, yeast autolysate โดยเติมลงในอาหารในปริมาณ 1-5 ปอนด์ ต่อ 1000 แกลลอน (28) acetopeptone และ acetozyme ใช้ได้ผลดีที่สุดโดยละลายใน ammonium phosphate Starter mash ประกอบด้วยกรดน้ำส้ม 1.5 % และแอลกอฮอล์ไม่เกิน 10.8 % (5) Shchelkunova (26) ได้กล่าวว่าเกลือฟอสเฟตเป็นตัวช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อน้ำส้ม และการเกิดกรดน้ำส้มให้เร็วขึ้น

Hall และผู้ร่วมงาน (16) ได้รายงานการสังเกตของ Hoyer และ Beijerinck ว่า Acetobacter aceti เจริญได้ดีใน salt ammonium nitrogen medium ที่มี ethanol, acetate เป็นแหล่งของคาร์บอนด้วย นอกจากนี้ยังพบอีกว่า (13, 23) Acetobacter aceti สามารถใช้ inorganic nitrogen เพื่อการเจริญเติบโตเมื่อมี glucose เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน ได้เร็วกว่าเมื่อมี ethanol เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน

Tomlinson และ Campbell (27) รายงานว่า Acetobacter aceti สามารถเจริญได้ในอาหารที่ประกอบด้วย glucose 2 %, yeast extract 0.2 %, pH 6.0 Gibbs และ Shapton (15) รายงานการค้นพบของ Frateur ว่า Acetobacter aceti เจริญได้ดีในอาหารที่ประกอบด้วย glucose 10 %, yeast extract 1 %, $CaCO_3$ 3 %, วุ้น 2 % ที่อุณหภูมิ 30°C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียม Starter และ vinegar stock

ได้เคยมีผู้ทำการทดลองใช้เชื้อบริสุทธิ์ในการหมักน้ำส้มสายชู พบว่าทำได้ยากต้องใช้เชื้อในปริมาณมากซึ่งไม่คุ้มค่าแม้ว่าจะทำได้ ถังหมัก, ถังเก็บ และเครื่องมืออื่น ๆ ไม่สามารถนำมานึ่งฆ่าเชื้อ และการทำงานในสภาพปราศจากเชื้อ (aseptic) ทำได้ยาก ดังนั้นการใช้เชื้อบริสุทธิ์จึงไม่นิยมแพร่หลาย และการค้นคว้าตามโรงงานต่าง ๆ ก็ไม่เป็นที่เปิดเผย (5)

การเริ่มต้นหมักใน submerged fermentation ใช้ส่วนผสมของน้ำส้มสายชูและน้ำส่า แล้วเติมสารอาหารลงไป อุณหภูมิ 30°C การหมักดำเนินไปจนมีแอลกอฮอล์เหลืออยู่ประมาณ 0.4 % (20) หลังจากการหมักสมบูรณ์แล้วเอาน้ำส้มสายชูที่ได้ออกประมาณครึ่งหนึ่ง ที่เหลือเก็บไว้ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในครั้งต่อไป (5)

การเตรียม vinegar stock ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ ถ้าเป็นพวกแป้งจะต้องย่อยให้แป้งกลายเป็นน้ำตาลเสียก่อน โดยใช้เอนไซม์ หรือกรดก็ได้ แต่สำหรับผลไม้แห้งต้องใส่น้ำเพื่อให้น้ำตาลจากผลไม้แห้งละลายออกมา สำหรับวัตถุดิบที่เป็นผลไม้สด เช่น องุ่น ก็ใช้วิธีคั้นเอาน้ำออกมา ส่วนวัตถุดิบที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำตาลสูงเช่น กากน้ำตาล, หรือน้ำผึ้ง ต้องทำให้เจือจาง แต่อย่างไรก็ตามวัตถุดิบจะต้องมีน้ำตาลอย่างน้อย 8 % (28)

การควบคุมการหมักแอลกอฮอล์ มีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะให้ได้ vinegar stock ที่มีกลิ่นและรสดี การหมักในระยะนี้ถ้าหากว่า lactic acid bacteria ปะปนอยู่ บักเตรีนี้จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลกติก และกรดน้ำส้ม ทำให้กลิ่นและรสเสียไป อีกทั้งยังทำให้ยีสต์ชะงักการเจริญเติบโตเมื่อมีปริมาณของกรดมากพอเช่น ถ้าการหมักมีกรดน้ำส้มเกิดขึ้นก่อนไม่ว่าในปริมาณเท่าใดจะทำให้มีน้ำตาลเหลืออยู่มากกว่าปกติ กรดน้ำส้ม 0.5 % ทำให้ปฏิกิริยาของยีสต์ลดลง แต่ถ้ามีกรดน้ำส้มมากกว่านี้จะชะงักขบวนการหมักได้ เมื่อไม่มีแอลกอฮอล์ให้ออกซิไดซ์ เชื้อน้ำส้มสายชูจะใช้น้ำตาลในการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สร้าง gluconic acid หรือ ketogluconic acid แล้วมีผลทำให้กลิ่นและรสเสียไป เช่นเดียวกับผลที่เกิดจาก lactic acid bacteria นอกจากนี้ ตลอดระยะของการหมักแอลกอฮอล์ยังต้องควบคุมการเจริญของ film yeast ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลได้ดีเช่นกัน (28)

การหมัก ethanol จากน้ำตาลจะถูก enzyme invertase และ enzyme zymase ที่ได้จากยีสต์ เปลี่ยนให้เป็น ethanol โดยตรง ดังปฏิกริยา (12, 17)

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \xrightarrow{\text{Invertase}} \underset{\text{glucose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{fructose}}{C_6H_{12}O_6}$$

$$\underset{\text{invert sugar}}{C_6H_{12}O_6} \xrightarrow{\text{Zymase}} \underset{\text{ethanol}}{2CH_3CH_2OH} + 2CO_2$$

นอกจากจะได้ ethanol แล้วยังได้ by-product อื่น ๆ เช่น aldehyde, ester(ethyl acetate), higher alcohol (fusel oils), fatty acid, aromatic compounds และสารตัวอื่น ๆ อีกซึ่งมีปะปนอยู่ในปริมาณน้อยมาก

<u>ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักแอลกอฮอล์ได้แก่</u> (6, 25)

1. <u>Ethanol</u> ความเข้มข้นของ ethanol สูงสุดที่เกิดจากการหมักโดยอาศัยยีสต์ ตั้งแต่ 0-19 % (โดยปริมาตร) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ว่ามีความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทนต่อความเข้มข้นของ ethanol ได้สูงเท่าไร

2. น้ำตาล น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (simple molecules) เช่น glucose, fructose พบว่ายีสต์สามารถนำไปใช้ได้เร็วกว่าน้ำตาลที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่ ๆ เช่น แป้ง, dextrin เนื่องจากยีสต์สามารถนำไปใช้ได้ทันที แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ว่ามีเอนไซม์ที่เหมาะสมกับวัตถุดิบชนิดนั้น ๆ หรือไม่ และขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้นอัตราเร็วของการหมักจะเพิ่มตามไปด้วย เมื่อถึงความเข้มข้นหนึ่งที่มากเกินพอที่ยีสต์จะทนได้จะทำให้อัตราเร็วของการหมัก และการเกิด ethanol ลดลง

3. คาร์บอนไดออกไซด์และความดัน คาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ แต่จะทำให้อัตราเร็วของการหมักเพิ่มขึ้นที่ความดันไม่สูงมากนัก ถ้าความดันของคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นถึง 7.3 บรรยากาศ จะทำให้อัตราเร็วของการหมักช้าลง หรือเกือบไม่มีเลย เมื่อความกัน ของคาร์บอนไดออกไซด์ถึง 8.0 บรรยากาศ

4. ชนิดของสารอาหาร (nutrients) ได้มีนักวิทยาศาสตร์ (12, 14, 24) ทำการศึกษาถึงผลของชนิดและปริมาณของสารอาหารที่ใช้ในการหมักกับยีสต์ในเวลาเท่ากัน พบว่าอาหารที่เติม $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 % และ K_2HPO_4 0.5 % จะช่วยให้ยีสต์ผลิตแอลกอฮอล์ได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับที่ใส่ $(NH_4)_2PHO_4$ 0.5 % หรือ K_2HPO_4 0.5 % เพียงอย่างเดียว

5. ออกซิเจน ยีสต์ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลในขบวนการหายใจ เพื่อทำให้เกิดพลังงาน ดังนั้นในขบวนการหมักแอลกอฮอล์จะเกิดระหว่าง aerobic growth phase (respiration) กับ anaerobic stationary phase (fermentation) สำหรับปริมาณออกซิเจนที่ต้องการจะมากหรือน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดและ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณของยีสต์ ยีสต์บางชนิดเมื่อมีปริมาณของออกซิเจนน้อยจะไปกระตุ้นการหมักให้มากขึ้น แต่บางชนิดอาจไม่ต้องการออกซิเจนในขณะเกิดการหมัก

6. กรดอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดน้ำส้ม, กรดโปรปิโอนิก, กรดบิวทีริก เป็นต้น มีผลต่อการหยุดหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์เช่น ที่ความเข้มข้นของกรดน้ำส้ม 0.1-0.5 %

7. Hydrogen ion concentration ความเป็นกรดของอาหารจะขัดขวางการเจริญของบักเตรี และราตัวอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ แต่ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีระหว่าง pH 3.0-4.5 ซึ่งมีผลให้อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์และอัตราการหมักเพิ่มขึ้น และเกิดได้ดี นักวิทยาศาสตร์ได้ทำการศึกษาถึงผลของการเจริญเติบโตของยีสต์ในอาหารที่มี pH ต่าง ๆ กัน พบว่า pH 4.5 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุด (24)

8. Growth factor ยีสต์ต้องการ Growth factor ในการแบ่งเซล และเจริญเติบโต ส่วนมากเป็นกลุ่มของวิตามิน B-complex เช่น biotin, thiamine, riboflavin, nicotinic acid และ pantothenic acid หน้าที่สำคัญของ thiamine ในรูปของ tiamine phosphate เป็น co-factor ในการเปลี่ยน pyruvic acid ให้กลายเป็น ethanol

9. โลหะ ในพวกเมล็ดธัญพืชเช่น ข้าวจะมีพวกธาตุต่าง ๆ เช่น คัลเซียม, ทองแดง, เหล็ก, มักเนเซียม และแมงกานีส ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ และในขบวนการ metabolism ของ glucose จนได้ alcohol แต่ถ้ามีในปริมาณมากเกินไปก็จะกลายเป็น inhibitor เช่น พวกสารประกอบกำมะถันต่าง ๆ จะทำให้เซลยีสต์แก่เร็ว พวกเหล็ก, อลูมิเนียม, ตะกั่ว, สังกะสี เป็น inhibitor ของการหมักแต่มีผลน้อยมาก สำหรับแคดเมียม, ทองแดง, ปรอท, พัลลาเดียม, ออสเมียม และเงิน จะเป็นตัวที่ทำให้ การหมักเกิดช้ามาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. อุณหภูมิ จะมีผลโดยตรงต่อ activity ของยีสต์ และมีผลทางอ้อมต่อปริมาณ ethanol ซึ่งทำให้ ethanol, aromatic compounds ต่าง ๆ ระเหยได้ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้น แต่อุณหภูมิส่วนมากที่ใช้ในการหมักจะอยู่ระหว่าง 10-35°C ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นมาก ๆ จะทำให้ยีสต์ตาย แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ที่นำมาใช้ในการหมัก อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักที่แตกต่างกันมีผลทำให้ by-product ที่เกิดขึ้นแตกต่างกันด้วย เช่นที่อุณหภูมิต่ำจะเกิดสารพวก volatile-ester, acetaldehyde, isoamyl และ active amyl alcohol ที่มีปริมาณน้อย

Underkofler และ Hickey (28) รายงานการค้นพบของ Cooney และ Emerson ว่าการเจริญของยีสต์จะช้าที่อุณหภูมิต่ำ และจะเร็วที่อุณหภูมิสูงในช่วง 20-30°C อุณหภูมิสูงสุดต่อการเจริญโดยทั่ว ๆ ไปของยีสต์จะอยู่ในช่วง 30-40°C แต่พวก Thermophilic yeast จะเจริญได้ที่ 50°C Rose และ Harrison (25) รายงานว่า Fell และ Phaff พบว่ายีสต์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37°C หรือสูงกว่านี้แต่ก็มีน้อยมาก ส่วน Richards พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ Saccharomyces cerevisiae อยู่ที่ 28°C แต่ While และ Munns พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ Saccharomyces cerevisiae อยู่ที่ 36°C

ในการเลี้ยงยีสต์สิ่งที่ต้องคำนึงถึงก็คือ (24) อาหารที่เป็นแหล่งของคาร์บอน โดยที่ยีสต์ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ เช่น น้ำตาลตามชนิดและปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญซึ่งเป็นน้ำตาล hexose เมื่อน้ำตาล hexose ถูกใช้ไปจะได้คาร์บอนไดออกไซด์ ethanol และพลังงาน เซลได้รับพลังงานในสภาพที่มีอากาศมากกว่าในสภาพที่ไม่มีอากาศจึงทำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลมากกว่าตามมาด้วย

น้ำตาลที่ยีสต์สามารถใช้ได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศเราเรียกว่า fermentable sugar (6, 24) ได้แก่ D-glucose, D-fructose, D-manose,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

galactose, maltose และ raffinose แต่ที่ยีสต์ทุกสายพันธุ์ใช้ได้คือ D-glucose, D-fructose และ D-manose ส่วน sucrose (25) ยีสต์ส่วนมากใช้ได้และใช้ได้ดีเมื่อ pH ของอาหารอยู่ระหว่าง 4-5 แต่น้ำตาลบางชนิดเช่น D-allulose ซึ่งพบในกากน้ำตาล (cane molasses) ไม่ปรากฏว่ายีสต์ชนิดไหนสามารถนำไปใช้ได้ นอกจากน้ำตาลแล้วยังมีสารอื่น ๆ ที่ยีสต์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ (24) เช่น ethanol, acetic acid ซึ่งมีในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยกระตุ้นการเจริญของยีสต์ Candida utilis ได้ดีขึ้น Saccharomyces cerevisiae ใช้ dihydroxyacetone, ketoglutaric acid และ oxaloacetic acid ได้

สำหรับแหล่งของไนโตรเจนมีความสำคัญต่อยีสต์มากอีกชนิดหนึ่ง (25) ซึ่งยีสต์ส่วนใหญ่จะใช้เกลือแอมโมเนียมได้ดีโดยเฉพาะ ammonium sulfate ยีสต์ทุกชนิดสามารถใช้ได้ ส่วน ammonium chloride ยีสต์ใช้ได้ไม่ดีนัก, mono, di, tri ammonium phosphate, urea, ammonium bicarbonate, ammonium acetate, ammonium lactate และ ammonium tartarate ช่วยเพิ่มการเจริญได้ดีเช่นเดียวกัน

Saccharomyces cerevisiae เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อแอลกอฮอล์ (24) (alcohol tolerent) มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาล hexose เพียงอย่างเดียวไปได้เป็น ethanol และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งในทางทฤษฎีได้ผลผลิต 51 และ 49 % โดยน้ำหนัก ตามลำดับ น้ำตาลที่ถูก ferment โดย Saccharomyces cerevisiae ได้แก่ glucose, fructose, manose galactose, sucrose, maltose และ raffinose

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนประกอบที่มีอยู่ในน้ำส้มสายชู

ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำส้มสายชู ขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้เปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ สภาพการผลิตของโรงงานและการเก็บ ทำให้ส่วนประกอบของน้ำส้มสายชูแตกต่างกันออกไป (1) ในขบวนการหมักเริ่มด้วยยีสต์ ซึ่งส่วนมากเป็น Saccharomyces cerevisiae เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์ (20) ดังในสมการ

$$\underset{\text{dextrose}}{C_6H_{12}O_6} \xrightarrow{\text{yeast}} \underset{\text{ethanol}}{C_2H_5OH} + 2CO_2$$

vinegar stock ที่ได้จะประกอบด้วยสารประกอบต่าง ๆ คือ แอลกอฮอล์, น้ำตาลที่เหลืออยู่เล็กน้อย, glycerol, formic acid, acetic acid, acetyl methyl carbinol และสารประกอบอื่น ๆ ที่มีอยู่ในวัตถุดิบที่ใช้เช่น malic acid, tartaric acid, ester, pigment, peptosin, protein และแร่ธาตุ (20, 28) ในขั้นต่อไปก็เป็นขบวนการที่แอลกอฮอล์เปลี่ยนไปเป็นกรดน้ำส้ม โดยอาศัย enzyme oxidase ในขบวนการ oxidation หรือ dehydrogination ซึ่งเกิดจากเชื้อน้ำส้มสายชูโดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับไฮโดรเจน ดังในสมการ (20)

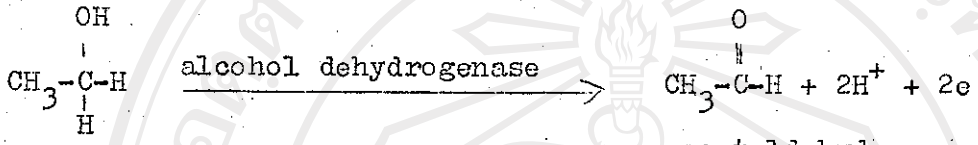
$$\underset{\text{ethanol}}{CH_3CH_2OH} + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow \underset{\text{acetaldehyde}}{CH_3CHO} + H_2O$$

$$CH_3CHO + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow \underset{\text{acetic acid}}{CH_3COOH}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

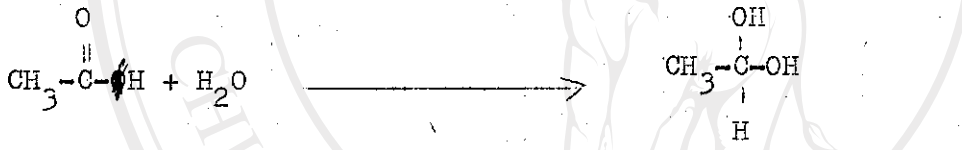
ขบวนการเกิดกรดน้ำส้มมีลำดับขั้นตอนในการเกิดดังในสมการต่อไปนี้ (20, 28)

1. การเกิด acetaldehyde



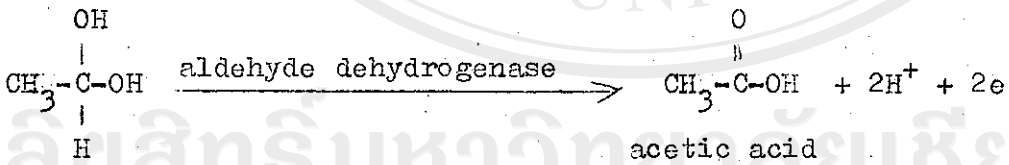
acetaldehyde

2. Hydration ของ acetaldehyde



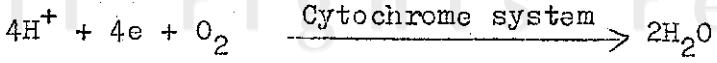
acetaldehyde hydrated acetaldehyde

3. การเกิดกรดน้ำส้ม



acetic acid

4. Electron transfer



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จากรายงานของ Underkofler และ Hickey (28), Pressesst และ Dunn (20) ได้คำนวณผลที่ควรได้โดยทางทฤษฎีทาง Stoichiometry ว่าน้ำตาล 1 กรัม เกิดเป็นแอลกอฮอล์ 0.511 กรัม หรือกรดน้ำส้ม 0.667 กรัม ดังนั้น แอลกอฮอล์ 1 กรัม เกิดเป็นกรดน้ำส้ม 1.304 กรัม ถ้าน้ำตาลถูกเปลี่ยนมาเป็นแอลกอฮอล์ ได้ 90 % และ oxidation ของแอลกอฮอล์เป็นกรดน้ำส้ม 85 % ดังนั้นวัตถุดิบซึ่งมีน้ำตาล 8 กรัม จะให้ผลผลิตเป็นกรดน้ำส้มเท่ากับ 8 x 0.667 x 0.90 x 0.85 เท่ากับ 4.08

เมื่อการหมักเสร็จสิ้นสมบูรณ์แล้ว มักพบสารประกอบอื่น ๆ ที่มีอยู่ในน้ำส้มสายชู (28) คือ aldehyde, ester, acetyl methyl carbinol, glycerol, lactic acid, malic acid และ tartaric acid ซึ่งกรด tartaric acid นี้จะพบในเหล้าองุ่นเท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved