บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

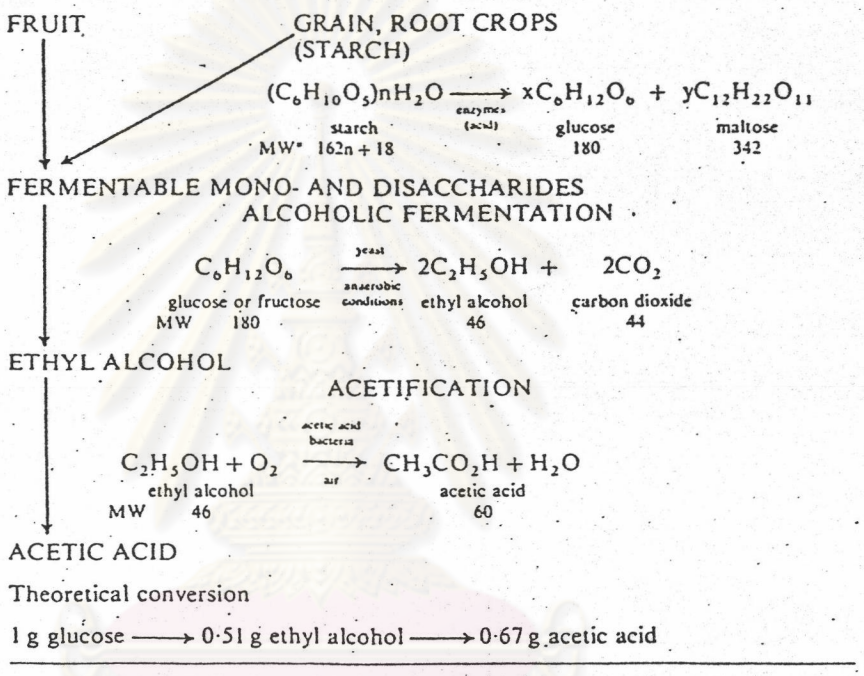
น้ำส้มสายชูเป็นที่รู้จักและนิยมกันมาเป็นเวลายาวนาน ในช่วงเวลาเดียวกับที่มนุษย์รู้จักการทำไวน์ โดยใช้เป็นส่วนผสมอาหารที่มีความสำคัญ คือใช้เป็นเครื่องปรุงรส และเป็นสารที่ช่วยในการถนอมอาหาร มีการกล่าวถึงน้ำส้มสายชูในคัมภีร์ไบเบิลว่าเป็นสารประกอบที่สำคัญในหมู่นักเล่นแร่แปรธาตุ และเป็นยากลางบ้านที่รู้จักกันแพร่หลาย

น้ำส้มสายชู (vinegar) มีรากศัพท์มาจากภาษาฝรั่งเศส vinaigre มีความหมายว่าไวน์ที่มีรสเปรี้ยวหรือมีรสแหลม (sour or sharp wine) (vin = wine, aigre = sour) อาจกล่าวได้อีกว่าน้ำส้มสายชูเป็นผลิตภัณฑ์ที่มาจากการทำให้เกิดกรด (acidification) ขึ้นในสารละลายอัลกอฮอล์ที่ได้จากการใช้น้ำตาลหรือแป้งเป็นวัตถุดิบ คำว่า "vinegar" ได้สูญเสียความหมายดั้งเดิม โดยในสหรัฐอเมริกาหมายถึงผลิตภัณฑ์กรดอะซิติกที่ได้จากการหมักน้ำแอปเปิลเท่านั้น

น้ำส้มสายชูผลิตโดยกระบวนการหมัก 2 ขั้นตอนประกอบด้วย ขั้นตอนที่ 1 เป็นการนำน้ำตาลมาหมักจนถูกเปลี่ยนเป็นเอธานอลโดยใช้ยีสต์ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้สายพันธุ์ Saccharomyces cerevisiae ส่วนในขั้นตอนที่ 2 แบคทีเรียสกุล Acetobacter จะออกซิไดซ์เอธานอลไปเป็นกรดอะซิติก แผนผังการผลิตน้ำส้มสายชูดังแสดงในรูปที่ 2.1

2.1 ต้นกำเนิดของการผลิตน้ำส้มสายชู

การผลิตน้ำส้มสายชูสามารถเกิดขึ้นได้จากการหมักตามธรรมชาติ จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดที่จำเป็นสำหรับการผลิตน้ำส้มสายชูนั้น มีปนอยู่ในวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูตามธรรมชาติและในแต่ละขั้นตอนการหมัก สภาวะแวดล้อมเป็นปัจจัยที่กำหนดการแข่งขันด้านการเจริญของจุลินทรีย์ ในตอนเริ่มแรกของการผลิตเอธานอลโดยยีสต์นั้นต้องใช้สารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 10 น้ำหนักต่อปริมาตรหรือมากกว่านี้ และปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้เหมาะสม ในระหว่างการหมักอัลกอฮอล์ต้องใช้สภาวะที่ไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) ค่าความเป็นกรดเป็นด่างลดลง และค่าความเข้มข้นของเอธานอลเพิ่มขึ้น ในขั้นตอนการนำสารละลายเอธานอลหรือที่เรียกว่าไวน์ไปหมักเพื่อผลิตน้ำส้มสายชูนั้น ต้องการ



Note: *MW = Molecular weight.

รูปที่ 2.1 แผนผังแสดงการผลิตน้ำส้มสายชู

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สภาวะมีออกซิเจน (aerobic condition) เพื่อให้แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกสามารถเจริญเติบโตในช่วงการหมักนี้ ระหว่างนั้นค่าความเป็นกรดเป็นด่างจะลดลงเรื่อย ๆ จนถึง 3 หรือต่ำกว่านั้น ในสภาวะธรรมชาติถ้านำสารอาหาร (substrate) ที่เหมาะสมมาตั้งทิ้งไว้และสัมผัสกับอากาศจะเกิดการหมักตามธรรมชาติได้เป็นเอธานอล และสุดท้ายจะได้น้ำส้มสายชูด้วยเหตุนี้น้ำส้มสายชูจึงได้ถูกค้นพบโดยมนุษย์ตั้งแต่เริ่มแรกก่อนมีการบันทึกตามประวัติศาสตร์

เนื่องจากความสัมพันธ์อันใกล้ชิดระหว่างอัลกอฮอล์กับน้ำส้มสายชู จึงอาจตั้งสมมติฐานได้ว่า ผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิดถูกค้นพบในเวลาเดียวกัน ในปี 1976 Conner และ Allgeier (อ้างถึงใน Adams, 1985) ได้บันทึกไว้ว่า "ยังไม่มีคำบอกความหมายที่แน่นอนในการบอกลักษณะหรือคุณสมบัติของเทอมต่อไปนี้ คือ ไวน์,ไวน์เก่า,ไวน์เปรี้ยว และน้ำส้มสายชู"

การหมักเบียร์และไวน์เป็นที่รู้จักกันดีมาแต่ครั้งอียิปต์โบราณและเมโสโปเตเมีย เป็นเวลาหลายพันปีก่อนคริสตกาล ในเมโสโปเตเมียระหว่าง 3000-2000 ปีก่อนคริสตกาล มีการประมาณว่าร้อยละ 40 ของธัญพืชทั้งหมดถูกใช้ไปในการหมัก เป็นที่รู้กันในอียิปต์ว่าการหมักเบียร์และไวน์ต่อไปนั้นจะทำให้ได้น้ำส้มสายชู และน้ำส้มสายชูของอียิปต์นั้นเป็นที่นิยมกันมากในกรีกและโรมันในเวลาต่อมา ชาวบาบิโลเนียนผลิตน้ำส้มสายชูจากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำเลี้ยงต้นปาล์ม (palm sap), อินทผลัม และมอลท์ ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้ปัจจุบันยังใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูอยู่

ความรู้เกี่ยวกับการผลิตน้ำส้มสายชูและกรรมวิธีการผลิต ได้แพร่กระจายไปสู่ประเทศอื่น ๆ จากตะวันออกกลางและจีน เทคนิคการทำน้ำส้มสายชูในญี่ปุ่นนั้นเชื่อกันว่ามีต้นกำเนิดมาจากจีนโดยมีการนำเข้ามาในช่วงระหว่าง ค.ศ. 369-404 น้ำส้มสายชูเป็นที่รู้จักกันในประเทศอังกฤษในช่วงทศวรรษแรกก่อนคริสตกาล โดยนำเข้ามาโดยชาวเซลท์ (Celts) ที่อยู่ระหว่างชายฝั่งแอตแลนติคของประเทศฝรั่งเศส เป็นไปได้ที่การผลิตน้ำส้มสายชูจากมอลท์ในอังกฤษนั้นเริ่มในสมัยโรมัน แต่รากศัพท์ของคำว่า "น้ำส้มสายชู (vinegar)" นั้นมาจาก vinaigre (Fr. sour wine คือไวน์เปรี้ยว) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าประเทศที่เป็นถิ่นกำเนิดนั้นคือประเทศฝรั่งเศส

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู

แต่เดิมนั้นผู้ผลิตน้ำส้มสายชูได้สั่งซื้ออัลกอฮอล์สำรองแบบเป็นครั้ง จากผู้ผลิตอัลกอฮอล์เพื่อใช้ในการผลิตเป็นน้ำส้มสายชู ต่อมาได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตโดยผู้ผลิตน้ำส้มสายชูได้ผลิตอัลกอฮอล์ใช้เอง เนื่องจากกระบวนการหมักทั้งสองมีความคล้ายคลึงกันมาก

วิธีการเตรียมสารละลายน้ำตาลเพื่อใช้ในการหมักอัลกอฮอล์นั้น ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ซึ่งต้องสนองความต้องการหลักคือ อัลกอฮอล์และน้ำส้มสายชูซึ่งผลิตได้ต้องมีคุณภาพเป็นที่น่าพอใจ และคุ้มค่าในเชิงเศรษฐศาสตร์ วัตถุดิบที่มีปริมาณน้ำตาลต่ำจะถูกนำมาใช้บางโอกาสเท่านั้น เนื่องจากความยากลำบากในการเก็บและการทำให้สารละลายน้ำตาลเข้มข้นขึ้น อย่างไรก็ตาม สามารถนำเอาเทคนิคการออสโมซิสแบบย้อนกลับ (reverse osmosis) ซึ่งเป็นเทคนิคเพิ่มความเข้มข้นของน้ำผลไม้ที่ช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าเทคนิคดั้งเดิมอื่น ๆ มาใช้ประกอบในกรณีที่ต้องผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำผลไม้เจือจาง

ส่วนวัตถุดิบที่มีปริมาณน้ำตาลสูงซึ่งมีความเหมาะสม เช่น กากน้ำตาล, น้ำเชื่อมจากข้าวโพด (corn syrup) และน้ำผึ้ง ในขั้นตอนหมักอัลกอฮอล์ต้องนำไปเจือจางด้วยน้ำเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสม (โดยทั่วไปอยู่ในช่วงร้อยละ 10-15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และเพื่อเป็นการลดอัตราการติดเชื้อ ต้องปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของวัตถุดิบให้มีค่าอยู่ในช่วง 4.5-5.0 โดยใช้กรดซัลฟุริก และการพาสเจอไรซ์เข้ามาช่วย

การคั้นน้ำผลไม้จากผลไม้ส่วนใหญ่ (เช่น แอปเปิล และองุ่น) ต้องมีการสับและบดคั้นผลไม้นั้น อาจมีการเติมเอนไซม์เพคติโนไลติค (pectinolytic enzymes) ลงไปในผลไม้ที่คั้นเนื่องจากการทำลายเพคตินของผลไม้ไปบางส่วนช่วยทำให้สะดวกต่อการคั้นและทำให้ได้ปริมาณน้ำผลไม้เพิ่มขึ้น (Rombouts และ Pilnik, 1980 อ้างถึงใน Adams, 1985) ในการเตรียมน้ำส้มสายชูจากกล้วยนั้นมีทำการเติมเอนไซม์เพคติโนไลติคลงในน้ำกล้วย แต่การแยกของเหลวออกทำได้ยากจนกว่าการหมักอัลกอฮอล์สิ้นสุดลง เช่นเดียวกับการผลิตน้ำส้มสายชูจากข้าว (Adams, 1978 อ้างถึงใน Adams, 1985)

วัตถุดิบจำพวกแป้ง เช่น เมล็ดธัญพืชต่าง ๆ จำเป็นต้องเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลเสียก่อน โดยการใช้ไฮโดรไลซิสด้วยกรด (acid hydrolysis) หรือใช้เอนไซม์ที่ย่อยแป้ง (starch-degrading enzyme) กระบวนการเปลี่ยนแป้งในอุตสาหกรรมรวมทั้งการผลิตอัลกอฮอล์จากธัญพืชเพื่อทำน้ำส้มสายชูกลั่นปัจจุบันยังนิยมใช้อะไมเลสเข้มข้น (2-amylase) และอะไมโลกูลโคซิเดส (amyloglucosidase)

ตารางที่ 2.1 แสดงวัตถุดิบต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู

ตารางที่ 2.1 แสดงวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู

Raw material	*Reference(s)*
Apple (Cider)	Lamb & Wilson (1923), Lawyer (1928), LeFevre (1924), Hallack (1921), Nagarathnama (1964), Vandecaveye (1926)
Banana	Adams (1978, 1980), Benon (1972), Eggebrecht (1939), von Loesecke (1929)
Banana skins	Cerasari & Botteri (1953)
Cashew apples	Adams (1980), Maldonado *et al.* (1975), Nagarathnama *et al.* (1964)
Cocoa sweatings	Adams *et al.* (1982)
Coconut water	Diokno-Pato & Vilela (1967)
Coffee pulp	Freise (1931)
Dates	Das & Sarin (1936), Samiullah & Ara (1969)
Ethanol	Arnstein (1923), Wustenfeld (1923)
Honey	Fabian (1929)
Jack-fruit	Datta & Biswas (1942)
Jamun	Datta & Biswas (1942), Virmani (1950)
Kaki (persimmon)	Cauda (1924), Junior & Aquarone (1981), Kim *et al.* (1980), LeFevre (1924)
Malt	Greenshields (1975a, b), Hassack (1929), White (1970)
Mango	Adams (1980), Beerh *et al.* (1976)
Maple products	LeFevre (1924)
Milk (whey)	Bean (1928), Hadorn & Zürcher (1973), Kosikowski (1979)
Molasses	Arnstein (1923), Hansford & Martin (1943)
Oranges	Maldonado *et al.* (1975), McNary & Dougherty (1960), Poore (1920)
Palm saps	
Buri	Robillos (1978)
Coconut	Anon. (1971), Nathanael (1952a, 1952b, 1958)
Nipa	Florenzani & Balloni (1969), Paivoke *et al.* (1982), Adriano & Banzon (1933)
Palmyrah	Varma (1959)
Peach	LeFevre (1924), Wyant (1919)
Pears	LeFevre (1924)
Pineapple	Anon. (1973), Maldonado *et al.* (1975), Richardson (1967), Spurgin (1964)
Prickly pear	Juritz (1920)
Prune	Wyant (1919)
Rice	Kuroiwa (1977), Masai (1980)
Sugar cane juice	Datta & Biswas (1942)
Sweet potatoes	Tsukahara & Nakamura (1946, 1950)
Tamarind	Maldonado *et al.* (1975)
Tea	DeSilva & Saravanapavan (1968)
Tomato	Wyant (1919)
Watermelon	Khattak *et al.* (1965a, b)
Wine	Hoffman (1926), Llaguno (1971)

2.3 การหมักอัลกอฮอล์

โดยทั่วไปยีสต์ที่ใช้ในการหมักอัลกอฮอล์มักใช้สายพันธุ์ Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus โดยใช้เชื้อหมักเริ่มต้น (starter) ในอัตราร้อยละ 2-10 โดยปริมาตร และเป็นการหมักแบบเป็นครั้ง (batch) การเปลี่ยนเฮกโซส (hexose) ให้เป็นเอธานอลสามารถแสดงในรูปสมการเคมีดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

เฮกโซส	เอทธานอล	คาร์บอนไดออกไซด์
180 กรัม	92 กรัม	88 กรัม

เนื่องจากการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นอัลกอฮอล์โดยใช้ยีสต์นั้น น้ำตาลบางส่วนถูกใช้ไปในรูปของพลังงาน บางส่วนถูกนำไปสร้างเซลยีสต์ หรือผลิตเป็นกลีเซอรอล และกรดซัคซินิค (succinic acid) ทำให้ปริมาณเอธานอลที่ผลิตได้น้อยลง ตามทฤษฎีแล้วได้ผลผลิต (theoretical yield) ร้อยละ 95 และในทางปฏิบัติจะได้ผลผลิต (practical yield) ร้อยละ 90 ของที่แสดงตามสมการ

ในขั้นตอนการหมักอัลกอฮอล์นี้จำเป็นต้องอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ เนื่องจากถ้าเกิดการหมักกรดอะซิติกขึ้นในขณะหมักอัลกอฮอล์แล้ว จะไปยับยั้งการทำงานของยีสต์ และทำให้การหมักอัลกอฮอล์ยุติลงในขณะที่ยังเหลือน้ำตาลที่ไม่ถูกหมักในปริมาณมาก โดยพบว่าความเข้มข้นของกรดอะซิติกเพียงร้อยละ 0.5 สามารถทำให้ประสิทธิภาพของยีสต์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกจะไปออกซิไดซ์อัลกอฮอล์ให้หายไป และยังเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดกลูโคนิคหรือคีโตกลูโคนิคและโพลีแซคคาไรด์ ทำให้เกิดรสชาดผิดปกติขึ้นในไวน์ เช่นเดียวกับแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติคจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดอะซิติกและกรดแลคติค นอกจากนี้ยังทำให้กลิ่นและรสชาดของไวน์ผิดปกติด้วย เพื่อลดปัญหาปนเปื้อนในขั้นตอนผลิตอัลกอฮอล์มักใช้วิธีเติมเชื้อยีสต์ที่มีความว่องไวลงไปในปริมาณสูงมากในตอนเริ่มต้นของการหมัก

การหมักอัลกอฮอล์นั้นสามารถดำเนินไปได้โดยไม่ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิการหมัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าทำการหมักในถังหมักขนาดเล็ก (small vessel) อุณหภูมิหมักที่เหมาะสมประมาณ 30 องศาเซลเซียส ในกรณีถังหมักมีขนาดใหญ่จำเป็นต้องมีการควบคุมอุณหภูมิหมักโดยใช้ขดหล่อเย็น (cooling coil) และเครื่องแลกเปลี่ยนความร้อนจากภายนอกหรือใช้น้ำฉีดพ่นที่รอบนอกของถังหมัก การวัดความคืบหน้าของการหมักทำได้โดยการวัดอัตราการเกิดกาซ

คาร์บอนไดออกไซด์ และวัดปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่โดยใช้บอลลิงหรือบริกซ์ไฮโดรมิเตอร์ (balling หรือ brix hydrometer) แต่ส่วนใหญ่นิยมวัดปริมาณอัลกอฮอล์ในน้ำหมักโดยใช้อีบูลลิโอมิเตอร์ (ebulliometer) โดยทั่วไปการหมักอัลกอฮอล์ยังคงหมักแบบเป็นครั้งนั้น การหมักจนเสร็จสมบูรณ์ต้องการระยะเวลาไม่แน่นอน แต่ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 48-72 ชั่วโมง

บางครั้งอาจใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ในการควบคุมแบคทีเรียที่ไม่ต้องการระหว่างการหมักอัลกอฮอล์ และต้องระวังว่าต้องกำจัดสารนี้ออกไปให้หมดก่อนนำสารละลายอัลกอฮอล์ไปหมักน้ำส้มสายชูต่อ เนื่องจากซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เหลืออยู่เป็นอันตรายต่อแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก การเก็บสารละลายอัลกอฮอล์เป็นเวลานาน หรือการผสมสารละลายอัลกอฮอล์ที่ไม่ผ่านการบำบัดมักจะเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ (free SO_2) และสามารถกำจัดสารดังกล่าวได้โดยการให้อากาศอย่างรุนแรง หรืออาจเติมสารเคมีเพื่อทำให้เกิดการจับตัว (binding) หรือทำให้เกิดออกซิเดชัน ซึ่งเป็นวิธีที่สะอาดและรวดเร็ว ในการใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ควรใช้อย่างประหยัด เพียง 100 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ก็สามารถป้องกันการเจริญของแบคทีเรียได้ (Vaughn, 1954)

เมื่อการหมักเสร็จสมบูรณ์แล้ว จำเป็นต้องกำจัดเซลยีสต์และวัสดุของแข็งที่กระจัดกระจายในน้ำหมักออกโดยการตกตะกอน สารละลายอัลกอฮอล์ที่ได้ถูกเก็บไว้เพื่อให้เกิดความเสถียร (stabilization) แล้วนำไปบ่ม (aging) หรือนำไปหมักกรดอะซิติกโดยตรง

ในการเก็บรักษาสารละลายอัลกอฮอล์ต้องเก็บในสภาวะไร้อากาศ เนื่องจากถ้าเก็บไว้ในที่เปิดอาจเกิดการสูญเสียอัลกอฮอล์โดยการระเหยและการเมตาบอลิซึมของยีสต์ นอกจากนี้อาจเกิดการออกซิเดชันทางเคมีซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนสี และเกิดการปนเปื้อนเนื่องจากแมลงวันน้ำส้มหรือแมลงอื่น ๆ มาตอม วิธีที่ดีที่สุดในการป้องกันไม่ให้สารละลายอัลกอฮอล์สัมผัสกับแบคทีเรียสร้างกรดแลคติคคือ ทำให้สารละลายอัลกอฮอล์เปลี่ยนสภาพไป โดยการเติมน้ำส้มสายชูจนได้สารละลายที่มีกรดอะซิติกร้อยละ 1 ก็เพียงพอที่จะควบคุมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติค หรืออาจเติมสารซัลเฟอร์ไดออกไซด์ดังได้กล่าวมาแล้ว

น้ำที่ใช้ในการเตรียมน้ำหมักจะต้องสะอาด, ไม่มีสี, ไม่มีกลิ่น, ปราศจากการเจือปนของจุลินทรีย์ และไม่มีอนุภาคใด ๆ แขวนลอยหรือตกตะกอนอยู่ และต้องปราศจากคลอรีน, โอโซน หรือสารประกอบเคมีอื่น ๆ ที่ก่ออันตรายจากยีสต์ (Ebner และ Follmann,1982)

ส่วนใหญ่ถ้าใช้วัตถุดิบตามธรรมชาติไม่จำเป็นต้องเติมสารอาหารเสริมพิเศษ อย่างไรก็ตามน้ำแอปเปิลมักมีสารประกอบไนโตรเจนน้อย ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยเติม 100 กรัมแอมโมเนียมฟอสเฟตต่อน้ำหมัก 1000 ลิตร ไวน์องุ่นบางอย่างต้องเติมแอมโมเนียมฟอสเฟตสูงถึง 400 กรัมเพื่อให้เกิดการหมักที่เหมาะสม มีการพัฒนาสูตรสารอาหารเสริมในกรณีที่ต้องการ

ผลิตน้ำส้มสายชูที่มีกรดอะซิติกสูงกว่าร้อยละ 12 เนื่องจากแบคทีเรียสร้างกรดอะซิติกต้องการกลูโคส 500-1000 กรัม ต่อน้ำหมัก 1000 ลิตร โดยต้องเติมสารอาหารรวม 300 กรัม ซึ่งได้แก่ โปแตสเซียม, โซเดียม, แมกนีเซียม, แคลเซียม, แอมโมเนียมในรูปฟอสเฟต, ซัลเฟต และเกลือคลอไรด์ และเติมเกลือแร่อีกเล็กน้อย (trace mineral) ได้แก่ เหล็ก, แมงกานีส, โคบอลท์, ทองแดง, โมลิบดีนัม, วาเนเดียม, สังกะสี การเติมสารเหล่านี้ต้องให้เพียงพอต่อความต้องการของการหมักกรดอะซิติก

ในเชิงการค้ามีการเติมสารเพิ่มเติม เช่น ยีสต์แห้งหรือยีสต์สกัด (yeast extract) เพื่อเร่งให้เกิดการหมักอีกครั้ง (restart) เร็วขึ้นเมื่อการหมักต้องหยุดชงักไปเพราะถูกรบกวน เช่น พลังงานที่ป้อนเข้ามาไม่เพียงพอ ปริมาณยีสต์ที่เพิ่มเข้าไปต้องต่ำกว่า 200 กรัมต่อน้ำหมัก 100 ลิตร ปริมาณสารอาหารเสริมที่กล่าวถึงข้างต้นจำเป็นสำหรับระบบหมักน้ำส้มสายชูที่ผลิตด้วยกระบวนการหมักแบบซับเมิร์จ (submerged fermentation process) สำหรับกระบวนการหมักแบบทริคกลิง (trickling process) ต้องการสารอาหารดังกล่าวเพียง 1/3 เท่านั้น ตามทฤษฎีแล้วต้องเติมสารอาหารอย่างประหยัดโดยพยายามหาปริมาณที่ต้องการใช้น้อยที่สุด โดยทั่วไปสารอาหารเสริมในการหมักน้ำส้มสายชูประกอบด้วยกลูโคส,แอมโมเนียม, ไนโตรเจน, ฟอสเฟตอนินทรีย์, กำมะถัน, แคลเซียม และวิตามิน สารอาหารผสมที่ขายทั่วไปในท้องตลาดจะใช้ชื่อการค้า เช่น Acetozym (Fring, FR Germany) และ Aceto-pep (Industrial Alcohol Co., USA) (Beaman, 1969 อ้างถึงใน Adams, 1985)

2.4 การหมักกรดอะซิติก

การหมักกรดอะซิติกเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชันเอธานอลโดยแบคทีเรีย เพื่อผลิตกรดอะซิติก และน้ำ สามารถเขียนแสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้เป็นสมการเคมีดังนี้

$$C_2H_5OH + O_2 \longrightarrow CH_3COOH + H_2O$$

เอทธานอล	ออกซิเจน	กรดอะซิติก	น้ำ
46 กรัม	32 กรัม	60 กรัม	18 กรัม

จากการคำนวณผลผลิตโดยการดุลสมการ (stoichiometric yeild) พบว่า เฮกโซส (หรือกลูโคส) 1 กรัมจะให้อัลกอฮอล์ 0.511 กรัมหรือกรดอะซิติก 0.677 กรัม และอัลกอฮอล์ 1 กรัม จะให้กรดอะซิติก 1.304 กรัม จากหนังสือบางเล่มพบว่าการเปลี่ยน

รวม (overall conversion) ของน้ำตาล 1 กรัมจะได้กรดอะซิติกอยู่ในช่วง 0.5-0.55 กรัมหรือเท่ากับร้อยละ 75-82.5 ในขณะที่การเปลี่ยนทางอุตสาหกรรม (industrial conversion) จากน้ำตาลไปเป็นอัลกอฮอล์จะสูงถึงร้อยละ 85-90 ตามทฤษฎี

ในทางปฏิบัติจะตั้งสมมติฐานว่าอัลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute alcohol) 1 มิลลิลิตร จะให้กรดอะซิติก 1 กรัมโดยการเกิดออกซิเดชันในเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ หรืออาจตั้งสมมติฐานว่าอัลกอฮอล์บริสุทธิ์ 1 กรัมจะให้กรดอะซิติก 1.26 กรัม โดยการเกิดออกซิเดชันทางชีววิทยา มีการบันทึกว่าประสิทธิภาพจะต่ำกว่าร้อยละ (1.26/1.304)x100 = 96.5

ในอุตสาหกรรมเกิดการเปลี่ยนอัลกอฮอล์ 1 กรัมไปเป็นกรดอะซิติก 1 กรัม ซึ่งมีประสิทธิภาพร้อยละ (1.0/1.304)x100 = 76.6 แต่ถ้ามีการหมักแบบต่อเนื่องจะได้ผลผลิตร้อยละ (1.1/1.304)x100 = 84.4 ถ้าการเปลี่ยนจากน้ำตาลไปเป็นอัลกอฮอล์เป็นร้อยละ 90 และการเปลี่ยนอัลกอฮอล์ไปเป็นกรดอะซิติกเท่ากับร้อยละ 85 ดังนั้นถ้ามีน้ำตาล 8 กรัมจะได้กรดอะซิติกเท่ากับ 8x0.667x0.9x0.85 = 4.08 กรัม แต่อย่างไรก็ตามบางกรณีการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นอัลกอฮอล์เท่ากับร้อยละ 85 ดังนั้นจะได้กรดอะซิติกเท่ากับ 8x0.667 x0.85x0.85 = 3.84 กรัม ด้วยเหตุนี้ถ้ามีน้ำตาลเพียงร้อยละ 8 จำเป็นต้องควบคุมประสิทธิภาพการเปลี่ยนให้ได้ตามที่กำหนด จึงจะได้ปริมาณกรดอะซิติกตามที่กฎหมายกำหนด (Vaughn, 1954)

จากสมการจะเห็นว่าเอธานอล 1 ลิตร จะให้กรดอะซิติก 1.036 กิโลกรัม และน้ำ 0.313 กิโลกรัม ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีปริมาตรเพิ่มขึ้นจากเดิมเล็กน้อย อยู่ในช่วงร้อยละ 1-3 ซึ่งหมายความว่า สารละลายเอธานอลร้อยละ 1 จะให้กรดอะซิติกประมาณร้อยละ 1 ความสัมพันธ์ดังกล่าวใช้ได้กับเอธานอลที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 9.2 นั่นคือถ้าปราศจากการสูญหายของเอธานอลเนื่องจากการระเหยหรือการเกิดออกซิเดชันมากเกินไปแล้ว ผลรวมของความเข้มข้นของเอธานอล (โดยปริมาตร) และกรดอะซิติก (น้ำหนักโดยปริมาตร) ซึ่งรวมเรียกว่าความเข้มข้นรวม หรือ G.K. (เยอรมัน Gesammte konzentration) จะมีค่าคงที่ตลอดการหมักกรดอะซิติก

ดังนั้นค่า G.K. yield ก็คือ G.K. ของน้ำส้มสายชูที่ผลิตได้ต่อ G.K.ของสารละลายอัลกอฮอล์ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู

อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการคำนวณผลผลิตของกรดที่ได้ (acid yield) ซึ่งก็คือการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดอะซิติกในระหว่างการหมัก จะมีค่าเท่ากับ ปริมาณความเข้มข้นของกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูต่อความเข้มข้นของอัลกอฮอล์ในน้ำหมักเริ่มต้น (Hromatka และ Ebner,1959 อ้างถึงใน Adams,1985) ค่า acid yield นี้จะมีค่าต่ำกว่า G.K. yield

เสมอ เนื่องจากไม่มีการนำเอาปริมาณอัลกอฮอล์ที่เหลืออยู่ในน้ำส้มสายชูมาคำนวณด้วย

การออกซิไดซ์อัลกอฮอล์ไปเป็นกรดอะซิติกเป็นปฏิกิริยาคายความร้อน (exothermic reaction) โดยจะปลดปล่อยความร้อนออกมาประมาณ 8.4 เมกกะจูลต่อเอธานอล 1 ลิตร ที่ถูกออกซิไดซ์ แต่ในทางปฏิบัติความร้อนที่เกิดจากการเกิดกรดอะซิติกจะต่ำกว่านี้ เนื่องจากพลังงานส่วนหนึ่งถูกใช้ไปในการผลิตเซลและใช้ไปในการเผาผลาญภายในเซล (ประมาณ 23 เมกกะจูลต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง) (Pirt,1978 อ้างถึงใน Adams,1985) ค่าคอร์เรคชันแฟคเตอร์ (correction factor) จะแตกต่างไปขึ้นอยู่กับวิธีการหมัก และวัตถุดิบที่ใช้

จากสมการจะเห็นว่า มีการใช้ออกซิเจนซึ่งป้อนเข้าไปในรูปของอากาศ เนื่องจากออกซิเจนสามารถละลายในน้ำหมักได้เพียงเล็กน้อย (8.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และลดน้อยลงกว่านี้ถ้าอุณหภูมิของตัวถูกละลายเพิ่มขึ้น) การมีออกซิเจนอย่างเพียงพอจัดเป็นปัจจัยที่ควบคุมอัตราเร็ว (rate limiting factor) ของปฏิกิริยาการเกิดกรดอะซิติก ปริมาณการถ่ายโอนมวลของออกซิเจนจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับเทคนิคที่ใช้

2.5 กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู

กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กระบวนการหลัก ๆ คือ

1. กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเชื้อเจริญที่บริเวณผิวหน้า (surface culture acetification)
2. กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบทริคกลิง (trickling process)
3. กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบซับเมิร์จ (submerged culture acetification)

2.5.1 กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเชื้อเจริญที่ผิวหน้า

การเจริญของแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกในถังหมักเปิด พบว่าเกิดฟิล์มของแบคทีเรียขึ้นปกคลุมบริเวณผิวหน้าของสารละลายอัลกอฮอล์ ซึ่งฟิล์มดังกล่าวจะทำหน้าที่เปลี่ยนอัลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก หรือน้ำส้มสายชูนั่นเอง

Cruess (1958 อ้างถึงใน Adams, 1985) ได้คิดวิธีผลิตน้ำส้มสายชูที่เรียกว่า "กระบวนการแบบเลท-อโลน (Let-alone process)" โดยบรรจุสารละลายที่มีอัลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบลงในถังแต่ไม่บรรจุเต็ม เพื่อให้มีอากาศอยู่ในถังด้วย แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เกิดกรดอะซิติกตามธรรมชาติขึ้นเอง กระบวนการดังกล่าวนี้ผลิตแบบเป็นครั้ง (batch)

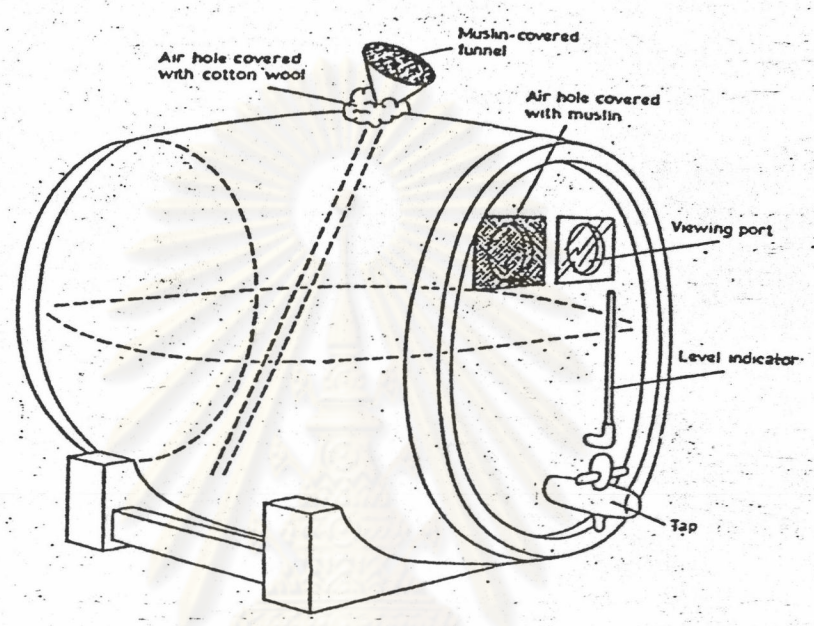
ดังนั้นจึงต้องทิ้งช่วงระยะเวลายาวเพื่อให้เกิดฟิล์มของแบคทีเรียเป็นครั้ง ๆ ไป ซึ่งทำให้สิ้นเปลืองสารอาหาร และใช้เวลายาวนาน นอกจากนั้นยังต้องมีการล้างทำความสะอาด และมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนในขณะที่เติมเชื้อลงไป

ต่อมาได้มีการปรับปรุงกระบวนการดังกล่าวโดยใช้วิธีเติม Acetobacter ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเดิม โดยใช้ถังสำหรับหมักกรดอะซิติกนั้นเป็นแหล่งเชื้อไปด้วย แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกจะเกาะติดอยู่ตามผนังถัง และแขวนลอยอยู่ในน้ำส้มสายชูที่เหลืออยู่จากการหมักครั้งก่อน ซึ่งสามารถใช้แบคทีเรียเหล่านี้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักครั้งต่อไป เนื่องจากไม่มีการตรวจวัดความคืบหน้าของการหมักที่ดำเนินไปเรื่อย ๆ จึงทำให้การเกิดกรดไม่สมบูรณ์ โดยมีอัลกอฮอล์จำนวนหนึ่งเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ วิธีปรับปรุงอีกวิธีคือ อาจเติมเชื้อ Acetobacter ที่ยังไม่ผ่านการพาสเจอไรซ์ลงไปในปริมาณมาก ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไปในบ้านเรือน และใช้ในเชิงการค้าในประเทศปากีสถาน และบางส่วนในประเทศญี่ปุ่นอีกด้วย

การล่าช้าและการสูญเสียสารอาหาร อันเนื่องมาจากการสร้างฟิล์มบริเวณผิวหน้าของแบคทีเรียในแต่ละครั้ง สามารถแก้ไขได้โดยใช้เทคนิคแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous technique) ซึ่งรู้จักกันในนามของ "กระบวนการแบบออร์ลีน (Orlean process)" หรือ "กระบวนการแบบฝรั่งเศส (French process)" ซึ่งเป็นวิธีที่เก่าแก่ และได้รับการยอมรับว่าเป็นกระบวนการที่ดีที่สุดในการผลิตน้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพดีที่สุด โดยใช้น้ำหมักที่มีอัลกอฮอล์เติมลงไปในถังโดยให้เหลือที่ว่างในถังส่วนหนึ่ง แล้วปล่อยให้เกิดกรดอะซิติกจนกระทั่งถึงจุดที่กำหนดไว้ โดยการวัดปริมาณอัลกอฮอล์ที่เหลืออยู่หรือวัดค่า G.K. จากนั้นทำการถ่ายน้ำส้มสายชูออกไปบางส่วน แล้วเติมน้ำหมักใหม่ลงไป แล้วเริ่มกระบวนการหมักใหม่อีกครั้งหนึ่ง น้ำหมักจะเข้าสู่ถังทางท่อที่ต่อทางด้านบนของถังหมัก ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ได้ถูกปล่อยออกทางด้านล่าง (ดังแสดงในรูปที่ 2.2) วิธีการดังกล่าวนี้ช่วยให้การเติมน้ำหมักใหม่เข้าไปในถังนั้นไม่ไปรบกวนฟิล์มที่เกิดบริเวณผิวหน้า รูต่าง ๆ ถูกปิดด้วยผ้าขาวบาง เพื่อป้องกันไม่ให้แมลงเข้าไป และเจาะรูอยู่เหนือระดับของเหลวเพื่อให้เกิดการไหลเวียนของอากาศ

เนื่องจากกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูดังกล่าวต้องใช้ระยะเวลายาวนานถึง 1-3 เดือนหรือนานกว่านี้ ดังนั้นน้ำส้มสายชูที่ได้จึงมีเอสเทอร์ หรือเอธิลอะซิเตตในปริมาณที่มากกว่าน้ำส้มสายชูที่ผลิตด้วยกระบวนการอื่น ๆ เมื่อใช้สารละลายอัลกอฮอล์ปริมาณเท่ากัน

ปัจจุบันนี้น้ำส้มสายชูในโลก มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ผลิตด้วยกระบวนการแบบออร์ลีนแม้ว่าเป็นวิธีที่ให้น้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพดีก็ตาม ในศตวรรษที่ 19 ได้มีการผลิตน้ำส้มสายชูในเชิงการค้าโดยใช้กระบวนการแบบออร์ลีน ถังหมักที่ใช้มีความจุ 50-100 แกลลอน วางอยู่บนกรอบไม้ที่แข็งแรง ถังดังกล่าวเรียงอยู่เป็นแถว ๆ และปล่อยทิ้งไว้ให้เกิดกรดอะซิติก



รูปที่ 2.2 การผลิตกรดอะซิติกโดยกระบวนการแบบออร์ลีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในที่ที่มีอากาศถ่ายเทได้สะดวก โดยบรรจุน้ำส้มสายชูลงในถังหมักเพียง 1/3 และจะเติมไวน์ลงไป 2.5 แกลลอนทุก ๆ 8 วัน ปล่อยไว้ให้เกิดกรดอะซิติกเมื่อมีน้ำหมักอยู่ 1/2 ของถัง แล้วทำการถ่ายน้ำหมักออก 1/3 ของน้ำหมักที่มีอยู่ทั้งหมด จากนั้นทำการเติมไวน์เพิ่มลงไปทดแทน วิธีดังกล่าวสามารถดำเนินอยู่ได้ไปเรื่อย ๆ นานถึง 25 ปี และต้องหยุดทำความสะอาดทุก ๆ 6-8 ปีต่อครั้ง

ได้มีการดัดแปลงกระบวนการดังกล่าวหลายวิธี โดยการพัฒนาเพื่อให้ได้ฟิล์มของแบคทีเรียที่ให้กรดอะซิติกในปริมาณมาก โดยการเพิ่มพื้นที่ผิวในการออกซิไดซ์ ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติก ในญี่ปุ่นมีการใช้เทคนิคการผลิตกรดอะซิติกแบบผิวต่อเนื่อง (continuous surface acetification technique) หลายวิธีด้วยกัน (Masai, 1980 อ้างถึงใน Adams, 1985) เช่น ให้น้ำหมักไหลผ่านถาดที่เรียงต่อกันเป็นอนุกรม ด้วยอัตราการไหลที่คงที่และไม่ทำลายฟิล์มของแบคทีเรีย เป็นต้น

กระบวนการแบบออร์ลีนสามารถผลิตน้ำส้มสายชูได้ 1/2 ของปริมาตรถังหมักต่อเดือน โดยน้ำส้มสายชูที่ได้มี G.K. สูงถึงร้อยละ 94 หรือมากกว่านั้น โดยวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่ง่าย ใช้อุปกรณ์ที่มีราคาถูก การผลิตกรดอะซิติกในปริมาณมากหรือน้อยขึ้นกับขนาดและจำนวนถังหมักที่เลือกใช้ เนื่องจากอัตราการเกิดกรดอะซิติกในกระบวนการดังกล่าวช้ามาก ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องใช้น้ำหล่อเย็น การใช้พลังงานจัดได้ว่าต่ำมาก อย่างไรก็ตาม กระบวนการผลิตวิธีนี้ต้องการพื้นที่สูง และต้องการแรงงานมากกว่าวิธีอื่น ๆ ซึ่งจะได้กล่าวถึงต่อไป กระบวนการหมักน้ำส้มสายชูแบบเชื้อเจริญที่ผิวหน้าจึงยังนิยมใช้ในประเทศกำลังพัฒนา ซึ่งราคาที่ดินไม่สูงนักและค่าแรงงานยังต่ำอยู่

2.5.2 กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบทริคกลิง

กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบทริคกลิง หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่ากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็ว (quick vinegar process) ซึ่งให้อัตราการผลิตกรดอะซิติกเร็วกว่ากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเชื้อเจริญที่ผิวหน้า เนื่องจากมีการเพิ่มพื้นที่ผิวของฟิล์มแบคทีเรีย มีการเพิ่มการให้ออกซิเจนแก่น้ำหมัก และเช่นเดียวกับกระบวนการแบบออร์ลีนนั่นคือเซลแบคทีเรียส่วนใหญ่จะอยู่ในเครื่องหมักในลักษณะเกาะเป็นเมือก ดังนั้นจึงสามารถลดระยะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในช่วงแลกเฟส (lag phase)

กระบวนการดังกล่าวยังเป็นที่รู้จักกันในชื่ออื่น ๆ อีก เช่น กระบวนการแบบเจนเนอเรเตอร์ (Generator process) หรือกระบวนการแบบเยอรมัน (German process) เป็นต้น วิธีการดังกล่าวถูกนำไปใช้ในเยอรมันตั้งแต่ปี 1832 โดย Schuzenbach

017450

และถูกนำไปใช้ในฝรั่งเศสตั้งแต่ปี 1670 ปัจจุบันกระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่นิยมกันอย่างแพร่หลายในการผลิตน้ำส้มสายชูเชิงการค้า

เครื่องหมักที่ใช้ในกระบวนการดังกล่าวนิยมเรียกว่า เจนเนอเรเตอร์ (generator) ซึ่งถูกออกแบบให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสมากที่สุดระหว่างเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก, สารละลายอัลกอฮอล์ และอากาศที่ให้กับเชื้อแบคทีเรีย เพื่อให้การออกซิไดซ์อัลกอฮอล์ไปเป็นกรดอะซิติกเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว การออกซิเดชันอัลกอฮอล์เกิดโดยหยดของเหลวเล็ก ๆ ของสารละลายอัลกอฮอล์ซึ่งถูกโปรยลงบนวัสดุบรรจุ (ได้แก่ ไม้บีชที่แล่เป็นชิ้นบาง ๆ, โค้ก ฯลฯ) ไหลลงไปทางด้านล่าง สัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียที่อยู่บนผิวของวัสดุบรรจุ และมีสภาพเหมาะสมสำหรับออกซิไดซ์อัลกอฮอล์อย่างรวดเร็ว การเกิดกรดอะซิติกจะเกิดขึ้นทันทีและเป็นไปอย่างรวดเร็วทั่วพื้นที่ผิวของวัสดุบรรจุ จึงเป็นที่มาของคำว่ากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็วที่ใช้แทนคำว่ากระบวนการแบบเจนเนอเรเตอร์ได้

เครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ มีลักษณะเป็นถังไม้รูปทรงกระบอกขนาดใหญ่ และเรียวลงเล็กน้อยเป็นรูปโคนทางตอนล่าง ไม้ที่นิยมใช้สร้างเป็นเครื่องหมักแบบนี้ได้แก่ Dregon fir, Louisiana cypress และ California redwood ภายในถังสามารถแยกออกได้เป็น 3 ตอน ตอนบนเป็นหัวกระจายน้ำหมักเพื่อให้แน่ใจว่าสารละลายอัลกอฮอล์กระจายไปทั่วบนผิววัสดุบรรจุ ตอนกลางบรรจุไม้บีชชิ้นบาง ๆ, โค้ก, ถ่านไม้, ตะกร้าเล็ก ๆ ที่สานจากหวาย, มัดหวาย, เยื่อไม้, ซังข้าวโพด, ก้านอ่อน, วัสดุเซรามิก หรือวัสดุอื่น ๆ ที่สามารถเพิ่มพื้นที่ผิวให้มาก ๆ ส่วนตอนล่างเป็นที่เก็บน้ำส้มสายชู และมีช่องให้อากาศผ่านเข้ามาได้

เกณฑ์ในการเลือกใช้วัสดุบรรจุ ต้องพิจารณาถึงราคาและความสามารถหาได้ (availability) เป็นสำคัญ กำลังการผลิต (productivity) ของเครื่องหมักแบบนี้ขึ้นกับปริมาณวัสดุบรรจุที่ใช้ ซึ่งโดยทั่วไปสามารถผลิตกรดอะซิติก 2-5 กิโลกรัมต่อลบ.เมตรวัสดุบรรจุต่อวัน นอกจากนี้วัสดุบรรจุที่ใช้ต้องไม่ทำให้น้ำส้มสายชูเกิดกลิ่นและรสที่ไม่พึงปรารถนา ก่อนที่นำวัสดุบรรจุมาใช้ต้องล้างด้วยน้ำ จากนั้นล้างด้วยน้ำส้มสายชู

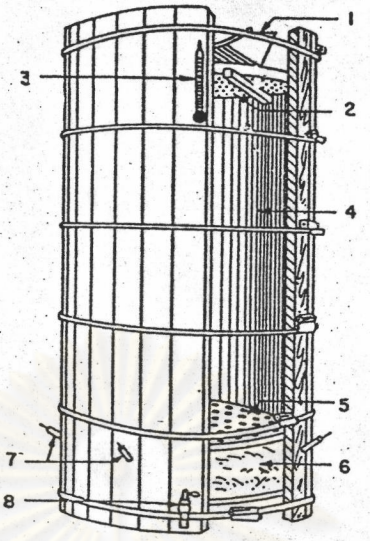
การทำงานของระบบหมักแบบนี้ สารละลายอัลกอฮอล์ถูกพ่นโปรยกระจายลงบนวัสดุบรรจุเป็นพัก ๆ ในปริมาณน้อยแต่คงที่ โดยอาศัยช่องสำหรับให้น้ำไหลผ่านหรือหัวใช้พรมโปรยที่หมุนไปรอบ ๆ โดยอัตโนมัติทางด้านบน ถ้าสารละลายอัลกอฮอล์ไหลอย่างต่อเนื่องลงมาเป็นสายจะทำให้ประสิทธิภาพลดลง เนื่องจากเชื้อที่เกาะอยู่บนผิววัสดุบรรจุต้องทำงานหนักเกินไป

ออกซิเจนซึ่งเป็นสิ่งสำคัญสำหรับแบคทีเรีย จะผ่านเข้ามาทางรูเจาะด้านข้างทางตอนล่างของเครื่องหมักในรูปของอากาศ อากาศจะลอยตัวขึ้นข้างบนผ่านวัสดุบรรจุและผ่านออกทางช่องว่างด้านบน เป็นที่แน่ใจว่าอากาศลอยตัวขึ้นด้านบนเนื่องจากได้รับความร้อนที่คายมาจากปฏิกิริยาการเกิดเป็นกรดของสารละลายอัลกอฮอล์ที่บริเวณตอนกลางของเครื่องหมัก

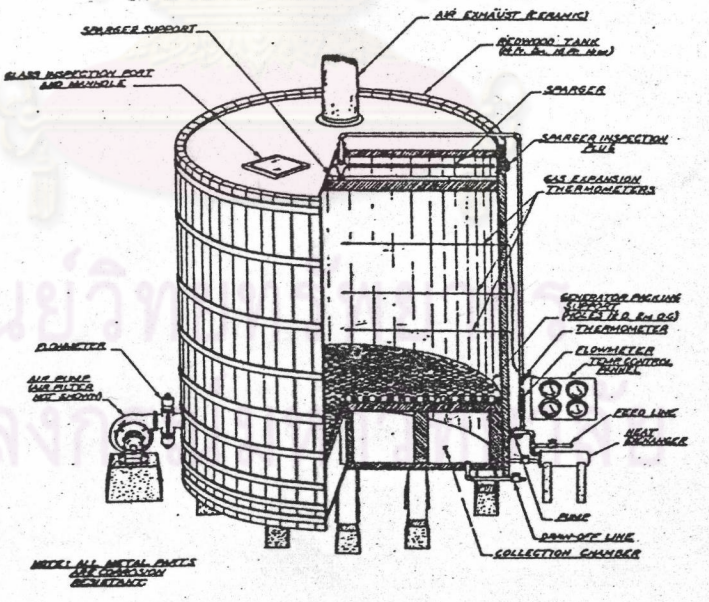
อุณหภูมิของเครื่องหมักต้องได้รับการควบคุมอย่างระมัดระวัง ในเจนเนอเรเตอร์แบบง่าย (simple generator ดังแสดงในรูปที่ 2.3) อุณหภูมิถูกควบคุมโดยการปรับอัตราการไหลลงมาของสารละลายอัลกอฮอล์ และปริมาณอากาศที่ไหลสวนทางขึ้นไปทางด้านบนผ่านวัสดุบรรจุซึ่งจะต้องได้สมดุลย์กันซึ่งทำให้ได้อุณหภูมิอยู่ที่ประมาณ 80-85 องศาฟาเรนไฮต์ ในเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ชนิดที่มีการไหลเวียนของน้ำหมัก (recirculating-type generator) ซึ่งเป็นระบบปิดและมีขนาดใหญ่ (ดังแสดงในรูปที่ 2.4 และ 2.5) อากาศจะถูกปั๊มผ่านเครื่องหมักในอัตราที่ไม่ค่อยคงที่ อุณหภูมิจึงถูกควบคุมโดยการหล่อเย็นสารละลายอัลกอฮอล์ ในสหรัฐอเมริกาและเยอรมันเครื่องหมักดังกล่าวจะมีอุณหภูมิประมาณ 80 องศาฟาเรนไฮต์ แต่ไม่เกิน 90 องศาฟาเรนไฮต์ ในอังกฤษเครื่องหมักดังกล่าวมีอุณหภูมิสูงถึง 105-110 องศาฟาเรนไฮต์ สำหรับการปฏิบัติงานที่เหมาะสม

ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมามีการใช้เครื่องหมักแบบฟริงซ์ (Frings generator) (ดังแสดงในรูปที่ 2.6) ซึ่งแก้ไขปัญหาการควบคุมอุณหภูมิแบบอัตโนมัติภายในคอลัมน์ที่บรรจุวัสดุบรรจุดังนี้ น้ำหมักจะถูกปั๊มอย่างต่อเนื่องจากห้องเก็บของเครื่องหมัก (collection chamber of fermenter) ผ่านเครื่องแลกเปลี่ยนความร้อนโปรยลงบนวัสดุบรรจุ น้ำหมักถูกทำให้เย็นโดยอัตโนมัติจนมีอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเมื่ออัตราการหมักสูง ๆ อุณหภูมิจะถูกลดลงเหลือ 26 องศาเซลเซียส ส่วนอากาศถูกเป่าเข้าสู่คอลัมน์ทางด้านล่าง เมื่อใช้ไม้บีชชิ้นบาง ๆ เป็นวัสดุบรรจุเครื่องหมักสามารถรับอัตราการป้อนเอธานอลสูงถึง 5 ลิตร/ลบ.เมตรวัสดุบรรจุกำลังการผลิตขึ้นอยู่กับอายุของวัสดุบรรจุและมีค่าระหว่างร้อยละ 85-90

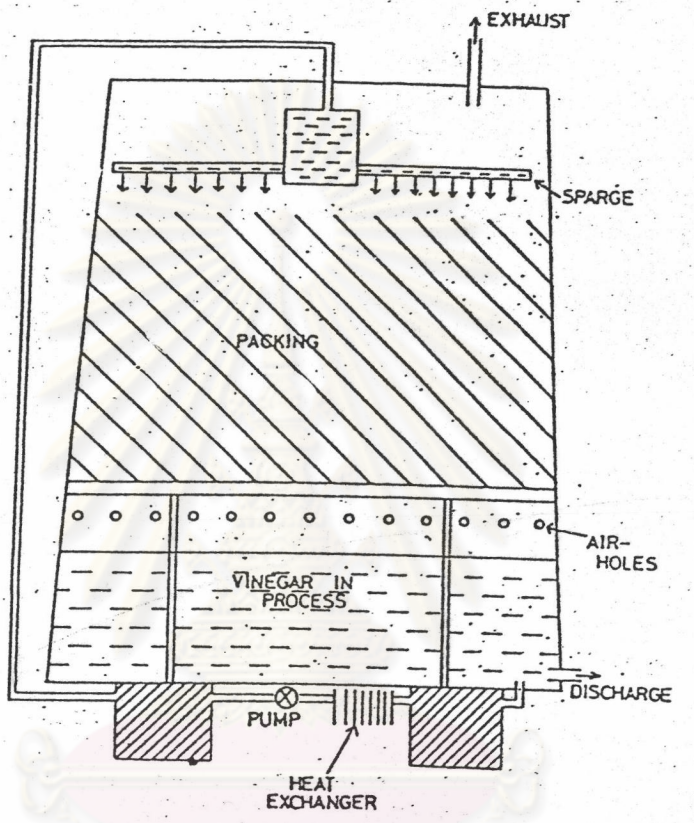
สำหรับการควบคุมอากาศและอุณหภูมิสามารถพิจารณาได้โดยอาศัยมวลสารสัมพันธ์ (stoichiometric relationship) ที่เกี่ยวข้องในการออกซิเดชันและความร้อนในการออกซิเดชันอัลกอฮอล์ไปเป็นกรดอะซิติก ปริมาณอากาศที่ต้องการและความร้อนที่เกิดจากการออกซิเดชันแสดงโดยเริ่มจากสารละลายอัลกอฮอล์ปริมาณ 1 แกลลอนที่มีอัลกอฮอล์ร้อยละ 11 โดยปริมาตรซึ่งเทียบเท่ากับร้อยละ 8.83 โดยน้ำหนัก ดังนั้นสารละลายอัลกอฮอล์ 1 แกลลอนจะมี 0.0883x3785x0.985 = 329.11 กรัมอัลกอฮอล์ เมื่อเปลี่ยนอัลกอฮอล์ไปเป็นกรดอะซิติกจะต้องใช้ออกซิเจน 329.11x(64/92) = 228.93 กรัม ซึ่งเท่ากับ 288.93/32 = 7.15 โมลออกซิเจน หรือเท่ากับ 7.15x22.4 = 160.16 ลิตรออกซิเจน เนื่องจากอากาศ



รูปที่ 2.3 เจนเนอเรเตอร์ผลิตน้ำส้มสายชูอย่างง่าย

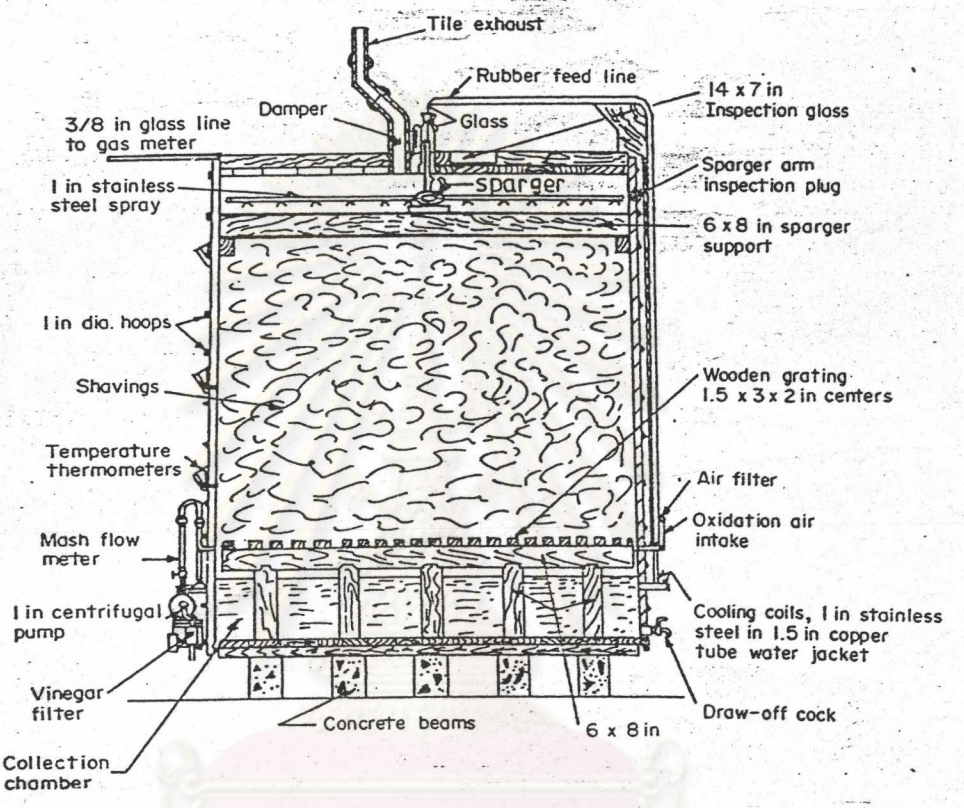


รูปที่ 2.4 เจนเนอเรเตอร์ผลิตน้ำส้มสายชูแบบหมุนเวียน



รูปที่ 2.5 เจนเนอเรเตอร์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.6 เจนเนอเรเตอร์ของฟริงซ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มีออกซิเจนอยู่ 1/5 ดังนั้นคิดเป็นอากาศ 160.16x5 = 800.8 ลิตร หรือ 800.8x0.0353 = 28.27 ลบ.ฟุตอากาศ เพื่อใช้ในการออกซิไดซ์อัลกอฮอล์ในสารละลายอัลกอฮอล์ 1 แกลลอน หรืออาจเขียนได้อีกอย่างหนึ่งว่าการออกซิเดชันเอธานอล 1 ลิตร ต้องใช้ออกซิเจน 43 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่เนื่องจากมีออกซิเจนอยู่เพียงร้อยละ 20 ในอากาศ ดังนั้นจึงต้องป้อนอากาศเข้าไป 10 เท่า อัตราการไหลของอากาศประมาณ 0.8-0.9 ลบ.เมตรต่อชม. ต่อลบ.เมตรของวัสดุบรรจุจึงจะเพียงพอ (Nickol,1979 อ้างถึงใน Adams,1985) ในทางปฏิบัติจะกำหนดให้ปริมาณอากาศที่ต้องการควรเป็น 2 เท่าของการคำนวณได้ เพื่อให้มั่นใจว่าปริมาณออกซิเจนในอากาศไม่เพียงพอกับความต้องการของแบคทีเรียในเครื่องหมักนี้

ในปี 1948 Cruess (อ้างถึงใน Vaughn, 1954) พบว่า 1 โมลของอัลกอฮอล์จะปลดปล่อยความร้อนออกมาระหว่างการเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก 115 คาลอรี ซึ่งเทียบกับ 115/46 = 2.5 คาลอรีต่อกรัมอัลกอฮอล์ ในสารละลายอัลกอฮอล์ 1 แกลลอนมีอัลกอฮอล์ 329.11 กรัม ดังนั้นจะให้ความร้อนออกมาระหว่างเกิดเป็นน้ำส้มสายชูเท่ากับ 329.11x2.5 = 822.78 คาลอรีหรือคิดเป็น 822.78x3.9685 = 3265.2 บีทียู เนื่องจากอุณหภูมิของเครื่องหมักที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 80-90 องศาฟาเรนไฮต์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการระบายความร้อนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา

อัลกอฮอล์และกรดอะซิติกจำนวนมาก สูญเสียไปในกระบวนการหมักแบบเร็ว ส่วนในกระบวนการแบบออร์ลีน Bioletti (1921 อ้างถึงใน Vaughn, 1954) พบว่ามีการระเหยของอัลกอฮอล์สูงประมาณร้อยละ 10 โดยปกติมีอัลกอฮอล์หลงเหลืออยู่ในน้ำส้มสายชูในปริมาณเล็กน้อย (ประมาณร้อยละ 0.5) เนื่องจากเป็นการไม่คุ้มค่าถ้าต้องการออกซิไดซ์อัลกอฮอล์ทั้งหมด ปริมาณอัลกอฮอล์และกรดอะซิติกบางส่วนสูญเสียโดยเกิดการออกซิเดชันอย่างสมบูรณ์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ และบางส่วนถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเอง นอกจากนี้บางส่วนยังหายไปจากผลของปฏิกิริยาข้างเคียง (side reaction) การสูญเสียเหล่านี้อาจลดลงได้โดยการควบคุมอุณหภูมิและอากาศที่ป้อนเข้าสู่เครื่องหมัก

ก. ความสามารถในการผลิตของเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์

จากข้อมูลที่ตีพิมพ์โดย Hydraulic Press Manufacturing Co. (1919 อ้างถึงใน Vaughn, 1954) พบว่าเครื่องหมักที่มีวัสดุบรรจุ 1 บุชเชล (bushel) สามารถผลิตน้ำส้มสายชูร้อยละ 6 ได้ 0.25 แกลลอนต่อวัน โดย 1 บุชเชลเท่ากับ 1.24 ลบ.ฟุตวัสดุบรรจุ ดังนั้นความสามารถในการผลิตน้ำส้มสายชูร้อยละ 6 ของวัสดุบรรจุ 1 ลบ.ฟุต เท่ากับ 0.25x(1/1.24) = 0.20 แกลลอนต่อวัน ซึ่งจะเห็นว่ามีค่าต่ำ แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถที่จะทำนายการทำงานของเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ได้ จนกว่าปฏิบัติงานจริง

ดังนั้นโดยทั่วไปจะกล่าวว่าวัสดุบรรจุ 1 ลบ.ฟุตสามารถผลิตน้ำส้มสายชูร้อยละ 6 ได้ 0.2-0.3 แกลลอนต่อวัน

เครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ที่ใช้มีหลายขนาด ขนาดเล็กที่สุดที่ใช้ในเชิงการค้ามีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-5 ฟุต สูง 8 ฟุต ในขณะที่ขนาดใหญ่ที่สุดมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 14-18 ฟุต และสูง 16-20 ฟุต

ข. การเพาะเชื้อในเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์

จากที่กล่าวมาแล้วว่า จำเป็นต้องนำวัสดุบรรจุไปล้างด้วยน้ำร้อนแล้วแช่ไว้ในน้ำส้มสายชูเพื่อให้แน่ใจว่ากำจัดกลิ่นและรสออกหมดแล้วก่อนนำมาใช้งาน เครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์นั้นจำเป็นต้องเพาะเชื้อ (seed) แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก ซึ่งโดยทั่วไปให้ใช้น้ำส้มสายชูสดที่ยังไม่ผ่านการพาสเจอไรซ์และยังไม่ผ่านการกรอง และพิสูจน์แล้วว่ามีประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกสูงอยู่ ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าน้ำส้มสายชูสดนี้ยังมีแบคทีเรียที่ต้องการอยู่ น้ำส้มสายชูสดนี้จะถูกนำมาไหลเวียนอย่างช้า ๆ ผ่านเครื่องหมักนาน 8-12 ชั่วโมง ในวันที่ 2 จึงเติมอัลกอฮอล์ลงในน้ำส้มสายชูจนมีอัลกอฮอล์ร้อยละ 2-3 จากนั้นให้ของเหลวไหลเวียนอย่างช้า ๆ อีกนาน 8-12 ชั่วโมง หลังจากนั้นปิดเครื่องหมักลดอากาศลงจนแบคทีเรียทวีปริมาณบนพื้นที่ผิวของวัสดุบรรจุ เมื่ออุณหภูมิภายในเครื่องหมักเพิ่มขึ้นจึงเริ่มเดินเครื่องอีกครั้ง อีกวิธีหนึ่งคือใช้น้ำส้มสายชูสดยังไม่พาสเจอไรซ์และมีอัลกอฮอล์อยู่ร้อยละ 2-3 จากนั้นนำไปไหลเวียนผ่านเครื่องหมักอย่างช้า ๆ ลดอากาศลงจนอุณหภูมิเพิ่มขึ้น แสดงว่าเครื่องหมักมีเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการแล้ว การเติมเชื้อในเครื่องหมักใช้เวลาประมาณ 7-10 วัน การเติมเชื้อในเครื่องหมักน้ำส้มสายชูจากน้ำแอปเปิลหรือไวน์ทำได้ง่ายกว่าในเครื่องหมักน้ำส้มสายชูกลั่น เนื่องจากน้ำส้มสายชูกลั่นเป็นสารสังเคราะห์และไม่มีสารอาหารตามธรรมชาติ (ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย) จึงต่างจากน้ำส้มสายชูจากไวน์หรือน้ำแอปเปิลซึ่งมีสารอาหารต่าง ๆ อยู่มากเพียงพอ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์พวกไนโตรเจนในกรณีที่นำน้ำส้มสายชูกลั่นมาใช้ในการเริ่มเพาะเชื้อแบคทีเรียในเครื่องหมัก

เนื่องจากการนำแบคทีเรียสร้างกรดอะซิติกที่เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์มาใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูเป็นสิ่งที่ไม่เหมาะสมและไม่คุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ แม้ว่าได้มีการกล่าวสรุปในบทความต่าง ๆ ว่าเป็นสิ่งที่ควรใช้ก็ตาม นอกจากนี้เครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์, ถังเก็บ และอุปกรณ์ไม้ต่าง ๆ ไม่สามารถพาสเจอไรซ์ จึงไม่สามารถใช้งานภายใต้สภาวะปลอดเชื้อได้จริง ๆ ดังนั้นเทคนิคการใช้สายพันธุ์บริสุทธิ์และอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเชื้อเริ่มต้นจึงเป็นสิ่งที่ไม่คุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์

การเติมเชื้อหมักเริ่มต้นโดยการเติมเชื้อ Acetobacter สายพันธุ์ที่ต้องการในปริมาณสูงมาก ๆ จะเป็นวิธีที่เหมาะสมในการควบคุมประชากรแบคทีเรียในกระบวนการแบบออร์ลีน ตัวอย่างเช่นการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ เมื่อใช้สารละลายอัลกอฮอล์ที่ไม่ผ่านการพาสเจอไรซ์มาเติมเชื้อ วิธีการนี้ไม่ต้องใช้สายพันธุ์บริสุทธิ์ เพียงแต่มีสายพันธุ์ที่ต้องการในปริมาณมากตอนเริ่มต้นเท่านั้น

ค. การควบคุมเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์

เมื่อเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ถูกเติมเชื้อแล้ว การปฏิบัติงานขึ้นกับการออกแบบว่าเป็นเครื่องหมักแบบไม่มีการหมุนเวียน (one-run generator) หรือแบบมีการหมุนเวียน (recirculating generator) ทำงานร่วมกับเครื่องหมักตัวอื่น ๆ

กระบวนการหมักแบบไม่มีการหมุนเวียน เป็นการผ่านของผสมของสารละลายอัลกอฮอล์และน้ำส้มสายชูเข้าไปในเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ สารละลายอัลกอฮอล์ที่ใช้ต้องมีการเติมกรดโดยใช้น้ำส้มสายชู เพื่อให้มีความเข้มข้นของกรดร้อยละ 3-3.5 และเกิดกรดเพิ่มขึ้นจนได้เป็นน้ำส้มสายชูมีความเข้มข้นของกรดประมาณร้อยละ 6

ในกระบวนการแบบแทนเดม (tandem process) นั้น สารละลายอัลกอฮอล์ไหลผ่านเครื่องหมักตัวหนึ่งเพื่อให้เกิดเป็นกรดบางส่วน การเกิดกรดจะเพิ่มสูงขึ้นอีกเมื่อผ่านสารละลายอัลกอฮอล์ที่ถูกออกซิไดซ์บางส่วนไปสู่เครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ตัวที่ 2 หรือตัวที่ 3 ต่อไป

ในกระบวนการแบบที่มีการหมุนเวียนนั้น สารละลายอัลกอฮอล์ถูกปั๊มผ่านวัสดุบรรจุไปเรื่อย ๆ จนอัลกอฮอล์ถูกออกซิไดซ์เป็นกรดอะซิติกตามต้องการ สารละลายอัลกอฮอล์ที่ใช้ในเครื่องหมักแบบแทนเดมหรือเครื่องหมักที่มีการหมุนเวียน จะมีการปรับปริมาณกรดโดยใช้น้ำส้มสายชูจนมีปริมาณกรดร้อยละ 1 หรือจะใช้โดยไม่มีการปรับกรดก็ได้

ความคิดเกี่ยวกับการนำสารละลายอัลกอฮอล์มาไหลเวียนผ่านเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์มีมาอย่างน้อย 125 ปีแล้ว ต่อมาเป็นที่นิยมกันมากขึ้นเนื่องจากมีประโยชน์คุ้มค่าเชิงเศรษฐศาสตร์หลายประการ กล่าวคือมีค่าใช้จ่ายต่ำ นอกจากนี้การควบคุมระบบหมักไม่ยุ่งยากและประหยัดพื้นที่ อุณหภูมิของอากาศภายนอกไม่มีผลต่อเครื่องหมักดังกล่าว เนื่องจากมีการใช้สารละลายอัลกอฮอล์มาหล่อเย็นเครื่องหมักด้วย ดังนั้นจึงเป็นการผลิตน้ำส้มสายชูที่สภาวะคงที่และมีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากไม่มีผลจากอุณหภูมิ นอกจากนี้ยังไม่มีการสะสมของฟองอันเกิดจากอัลกอฮอล์, อะเซทาลดีไฮด์ และกรดอะซิติก เนื่องจากเครื่องหมักดังกล่าวเป็นระบบปิด อากาศภายนอกเข้ามาไม่ได้และมีช่องระบายอากาศออกไปสู่บรรยากาศภายนอกแทน การไม่มีฟองนี้มีประโยชน์ในแง่ความสะอาดเนื่องจากแมลงวันน้ำส้มสายชู (vinegar flies)ไม่

ถูกดึงดูดให้มาในบริเวณนั้น

น้ำส้มสายชูจากน้ำแอปเปิลและจากไวน์ รวมทั้งน้ำส้มสายชูกลั่นสามารถผลิตได้ในเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ที่มีการหมุนเวียน ความจริงแล้วน้ำส้มสายชูจากน้ำแอปเปิลและจากไวน์ผลิตในเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ได้ง่ายกว่าน้ำส้มสายชูกลั่น อย่างไรก็ตามปัญหาการอุดตันของอันเกิดจาก Acetobacter xylinum พบมากในเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำแอปเปิลและจากไวน์มากกว่าที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูกลั่น เนื่องจากสารอาหารที่ Acetobacter xylinum ต้องการมีอยู่ในสารละลายอัลกอฮอล์ของน้ำส้มสายชูจากน้ำแอปเปิลและจากไวน์มากมาย ในรูปของสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่ซับซ้อน และอัลกอฮอล์หรือสารคาร์โบไฮเดรต เพื่อใช้ผลิตเซลลูโลสเมมเบรนที่เป็นเมือกหนา ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาหารอุดตันในเครื่องหมักได้

ในกรณีทั่วไปพบว่า เครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำแอปเปิลหรือจากไวน์สามารถทำงานได้ยาวนานประมาณ 6 เดือน แต่ถ้ามีการควบคุมดูแลอย่างดีเครื่องหมักที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูดังกล่าวสามารถปฏิบัติงานได้อย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพสูงเป็นเวลานานถึง 1 ปี ก่อนที่การเกิดเมือกหนาจนอุดตันภายในเครื่องหมักอย่างรุนแรง การแก้ไขปัญหาการเกิดเมือกหนาสามารถกระทำได้โดยใช้สารละลายอัลกอฮอล์ที่มีอัลกอฮอล์เพียงพอในการผลิตน้ำส้มสายชูที่มีกรดอะซิติกสูงถึงร้อยละ 10 อย่างไรก็ตามแบคทีเรียชนิดนี้กระจายอยู่กว้างขวางในอุตสาหกรรม ผู้ผลิตส่วนมากจึงไม่พยายามกำจัด A. xylinum ออกจากเครื่องหมัก แต่หันมาเลือกใช้วัสดุบรรจุที่ไม่ถูกทำลายง่ายและราคาไม่แพง เมื่อเครื่องหมักเกิดการอุดตันจนไม่คุ้มค่าที่จะปฏิบัติงานแล้วก็นำวัสดุบรรจุออกมาทำความสะอาด ดังนั้นโค้ก, มัดหวาย และซังข้าวโพดจึงเป็นวัสดุบรรจุที่นิยมใช้กันทั่วไปในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ ส่วนน้ำส้มสายชูกลั่นไม่เกิดการอุดตันดังนั้นจึงนิยมใช้ไม้บีชแผ่นบาง ๆ ซึ่งสามารถปฏิบัติงานได้เป็นเวลานาน โดยไม่เกิดการอุดตันจากเมือกที่ผลิตโดย A. xylinum อย่างไรก็ตามผู้ผลิตน้ำส้มสายชูกลั่นมักมีปัญหาจากแบคทีเรียประเภทอื่น ๆ ที่มาปนเปื้อน ตามที่กล่าวมาแล้วว่าน้ำส้มสายชูกลั่นแทบไม่มีสารอาหารเลย อัลกอฮอล์ที่ใช้ถูกกฎหมายกำหนดให้แปลงสภาพไปเป็นเอธิลอะซิเตต หรือน้ำส้มสายชูกลั่น ถ้าอัลกอฮอล์นั้นไม่ได้ผลิตโดยกระบวนการระเหยต้องถูกนำมาเจือจางด้วยน้ำก่อนเพื่อเตรียมเป็นสารละลายอัลกอฮอล์ การออกซิไดซ์สารละลายอัลกอฮอล์ดังกล่าวจำเป็นต้องเติมสารอาหารที่ช่วยในการเจริญเติบโต และกิจกรรมการออกซิไดซ์ของแบคทีเรีย สารอาหารที่จำเป็นได้แก่ สารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ของไนโตรเจน รวมทั้งไดเบสิก แอมโมเนียมฟอสเฟต, ยูเรีย, แอสพาราจิน, เพนโตส, ยีสต์ออโตไลเซส และสารประกอบอื่น ๆ ที่เป็นอาหารของแบคทีเรีย ผู้ผลิตส่วนใหญ่นิยมใช้สารดังกล่าวมากกว่าการที่

จะพัฒนาหาสูตรอาหารของตนเองขึ้นมา สารอาหารของแบคทีเรียที่นิยมเติมลงในสารละลายอัลกอฮอล์ของน้ำส้มสายชูกลั่นจะเติมในอัตราส่วนเข้มข้น 1-5 ปอนด์ต่อ 1000 แกลลอน

มักพบว่าเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูกลั่นปฏิบัติงานไม่เต็มกำลังการผลิต เนื่องจากแบคทีเรียทำงานไม่เหมาะสม แม้ว่าสภาวะทางฟิสิกส์และเคมีมีความเหมาะสมสำหรับแบคทีเรียก็ตาม เมื่อปรากฏเหตุการณ์เช่นนี้เกิดขึ้นควรทำการตรวจสอบเครื่องหมักอีกครั้ง และเอาใจใส่ต่อปัจจัยทุกอย่างที่มีผลต่อการทำกิจกรรมของแบคทีเรีย ถ้าไม่พบสิ่งผิดปกติก็ควรทำการเพิ่มประสิทธิภาพของเครื่องหมักอีกครั้งโดยการเติมเชื้ออีกครั้งหนึ่ง (reseeding) (Vaughn, 1954)

จากการศึกษาปัจจัยที่มีต่อประสิทธิภาพการทำงานของเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูกลั่น พบว่าตัวแปรต่าง ๆ เช่น องค์ประกอบของสารละลายอัลกอฮอล์, ปริมาณคลอรีนและความบริสุทธิ์ของน้ำกลั่น, สารอาหารที่ใช้, ปัจจัยที่ใช้ในการปรับปรุงกลิ่น และสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำส้มสายชูจะช่วยเพิ่มกำลังการผลิตและปรับปรุงคุณภาพน้ำส้มสายชู โดยน้ำที่ดีต้องมีปริมาณของแข็ง, ความกระด้าง และปริมาณคลอไรด์น้อย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าปริมาณโลหะที่พบในสารละลายอัลกอฮอล์ไม่มีผลต่อการลดประสิทธิภาพการเกิดกรดอะซิติกในเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์

ปกติแล้วกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็วจะทำงานแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยการเติมน้ำหมักใหม่ลงสู่น้ำส้มสายชูที่ทำเสร็จแล้วนั้น ความเข้มข้นของเอธานอลจะไม่กระทบกระเทือนต่อการเกิดกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 4-5 การเกิดกรดอะซิติกจะสิ้นสุดลงเมื่อเหลือเอธานอลอยู่ในน้ำหมักประมาณร้อยละ 0.3 มีผู้อธิบายว่าปริมาณเอธานอลที่เหลืออยู่นี้เกิดเป็นเอสเทอร์ในระหว่างการเก็บเป็นการปรับปรุงกลิ่นของน้ำส้มสายชูให้ดีขึ้น แต่เหตุผลสำคัญคือเป็นการป้องกันการเกิดออกซิเดชันมากเกินไป เนื่องจากเมื่อเอธานอลขาดแคลน Acetobacter จะออกซิไดซ์กรดอะซิติกให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำซึ่งทำให้กรดสูญเสียไป วิธีแก้ไขเมื่อเกิดการออกซิเดชันมากเกินไปมีวิธีเดียวคือ หยุดการทำงาน (shut down) ล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อเสีย

2.5.3 กระบวนการผลิตกรดอะซิติกแบบซับเมิร์จ

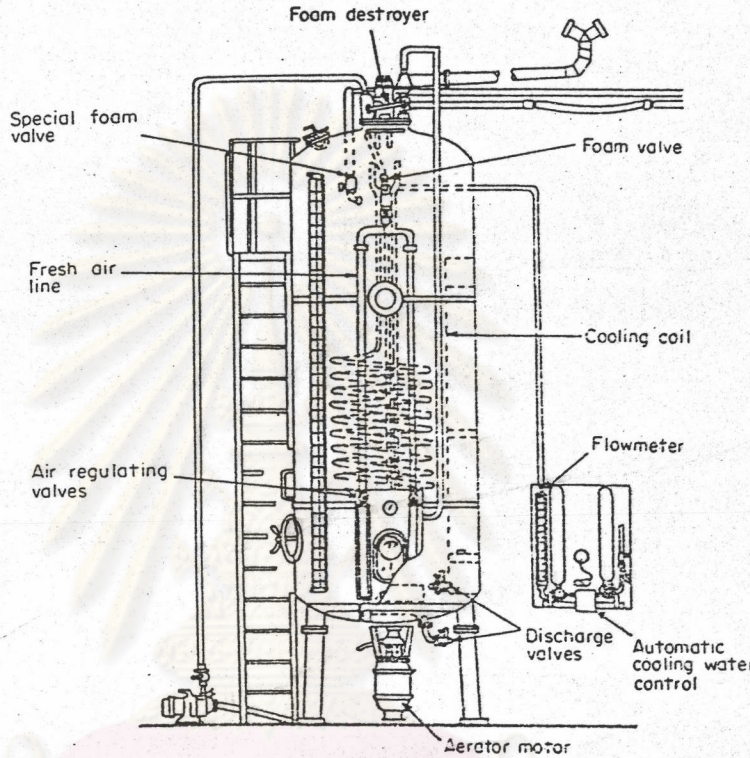
เมื่อปลายศตวรรษที่ 19 มีการพัฒนาการทำยีสต์ขนมปังและกระบวนการอะไมโล (Grove, 1914; Burrows, 1979 อ้างถึงใน Adams, 1985) จากการพัฒนาการหมักเพนิซิลินในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 จึงเป็นการกระตุ้นให้มีการนำกระบวนการหมักแบบซับเมิร์จและมีการให้อากาศไปใช้ในการหมักน้ำส้มสายชู เครื่องหมักที่ใช้ในการผลิตกรดอะซิติก

แบบซับเมิร์จที่ประสบความสำเร็จมากที่สุดคือ เครื่องหมักแบบอะซิเตเตอร์ (acetator) ซึ่งเป็นผลงานของ Hromatka และ Ebner จัดจำหน่ายโดย Heinrich Frings GmbH&Co. ดังแสดงในรูปที่ 2.7 (Hromatka และ Ebner, 1959 อ้างถึงใน Adams,1985) เครื่องหมักที่ใช้สามารถผลิตน้ำส้มสายชูมีความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 10 มีกำลังการผลิต 750-12000 ลิตรต่อวัน ตั้งแต่ปี 1954 มีการขายเครื่องหมักดังกล่าวไปแล้วถึง 350 เครื่องซึ่งมีความจุทั้งสิ้น 500 ล้านลิตรต่อปี ตัวถังหมักอาจทำจากสเตนเลสหรือไม้ แต่ส่วนข้อต่อและท่อเป็นสเตนเลสหรือพลาสติกทั้งหมด ลักษณะสำคัญที่สุดของอะซิเตเตอร์คือ ส่วนกระจายอากาศด้วยตัวเอง (its self-priming aerator) ซึ่งประกอบด้วยใบพัดกลวงขับเคลื่อนด้านล่างอยู่ล้อมรอบแกนที่ไม่หมุน ใบพัดหมุนด้วยความเร็ว 1450-1750 รอบต่อนาที ดึงอากาศลงมาตามท่อแล้วปล่อยออกสู่น้ำหมัก ของเหลวถูกดูดจากด้านบนลงมาด้านล่างของใบพัดผสมกับอากาศ

ในการศึกษาเปรียบเทียบการแพร่ของอากาศ โดยใช้ยีสต์ขนมปังในเครื่องหมักที่มีความจุ 15000 แกลลอนต่อกับเครื่องเติมอากาศแบบฟริงซ์ มีสัมประสิทธิ์การดูดซึมอากาศ (k_La) 1740 มิลลิลิตรออกซิเจนต่อ 100 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อบรรยากาศ ในขณะที่สัมประสิทธิ์การดูดซึมอากาศของเครื่องหมักขนาดเดียวกันต่อกับเครื่องเติมอากาศและใบพัดจะมีค่า 1200 มิลลิลิตรออกซิเจนต่อ 100 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อบรรยากาศ (Ebner และ Enenkel, 1970 อ้างถึงใน Adams,1985)

Hromatka, Ebner และคณะ ได้ทำการทดลองศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดกรดอะซิติกแบบซับเมิร์จที่รู้จักกันดีคือ ความไวของแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกต่อการขาดแคลนออกซิเจน พบว่าถ้าแบคทีเรียจากกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็วอยู่ในสภาวะที่ขาดออกซิเจนเป็นเวลาต่าง ๆ กัน อัตราการเกิดกรดอะซิติกขึ้นอยู่กับความยาวนานของเวลาที่แบคทีเรียขาดออกซิเจน ผลกระทบต่อการเกิดกรดน้อยมากถ้าช่วงเวลาที่ขาดออกซิเจนนั้นสั้น (1 ชั่วโมง) แต่ผลกระทบดังกล่าวรุนแรงมากถ้าขาดออกซิเจนเป็นเวลานานติดต่อกัน 7 ชั่วโมง และรุนแรงขึ้นถ้าเป็นกระบวนการผลิตกรดอะซิติกแบบซับเมิร์จ การหยุดการให้อากาศนานกว่า 1 นาทีหรือนานกว่านั้นมีผลยับยั้งการเกิดกรดอะซิติกอย่างสมบูรณ์ ถ้าน้ำหมักมีค่า G.K. เท่ากับ 11.35 ถ้าน้ำหมักมีค่า G.K. ต่ำกว่านั้นแม้จะหยุดการให้อากาศนานกว่าก็มีผลทำลายน้อยกว่า ตัวอย่างเช่น ถ้าหยุดการให้อากาศ 2 นาทีในน้ำหมักที่มีค่า G.K. 4.8 จะลดอัตราการเกิดกรดอะซิติกลงร้อยละ 34 ถ้ากำหนดให้ค่า G.K. คงที่อัตราการทำลายเซลจะเพิ่มขึ้นเมื่อค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ซึ่งเห็นได้ว่าการขาดออกซิเจนไปทำลายกลไกการป้องกันกรดของแบคทีเรีย

เครื่องหมักแบบอะซิเตเตอร์ใช้พลังงานในการเติมอากาศอยู่ในช่วง 1.2-20.0 กิโลวัตต์ต่อชั่วโมงขึ้นอยู่กับแบบ



รูปที่ 2.7 เครื่องหมักแบบอะซิเตเตอร์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบซับเมิร์จ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระบบหมักแบบนี้มักดำเนินแบบกึ่งต่อเนื่อง แต่ละรอบกินเวลา 24-48 ชั่วโมง มีการรักษาอุณหภูมิให้คงที่ที่ประมาณ 30 องศาเซลเซียสโดยใช้การหล่อเย็นด้วยน้ำ อัตราการไหลของน้ำ 500-8000 ลิตรต่อชั่วโมง อาจมีการใช้หอทำความเย็น (cooling tower) หรือหน่วยทำความเย็น (refrigeration unit) เพื่อนำน้ำหล่อเย็นกลับมาใช้ใหม่

เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชันมากเกินไป ดังนั้นจึงหยุดการทำงานของระบบเมื่อเหลืออัลกอฮอล์ในน้ำหมักประมาณร้อยละ 0.1-0.3 โดยมีการวิเคราะห์น้ำหมักเป็นช่วง ๆ และอาศัยประสบการณ์ในการดึงน้ำหมักออกอย่างแม่นยำเพื่อกำจัดปัญหาที่อาจเกิดขึ้นนี้ และเพื่อให้สะดวกสบายมากขึ้น บริษัทฟริงซ์ได้ผลิตเครื่องมือสำหรับวัดปริมาณอัลกอฮอล์แบบอัตโนมัติและต่อเนื่องเรียกว่า อัลโคกราฟ (alcograph) เครื่องมือดังกล่าวตรวจสอบปริมาณเอธานอล โดยการเปรียบเทียบจุดเดือดของน้ำหมักจากเครื่องหมักกับน้ำหมักที่ปราศจากอัลกอฮอล์โดยการกลั่น ผลต่างดังกล่าวเป็นสัดส่วนกับปริมาณอัลกอฮอล์ น้ำหมักไหลในอัตรา 9 มิลลิลิตรต่อนาที ผ่านท่อเพิ่มความร้อน (preheating vessel) ไปสู่ท่อต้มกลั่น (boiling vessel) 2 อันที่ต่อกันแบบอนุกรม ท่ออันที่ 1 จะต่อกับรีฟลักซ์คอนเดนเซอร์ (reflux condensor) ดังนั้นอุณหภูมิของน้ำหมักจะเท่ากับจุดเดือดของตัวมันเอง ส่วนท่ออันที่ 2 ทำหน้าที่กลั่นเอธานอลออกมา และวัดความแตกต่างของจุดเดือดทั้งสองโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ แล้วบันทึกผล (Ebner และ Enenkel,1969 อ้างถึงใน Adams,1985) เมื่อการหมักสิ้นสุดลงน้ำส้มสายชูถูกปั๊มออกมาครึ่งหนึ่งหรือมากกว่านั้น แล้วเติมน้ำหมักใหม่เข้าไปโดยเติมลงไปเหนือเครื่องเติมอากาศเพื่อให้น้ำหมักมีการผสมกันอย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ

โฟมซึ่งเป็นผลจากจลินทรีย์ เป็นปัญหาที่มีอยู่ตลอดในการหมักแบบซับเมิร์จที่มีการให้อากาศ ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียน้ำหมัก, ปิดกั้นทางออกของอากาศ, เพิ่มการเสี่ยงต่อการมีเชื้ออื่นเจือปน และลดอัตราการถ่ายโอนออกซิเจน การเกิดฟองนี้สามารถควบคุมได้โดยการเติมสารเคมีจำกัดฟอง เช่น ซิลิโคน แต่สารดังกล่าวช่วยเพิ่มขนาดฟองอากาศและเป็นการลดอัตราการถ่ายโอนออกซิเจน ได้มีการออกแบบเครื่องกำจัดฟองหลายรูปแบบ เช่น เครื่องกำจัดฟองกลแบบหนึ่งที่ใช้ในเครื่องหมักแบบอะซิเตเตอร์ โดยเครื่องกำจัดฟองดังกล่าวต่ออยู่ที่ด้านบนของเครื่องหมัก และเมื่อมีฟองเกิดขึ้นก็ถูกดันขึ้นด้านบนและถูกเหวี่ยงทำให้ฟองแตกแยกออกเป็นของเหลวกับกาซ ของเหลวและฟองที่ไม่แตกถูกปั๊มกลับสู่ถังทางด้านล่างโดยผ่านทางท่อป้อนย้อนกลับ ส่วนกาซออกไปทางช่องระบายอากาศ ความเร็วรอบของการเหวี่ยงเท่ากับ 1000-1450 รอบต่อนาที ใช้พลังงานทั้งสิ้น 0.01-0.04 กิโลวัตต์.ชั่วโมงต่อลบ.เมตรอากาศในฟอง

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตน้ำส้มสายชูแบบซับเมิร์จกับการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็ว พบว่าเครื่องหมักแบบอะซิเตเตอร์ทำงานได้เร็วกว่าเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ โดยทั่วไปจะมีประสิทธิภาพการเปลี่ยนสูงกว่า (ประมาณร้อยละ 94) นอกจากนี้โรงงานที่ใช้กระบวนการหมักแบบซับเมิร์จยังทำงานและควบคุมได้ง่ายกว่า ใช้แรงงานคนน้อยกว่า และใช้พื้นที่เพียงครึ่งหนึ่งของโรงงานที่ใช้การผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็ว อย่างไรก็ตามระบบดังกล่าวนี้ใช้เงินลงทุนสูงกว่า ใช้น้ำหล่อเย็น และพลังงานในสัดส่วนที่สูงกว่ามาก อนึ่ง ถ้าระบบจ่ายพลังงานล้มเหลวกระบวนการหมักแบบซับเมิร์จจะมีปัญหาทันที นอกจากนี้น้ำส้มสายชูที่ผลิตจากกระบวนการดังกล่าวจะขุ่นมาก และต้องผ่านการทำให้ใสก่อน

กระบวนการแบบซับเมิร์จที่ใช้กันนอกเหนือจากระบบหมักแบบอะซิเตเตอร์แล้ว ยังมีอีกหลายกระบวนการ เช่น คาร์วิเตเตอร์ของเยาแมน (Yeoman's cavitator) ซึ่งพัฒนาโดย Meyer และจัดจำหน่ายโดย Yeoman Brothers Company รัฐอิลลินอยส์ ประเทศสหรัฐอเมริกา (Mayer, 1963 อ้างถึงใน Adams, 1985) ในช่วง 1959-1970 ระบบดังกล่าวมีการดึงน้ำหมักให้ไหลไปตามท่อที่อยู่ตรงกลาง ทำให้น้ำหมักมีการไหลเวียน ภายในท่อมีใบพัด (turbine) ที่ขับเคลื่อนทางด้านบนทำให้การผสมระหว่างอากาศกับน้ำหมัก และเป็นตัวดันให้น้ำหมักไหลออกไปจากท่อทำให้น้ำหมักมีการไหลเวียน ระบบดังกล่าวมีการผลิตขายอยู่ไม่นาน ปัจจุบันเหลือเพียงบางโรงงานที่ยังใช้งานอยู่ในอเมริกาและญี่ปุ่น ไม่เหมาะกับการหมักน้ำส้มสายชูที่มีความเข้มข้นสูง

กระบวนการแบบบอร์กีส (Bourgeois process) ขายโดยบริษัทของสวิสเซอร์แลนด์ Bourgeois Freres & Cie นิยมใช้ในสเปนและอิตาลีในช่วง 1955-1980 ระบบนี้ใช้หอหมัก 2 หอ หอหนึ่งเติมเชื้อให้อีกหอหนึ่ง และมีเครื่องอัดอากาศสำหรับเติมอากาศการเกิดกรดอะซิติกดำเนินไปเรื่อย ๆ จนกว่าเอธานอลถูกใช้หมด และมีการเติมเอธานอลบางส่วนเพื่อช่วยรักษากลิ่นของน้ำส้มสายชู ระบบนี้ช้ามากและเหมาะกับน้ำส้มสายชูที่มีความเข้มข้นต่ำ (Bourgeois Freres, 1956 อ้างถึงใน Ebner, 1982)

กระบวนการแบบฟาร์ดอน (Fardon process) เป็นระบบหมักที่จัดจำหน่ายโดย Fardon Vinegar Co. ในช่วง 1960-1975 ระบบนี้มีการเติมอากาศโดยดึงน้ำหมักจากเครื่องหมักและนำไปผ่านหัวฉีดเวนจูรี (verturi nozzle) ระบบนี้มีกำลังการผลิตต่ำเนื่องจากการกระจายอากาศไม่สม่ำเสมอและใช้พลังงานมาก ยังมีการใช้ระบบนี้ในโรงงานหลาย ๆ แห่งของอาฟริกาใต้ (White, 1970 อ้างถึงใน Adams, 1985)

วินีเกเตเตอร์ (vinegator) เป็นเครื่องหมักอีกชนิดที่ใช้ในการหมักแบบซับเมิร์จ ผลิตโดยบริษัท Chemap ของสวิสเซอร์แลนด์ ระบบนี้ใช้ใบพัดกวนที่เติมอากาศได้เอง (self-aspirating stirrer) คู่กับเครื่องอัดอากาศ โดยเครื่องอัดอากาศนั้นถูกควบคุมโดยอิเลคโทรดที่วัดปริมาณออกซิเจนได้ (polarographic oxygen electrode) และทำงานเมื่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักต่ำกว่าค่าที่กำหนด ซึ่งเป็นระบบที่ใช้พลังงานอย่างมีประสิทธิภาพ เครื่องหมักดังกล่าวยังต่ออยู่กับเครื่องกำจัดฟองกลอีกด้วย (Muller, 1978 อ้างถึงใน Adams, 1985)

2.5.4 <u>การผลิตกรดอะซิติกเข้มข้น</u>

ในปี 1962 มีโรงงานใหม่สำหรับผลิตกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) จากกากน้ำตาลในประเทศตุรกี ได้ผลผลิต 2 ตันต่อวัน ขั้นตอนของกระบวนการมีดังนี้

1) หมักอัลกอฮอล์จากกากน้ำตาลเจือจาง
2) แยกเอธานอลบริสุทธิ์โดยการทำเรคติฟิเคชัน (rectification)
3) หมักน้ำส้มสายชูแบบซับเมิร์จโดยใช้เอธานอลเจือจาง
4) สกัดกรดอะซิติกออกจากน้ำส้มสายชูโดยใช้เอธิลอะซิเตท
5) แยกการสกัดโดยการใช้การกลั่นได้เป็นกรดอะซิติกแอนไฮดรัสและเอธิลอะซิเตท
6) แยกเอธิลอะซิเตทออกจากน้ำส้มสายชูที่สกัดแล้วโดยใช้การกลั่น

โรงงานดังกล่าวปฏิบัติงานมากว่า 20 ปี แม้ว่าโรงงานจำนวนหนึ่งที่ก่อตั้งขึ้นในประเทศอื่น ๆ ในระหว่างศตวรรษที่ 60 จะถูกปิดลงไปแล้ว ความคุ้มค่าในเชิงเศรษฐศาสตร์ขึ้นกับราคาของกรดอะซิติกเข้มข้นในตลาดโลก อย่างไรก็ตามดูเหมือนว่าราคาน้ำมันที่แพงขึ้น ทำให้โรงงานดังกล่าวต้องปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพสูงกว่าแต่ก่อน เพื่อให้สามารถแข่งขันในตลาดโลกได้ (Ebner, 1982)

2.5.5 <u>การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู</u>

มีระบบหมักน้ำส้มสายชูหลายระบบที่ได้พัฒนามาจากระบบการหมักแบบทริคกลิง รายละเอียดของแต่ละระบบมีดังนี้

เจนเนอเรเตอร์แบบจุ่ม (dipping generator) ประกอบด้วยถังเก็บซึ่งภายในบรรจุตะกร้าหวายที่เต็มไปด้วยไม้บีชบาง ๆ เป็นวัสดุบรรจุซึ่งตะกร้านี้ยกขึ้นลงได้ ทำการเติมสารละลายอัลกอฮอล์ลงไปในถังเก็บปริมาณครึ่งหนึ่ง และจุ่มตะกร้าดังกล่าวลงใน

สารละลายอัลกอฮอล์ หลังจากนั้นช่วงเวลาหนึ่งจึงยกตะกร้าออก ตะกร้าที่เต็มไปด้วยไม้บีช และอิ่มตัวด้วยสารละลายอัลกอฮอล์จะสัมผัสอากาศเป็นเวลานานช่วงหนึ่งที่ และเกิดการออกซิไดซ์อัลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก แล้วจึงเริ่มซ้ำกระบวนการดังกล่าว

เจนเนอเรเตอร์แบบดีสเพลสเมนท์ (displacement generator) ประกอบด้วยถัง 2 ชั้นโดยถังชั้นในลอยได้ และมีเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์อีก 2 ตัวอยู่ด้านข้างของถัง 2 ชั้นดังกล่าว เมื่อเติมน้ำหรือวัสดุอื่นที่มีน้ำหนักลงไปในถังลอยชั้นใน สารละลายอัลกอฮอล์ที่อยู่ในถังเก็บหลักจะถูกบังคับให้ไหลไปสู่เครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ 2 ตัวที่อยู่ด้านข้างถัง 2 ชั้น เมื่อวัสดุบรรจุในเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ทั้ง 2 อิ่มตัว และถัง 2 ชั้นนั้นว่างเปล่าลงแล้ว ของเหลวที่ท่วมขังอยู่ในเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ทั้ง 2 จะถูกปล่อยกลับสู่ถังเก็บหลัก

เจนเนอเรเตอร์แบบลูกกลิ้ง (horizontal revolving-drum) ประกอบด้วยถังทรงกระบอก ซึ่งได้รับการออกแบบให้อากาศปริมาณมากที่สุดผ่านเข้าไปสัมผัสกับวัสดุบรรจุที่อยู่ภายในเครื่องหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ ส่วนลูกกลิ้งดังกล่าวอยู่ภายในทรงกระบอกอีกชั้นหรืออยู่ในถังซึ่งให้อากาศเข้า ขณะที่ลูกกลิ้งหมุนไป ครึ่งหนึ่งของลูกกลิ้งสัมผัสอากาศ ส่วนอีกครึ่งหนึ่งแช่อยู่ในสารละลายอัลกอฮอล์

กระบวนการหมักแบบเจนเนอเรเตอร์ถูกดัดแปลงให้มีการปรับปรุงทั้งทางด้านออกแบบและอุปกรณ์ต่าง ๆ โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและง่ายต่อการปฏิบัติงาน (Vaughn, 1954)

กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูที่น่าสนใจอีกกระบวนการหนึ่งคือ การผลิตในอะตอมไมซิงแชมเบอร์ (atomizing chamber) ซึ่งจดสิทธิบัตรโดย Mackin (1947, อ้างถึงใน Vaughn, 1954) ในกระบวนการดังกล่าว สารละลายอัลกอฮอล์ซึ่งมีแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกจะถูกโปรยผ่านหัวกระจายที่อยู่ด้านบนของแชมเบอร์ หยดของเหลวตกผ่านอากาศที่ไหลแบบปั่นป่วนสวนทางขึ้นมา ของเหลวที่ไหลลงไปถูกเก็บและทำให้เย็นมีอุณหภูมิต่ำกว่า 95 องศาฟาเรนไฮต์ และส่งกลับไปที่แชมเบอร์อีกครั้งจนกว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของอัลกอฮอล์อย่างสมบูรณ์

นอกจากต้องพิจารณาความสำคัญเชิงการค้าแล้ว ควรพิจารณาถึงความสามารถในการออกซิไดซ์อัลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกโดยใช้แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก โดย Hromatka และ Ebner (1949, อ้างถึงใน Vaughn,1954) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการออกซิเดชันด้วยกระบวนการหมักแบบทริคกลิง กับการออกซิเดชันด้วยกระบวนการหมักแบบซับเมิร์จ พบว่าสำหรับกระบวนการหมักแบบทริคกลิงนั้น การใช้ออกซิเจนในการผลิตน้ำส้มสายชู

แปรผันเป็นเส้นตรงเมื่อเทียบกับเวลา ส่วนในกระบวนการหมักแบบซับเมิร์จพบว่าการใช้ออกซิเจนแปรผันเป็นเอกซ์โปเนนเชียลเมื่อเทียบกับเวลา นั่นคือกระบวนการหมักแบบซับเมิร์จสามารถออกซิไดซ์ออกอัลกอฮอล์ได้เร็วกว่ากระบวนการหมักแบบทริคกลิงถึง 30 เท่า เมื่อกำหนดให้ปริมาณอัลกอฮอล์เริ่มต้นเท่า ๆ กัน ในระหว่างการหมักแบบซับเมิร์จนั้นแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกใช้ออกซิเจนเฉลี่ยเท่ากับ = 7750 มิลลิลิตรออกซิเจนต่อกรัมน้ำหนักเซลแห้งต่อชั่วโมง

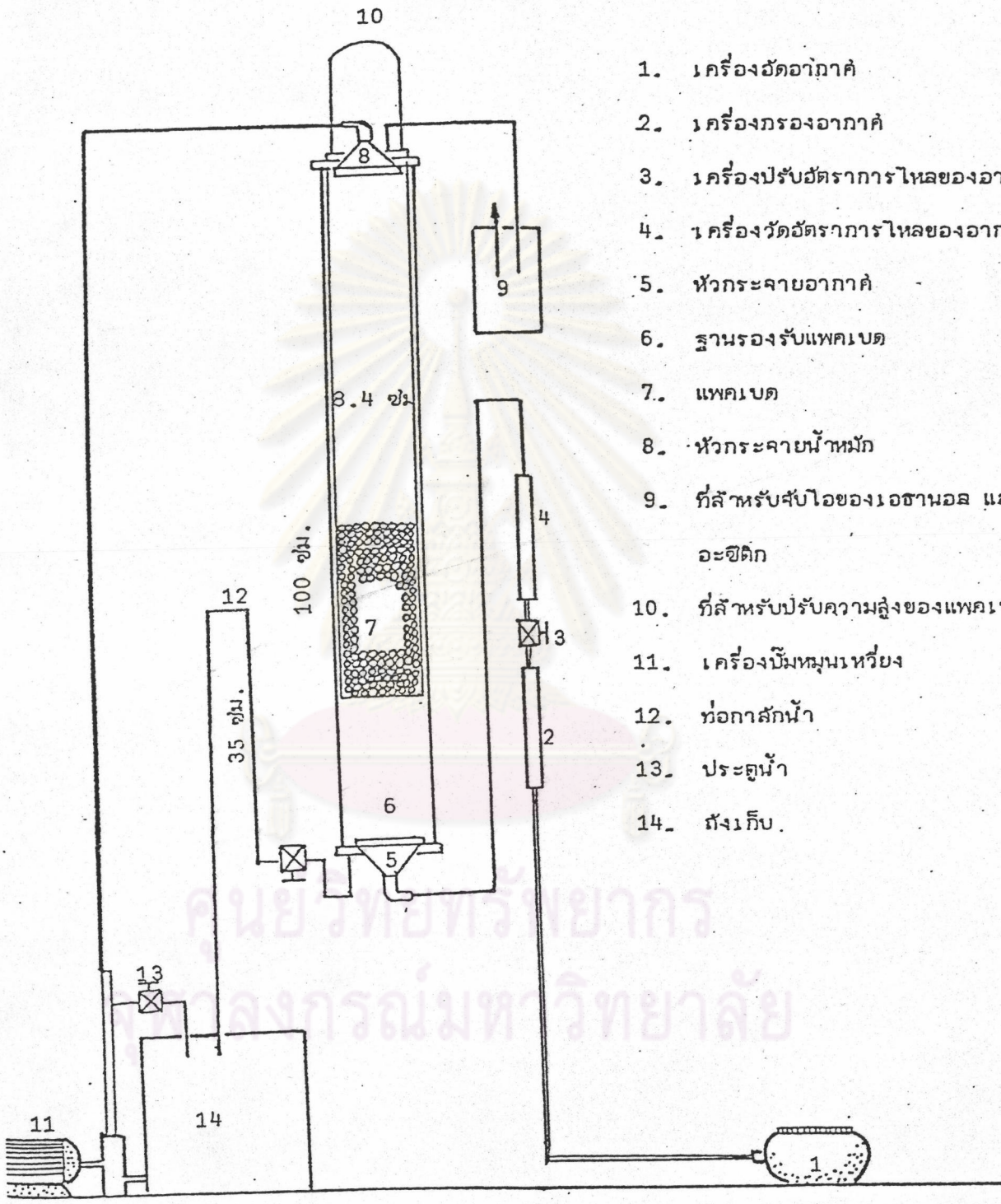
สำหรับในประเทศไทย ที่ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู โดยอาศัยกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบทริคกลิงเป็นพื้นฐาน มีรายละเอียดคร่าว ๆ ดังนี้

ในปี ค.ศ. 1977 (พ.ศ. 2520) ศุภมาศได้ทำการผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำสับปะรดโดยใช้กระบวนการหมักแบบทริคกลิง เครื่องหมักที่ใช้มีลักษณะเป็นท่อทรงกระบอกกลวง ภายในบรรจุไม้ไผ่ชิ้นเล็ก ๆ ทำหน้าที่เป็นวัสดุบรรจุ อัตราการไหลเวียนของน้ำหมักภายในเครื่องหมักเท่ากับ 1 ลิตรชั่วโมง สามารถผลิตน้ำส้มสายชู 1500 มิลลิลิตรซึ่งมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกร้อยละ 5 ได้ภายในเวลา 60 ชั่วโมง

ในปี ค.ศ. 1981 (พ.ศ. 2524) พรทิพย์ได้ทำการศึกษาเครื่องหมักแบบคอลัมน์ชนิดเบดบรรจุ (ดังแสดงในรูปที่ 2.8) ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์สับปะรดโดยอาศัยข้อดีของกระบวนการหมักแบบทริคกลิงและแบบซับเมิร์จ วัสดุบรรจุที่ใช้ทำจากไม้มะค่า มีลักษณะเป็นทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ซม. อัตราการไหลเวียนของน้ำหมักภายในเครื่องหมักเท่ากับ 2.7 ลิตรต่อนาที ใช้วัตถุดิบเป็นไวน์สับปะรดซึ่งมีความเข้มข้นของเอธานอลต่อกรดอะซิติกเป็น 7:1 (ร้อยละโดยปริมาตร : ร้อยละน้ำหนักโดยปริมาตร) สามารถผลิตน้ำส้มสายชูซึ่งมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกร้อยละ 5 ได้ภายในเวลา 50 ชั่วโมง

ในปี ค.ศ. 1984 (พ.ศ. 2527) ศิริวรรณได้ทำการศึกษาเครื่องหมักแบบหลายชั้น (ดังแสดงในรูปที่ 2.9) ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์สับปะรด พบว่าการนำเครื่องหมักมาต่อติดกันอย่างอนุกรม 4 ชั้นแบบรวมคอลัมน์ให้ผลดีที่สุด สามารถผลิตน้ำส้มสายชูที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกร้อยละ 6 ได้ภายในเวลา 90 ชั่วโมง

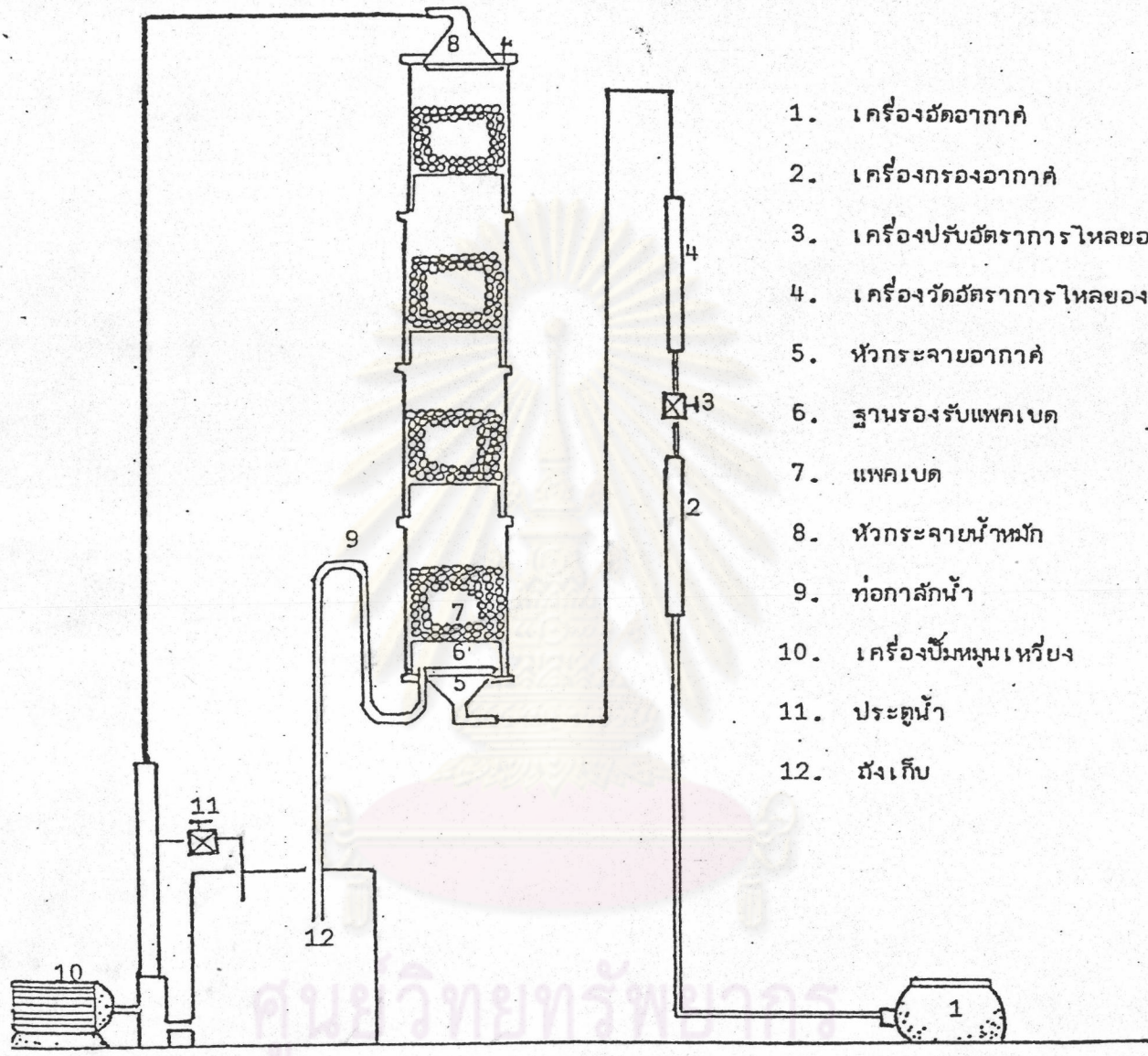
ในปี ค.ศ. 1988 (พ.ศ. 2531) ประพนธ์ได้ทำการศึกษาเครื่องหมักแบบหลายคอลัมน์ (ดังแสดงในรูปที่ 2.10) ในการผลิตน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่อง โดยการนำเครื่องหมักเบดบรรจุแบบคอลัมน์เดี่ยวจำนวน 4 ชุดมาต่ออนุกรมเข้าด้วยกัน แต่ละชุดมีส่วนประกอบและขนาดเหมือนกันทุกประการ ซึ่งได้กล่าวถึงรายละเอียดของเครื่องหมักดังกล่าวในหัวข้อ 3.1.3. ผลงานวิจัยพบว่าสภาวะที่ทำให้เกิดกรดอะซิติกมากที่สุดในเครื่องหมักดังกล่าวคือ อัตราส่วนความสูงของเบดบรรจุต่อความสูงของช่องว่างเหนือเบดบรรจุเท่ากับ 1:0.95 อัตรา



1. เครื่องอัดอากาศ
2. เครื่องกรองอากาศ
3. เครื่องปรับอัตราการไหลของอากาศ
4. เครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ
5. หัวกระจายอากาศ
6. ฐานรองรับแพคเบด
7. แพคเบด
8. หัวกระจายน้ำหมัก
9. ที่สำหรับจับไอของเอธานอล และกรดอะซิติก
10. ที่สำหรับปรับความสูงของแพคเบด
11. เครื่องปั๊มหมุนเหวี่ยง
12. ท่อกาลักน้ำ
13. ประตูน้ำ
14. ถังเก็บ

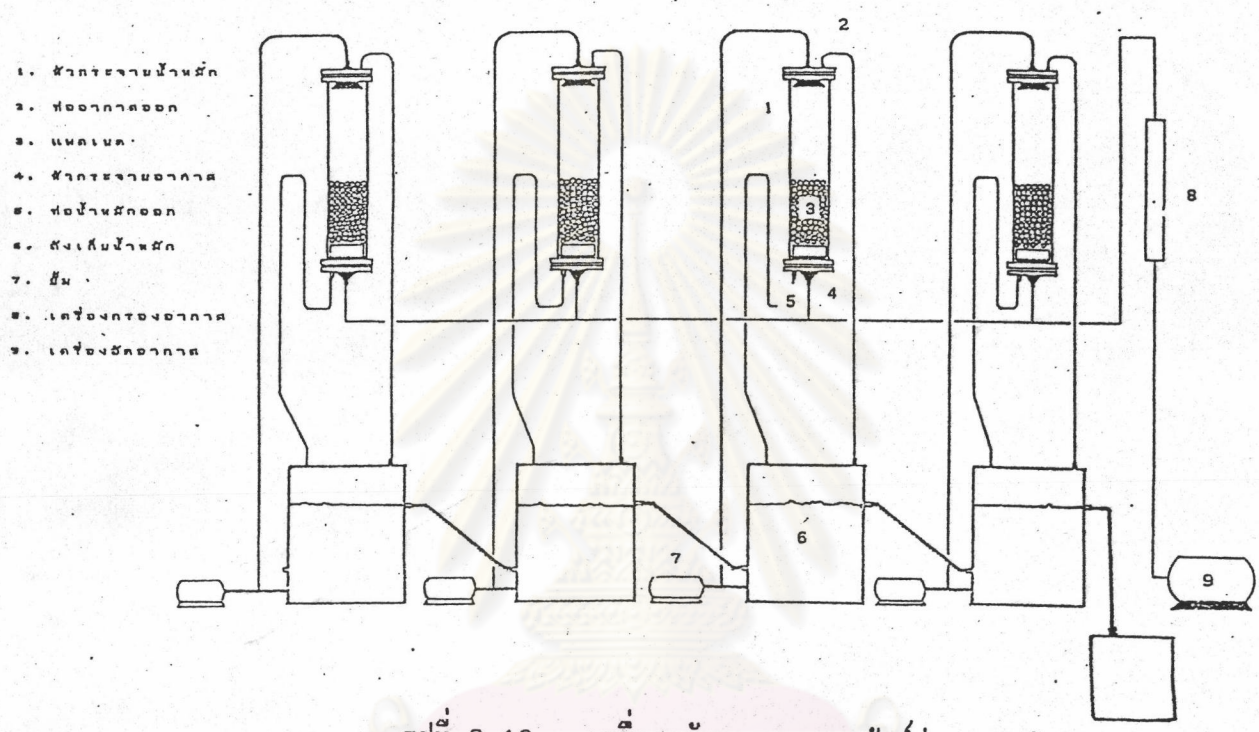
รูปที่ 2.8 เครื่องหมักแบบแพคเบดคอลัมน์หนึ่งชั้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.9 เครื่องหมักอนุกรม 4 ชั้นแบบรวมคอลัมน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.10 เครื่องหมักแบบหลายคอลัมน์ต่ออนุกรมกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I10313102

การไหลเวียนของน้ำหมักภายในเครื่องเท่ากับ 2.8 ลิตรต่อนาที อัตราการให้อากาศของเครื่องหมักที่ 1, 2, 3 และ 4 เท่ากับ 0.04, 0.04, 0.06 และ 0.06 ปปน. (ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที) ตามลำดับ และระบบการไหลเวียนของน้ำหมักเป็นแบบกาลักน้ำ เมื่อนำสภาวะดังกล่าวมาใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่องจากไวน์สับปะรดสามารถผลิตน้ำส้มสายชูได้วันละ 5.53 ลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกร้อยละ 5.5 และเมื่อนำเอาผลิตภัณฑ์จากถังเก็บน้ำหมักที่ 4 มาป้อนย้อนกลับสู่ถังเก็บน้ำหมักที่ 1 แล้วทำการผลิตน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่อง พบว่าสามารถผลิตน้ำส้มสายชูได้สูงขึ้นเป็นวันละ 6.22 ลิตร แต่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกลดลงเล็กน้อยเท่ากับร้อยละ 5.1

2.6 องค์ประกอบของน้ำส้มสายชู

ในการผลิตน้ำส้มสายชูจำเป็นต้องใช้กระบวนการหมัก 2 กระบวนการซึ่งใช้จุลินทรีย์ต่างชนิดกันดังกล่าวมาแล้ว วัตถุดิบที่ใช้ต้องนำไปหมักให้เป็นอัลกอฮอล์ก่อนโดยใช้ยีสต์ จากนั้นนำไปทำให้เกิดกรดโดยการออกซิเดชันโดยแบคทีเรีย

2.6.1 องค์ประกอบของสารละลายอัลกอฮอล์

น้ำตาลคาร์บอน-6 ในวัตถุดิบซึ่งอาจมีมาตั้งแต่เริ่มต้น หรือเกิดขึ้นโดยการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของเอนไซม์หรือสารเคมี จะถูกเปลี่ยนโดยยีสต์สกุล Saccharomyces ให้เป็นอัลกอฮอล์โดยการหมักแบบไม่มีการให้อากาศ การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีนี้สามารถแสดงเป็นสมการอย่างง่ายได้ดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{yeast enzymes}} 2\,CH_3CH_2OH + 2\,CO_2$$

เฮกโซส อัลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์

สมการนี้เป็นการประมาณเท่านั้น ไม่ได้พิจารณาว่าเฮกโซสบางส่วนหลงเหลืออยู่ไม่ถูกหมักหรือมีผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เล็กน้อยเกิดขึ้นในการหมัก ดังนั้นสารละลายที่จะนำไปหมักเป็นกรดอะซิติกอาจมีอัลกอฮอล์, น้ำตาล (เฮกโซส), กลีเซอรอล, กรดฟอร์มิค, กรดอะซิติก, กรดแลคติค, กรดซัคซินิค, อะเซทิลเมธิลคาร์บินอล และองค์ประกอบสำคัญอื่น ๆ ตามวัตถุดิบที่ใช้ องค์ประกอบตามธรรมชาติเหล่านี้ เช่น กรดมาลิค, กรดทาร์ทาริค, เอสเทอร์, เม็ดสี,

เพนโทซาน, โปรตีน และเกลือแร่ เป็นต้น

การปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ทำลายคุณสมบัติของสารละลายอัลกอฮอล์ได้ เช่น แบคทีเรียผลิตกรดแลคติค (เช่น Lactobacillus และ Leuconostoc) ทำให้เกิดกรดอะซิติกและแลคติคเพิ่มขึ้น และทำให้เกิดรสชาดผิดปกติ ("mousey" taste) โดยการทำลายน้ำตาลที่มีอยู่ในวัตถุดิบหรือสารละลายอัลกอฮอล์ แบคทีเรียดังกล่าวยังอาจทำลายกรดมาลิคโดยการเกิดเป็นกรดแลคติคหรือทำให้เกิดแมนนิทอลจากฟรุคโตสถ้าหากมีกรดมาลิคหรือฟรุคโตสในวัตถุดิบหรือสารละลายอัลกอฮอล์ การเพิ่มขึ้นของเมธิลอัลกอฮอล์อย่างผิดปรกติอาจเป็นผลมาจากรา (mould) ในผลไม้ (โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแอปเปิล และ พีช) ผลิตเอนไซม์ไปทำลายเพคติน

2.6.2 องค์ประกอบของน้ำส้มสายชู

อัลกอฮอล์ที่มีในสารละลายอัลกอฮอล์ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกโดยเอนไซม์ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียสร้างกรดอะซิติก ขั้นตอนการผลิตน้ำส้มสายชูนี้แสดงโดยปฏิกิริยา

$$2\ CH_3CH_2OH + 2\ O_2 \xrightarrow{\text{acetobacter enz.system}} 2\ CH_3COOH + 2\ H_2O$$

อัลกอฮอล์ ออกซิเจน กรดอะซิติก น้ำ

ความจริงแล้วการเปลี่ยนอัลกอฮอล์ให้เป็นกรด เป็นการออกซิเดชันทีละขั้น (step-wise oxidation) สารผลิตผลระหว่างปฏิกิริยาที่สำคัญคือ อะเซทาลดีไฮด์จะเกิดขึ้นก่อนการทำให้เกิดกรด การออกซิเดชันอัลกอฮอล์ให้ไปเป็นกรดอะซิติกจะแสดงได้ถูกต้องยิ่งขึ้นเมื่อเขียนเป็น 2 ปฏิกิริยา คือ

$$CH_3CH_2OH + O \xrightarrow{\text{Acetobacter enz.system}} CH_3CHO + H_2O$$

$$CH_3CHO + O \xrightarrow{\text{Acetobacter enz.system}} CH_3COOH$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปฏิกิริยาดังกล่าวไม่เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นอัลกอฮอล์รวมทั้งสารอื่น ๆ และสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักวัตถุดิบจึงหลงเหลือให้เห็นในผลิตภัณฑ์สุดท้ายซึ่งได้แก่ อัลดีไฮด์, เอสเทอร์, อะเซทิลเมธิลคาร์บินอล, กลีเซอรอล, กรดแลคติค, กรดมาลิค และกรดทาร์ทาริค สำหรับกรดทาร์ทาริคพบในน้ำส้มสายชูที่ผลิตจากไวน์เท่านั้น

ก. น้ำส้มสายชูกลั่น

Schanderl และ Staudenmayer (1956 อ้างถึงใน Ebner, 1983) เป็นคนแรกที่ค้นพบว่ามีกรดอะมิโน 8 ชนิด และวิตะมินบี รวมอยู่ในน้ำส้มสายชูกลั่นที่ผลิตจากการหมักแบบซับเมิร์จ โดยการทำโครมาโตกราฟีกระดาษ (paper chromatrgraphy) พบว่ามีเพียงกลูโคสและเกลืออนินทรีย์เท่านั้นที่มีอยู่เนื่องจากสารอาหารเสริมที่เติมลงไป ส่วนสารอื่น ๆ ที่ค้นพบนั้นเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ไม่ใช่สารที่เติมลงไปในระหว่างกระบวนการหมัก

Haeseler และคณะ (1957 อ้างถึงใน Ebner, 1983) พบว่าในน้ำส้มสายชูกลั่นที่ผลิตด้วยการหมักแบบซับเมิร์จประกอบด้วยกรดอะซิติก 11 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร, ไรโบฟลาวิน 15 ไมโครกรัมต่อลิตร, นิโคตินเอมีด 83 ไมโครกรัมต่อลิตร และกรดแพนโธเทนิค 33 ไมโครกรัมต่อลิตร

Bourgeois (1957 อ้างถึงใน Ebner,1957) ได้แสดงกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่พบอยู่ในน้ำส้มสายชูกลั่นที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกร้อยละ 4.5 จะมีไอโซ-ลิวซีน 4.4 ไมโครกรัมต่อลิตร, ลิวซีน 3.0 ไมโครกรัมต่อลิตร, ฟีนิลอะลานีน 2.9 ไมโครกรัมต่อลิตร, อาร์จีนีน 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร, ไลซีน 2.3 ไมโครกรัมต่อลิตร, ไทราซีน 1.1 ไมโครกรัมต่อลิตร, ซีสทีน 0.58 ไมโครกรัมต่อลิตร, เมไธโอนีน 0.3 ไมโครกรัมต่อลิตร และทริปโทเฟน 0.016 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้ผลิตโดยแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก

ข. น้ำส้มสายชูจากไวน์

Haeseler และคณะ (1957 อ้างถึงใน Ebner, 1983) พบว่าในน้ำส้มสายชูที่ผลิตจากไวน์และมีปริมาณกรดอะซิติกประมาณร้อยละ 10 นั้นมีไรโบฟลาวิน 64.5 ไมโครกรัมต่อลิตร, นิโคตินเอมีด 266 ไมโครกรัมต่อลิตรและกรดแพนโธเทนิค 167 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นว่าสารต่าง ๆ เหล่านี้มีปริมาณมากกว่าที่พบในน้ำส้มสายชูกลั่น

ในน้ำส้มสายชูจากไวน์นั้น มีกรดอะมิโนชนิดเดียวกับที่พบในน้ำส้มสายชูกลั่นแต่มีปริมาณมากกว่า จากการตรวจสอบของ Bourgeois (1957 อ้างถึงใน Ebner, 1983) พบว่าในน้ำส้มสายชูจากไวน์ที่มีกรดอะซิติก 4.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรนั้นมีไอโซลิวซีน 540 มิลลิกรัมต่อลิตร, ฟีนิลอะลานีน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไลซีน 88 มิลลิกรัมต่อลิตร, ลิวซีน

88 มิลลิกรัมต่อลิตร, ซีสทีน 85 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาร์จีนีน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร, เมไธโอนีน 19 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไทโรซีน 13 มิลลิกรัมต่อลิตร และทริปโทเฟน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

Galoppini และ Rotini (1957 อ้างถึงใน Ebner, 1983) พบว่าระหว่างการหมักผลิตกรดอะซิติกนั้นมีอะเซทิลเมธิลคาร์บินอลเกิดขึ้นในปริมาณต่าง ๆ กัน และมีการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Federico (1948), Federico และGobis (1949) และ Antoniani และคณะ (1953 อ้างถึงใน Ebner, 1983) พบว่า อะเซทิลเมธิลคาร์บินอลเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการออกซิไดซ์ 2,3-บิวทีลีนไกลคอล และมีเพียงส่วนน้อยที่ได้จากการเปลี่ยนกรดแลคติค, กรดฟูมาริค, กรดทาร์ทาริค, กรดมาลิค หรือกรดแอสพาร์ทิค และจากน้ำตาล เช่น แมนโนส, ฟรุคโตส และไซโลส Hadorn และ Beetschen (1965 อ้างถึงใน Ebner, 1983) ไม่พบความสัมพันธ์โดยตรงระหว่าง 2,3-บิวทีลีนไกลคอลกับการเกิดอะเซทิลเมธิลคาร์-บินอลในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ ปริมาณอะเซทิลเมธิลคาร์บินอลในน้ำส้มสายชูจากไวน์นั้น มีมากน้อยแตกต่างกันตั้งแต่ 10 จนถึง 800 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในปี 1973 Garcia และคณะ (อ้างถึงใน Ebner, 1983) ได้วิเคราะห์น้ำส้มสายชูจากไวน์ 20 ชนิด พบว่าส่วนใหญ่ประกอบด้วย อะซิโทอีน และบิวทีลีนไกลคอล แต่มีเพียง 7 ชนิดที่มีไดอะซิล ต่อมา 1974 Zappavigna (อ้างถึงใน Ebner, 1983) พบไทรามีนในตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากไวน์ทุกตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ทั้งหมด

2.7 มาตรฐาน และการวิเคราะห์น้ำส้มสายชู

การกำหนดมาตรฐานของอาหารมีเพื่อป้องกันผู้บริโภคและผู้ผลิตให้รอดพ้นจากการปฏิบัติงานที่ไม่ละเอียดรอบคอบ หรือมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ โดยปกติเป็นการกำหนดกฎเกณฑ์เกี่ยวกับคุณภาพของเครื่องบริโภค, อธิบายถึงวิธีวิเคราะห์ และข้อกำหนดที่ยอมรับได้ (acceptable limit) คู่แข่งที่ถูกต้องตามกฎหมายของน้ำส้มสายชูก็คือ กรดอะซิติกสังเคราะห์ชนิดที่กินได้ (edible grade) นำมาเจือจางด้วยน้ำ และมักมีการเติมสีโดยใช้น้ำตาลไหม้ (caramel) น้ำส้มสายชูที่ได้จากหมักมีความแตกต่างจากน้ำส้มสายชูที่ไม่ผ่านการหมักในแง่ของ "ความนุ่มลื้น (smoothness) และกลิ่นหอม (bouquet and aroma)" โดยน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักมีความเด่นกว่าในทุก ๆ ด้าน จึงมีการกำหนดเทอม "สารปรุงแต่งที่ไม่ผ่านการหมัก" (non-brewed condiment)

Codex Alimentarius Commission of the joint FAO/WHO Food Standards Programme ได้มีส่วมร่วมในการกำหนดมาตรฐานของน้ำส้มสายชูในยุโรป โดยให้คำจำกัดความว่า

Vinegar is a liquid fit for human consumption, produced from a suitable raw material of agricultural origin, containing starch, sugars, or starch and sugars, by the process of double fermentation, alcoholic and acetous, and contains a specified amount of acetic acid.

มาตรฐานดังกล่าวยังได้อธิบายถึงน้ำส้มสายชูแต่ละชนิด, องค์ประกอบที่จำเป็นและคุณภาพ, ส่วนผสม, สิ่งปนเปื้อน, ความสะอาด, น้ำหนักและวิธีวัด, ฉลาก และวิธีการวิเคราะห์ (Co-ordinating Committee for Europe, 1981 อ้างถึงใน Adams, 1985)

สำหรับมาตรฐานของน้ำส้มสายชูแต่ละชนิดที่กำหนดโดย Food and Drug Administration of United States, Department of Agriculture ตั้งแต่ปี 1936 (Vaughn, 1954) มีดังนี้

- น้ำส้มสายชูจากแอปเปิล เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำแอปเปิลให้เป็นอัลกอฮอล์แล้วหมักต่อจนได้กรด โดยในสารละลาย 100 มิลลิลิตร (20 องศาเซลเซียส) จะต้องมีกรดอะซิติกไม่ต่ำกว่า 4 กรัม

- น้ำส้มสายชูจากไวน์, น้ำส้มสายชูจากองุ่น เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักองุ่นให้เป็นอัลกอฮอล์แล้วหมักต่อจนได้กรด โดยในสารละลาย 100 มิลลิลิตร (20 องศาเซลเซียส) ต้องมีกรดอะซิติกไม่ต่ำกว่า 4 กรัม

- น้ำส้มสายชูจากมอล์ทเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักข้าวบาร์เลย์, มอล์ท หรือธัญพืช โดยนำไปแช่จนกลิ่นหรือส่วนประกอบละลายออกมา แล้วนำไปหมักให้ได้เป็นอัลกอฮอล์แล้วหมักต่อจนได้กรดโดยไม่มีการกลั่น และในสารละลาย 100 มิลลิลิตร (20 องศาเซลเซียส) ต้องมีกรดอะซิติกไม่ต่ำกว่า 4 กรัม

- น้ำส้มสายชูจากน้ำตาล เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลข้น (sugar syrup), กากน้ำตาล และน้ำตาลข้นที่ผ่านการกลั่น (refiner's syrup) ให้ได้อัลกอฮอล์แล้วหมักต่อจนได้กรด และในสารละลาย 100 มิลลิลิตร (20 องศาเซลเซียส) ต้องมีกรดอะซิติกไม่ต่ำกว่า 4 กรัม

- น้ำส้มสายชูจากกลูโคส เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักสารละลายกลูโคสให้กลายเป็นอัลกอฮอล์แล้วหมักต่อจนได้กรด สารละลายที่ได้จะบิดระนาบไปทางขวา (dextro-rotary) และในสารละลาย 100 มิลลิลิตร (20 องศาเซลเซียส) ต้องมีกรดอะซิติกไม่ต่ำกว่า 4 กรัม

- น้ำส้มสายชูกลั่น (spirit vinegar, distilled vinegar, grain vinegar) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักอัลกอฮอล์กลั่นเจือจางให้กลายเป็นกรดอะซิติก และในสารละลาย 100 มิลลิลิตร (20 องศาเซลเซียส) ต้องมีกรดอะซิติกไม่ต่ำกว่า 4 กรัม

น้ำส้มสายชูที่ใช้เป็นเครื่องปรุงรส (seasoned vinegar) เตรียมโดยนำมะเดื่อไปแช่จนกลิ่นหรือส่วนประกอบละลายออกมา หรือโดยการนำน้ำส้มสายชูจากไวน์ไปผสมร่วมกับสมุนไพร, เครื่องเทศ หรือกระเทียม จุดประสงค์ที่ใช้เนื่อใช้เป็นเครื่องชูรส น้ำส้มสายชูเหล่านี้ต้องมีการบอกเครื่องปรุงรสที่ใช้และวัตถุดิบพื้นฐานที่ทำน้ำส้มสายชู น้ำส้มสายชูดังกล่าวต้องมีกรดอะซิติกอย่างต่ำ 4 กรัม ในสารละลาย 100 มิลลิลิตร (20 องศาเซลเซียส)

น้ำส้มสายชูที่ทำจากวัตถุดิบหลายชนิดผสมกัน ต้องระบุว่า "สารประกอบ" (compound) ไว้ที่ฉลากให้เห็นเด่นชัด

น้ำส้มสายชูที่มีการบำบัดโดยใช้กลิ่นหรือสีที่ไม่เป็นอันตราย เพื่อให้มีลักษณะเฉพาะพิเศษต้องติดฉลากว่า "น้ำส้มสายชูเลียนแบบ" (imitation vinegar)

สำหรับประเทศไทย มีมาตรฐานของน้ำส้มสายชูที่กำหนดโดยกระทรวงสาธารณสุข (ประพนธ์, 2531) ไว้ดังต่อไปนี้

ข้อที่ 1. น้ำส้มสายชูแบ่งออกเป็น

1. น้ำส้มสายชูหมัก ได้แก่ ผลิตผลที่ได้จากธัญพืช ผลไม้ หรือน้ำตาลแล้วหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีตามธรรมชาติ

2. น้ำส้มสายชูกลั่น ได้แก่ การนำสุราขาวเจือจาง หรืออัลกอฮอล์เจือจาง หมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีธรรมชาติ หรือได้มาจากการกลั่นน้ำส้มสายชูหมักหรือน้ำส้มสายชูกลั่น

3. น้ำส้มสายชูเทียม ได้แก่ การเอากรดอะซิติกมาเจือจางกับน้ำ

ข้อที่ 2. สำหรับคุณภาพและมาตรฐานของน้ำส้มสายชูหมัก และน้ำส้มสายชูกลั่นมีดังนี้

1. ต้องมีกรดอะซิติกไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

2. ต้องไม่มีกรดน้ำส้ม หรือกรดอะซิติกที่มิได้มาจากการผลิตน้ำส้มสายชูหมักหรือน้ำส้มสายชูกลั่นตามกรรมวิธีธรรมชาติ

3. ต้องไม่มีการเจือจางกรดซัลฟุริก หรือกรดแร่อิสระอย่างอื่น

4. ต้องไม่มีตะกอน เว้นไว้แต่ตะกอนอันเกิดจากธรรมชาติจากกรรมวิธีที่ผลิต

5. ต้องไม่มีหนอนน้ำส้ม (vinegar eel)

ข้อที่ 3. การแต่งสีน้ำส้มสายชูหมักหรือน้ำส้มสายชูกลั่นให้ใช้สีน้ำตาลไหม้ (caramel)

ข้อที่ 4. สำหรับน้ำส้มสายชูเทียม ต้องมีคุณภาพและมาตรฐาน ดังนี้

1. ต้องมีกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

2. ต้องไม่มีกรดซัลฟุริกหรือกรดแร่อิสระอย่างอื่น

3. ต้องไม่มีตะกอน

4. ไม่มีการเจือจางสีชนิดใด ๆ

ข้อที่ 5. น้ำส้มสายชูหมัก น้ำส้มสายชูกลั่น และน้ำส้มสายชูเทียมที่ผลิตและจำหน่ายต้องมีฉลาก และในการแสดงฉลากนั้นอย่างน้อยต้องมีข้อความเป็นอักษรหรือภาษาไทยที่เห็นได้ชัดเจนดังต่อไปนี้

1. คำว่า "น้ำส้มสายชูหมัก" คำว่า "น้ำส้มสายชูกลั่น" หรือคำว่า "น้ำส้มสายชูเทียม" แล้วแต่กรณีและเลขทะเบียนอาหาร

2. ปริมาตรของน้ำส้มสายชูเป็น มล.

3. ชื่อผู้ผลิต และตำบลที่ตั้งของโรงงาน

4. กรณีน้ำส้มสายชูกลั่นมีกรดน้ำส้มเกินกว่า 7 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรต้องระบุปริมาณของน้ำส้มสายชูคิดเป็นกรดต่อ 100 มิลลิลิตร และวิธีทำให้เจือจางก่อนนำไปใช้บริโภค

การตรวจวัดว่าน้ำส้มสายชูเป็นน้ำส้มสายชูที่มีการปลอมปนหรือสังเคราะห์ เป็นงานที่ซับซ้อน วิธีที่ดีที่สุดคือ การตรวจสอบสารที่เป็นองค์ประกอบทั่วไปของน้ำส้มสายชูหลาย ๆ ชนิด สารประกอบดังกล่าวคือ อะเซทิลเมธิลคาร์บินอล ซึ่งพบในน้ำส้มสายชูทุกชนิดที่มีต้นกำเนิดทางชีววิทยา นอกจากนี้ก็คือกรดฟอร์มิค ซึ่งพบในปริมาณมากพอประเมินได้ในน้ำส้มสายชูที่ผลิตจากกรดอะซิติกสังเคราะห์ แต่พบในปริมาณน้อยมากในน้ำส้มสายชูหมัก

ในการวิเคราะห์ต้องมีการตรวจสอบความถ่วงจำเพาะ, ของแข็ง, เถ้า, การละลายน้ำ และสภาพความเป็นด่างของเถ้า, อัลกอฮอล์, สภาพกรดทั้งหมด, กรดที่ไม่ระเหยง่าย, กรดที่ระเหยง่าย, โพลาไรเซชัน, สารรีดิวซ์รวม (total reducing substances) ก่อนและหลังการเปลี่ยนแปลง, น้ำตาล, อะเซทิลเมธิลคาร์บินอล, สารรีดิวซ์ที่ระเหยได้ (volatile reducing substances), กรดฟอสฟอริคที่ละลายและไม่ละลายน้ำ, เปอร์แมงกาเนต, ค่าออกซิเดทีฟ (oxidative value), กรดเกลือแร่, เพนโทซาน, กรดฟอร์มิค และกลีเซอรอล

แต่คุณภาพหลักของน้ำส้มสายชูคือ ปริมาณกรดอะซิติก ซึ่งตามมาตรฐานในอเมริกาต้องมีกรดอะซิติกอย่างน้อยที่สุดร้อยละ 4 น้ำหนักโดยปริมาตร มาตรฐานดังกล่าวยังใช้กันในอังกฤษโดย Food Standard Committee แต่น้ำส้มสายชูที่บรรจุขวดขายในอังกฤษโดยทั่วไปจะมีปริมาณกรดอะซิติกร้อยละ 5 สำหรับ Codex Standard กำหนดให้น้ำส้มจากไวน์มีปริมาณกรดต่ำสุดร้อยละ 6 และร้อยละ 5 สำหรับน้ำส้มสายชูอื่น ๆ ปริมาณเป็นกรดทั้งหมดในน้ำส้มสายชูสามารถวัดได้โดยการไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ส่วนกรดที่ระเหยได้ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงปริมาณกรดอะซิติกที่แท้จริงสามารถหาได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ หรือหาจากผลต่างของกากที่เหลือจากการระเหย

การวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างไม่สามารถใช้บอกความแตกต่างระหว่างน้ำส้มสายชูแท้กับกรดอะซิติกเจือจาง มีการทดสอบหลายอย่างที่สามารถบอกได้โดยใช้ความจริงที่ว่า น้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักมีองค์ประกอบย่อยอีกมากมายนอกเหนือไปจากกรดอะซิติกแล้ว วิธีที่ง่ายที่สุดแต่ไม่ค่อยเป็นจริงนัก คือการวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง สารที่ไม่ระเหยในน้ำส้มสายชูทำให้น้ำส้มสายชูมีค่าความเป็นกรดสูงเป็นด่างสูงกว่าสารละลายกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้นเท่ากัน เช่น สารละลายกรดอะซิติกร้อยละ 5 มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 2.46 ในขณะที่น้ำส้มสายชูที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 ให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 2.8-3.2 (White, 1971 อ้างถึงใน Adams, 1985) ดังนั้นน้ำส้มสายชูกลั่นซึ่งผ่านการกำจัดสารที่ไม่ระเหยส่วนใหญ่ออกไปแล้วจึงมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างใกล้เคียงกับน้ำส้มสายชูสังเคราะห์ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์โดยใช้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างได้ ในทำนองเดียวกันน้ำส้มสายชูที่ได้จากการผสม (blended vinegar) ก็ไม่สามารถใช้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างอย่างเดียวในการตรวจสอบว่าน้ำส้มสายชูดังกล่าวได้จากการผสมน้ำส้มสายชูกลั่นหรือกรดอะซิติก

การวิเคราะห์ทางเคมีแบบเปียก (wet chemical analysis) สามารถบอกความแตกต่างระหว่างน้ำส้มสายชูหมักกับน้ำส้มสายชูที่ไม่ได้ผ่านการหมักได้ โดยที่ตัวอย่างน้ำส้มสายชูที่ผ่านการหมักนั้นเมื่อนำไปกลั่นวิเคราะห์ จะได้สารประกอบพวกอะเซโทอิน (อะเซทิลเมธิลคาร์บินอล), ไดอะเซทิล, เอธานอล, อะซิเตต, เอสเทอร์และอื่น ๆ รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดังกล่าวอยู่ในหนังสือของ Pearson (Egan และคณะ, 1981 อ้างถึงใน Adams, 1985) นอกจากนี้ก็มีกรดฟอร์มิค ซึ่งพบในปริมาณที่มากพอประเมินได้ในน้ำส้มสายชูสังเคราะห์ แต่พบน้อยมากในน้ำส้มสายชูหมัก

วิธีการที่รวดเร็วในการบอกความแตกต่างระหว่างน้ำส้มสายชู กับกรดอะซิติกเจือจาง คือ การใช้ความสามารถในการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (UV absorption) เมื่อนำน้ำส้มสายชูมากลั่น และนำสารที่ได้จากการกลั่นไปวิเคราะห์พบว่า มันสามารถดูดกลืนแสงได้

สูงสุดในช่วง 270-285 นาโนเมตร ส่วนน้ำส้มสายชูที่ไม่ได้มาจากการหมักจะดูดกลืนแสงได้น้อยกว่าในช่วงคลื่นดังกล่าว แต่สารที่ไม่มีสีในคาราเมลอาจถูกกลั่นปนออกมา และทำให้ค่าที่อ่านได้ผิดพลาด นอกจากนี้ยังอาจใช้วิธีการวัดค่าความดันออสโมติค หรือค่าการลดลงของจุดเยือกแข็งก็อาจบอกความแตกต่างของน้ำส้มสายชูได้

กรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูมีส่วนประกอบตามธรรมชาติของคาร์บอน-14 ที่เป็นสารกัมมันตภาพรังสี (radioactive isotope carbon-14) ในปริมาณที่สูงกว่ากรดอะซิติกที่สังเคราะห์จากปิโตรเลียม เนื่องจากกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูได้จากการสังเคราะห์คาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศโดยอาศัยสิ่งมีชีวิต แต่วิธีวิเคราะห์ปริมาณรังสีนี้ไม่สามารถบอกความแตกต่างของน้ำส้มสายชูกับกรดอะซิติกที่ได้จากการกลั่นจากไม้ หรือการออกซิเดชันเอธานอลที่ได้จากการหมัก

2.8 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอัลกอฮอล์และน้ำส้มสายชู

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอัลกอฮอล์และน้ำส้มสายชู ได้แก่ ยีสต์ ซึ่งใช้ในขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลในน้ำสับปะรดให้กลายเป็นเอธานอล และแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก ซึ่งใช้ในขั้นตอนการเปลี่ยนเอธานอลให้กลายเป็นกรดอะซิติก รายละเอียดเกี่ยวกับการผลิตเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการหมักแสดงไว้ในภาคผนวก ก.

2.8.1 ยีสต์

ยีสต์ได้เข้ามามีบทบาทกับมนุษย์เราเป็นเวลานานนับหลายพันปีแล้ว โดยรู้จักยีสต์ครั้งแรกในฐานะเป็นตัวทำให้เกิด "น้ำเมา" ซึ่งก็ได้มีการกล่าวถึงบ่อย ๆ ในการบันทึกประวัติศาสตร์บางตอน ความสำคัญของยีสต์มีทั้งที่เป็นประโยชน์และโทษต่ออาหาร แต่ส่วนใหญ่รู้จักยีสต์ทางด้านความมีประโยชน์มากกว่าโทษ ประโยชน์ของยีสต์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหารมีหลายอย่าง เช่น การทำขนมปัง, ไวน์, เหล้า, เบียร์, อัลกอฮอล์, อาหารเสริมโปรตีน, อุตสาหกรรมสังเคราะห์วิตะมิน, เอนไซม์ และไขมัน เป็นต้น ส่วนยีสต์ที่ให้โทษก็มีหลายชนิด เป็นยีสต์ที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่อาหารและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ทำให้อาหารหมักดองต่าง ๆ, เนื้อ, แหนม, ขนมปัง, น้ำผลไม้, น้ำเชื่อม, น้ำผึ้ง, ไวน์, เบียร์ ฯลฯ มีสี กลิ่น รสเสียหาย ได้แก่ ยีสต์พวกที่ทำให้เกิดฟิล์ม (film yeast), ยีสต์พวกแอสโมฟิลิค (asmophilic yeast) และพวก Rhadotorula เป็นต้น นอกจากนี้ยังมียีสต์ที่ทำให้เกิดโรคกับคน พืช และสัตว์ (สุทธิศักดิ์,ม.ป.ป.)

ยีสต์ส่วนใหญ่อยู่ในรูปเซลเดียวมีรูปร่างหลายแบบ อาจมีรูปร่างกลม, ไข่, ท่อนยาว, ยาวเรียงกัน หรือต่อกันเป็นสายก็มี โดยทั่วไปยีสต์มีขนาดโตกว่าแบคทีเรียแทบทุกชนิด ขนาดของยีสต์มีความแตกต่างกันมาก คือ กว้างประมาณ 1-5 ไมโครเมตร และยาว 5-30 ไมโครเมตร หรือมากกว่านั้น

ก. **ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์**

- <u>อาหาร</u> น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานที่ดีที่สุดของยีสต์ แม้ว่ายีสต์สามารถใช้กรดอินทรีย์และอัลกอฮอล์ได้ก็ตาม ยีสต์ใช้น้ำตาลได้ทั้งในสภาพการหมักที่มีการให้อากาศและไม่มีการให้อากาศ ดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow CO_2 + H_2O$$ (สภาพที่มีการให้อากาศ)

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow C_2H_5OH + CO_2$$ (สภาพที่ไม่มีการให้อากาศ)

การหมักน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ นอกจากได้อัลกอฮอล์เป็นส่วนใหญ่แล้วก็ยังได้เอสเทอร์,กลีเซอรอล และอัลดีไฮด์เกิดขึ้นด้วย ยีสต์ดังกล่าวมีประโยชน์มากมายในอุตสาหกรรมการผลิตอัลกอฮอล์ เบียร์ ไวน์ และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ

ยีสต์สามารถใช้สารตั้งแต่รูปง่าย ๆ เช่น แอมโมเนีย ยูเรีย จนถึงสารซับซ้อนมาก ๆ เช่น กรดอะมิโน, โพลีเปปไทด์ ฯลฯ นอกจากนี้ยีสต์ยังมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี จึงทำให้ยีสต์สปีชีส์หนึ่ง ๆ มีหลายสายพันธุ์(strain) ซึ่งมีคุณสมบัติที่นำไปใช้ประโยชน์ได้แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น <u>Saccharomyces cerevisiae</u> มีสายพันธุ์ที่ใช้สำหรับทำขนมปัง, เบียร์, ไวน์, ผลิตอัลกอฮอล์, ผลิตโปรตีน และอื่น ๆ พวกนี้มีทั้งที่เป็นทอปยีสต์ (top yeast) ซึ่งเจริญอยู่ที่ผิวหน้าของอาหารและพวกบอททอมยีสต์ (bottom yeast) ซึ่งจะเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนอยู่ที่ส่วนก้นของถังหมัก

- <u>ความชื้น</u> โดยทั่ว ๆ ไปยีสต์ต้องการความชื้นมากกว่าราแต่น้อยกว่าแบคทีเรีย

- <u>ความเป็นกรดเป็นด่าง</u> ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4-4.5

- <u>ออกซิเจน</u> ยีสต์เจริญในสภาพที่มีออกซิเจนได้ดีที่สุด ส่วนในสภาพไม่มีอากาศจะเจริญได้ช้ากว่า

ข. ยีสต์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม

ยีสต์ที่ใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่เป็นพวกยีสต์ใน class Hemiascanycetes และส่วนใหญ่อยู่ในสกุล Saccharomyces สำหรับคำว่า ยีสต์ป่า (wild yeast) หมายถึง ยีสต์ชนิดใดก็ตามที่ไม่ใช่ตัวที่ต้องการมาใช้ประโยชน์ แต่ปะปนมาในกระบวนการ ฉนั้นยีสต์ที่มีประโยชน์ในกระบวนการหนึ่งของการผลิตอาจเป็นยีสต์ป่าของอีกกระบวนการหนึ่งก็ได้

ยีสต์สกุล Saccharomyces เซลของยีสต์พวกนี้เป็นรูปกลม รูปไข่ หรือค่อนข้างยาว สปีชีส์ที่สำคัญคือ Saccharomyces cerevisiae ซึ่งมีบทบาทในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น ขนมปัง, ไวน์, กลีเซอรอล และอินเวอร์เทส (invertase) สำหรับทอปยีสต์มีความว่องไวในการหมักมากและเจริญได้อย่างรวดเร็วที่ 20 องศาเซลเซียส การรวมกลุ่มของเซลและการเกิดคาร์บอนไดออกไซด์อย่างรวดเร็วจะไปดันให้เซลลอยขึ้นอยู่บนผิวหน้าของอาหาร จึงเรียกว่า ทอปยีสต์ ส่วนบอททอมยีสต์นั้นเซลไม่มีการเกาะกลุ่มและเจริญอย่างช้า ๆ มีความว่องไวในการหมักที่อุณหภูมิต่ำ (10-15 องศาเซลเซียส) เนื่องจากไม่มีการรวมกลุ่มของเซลและการเจริญเป็นไปอย่างช้า ๆ ทำให้เกิดกาซคาร์บอนไดออกไซด์น้อย เซลจึงค่อย ๆ ตกตะกอนอยู่ที่ก้นภาชนะจึงเรียกว่า บอททอมยีสต์

S. cerevisiae var. ellipsiodeus เป็นพวกที่ให้อัลกอฮอล์สูง จึงนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอัลกอฮอล์ ไวน์ และสุรา

2.8.2 แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก

จุลินทรีย์ที่ออกซิไดซ์เอธานอลไปเป็นกรดอะซิติก เรียกทั่ว ๆ ไปว่า แบคทีเรียผลิตอะซิติก (acetic acid bacteria) จุลินทรีย์ดังกล่าวแตกต่างจากแบคทีเรียอื่นที่เกิดการเมตาโบลิซึมในตัวกลางที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่ำได้ดี แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกนี้มีรูปร่างหลายแบบ (polymorphous) คือมีรูปร่างตั้งแต่เป็นวงรีจนถึงเป็นแท่ง, เป็นเส้นตรงหรือโค้งน้อย ๆ, มีความยาวของเซลระหว่าง 0.5-0.8 จนถึง 0.9-4.2 ไมโครเมตร อาจพบอยู่เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือเป็นสาย มีทั้งแบบที่เคลื่อนที่ไม่ได้และเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา บางชนิดผลิตเม็ดสี บางชนิดผลิตเซลลูโลส เนื่องจากการใช้สายพันธุ์บริสุทธิ์ของแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกนั้นไม่เป็นที่นิยมกันในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มสายชู ส่วนใหญ่การใช้สายพันธุ์ผสมหรือสายพันธุ์ที่ไม่ทราบชื่อ (undefined cultures) ไม่ใช่ปัญหาสำคัญ เนื่องจากกระบวนการหมักสามารถดำเนินต่อไปได้และให้ผลที่น่าพอใจ โดยไม่ต้องมีการควบคุมให้ปลอดเชื้ออย่างเด็ดขาด

ฟิล์มที่เกิดขึ้นในขณะผลิตกรดอะซิติกโดยใช้ไวน์นั้น ความจริงเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งถูกค้นพบโดย Persoon ในปี 1822 (อ้างถึงใน Adams, 1985) เขาได้ให้ชื่อจุลินทรีย์นั้นว่า Mycoderma (แปลว่า ฟิล์มที่มีความหนืด) ในปี 1837 Kutsing (อ้างถึงใน Adams, 1985) ได้ค้นพบความสัมพันธ์ระหว่างฟิล์มกับกระบวนการเกิดกรดอะซิติกเช่นกัน แต่เขาเรียกจุลินทรีย์ดังกล่าวว่า Ulvina aceti (แปลว่า พืชจำพวกเห็ดรา) นอกจากนี้ยังมีผู้ทำการทดลองโดยใช้กระบวนการออร์ลีน และได้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฟิล์มจุลินทรีย์ ออกซิเจน และการเกิดกรดอะซิติก แม้ว่าเขาล้มเหลวในการบ่งบอกธรรมชาติของแบคทีเรียโดยได้อธิบายว่าฟิล์มดังกล่าวเป็นพืชเล็ก ๆ จำพวกเห็ดรา

ในปี 1894 Hensen ได้แยกแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูออกเป็น 3 สปีชีส์ ให้ชื่อว่า Bacterium aceti, B. pasteurianum และ B. kutzingianum ในขณะที่ Brown ให้ชื่อแบคทีเรียที่สร้างฟิล์มว่า Bacterium xylinum ในปี 1900 Beijerinck ได้ให้ชื่อทั่วไป (generic name) ของแบคทีเรียดังกล่าวว่า Acetobacter

ในปี 1968 Asai (อ้างถึงใน Adams, 1985) ได้แบ่งสกุลของ Acetobacter ออกเป็น 2 สกุลคือ Acetobacter และ Gluconobacter ซึ่ง Gluconobacter มีลักษณะเฉพาะได้แก่ ความสามารถในการผลิตกรดกลูโคนิคได้จากกลูโคส, ไม่เกิดฟิล์มในอาหารเหลว และเจริญเติบโตได้น้อยมากในเบียร์และสาเก

งานที่ยืนยันว่าแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกมี 2 ชนิดอีกงานหนึ่ง คือการศึกษาด้านสารอาหารและชีวเคมีของ Rainbow และคณะ (1953 อ้างถึงใน Adams, 1985) โดยพบว่า Acetobacter เป็นพวกแลคตาฟิลิค (lactaphilic) คือเจริญได้ดีบนแลคเตท และในหลายกรณีอาจมีเกลือแอมโมเนียมรวมอยู่ด้วยโดยเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่เจริญได้น้อยมากบนกลูโคส และต้องการออกซิเจนเป็นปัจจัยในการเจริญเติบโต ในขณะเดียวกันแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกอีกพวก คือ Acetomonas หรือ Gluconobacter จัดเป็นพวกกลูโคฟิลิค (glucophilic) คือสามารถเจริญได้ดีบนกลูโคส แต่เจริญได้น้อยมากบนแลคเตท นอกจากนี้ยังต้องการกรดอะมิโนในการสังเคราะห์อาหารและต้องการปัจจัยในการเจริญ เช่น กรดนิโคตินิค, แพนโทธิเนต และพี-อะมิโน เบนโซเอทในบางครั้ง

ล่าสุดใน Bergey's Manual ได้อธิบายถึงลักษณะเฉพาะของ Acetobacter และ Gluconobacter ไว้ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก

Characteristics of the Acetic Acid Bacteria (based on tables in Bergey's Manual, see De Ley & Frateur, 1974a, b)

	Acetobacter										*Gluconobacter*
Gram stain	−										−
Morphology	Ellipsoidal to rod-shaped Peritrichous flagella or none										Ellipsoidal to rod-shaped Polar flagella or none
Growth at pH 4·5	+										+
Oxidn of ethanol to acetic acid	+ +										+
Acetate to CO_2	+										−
Lactate to CO_2	+										−
Krebs cycle	+										−
Catalase	+										+
Species:	*A. aceti*				*A. pasteurianus*					*A. peroxydans*	*G. oxydans*
Sub-species:*	a	b	c	d	a	b	c	d	e		
Ketogenesis in glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+
Formation of:											
5-ketogluconate	(+)	(+)	(+)	(+)	−	−	−	−	−	−	+
2-ketogluconate	(+)	(+)	(+)	(+)	d	−	−	−	−	−	+
Gluconate	+	+	+	+	(+)	+	+	−	−	−	+
Growth on ethanol/ ammonium salts	+	−	(−)	+	(−)	+	+	−	−	+	−
Produces cellulose	−	−	+	−	−	−	+	−	−	−	−
Produces gamma-pyrones	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	+
Produces brown pigment	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	
G+C moles %	59 −65	60 −61	62 −63	64	55 −62	62			55 − 56	61–64	60–64

A. aceti: a. aceti; b. orleanensis; c. xylinum; d. liquefaciens

A. pasteurianus: a. pasteurianus; b. lovaniensis; c. astunensis; d. ascendens; e. paradoxus

Key to symbols: +, >90% positive; −, >90% negative; d, 11–89% positive (among the isolates tested). ( ), delayed reaction.

ก. ปัจจัยในการเจริญเติบโต

มีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการทำกิจกรรมของแบคทีเรีย (สุทธิศักดิ์, ม.ป.ป.) ปัจจัยสำคัญ ๆ ได้แก่

ก.1 <u>อาหาร</u> แบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถใช้อาหารได้หลายประเภท อาหารของแบคทีเรียอาจแบ่งย่อยออกเป็น

- แหล่งคาร์บอน แบคทีเรียนำอาหารพวกนี้ไปใช้เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างและแหล่งให้พลังงานแก่เซล สารนี้อาจอยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ เช่น แป้ง , น้ำตาล , ไขมัน เป็นต้น

- แหล่งไนโตรเจน แบคทีเรียใช้สารพวกนี้ไปสร้างโปรตีน, เอนไซม์ และกรดนิวคลีอิคในเซล สารพวกนี้อาจอยู่ในรูปสารอินทรีย์ เช่น โปรตีน, เปปไทด์, กรดอะมิโน ฯลฯ หรืออยู่ในรูปสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียม (NH_4^+), ไนเตรท (NO_3^-), ไนไตรท์ (NO_2^-) และยูเรีย เป็นต้น

- ตัวรับอิเลคตรอนจากปฏิกิริยาการหายใจของแบคทีเรีย เพื่อทำให้มีพลังงานเกิดขึ้นสำหรับใช้ในการดำรงชีวิตและทำกิจกรรมของแบคทีเรีย สารพวกนี้ทำหน้าที่รับเอาอิเลคตรอนเข้าไว้ เช่น ออกซิเจน และสารอื่น ๆ ที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น ไนเตรท, ซัลเฟต, ฟอสเฟต และสารอินทรีย์บางชนิด ฯลฯ

- เกลือแร่ที่จำเป็นต่อแบคทีเรียทั่ว ๆ ไป ได้แก่ ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส,โปแตสเซียม,คาร์บอน,ไฮโดรเจน, ออกซิเจน, แคลเซียม, แมกนีเซียม, ซัลเฟอร์, เหล็ก, แมงกานีส,สังกะสี, ทองแดง และโคบอลต์ โดยแร่ธาตุเหล่านี้ทำหน้าที่ต่าง ๆ กันในขบวนการเมตาโบลิซึมของเซล

- ปัจจัยในการเจริญเติบโต ได้แก่ พวกวิตามินต่าง ๆ เช่น ไพริมิดีน, นิวรีน เป็นต้น ซึ่งเป็นสารที่แบคทีเรียต้องการเพียงเล็กน้อยแต่ก็มีความสำคัญในขบวนการที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตเมื่อขาดสารพวกนี้ปฏิกิริยาต่าง ๆ ในขบวนการเมตาโบลิซึมจะทำงานไม่ได้ สารพวกนี้แบ่งออกเป็น

essential growth factor เป็นสารที่เป็นปัจจัยในการเจริญเติบโตที่แบคทีเรียสร้างเองไม่ได้แต่จำเป็นต้องในในการดำรงชีวิต

non esssential growth factor เป็นสารที่เป็นปัจจัยในการเจริญเติบโตที่แบคทีเรียสามารถสร้างขึ้นมาใช้ได้เอง

ก.2 <u>ความชื้น</u> โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียมีความต้องการความชื้นในอาหารมากกว่าเชื้อราและยีสต์

ก.3 อุณหภูมิ โดยทั่วไปแบคทีเรียมีความต้องการอุณหภูมิสำหรับการเจริญเติบโตแตกต่างกัน แบ่งออกได้เป็น 3 พวกดังนี้

- ไซโครฟิลิค (psychrophilic) แบคทีเรียพวกนี้เจริญได้ดีในสภาพอุณหภูมิต่ำ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 15 องศาเซลเซียส

- เมโซฟิลิค (mesophilic) หมายถึงแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง มีอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 28-35 องศาเซลเซียส

- เทอร์โมฟิลิค (thermophilic) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส คือประมาณ 55 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2.3 แสดงช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ

	อุณหภูมิต่ำสุด (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิสูงสุด (องศาเซลเซียส)
ไซโคฟิลิค	0	15	30
เมโซฟิลิค	5-25	28-35	30-50
เทอร์โมฟิลิค	25-45	55	60-90

ก.4 ความเป็นกรดเป็นด่าง แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีที่สภาพเป็นกลาง แต่ก็มีแบคทีเรียบางชนิดที่ทนกรดได้บ้าง และเจริญในสภาพเป็นกรดเล็กน้อยได้

ก.5 ออกซิเจน สามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ตามความต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิตได้ดังนี้

- แอโรบิคแบคทีเรีย (aerobic bacteria) หมายถึงแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ซึ่งอาจแยกเป็น ออบลิเกทแอโรบิคแบคทีเรีย (obligate aerobic bacteria) ซึ่งพวกนี้ขาดออกซิเจนไม่ได้เลย กับแฟคคัลเททีฟแอโรบิคแบคทีเรีย (facultative aerobic bacteria) พวกนี้โดยปกติเจริญเติบโตในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน แต่ในสภาพที่มีออกซิเจนก็เจริญได้

- แอนแอโรบิคแบคทีเรีย (anaerobic bacteria) พวกนี้ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตจึงเจริญได้ดีในที่ไม่มีออกซิเจน และสามารถแบ่งย่อยได้เหมือนพวกแรก

- ไมโครแอโรฟิลิคแบคทีเรีย (microaerophilic bacteria) พวกนี้ต้องการออกซิเจนปริมาณเพียงเล็กน้อย ไม่ค่อยเจริญในสภาพที่มีออกซิเจนมาก ๆ หรือไม่มีเลย

ก.6 สารยับยั้งการเจริญเติบโต พวกนี้อาจมีอยู่ในอาหารตามธรรมชาติ หรือใส่ลงไปภายหลังโดยบังเอิญหรือเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ สารดังกล่าวอาจสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้แทบทั้งหมดหรือยับยั้งได้เฉพาะบางชนิดเท่านั้น เช่น พวกยีสต์ที่ใช้ทำไวน์สามารถผลิตอัลกอฮอล์มายับยั้งเชื้อตัวอื่นที่ปะปนอยู่ในถังหมัก

แบคทีเรียที่ให้กรดอะซิติกในกลุ่ม suboxydans และ peroxydans (Frateur nomenclature) ส่วนใหญ่ต้องการปัจจัยในการเจริญเติบโต (Gossele และคณะ, 1980 อ้างถึงใน Ebner, 1982) ปัจจัยเหล่านี้ขึ้นกับการเติมและการใช้แหล่งคาร์บอน ส่วนใหญ่จะเลือกใช้กรดพาราอะมิโนเบนโซอิค, ไนอะซิน, ไธอามีน และกรดแพนโทเธนิค ในปี 1966 Aneyama และ Kondo (อ้างถึงใน Ebner, 1982) พบว่า Acetobacter บางสายพันธุ์ไม่ต้องการวิตามินถ้าอยู่ในสภาวะที่มีกลูโคส

ในการทำนายขบวนการเมตาโบลิซึมของแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกที่ใช้ในอุตสาหกรรม พึงระลึกว่าแบคทีเรียที่ใช้เป็นสายพันธุ์ผสมซึ่งอาจมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบไป และระบบเอนไซม์บางส่วนในเซลอาจถูกยับยั้งโดยสภาวะแวดล้อม จึงมีความเป็นไปได้ว่าในระบบการหมักแบบซับเมิร์จนั้น เอนไซม์ของวัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิค (tricarboxylic cycle) ถูกปิดกั้นเนื่องจากความเป็นกรดเป็นด่างต่ำ และนี่เองป้องกันไม่ให้เกิดการออกซิเดชันกรดอะซิติกไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ บางครั้งการเกิดออกซิเดชันมากเกินไปอาจเกิดขึ้นหลังจากเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมอย่างฉับพลัน ตัวอย่างเช่น การลดลงอย่างรุนแรงของความเข้มข้นกรดรวม หรืออาจมีการขาดแคลนเอธานอลร่วมด้วย

นอกจากนี้ในปี 1976 Ebner (อ้างถึงใน Ebner, 1982) พบว่าการออกซิเดชันเอธานอลไปเป็นกรดอะซิติก ไม่ได้ขึ้นกับการแบ่งตัวของเซล (cell multiplication) ทั้งหมด เนื่องจากหลังจากการเติบโตของเซลหยุดลงแล้ว โดยที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงตามที่กำหนด แต่เซลยังสามารถออกซิไดซ์เอธานอลไปเป็นกรดอะซิติกได้ในอีกช่วงเวลาหนึ่ง เมื่อพ้นช่วงดังกล่าวแล้ว เซลจะตายไปอย่างรวดเร็วและการออกซิเดชันจะหยุด เพื่อเป็นการยืนยันงานวิจัยของ Ebner ในปี 1977 Vera และ Wang (อ้างถึงใน

Ebner, 1982) ทำการทดลองพบว่ามีการเกิดกรดอะซิติก หลังจากการเติบโตของเซลหยุดชะงักลงที่ความเข้มข้นของกรดอะซิติกร้อยละ 3 โดยที่ต้องการความเข้มข้นของกรดร้อยละ 4-7 ดังนั้นการเกิดกรดอะซิติกจึงขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญเติบโตและความเข้มข้นของเซลจริง (actual cell concentration)

ข. สายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม

ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำส้มสายชู แบคทีเรียที่ใช้ส่วนใหญ่ไม่ได้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ แต่เป็นหลายสายพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องจากสายพันธุ์บริสุทธิ์มีการพัฒนาจนแปรเปลี่ยนไปได้ง่าย (variability) ในสภาวะต่าง ๆ ที่ถูกกำหนดในถังหมัก แต่แบคทีเรียหลายสายพันธุ์ไม่ก่อปัญหาดังกล่าว

การหมักกรดอะซิติกอาจดำเนินไปได้เป็นปี ๆ โดยไม่มีการหยุดชะงักหรือมีประสิทธิภาพลดลง ถ้ามีการเลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ที่พัฒนาขึ้นมาจนมีความสามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงและสามารถอาศัยอยู่โดยใช้สารอาหารปริมาณต่ำสุด คุณสมบัติของแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกสายพันธุ์ที่แยกใหม่อาจเปลี่ยนแปลงไปจากที่เพาะเชื้อครั้งแรก และถ้าสายพันธุ์ดังกล่าวถูกถ่ายเชื้อ (cultivate) หลาย ๆ ครั้งอาจแสดงคุณสมบัติอื่น ๆ ที่สำคัญยิ่งซึ่ง. การปรับตัวดังกล่าวยังมีผลต่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่ผลิตได้ด้วย ดังนั้นในทางปฏิบัติการถ่ายแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกจากที่เพาะเลี้ยงบนผิววุ้น (surface culture) ลงสู่อาหารเหลว (submerged culture) และอื่น ๆ จึงมีปัญหามาก ทั้งในแง่ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตที่ต้องรักษาให้มีความเข้มข้นรวมมากกว่าร้อยละ 12 (Shimwell,1959 อ้างถึงใน Ebner,1982)

โดยทั่วไปโรงงานน้ำส้มสายชู มักสนใจการใช้สายพันธุ์ของแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกเป็นอันดับแรก โดยแบคทีเรียที่ใช้ต้องทนทานต่อความเข้มข้นของกรดอะซิติก, ต้องการสารอาหารปริมาณน้อย ๆ, ไม่เกิดออกซิเดชันมากเกินไป และให้อัตราการผลิตสูง ๆ (Schocher และคณะ, 1979 อ้างถึงใน Ebner, 1982) ในปี 1950 มีการศึกษาการหมักกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นสูง ๆ อย่างต่อเนื่องในห้องปฏิบัติการของบริษัท Heinrich Frings ในกรุงบอนน์ เยอรมัน สายพันธุ์ดังกล่าวถูกใช้หมักน้ำส้มสายชูไปทั่วโลก

การแก้ปัญหาการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์อาจทำได้ โดยใช้เครื่องหมักที่ติดตั้งใหม่ซึ่งถูกเติมเชื้อโดยตรงโดยใช้เครื่องหมักที่เคลื่อนที่ได้ ถ้าไม่มีวิธีดังกล่าว น้ำส้มสายชูที่ได้จากห้องปฏิบัติการดังกล่าวจะถูกบรรจุลงในขวด แล้วส่งไปในห้องที่ฆ่าเชื้อก่อนขนส่งไปยังที่ห่างไกล เมื่อถึงที่หมายน้ำส้มสายชูดังกล่าวถูกนำไปให้อากาศในเครื่องหมักนำร่อง (pilot fermenter) จนเกิดการหมักอีกครั้ง แล้วจึงนำน้ำหมักที่ได้ไปเติมลงสู่เครื่องหมักระดับพาณิชย์ (commercial fermenter) ด้วยวิธีนี้การเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์จึงไม่เกิดขึ้น อย่างน้อยก็

นานพอตราบเท่าที่มีการวัดจลน์ศาสตร์ของการเกิดปฏิกริยา (kinetic of reaction) และขบวนการเมตาโบลิซึม

2.9. ขั้นตอนการทำน้ำส้มสายชู

หลังจากสิ้นสุดการหมักกรดอะซิติก น้ำส้มสายชูจะถูกบรรจุเต็มในถังไม้หรือสเตนเลสปิดเป็นระยะเวลานาน อาจเป็นปี ในระหว่างนั้นน้ำส้มสายชูมีการพัฒนารสและกลิ่นเองและมีการตกตะกอนของพวกคอลลอยด์ที่ไม่เสถียร น้ำส้มสายชูดิบโดยทั่วไปมีความขุ่นเนื่องจากมีแบคทีเรียและอนุภาคอื่น ๆ แขวนลอยอยู่ ความขุ่นนี้ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตที่ใช้ โดยทั่วไปมีปัญหาน้อยเมื่อใช้กระบวนการผลิตแบบออร์ลีน เนื่องจากมีการตกตะกอนเกิดขึ้นในระหว่างการเกิดกรดอะซิติกและสามารถนำไปบรรจุขวดได้เลยโดยไม่ต้องผ่านการบำบัดก่อน น้ำส้มสายชูจากกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็วมักผ่านการทำให้ใส โดยใช้เครื่องกรองซึ่งบรรจุไดอะตอมมาเชียสเอิร์ธ (diatomaceous earth) เป็นสารช่วยกรอง ในการหมักแบบชับเมิร์จจุลินทรีย์ที่ว่องไวจะแขวนลอยอยู่ในน้ำส้มสายชู การทำให้ใสในขั้นแรก (preliminary fining treatment) จึงเป็นสิ่งจำเป็น สารช่วยทำให้ใส (fining agent) ได้แก่ ไอซินกลาส, เคซีน, เจลาติน ร่วมกับแทนนิน เป็นต้น แต่ที่ใช้มากที่สุดคือ เบนโทไนท์ โดยเติมลงไปในรูปของสารแขวนลอยในอัตราส่วน 5 กิโลกรัมต่อน้ำส้มสายชู 10000 ลิตร กวนผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ให้ตกตะกอน น้ำส้มสายชูส่วนที่ใสจะถูกกรองแยกออกมา มีการจดสิทธิบัตรวิธีการทำน้ำส้มสายชูให้ใสโดยใช้การกรองแบบอุลตรา (ultrafiltration) (Ebner และ Enenkel, 1976 อ้างถึงใน Adams, 1985)

ในบางกรณีอาจมีสิ่งที่ไม่ใช่แบคทีเรียที่ทำให้น้ำส้มสายชูขุ่นเช่น หนอนน้ำส้ม (vinegar eel), Anguillula aceti เป็นหนอนตัวกลม ไม่มีโทษ และมักพบทั่วไปในเครื่องหมักของกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็ว หรือเครื่องหมักของกระบวนการออร์ลีน แต่พบน้อยในกระบวนการหมักแบบชับเมิร์จ สามารถกำจัดได้โดยการพาสเจอไรซ์และการกรอง โดยทั่วไปถือว่าการมีหนอนน้ำส้มอยู่นั้นไม่มีผลกระทบต่อการเกิดกรดอะซิติก แต่มีผู้กล่าวว่าหนอนน้ำส้มช่วยปรับปรุงกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูให้เร็วขึ้น โดยมีการย่อยสลาย (scavenging) ร่วมกับการเจริญของแบคทีเรีย (Zalkan และ Fabian, 1953 อ้างถึงใน Adams, 1985) โรงงานที่มีมาตรฐานด้านความสะอาดสูงขึ้น จะไม่มีหนอนน้ำส้ม ในศตวรรษที่ 17 มีความเชื่อกันว่าความเปรี้ยวของน้ำส้มสายชูนั้นเกิดจากหนอนน้ำส้มใช้หางแทงลิ้นของคน (Mitchell, 1926 อ้างถึงใน Adams, 1985)

ความขุ่นหรือตะกอนที่เกิดขึ้นในน้ำส้มสายชูนั้นเกิดเนื่องจากน้ำส้มสายชูมีการสัมผัสกับวัสดุที่ไม่มีความต้านทานต่อกรด เช่น เหล็ก หรือทองแดง จึงทำให้น้ำส้มสายชูนี้ไม่เหมาะสมสำหรับการทำผักดอง ถ้ามีอิออนของโลหะปนอยู่ในน้ำส้มสายชูในปริมาณมากจะมีผลต่อรสชาดของน้ำส้มสายชู (Vaughn, 1954 อ้างถึงใน Adams,1985) สามารถป้องกันได้โดยเลือกใช้วัสดุในการก่อสร้างโรงงานและอุปกรณ์ให้เหมาะสม แต่เมื่อเกิดปัญหาขึ้นแล้วควรตกตะกอนเหล็กหรือทองแดงโดยใช้แทนนิน (Campbell, 1928 อ้างถึงใน Adams,1985) หรือบำบัดด้วยโปแตสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ แต่ต้องทำด้วยความระมัดระวัง อาจใช้สารเคมีที่เตรียมขึ้นเป็นพิเศษ เช่น คูเฟกซ์ (Cufex) (Scott Laboratories Inc.) (Amerine และคณะ, 1980 อ้างถึงใน Adams, 1985)

Scheele เป็นคนแรกที่บันทึกว่า เมื่อ 200 ปีมาแล้ว การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและการป้องกันความขุ่นในน้ำส้มสายชูที่บรรจุขวดแล้ว สามารถทำได้โดยการบำบัดด้วยความร้อน (Partington,1962 อ้างถึงใน Adams, 1985) และเช่นเดียวกับจุลินทรีย์ที่มีแกรมลบประเภทอื่น ๆ แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกก็ไม่มีความต้านทานต่อความร้อนเหมือนกัน การให้ความร้อนกับน้ำส้มสายชูให้มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2-3 นาทีก็เพียงพอสำหรับกำจัดแบคทีเรียที่ปนอยู่ได้ ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการให้ความร้อนแล้วจะถูกบรรจุลงในขวดในขณะที่ร้อนอยู่ หรืออาจใช้วิธีดั้งเดิมของ Scheele คือ ทำการพาสเจอไรซ์หลังจากการบรรจุขวดแล้วก็ได้

นอกจากการทำพาสเจอไรซ์แล้วอาจใช้วิธีเติมสารเคมี (chemical preservative) เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ในอังกฤษน้ำส้มสายชูจากแอปเปิลและไวน์มีปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไม่เกิน 200 ส่วนในล้านส่วน แต่สำหรับน้ำส้มสายชูชนิดอื่นจะมีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ได้สูงสุดเพียง 70 ส่วนในล้านส่วนเท่านั้น

การผลิตน้ำส้มสายชูที่มีปริมาณกรดอะซิติกสูง ๆ มีข้อได้เปรียบหลายประการ เป็นต้นว่าลดค่าใช้จ่ายในการขนส่งและการบรรจุ นอกจากนี้ยังทำให้ประสิทธิภาพในการดองอาหารที่มีความชื้นสูงดีขึ้น ความเข้มข้นสูงสุดของกรดอะซิติกที่ผลิตได้จากการหมักมักอยู่ในช่วงร้อยละ 10-15 แต่มีการรายงานว่าอาจทำให้สูงได้ถึงร้อยละ 18 (Kunimatsu และคณะ, 1981 อ้างถึงใน Adams,1985) การกลั่นให้กรดอะซิติกมีความเข้มข้นมากขึ้นนั้นทำได้ยาก แต่มีสิทธิบัตรที่สามารถใช้กระบวนการกลั่นลำดับส่วนในการกลั่นกรดอะซิติกร้อยละ 10 ให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 20 (Buck, 1958 อ้างถึงใน Adams, 1985) แต่เดิมนั้นการกลั่นน้ำส้มสายชูทำเพื่อลดปริมาณของแข็งที่มีอยู่ในน้ำส้มสายชูเท่านั้น

การเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะซิติกโดยการทำให้น้ำในน้ำส้มสายชูแข็งตัว ได้ถูกบันทึกไว้โดย Glauberr ในปี 1657 และโดย Stahl ในอีกหลายปีต่อมา กระบวนการแช่แข็งน้ำส้มสายชูและกรองแยกเอาผลึกน้ำแข็งออกมีการจดเป็นสิทธิบัตรโดย Wenzelberger และกระบวนการดังกล่าวได้ถูกพัฒนาโดย Chemetron Corp. สามารถผลิตน้ำส้มสายชูร้อยละ 20 จากน้ำส้มสายชูร้อยละ 12 โดยการแช่แข็งน้ำส้มสายชูและแยกเอาผลึกน้ำแข็งออกโดยการเซนตริฟิวจ์ (Beverly และ Schumann, 1968 อ้างถึงใน Adams, 1985)

นอกจากนี้ยังมีวิธีที่สามารถผลิตกรดอะซิติกเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 87 ได้โดยการผสมของไหลที่สามารถเกิดเป็นไฮเดรท (hydrate forming fluid) (trichlorofluoromethane) ที่อุณหภูมิต่ำ และตามด้วยการระเหิดลำดับส่วน (fractional sublimation) (Davies, 1980 อ้างถึงใน Adams, 1985)

2.10 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ซึ่งเป็นที่ทำงานหรือเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้น เป็นส่วนสำคัญที่สุดในกระบวนการชีวเคมี เครื่องปฏิกรณ์ที่ได้รับการออกแบบอย่างดีจะทำให้สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะแก่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่เหมาะสมด้วย

รูปแบบของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ดี มีประสิทธิภาพสูงนั้น ต้องมีสิ่งต่าง ๆ ดังนี้

1. ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งต้องมีเป็นปริมาณมาก
2. การรักษาสภาวะปลอดเชื้อที่ดี
3. ประสิทธิภาพของการกวนสูง เพื่อให้การกระจายของสารอาหารและเชื้อจุลินทรีย์เป็นไปอย่างทั่วถึง
4. มีการกำจัดความร้อนที่เกิดขึ้น
5. การเกิดสภาวะเฉือน (shear condition) ที่ถูกต้อง ถ้าอัตราการเฉือนสูงจะเป็นอันตรายต่อเชื้อ แต่ถ้าอัตราการเฉือนต่ำก็ไม่เป็นที่ต้องการเนื่องจากจะเกิดฟลอค (flocculation) หรือการเจริญเติบโตของเชื้อบนผนังเครื่องปฏิกรณ์หรือใบพัดกวนซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการ

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในอุตสาหกรรมทั่วไป แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

1. ไม่มีการกวน, ไม่มีการให้อากาศ (ร้อยละ 86)
2. ไม่มีการกวน, มีการให้อากาศ (ร้อยละ 11)
3. มีการกวน , มีการให้อากาศ (ร้อยละ 13)

มีการเปรียบเทียบรูปแบบต่าง ๆ ของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ดังแสดงในตารางที่ 2.4 (Verschoor,1985 อ้างถึงใน Cliffe,1988) เครื่องปฏิกรณ์แบบท่อที่ไม่มีการกวน ไม่มีการให้อากาศใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จำพวกไวน์, เบียร์ และเนย ซึ่งเป็นกระบวนการแบบไม่ใช้ออกซิเจนและผลิตแบบเป็นครั้ง เนื่องจากกระบวนการดังกล่าวเป็นการควบคุมทางจลนศาสตร์ ดังนั้นปรากฏการณ์การถ่ายโอนจึงมีความสำคัญรองลงมา ส่วนการพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ ส่วนใหญ่ต้องการให้มีการเจริญของจุลินทรีย์ในท่อที่มีการกวนและมีการให้อากาศ

ปัจจัยสำคัญ 2 ประการที่มีผลต่อการออกแบบเครื่องปฏิกรณ์คือ การถ่ายโอนออกซิเจนและผลของการเฉือน

2.11 การถ่ายโอนออกซิเจนและการวัดค่า $k_L a$

การเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการหมักแบบชับเมิร์จต้องใช้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารอาหาร แต่เนื่องจากออกซิเจนละลายลงสู่สารละลายได้น้อยมาก ดังนั้นจึงต้องป้อนออกซิเจนเข้ามาแบบต่อเนื่อง การถ่ายโอนออกซิเจนจากกาซสู่จุลินทรีย์ต้องผ่านหลายขั้นตอน ขั้นแรกออกซิเจนจากกาซเกิดการถ่ายเทไปสู่ผิวสัมผัสระหว่างกาซและของเหลว (gas-liquid interface), แล้วจึงผ่านรอยต่อ, ผ่านเข้าสู่ของเหลว และท้ายสุดจึงเข้าสู่จุลินทรีย์ กระบวนการทั้งหมดเกิดขึ้นได้ เนื่องจากความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนในกาซและที่ฟิล์มจุลินทรีย์

อัตราการถ่ายโอนออกซิเจนที่ความเข้มข้นต่ำแปรผันโดยตรงกับความแตกต่างของความเข้มข้นของออกซิเจน สำหรับการถ่ายโอนออกซิเจนจากผิวสัมผัสระหว่างกาซและของเหลวไปสู่ของเหลว สามารถเขียนได้ว่า

$$N_A = k_L(C^\circ - C) \qquad (2.1)$$

เมื่อ N_A = ออกซิเจนฟลักซ์, กิโลโมลต่อตร.เมตรต่อวินาที

k_L = สัมประสิทธิ์การถ่ายโอนมวลทางด้านของเหลว, เมตรต่อวินาที

C° = ความเข้มข้นของออกซิเจนในของเหลวที่ผิวสัมผัส, กิโลโมลต่อลบ.เมตร

ตารางที่ 2.4 แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบต่าง ๆ ของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (ข้อมูลจาก Verschoor, 1985)

	Manufacture of fermentation products		Waste water treatment	
Biomass conc ($kg \cdot m^{-3}$)	10–50		Aerobic 5	Anaerobic 50
	Moulds	Other		
Viscosity (Pa s)	High 0.1–1.5	Low 0.1	Low 0.01	Low 0.01
Oxygen consumption ($kg \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}) \times 10^3$	High 0.2–1.0	High 0.2–1.0	Low 0.002–0.01	Absent —
Heat transfer	Low	High	Low	Absent
Heat production, metabolic ($kW \cdot m^{-3}$)	3–15	3–15	0.03–0.14	Negligible
Heat transfer ($kW \cdot m^{-2} \cdot °C$)	3–5	3–5	—	—
Power consumption ($kW \cdot m^{-3}$)	3–15	5	0.02–0.05	Negligible

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

C = ความเข้มข้นของออกซิเจนในของเหลว, กิโลโมลต่อลบ.เมตร

สัมประสิทธิ์การถ่ายโอนมวลทางด้านกาซ สามารถให้นิยามในรูปของความดันย่อยได้ดังนี้

$$N_A = k_g(p - p^\circ) \qquad (2.2)$$

เมื่อ k_g = สัมประสิทธิ์การถ่ายโอนมวลทางด้านกาซ, กิโลโมลต่อตร.เมตรต่อวินาทีต่อบาร์

p, p° = ความดันย่อยของออกซิเจนในกาซ (ทั้งหมดและที่ผิวสัมผัส ตามลำดับ), บาร์

โดยทั่วไปการวัดความเข้มข้นที่ผิวสัมผัสไม่สามารถทำได้ ดังนั้นจึงหาค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนมวลทั้งหมดโดยใช้ผลต่างของความเข้มข้นของออกซิเจนในของเหลวแทน

$$N_A = k_L(C^* - C) \qquad (2.3)$$

เมื่อ k_L = สัมประสิทธิ์การถ่ายโอนมวลทั้งหมด โดยใช้ผลต่างของความเข้มข้นของออกซิเจนในของเหลว, กิโลโมลต่อตร.เมตรต่อวินาทีต่อบาร์

C^* = ความเข้มข้นของออกซิเจนในของเหลวที่สมมูลกับความดันย่อยของกาซ, กิโลโมลต่อลบ.เมตร

ถ้าใช้กฎของเฮนรี่ (Henry's law)

$$p = HC^* \qquad (2.4)$$

ดังนั้น

$$1/k_L = 1/(HK_g) + 1/K_L \qquad (2.5)$$

เนื่องจากไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นที่ทุก ๆ จุดในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพได้ จึงใช้ค่าความเข้มข้นและค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนมวลเฉลี่ยแทน ในการหาอัตราการถ่ายโอนออกซิเจนทั้งหมดในเครื่องปฏิกรณ์ต้องหาค่าพื้นที่ผิวทั้งหมดที่สามารถถ่ายโอนออกซิเจนได้ ซึ่งประมาณได้ยาก จึงใช้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนมวลทั้งหมดร่วมกับพื้นที่ผิวของฟองกาซ เรียกว่า k_La

อัตราการถ่ายโอนออกซิเจนเข้าสู่เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (O_2 uptake rate) คือ

$$N_A = k_La(C^* - C) \qquad (2.6)$$

เมื่อ a = พื้นที่ผิวของฟองอากาศต่อปริมาตร, ตร.เมตรต่อลบ.เมตร

เทอม k_La จะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของวัตถุดิบที่ใช้ทำเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor media) และขึ้นกับคุณสมบัติทางกายภาพและสภาวะการทำงานของเครื่องปฏิกรณ์ ค่า k_La นี้สามารถควบคุมได้ โดยสภาวะการกวนและอัตราการให้อากาศ อาจกล่าวได้ว่าโดยทั่วไปออกซิเจนเป็นสารที่จำกัดการเจริญ แต่ถ้าความเข้มข้นของออกซิเจนมี

มากถึงปริมาณหนึ่ง การเจริญของจุลินทรีย์จะไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของออกซิเจน ความรู้เกี่ยวกับค่า k_La ทำให้สามารถควบคุมการปฏิบัติงานของเครื่องปฏิกรณ์ให้อยู่ในสภาวะที่ออกซิเจนไม่ได้เป็นปัจจัยในการจำกัดการเจริญ ในหลายกรณี เช่น แบคทีเรีย และยีสต์ ถ้าต้องการให้มีออกซิเจนอย่างเพียงพอต้องทำให้มีการกวนอย่างรุนแรงมากซึ่งหมายถึงค่าแรงเค้นเฉือน (shear stress) สูงมาก ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อเซลพืชและสัตว์ได้ จึงทำให้การออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแตกต่างจากถังกวนทั่ว ๆ ไป

มีการพัฒนาวิธีการมากมายเพื่อทำการทดลองหาค่า k_La วิธีที่ถูกต้องที่สุดคือ วิธีของ Wang และคณะ (1979 อ้างถึงใน Cliffe,1988) เป็นการวัดค่าความเข้มข้นและอัตราการไหลของออกซิเจนที่เข้ามาและออกไปที่สภาวะคงที่ เพื่อใช้หาอัตราการถ่ายโอนออกซิเจน การวัดค่าความเข้มข้นของออกซิเจนในของเหลวทำได้ โดยใช้อิเลคโทรดสำหรับวัดออกซิเจนที่ละลายอยู่ วิธีการดังกล่าวอาศัยการทำสมดุลย์มวลสารของออกซิเจนในวัฏภาคของเหลว

$$dC/dt = k_La(C^*-C)-N_r \qquad (2.7)$$

วิธีการดังกล่าวประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกหยุดการให้อากาศในเครื่องปฏิกรณ์และทำการไล่อากาศออก โดยใช้ไนโตรเจนจนกระทั่งความเข้มข้นของออกซิเจนในเครื่องปฏิกรณ์เท่ากับ 0 ในขั้นตอนที่ 2 ทำการให้อากาศแล้ววัดความเข้มข้นของออกซิเจนเป็นฟังก์ชันกับเวลาวาดกราฟระหว่างความเข้มข้นกับเวลา แล้วหาค่า dc/dt ซึ่งก็คือความชันจากกราฟ จากนั้นวาดกราฟระหว่าง dC/dt กับ (C^*-C) ซึ่งจะให้กราฟเส้นตรง มีความชันเท่ากับ k_La และจุดตัดเท่ากับ (-Na)

2.12 การพิจารณาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของเครื่องหมักน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่อง

เครื่องหมักที่ดีมีความสำคัญอย่างมากต่อประสิทธิภาพของการหมัก ในกรณีเครื่องหมักแบบเบดบรรจุจะเน้นถึงพื้นที่ผิวในการสัมผัสของน้ำหมัก อากาศ และแบคทีเรีย ซึ่งทำให้แบคทีเรียสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ระบบการไหลของของไหลต่าง ๆ ผ่านเบดบรรจุยังมีความสำคัญต่อการหมักด้วย ตัวอย่างเช่น เครื่องหมักน้ำส้มสายชูของพรทิพย์ (พรทิพย์, 2524) ได้สร้างเครื่องหมักเบดบรรจุชั้นเดียวใช้ไม้มะค่ารูปทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ซม. เป็นวัสดุบรรจุ มีระบบการไหลเวียนของของไหลโดยใช้หัวกระจายน้ำหมักและหัวกระจายอากาศเป็นรูปฝักบัว ทำให้อากาศออกมาเป็นฟองละเอียด พร้อมกับระบบหล่อเย็น ซึ่งทั้งหมดนี้ได้รวมเอาข้อดีของเครื่องหมักที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบทริคกลิง และแบบซับเมิร์จเข้าด้วยกันจึงเป็นเครื่องหมักที่มีประสิทธิภาพ

จากการที่กล่าวมาแล้ว จะเห็นว่าประสิทธิภาพของเครื่องหมักขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของเครื่องหมัก และสภาวะแวดล้อมในการควบคุมระบบหมัก ซึ่งได้แก่

- วัสดุบรรจุ
- ระบบการไหลเวียนของน้ำหมัก
- ระบบการให้อากาศ
- ระบบการไหลของน้ำหมัก

2.12.1 วัสดุบรรจุ

เนื่องจากปฏิกิริยาการเกิดกรดอะซิติกเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนั้นการให้ไวน์ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูมีโอกาสสัมผัสกับอากาศมากที่สุด จึงทำให้อัตราของปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้น การใช้วัสดุบรรจุซึ่งทำหน้าที่เป็นที่ยึดเกาะของแบคทีเรีย ทำให้การแพร่กระจายของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมักผ่านเข้าไปในเซลจุลินทรีย์ และแพร่กระจายสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด ดังนั้นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสให้มากก็เท่ากับเป็นการเพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลสารให้สูงขึ้นด้วย ดังจะเห็นได้จากความสัมพันธ์ในรูปสมการดังต่อไปนี้

$$\text{อัตราการถ่ายเทมวลสาร} = ka\Delta c \qquad (2.8)$$

โดยที่ k = สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสาร

a = พื้นที่ผิวสัมผัส (interfacial area)

Δc = ความแตกต่างของความเข้มข้นของสารระหว่างพื้นที่ผิวสัมผัส (concentration gradient)

จากสมการที่ (2.8) พบว่าเมื่อพื้นที่ผิวมากขึ้น อัตราการถ่ายเทมวลสารจะเพิ่มขึ้นซึ่งหมายถึงอัตราการเกิดกรดอะซิติกเร็วขึ้น และประสิทธิภาพเครื่องหมักสูงขึ้น แต่ถ้าต้องการให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสมาก วัสดุบรรจุที่ใช้ต้องมีขนาดเล็กลงซึ่งทำให้ช่องว่างระหว่างเม็ดวัสดุบรรจุน้อยลง และเมื่อมีการไหลผ่านของน้ำหมักและอากาศจะเกิดความดันลดลงมาก ทำให้เกิดการท่วมล้น (flooding) ได้ ดังนั้นขีดจำกัดของขนาดวัสดุบรรจุทรงกลมและอัตราการไหลของของไหลผ่านเบดบรรจุจึงต้องสัมพันธ์กัน

วัสดุบรรจุที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้คือ (ศิริวรรณ, 2527)

- ให้พื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศ น้ำหมัก และแบคทีเรียสูง ฉะนั้นวัสดุบรรจุที่ใช้จึงต้องมีพื้นที่ผิวมาก
- แข็งแรง มีอายุการใช้งานนาน
- น้ำหนักเบา

- ไม่เป็นพิษต่อแบคทีเรีย
- สามารถให้แบคทีเรียเกาะได้ดี
- ไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสเสียไป
- สามารถติดตั้งเคลื่อนย้าย และทำความสะอาดได้ง่าย
- ขนาดพอเหมาะ ไม่เล็กหรือใหญ่เกินไป เนื่องจากถ้าวัสดุบรรจุมีขนาดใหญ่เกินไป ทำให้มีพื้นที่ผิวน้อย แต่ถ้ามีขนาดเล็กเกินไปก็ทำให้ความพรุนลดลงและเกิดปัญหาการท่วมล้นได้

2.12.2 <u>ระบบการไหลเวียนของน้ำหมัก</u>

ระบบการไหลเวียนของน้ำหมักที่ดี สามารถช่วยให้การถ่ายเทมวลสารของออกซิเจนและสารอาหารมีประสิทธิภาพมากขึ้น ทั้งยังทำให้แบคทีเรียมีโอกาสรับอากาศได้ดีขึ้น ซึ่งถ้ามีบางส่วนขาดอากาศหรือออกซิเจนนานเกินไปแบคทีเรียก็อาจตายได้

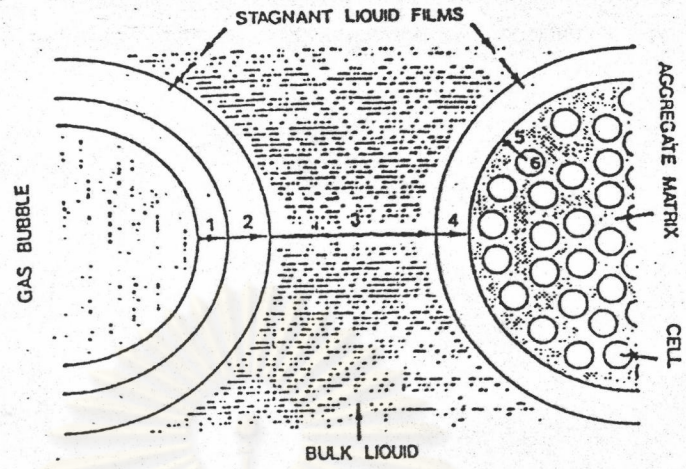
ในปี 2527 ศิริวรรณ ทำการศึกษาศึกษาเครื่องหมักแบบหลายชั้น พบว่าการไหลเวียนของน้ำหมักแบบกาลักน้ำดีที่สุด ซึ่งนอกจากสามารถผลิตกรดอะซิติกได้เร็วแล้ว ยังทำให้แบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้นานอีกด้วย จากการขึ้นลงของน้ำหมักท่วมวัสดุบรรจุเป็นจังหวะ (ศิริวรรณ,2527)

2.12.3 <u>ระบบการให้อากาศ และระบบการไหลของน้ำหมัก</u>

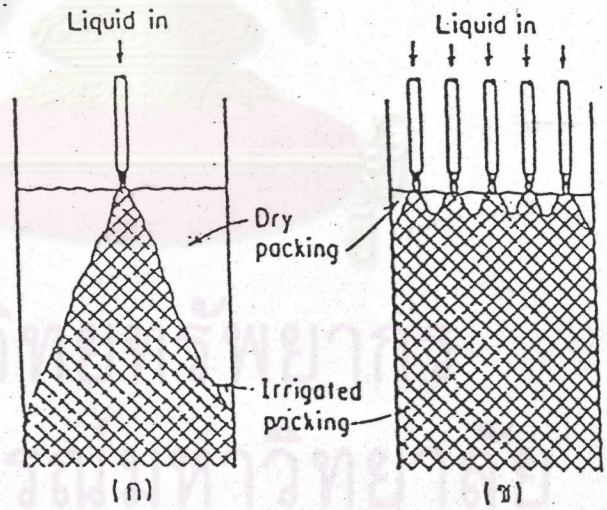
ดังนั้นอัตราการไหลเข้าของทั้งน้ำหมักและอากาศ จึงมีผลโดยตรงต่อการเกิดกรดอะซิติกช้าหรือเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบการไหลเวียนของน้ำหมักแบบกาลักน้ำนั้น การสัมผัสของน้ำหมัก อากาศ และจุลินทรีย์จะมี 2 ลักษณะ ซึ่งทำให้การถ่ายเทมวลสารสลับซับซ้อนขึ้น ดังนี้คือ

ก. **ขณะที่น้ำหมักท่วมวัสดุบรรจุ**

อากาศที่ไหลเข้าทางส่วนล่างของเบดมีลักษณะเป็นฟองอากาศเล็ก ๆ ผ่านน้ำหมักที่ท่วมเบดบรรจุ ออกซิเจนในอากาศละลายเข้าไปในน้ำหมัก และมีอีกส่วนหนึ่งแพร่กระจายผ่านฟิล์มบาง ๆ ของแบคทีเรียที่อยู่บนผิวของวัสดุบรรจุพร้อมกับเอธานอล เกิดปฏิกิริยากลายเป็นกรดอะซิติก ดังแสดงในรูปที่ 2.11 (Eckenfelder, 1959 อ้างถึงในประพนธ์, 2531) ดังนั้นปรากฏการณ์ช่วงนี้ อัตราเร็วของอากาศจึงมีผลอย่างมากต่อการละลายของออกซิเจนเข้าสู่น้ำหมัก



รูปที่ 2.11 ปรากฏการณ์การถ่ายเทมวลสารจากฟองอากาศสู่เซลของเชื้อจุลินทรีย์



รูปที่ 2.12 (ก) ระบบหัวกระจายอากาศจุดเดียว (ข) ระบบหัวกระจายอากาศหลายจุด

การให้อากาศในกระบวนการหมักโดยทั่วไปมีสมการพื้นฐาน คือ (Peeble, 1953 อ้างถึงในประพนธ์, 2531)

$$d_B \quad \alpha \quad F_a^{\Phi} \tag{2.9}$$

โดยที่ d_B = เส้นผ่านศูนย์กลางของฟองอากาศ

F_a = อัตราการป้อนอากาศ

ϕ = ค่าคงที่

ในเครื่องหมักทั่วไปขนาดของฟองอากาศอยู่ในช่วง 1.5-10 มิลลิเมตร ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ วัตถุดิบ และผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงมีคุณสมบัติคล้าย ๆ กับน้ำ

เมื่อฟองอากาศผ่านน้ำหมัก ออกซิเจนในอากาศจะแพร่กระจายสู่น้ำหมักซึ่งขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวสัมผัสโดยตรง และการถ่ายเทมวลสารดังกล่าวก็ขึ้นอยู่กับความเร็วของฟองอากาศด้วย ดังสมการการถ่ายเทมวลของออกซิเจน (k_L)

$$k_L a = F_a H_L / d_B . v_B^{1/2} . V' \tag{2.10}$$

โดยที่ k_L = สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารของออกซิเจน

a = พื้นที่ผิวสัมผัส (interfacial area) ต่อปริมาตร, ตร.เมตรต่อลบ.เมตร

F_a = อัตราการให้อากาศ, ลบ.ซม.ต่อนาที

H_L = ความลึกของของเหลว, เมตร

d_B = เส้นผ่าศูนย์กลางของฟองอากาศ, มิลลิเมตร

v_B = ความเร็วของฟองอากาศ, เมตรต่อวินาที

V' = ค่าคงที่

$k_L a = \beta F$

β = ค่าคงที่

จากสมการที่ (2.10) พบว่าการถ่ายเทมวลสารแปรตามอัตราการให้อากาศ ซึ่งหมายความว่าออกซิเจนสามารถละลายน้ำเข้าไปในน้ำหมักได้มากขึ้นเมื่อเปลี่ยนอัตราการให้อากาศ ทำให้การผลิตกรดอะซิติกเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ กล่าวคือออกซิเจนทำปฏิกิริยากับเอธานอลเป็นกรดอะซิติกโดยแบคทีเรียที่อยู่บนผิวของวัสดุบรรจุเป็นตัวเปลี่ยน

ข. เมื่อวัสดุบรรจุไม่มีน้ำหมักขังอยู่

น้ำหมักถูกป้อนเข้ามาโดยไหลผ่านหัวกระจายน้ำหมักลงบนวัสดุบรรจุตลอดเวลา พร้อมกับอากาศก็ถูกป้อนผ่านหัวกระจายอากาศเข้าทางด้านล่างของเบด ในช่วงนี้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมัก รวมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อจะถ่ายเทจากน้ำหมักผ่านฟิล์มบาง ๆ ที่

เคลือบบนวัสดุบรรจุซึ่งมีแบคทีเรียเกาะอยู่ อัตราการเกิดกรดอะซิติกขึ้นอยู่กับการถ่ายเทมวลสารของออกซิเจน และอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านฟิล์มเข้าไปได้มากน้อยเพียงใด ซึ่งก็เกี่ยวข้องกับอัตราการป้อนเข้าน้ำหมักผ่านวัสดุบรรจุเร็วหรือช้าด้วย (Wilson และGeankoplis, 1966 อ้างถึงในประพนธ์, 2531)

นอกจากนี้การกระจายน้ำหมักและอากาศให้ทั่วถึงทุกพื้นที่ผิว ยังมีส่วนช่วยส่งเสริมให้วัสดุบรรจุมีแบคทีเรียเกาะอยู่เต็มพื้นที่ และทำการผลิตกรดอะซิติกออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาหัวกระจายน้ำหมักและอากาศดังกล่าว ซึ่งพบว่าหัวกระจายน้ำหมักควรมีการออกแบบให้น้ำหมักไหลลงมาจากหลายจุด (Coulson และ Richardson, 1968 อ้างถึงในประพนธ์, 2531) ดังรูปที่ 2.12 เพื่อให้วัสดุบรรจุมีโอกาสสัมผัสกับน้ำหมักได้มากที่สุด

ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ช่วยให้ประสิทธิภาพในการหมักดีขึ้น ซึ่งเมื่อนำเอาข้อดีต่าง ๆ ของการหมักแบบไม่ต่อเนื่องมาพิจารณาใช้เป็นพื้นฐานในการหมักแบบต่อเนื่อง ทำให้สามารถพัฒนากระบวนการหมักได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในการนำเครื่องหมักหลายเครื่องมาทำงานร่วมกันอย่างต่อเนื่อง โดยให้ผลผลิตของเครื่องแรกเป็นวัตถุดิบของเครื่องถัดไป และผลผลิตของเครื่องถัดไปก็เป็นวัตถุดิบของเครื่องต่อ ๆไปตามลำดับ โดยให้ไหลผ่านเครื่องหมักตั้งแต่เครื่องแรกจนถึงเครื่องสุดท้าย แล้วได้ผลผลิตสุดท้ายที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกตามต้องการ ในระหว่างการไหลผ่านนี้ส่วนประกอบต่าง ๆ ของน้ำหมักมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา เช่น ความเข้มข้นของสารอาหาร (เอธานอล) ลดลง แต่ความเข้มข้นของกรดอะซิติกจะเพิ่มขึ้น กระบวนการนี้เรียกว่า ระบบการไหลทางเดียวในเครื่องหมักหลายเครื่อง (single stream multi-stage system) (Calcott และ Phil, 1985 อ้างถึงในประพนธ์, 2531)

2.13 ระบบหมักแบบต่อเนื่อง

การหมักแบบเป็นครั้งนั้น การเจริญของจุลินทรีย์อยู่ในระบบปิด และวัฏจักรการเจริญไม่ได้เป็นคุณสมบัติที่มีมาแต่เดิม (inherent property) ของจุลินทรีย์ แต่เป็นผลมาจากการเจริญในสภาพแวดล้อมที่มีสารอาหารจำกัด การที่การเจริญหยุดชะงักลงเป็นผลมาจากการขาดแคลนสารอาหาร หรือมีการสะสมของผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษ แม้แต่ในระยะที่มีการเจริญแบบเอกซ์โปเนนเชียล (exponential growth phase) องค์ประกอบของสารและเซลก็ยังมีการ

เปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการเจริญที่สภาวะคงที่ ซึ่งเป็นการเจริญที่สภาพแวดล้อมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง จึงไม่ปรากฏในระบบการหมักแบบเป็นครั้ง (Marison, 1988)

ส่วนการหมักแบบต่อเนื่อง เป็นระบบที่การเจริญของเซลอยู่ในระบบเปิดซึ่งประชากรจุลินทรีย์ถูกรักษาให้อยู่ในสภาพการเจริญที่สมดุลย์อย่างต่อเนื่อง โดยมีการดึงน้ำหมักบางส่วนออกไปอย่างต่อเนื่อง และป้อนน้ำหมักใหม่เข้ามาแทนที่ในอัตราเดียวกัน

ระบบการหมักแบบต่อเนื่องแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่

1. **เคโมสแตท** (chemostat) เป็นระบบที่ป้อนสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญในอัตราที่คงที่ เป็นผลให้ความหนาแน่นและอัตราการเจริญของจุลินทรีย์มีการปรับตัวเองไปตามสารอาหารที่ป้อนเข้ามา

2. **เทอร์บิโดสแตท** (turbidostat) เป็นระบบที่ควบคุมให้ความหนาแน่นของเซลคงที่ โดยการป้อนน้ำหมักใหม่เข้ามาตามที่ต้องการ

ทั้ง 2 ระบบแสดงในรูปที่ 2.13 แม้ว่าระบบทั้ง 2 มีการควบคุมอัตราการเจริญแตกต่างกัน แต่ก็มีความซับซ้อนทั้งคู่ และสามารถอธิบายได้โดยใช้สมการจลนศาสตร์ที่คล้ายคลึงกัน

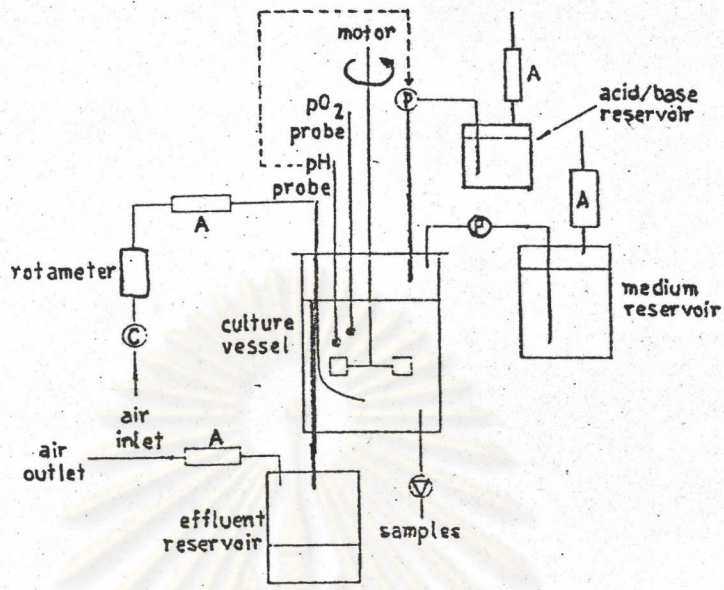
ระบบดังกล่าวมีความต้องการพื้นฐานเหมือนกัน คือ วิธีการควบคุมให้ปริมาตรของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพคงที่ ซึ่งมีหลายวิธี วิธีที่ง่ายที่สุด คือ การใช้ท่อไหลล้น (overflow tube) หรือใช้ขอบกั้นที่มีความสูงคงที่อยู่ภายในเครื่องปฏิกรณ์ ดังนั้นเมื่อมีการป้อนน้ำหมักใหม่เข้าสู่เครื่องปฏิกรณ์ น้ำหมักที่มีปริมาตรเท่ากันจะไหลผ่านท่อไหลล้น แล้วไหลเข้าสู่ถังเก็บตามแรงโน้มถ่วงโลก นอกจากนี้อาจต่อปั๊มเข้ากับท่อทางออกของน้ำหมัก และควบคุมอัตราการปั๊มออกให้เท่ากับอัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก

ส่วนวิธีที่ซับซ้อนนั้น คือวางเครื่องปฏิกรณ์ทั้งหมดบนเครื่องชั่ง และพยายามควบคุมให้น้ำหนักของเครื่องปฏิกรณ์คงที่ โดยการควบคุมอัตราการปั๊มน้ำหมักออก

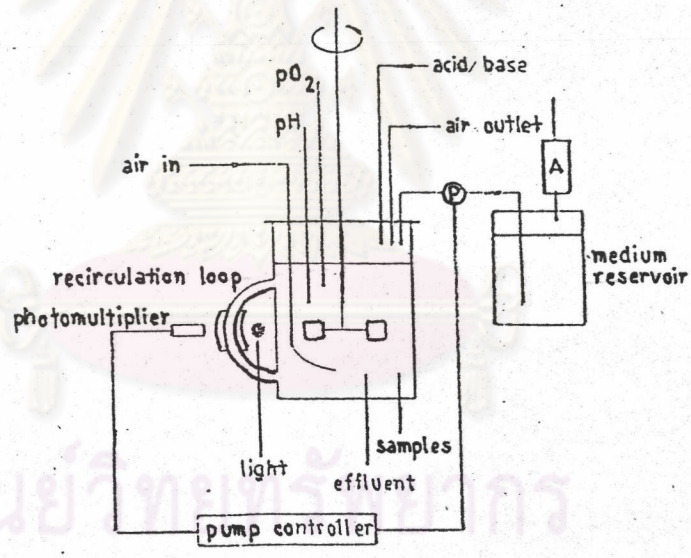
ในระบบการหมักแบบเทอร์บิโดสแตทมีการติดตั้งระบบการวัดเซลด้วยแสง (photocell system) ซึ่งทำหน้าที่วัดความหนาแน่นของเซลอย่างต่อเนื่อง และรักษาความหนาแน่นของเซลให้คงที่โดยการควบคุมอัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก

นอกจากการควบคุมการไหลเข้าออกของน้ำหมักให้คงที่แล้ว ยังต้องควบคุมสิ่งแวดล้อมสำคัญอื่น ๆ ด้วย ได้แก่ อุณหภูมิ, ความเป็นกรดเป็นด่าง และออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมัก เป็นต้น

เนื่องจากระบบการหมักแบบเคโมสแตทเป็นระบบหมักที่ใช้ทั่วไปมากที่สุด ดังนั้นจึงจะกล่าวอธิบายรายละเอียดของระบบเคโมสแตท ซึ่งทฤษฎีดังกล่าวยังสามารถใช้อธิบายระบบหมักแบบเทอร์บิโดสแตทได้อีกด้วย



(ก)



(ข)

รูปที่ 2.13 แสดงระบบการหมักแบบต่อเนื่องชนิด (ก) เคโมสแตท และ (ข) เทอร์บิโดสแตท
A = เครื่องกรองอากาศ P = ปั๊ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.13.1 ทฤษฎีเกี่ยวกับระบบหมักแบบเคโมสแตท

ในระบบหมักแบบเคโมสแตท อัตราการเจริญสามารถหาได้โดยแปรค่าอัตราการป้อนสารอาหารที่จำเป็น ซึ่งอาจเป็นคาร์บอน, ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส หรือวิตามิน โดยสารอาหารจำเป็นดังกล่าวต้องมีอยู่มากเกินพอ ความสามารถในการแปรค่าอัตราการเจริญโดยการเปลี่ยนอัตราการป้อนสารอาหาร เป็นข้อได้เปรียบมากที่สุดของการหมักแบบต่อเนื่องที่มีต่อการหมักแบบเป็นครั้ง และยังเป็นสิ่งที่อธิบายคุณสมบัติเฉพาะของเคโมสแตทอีกด้วย โดยการควบคุมให้อัตราการป้อนสารอาหารคงที่ ก็เป็นการควบคุมระบบการหมักให้มีการเจริญอยู่ในสภาวะคงที่ (Marison, 1988)

2.13.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความเข้มข้นของเซล

คุณสมบัติเฉพาะของเคโมสแตท และการเจริญที่สภาวะคงที่สามารถแสดงได้โดยใช้สมการต่อไปนี้ ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลและความเข้มข้นของสารอาหารกับอัตราการป้อนสารอาหารหรืออัตราการเจือจางนั่นเอง สมการดังกล่าวได้จากการทำสมดุลมวลสารของเซลและสารอาหารในเครื่องปฏิกรณ์

สำหรับเซล :

เซลที่สะสม = เซลเข้า - เซลออก + เซลที่เจริญ - เซลที่ตาย

$$\frac{dX}{dt} = \frac{FX_0}{V} - \frac{FX}{V} + \mu X - \alpha X \qquad (2.11)$$

เมื่อ F = อัตราการไหลของสารอาหารที่ป้อนเข้ามา, ลิตรต่อชม.

V = ปริมาตรของน้ำหมักในเครื่องปฏิกรณ์, ลิตร

X_0 = ความเข้มข้นของเซลในสารอาหารที่ป้อนเข้ามา, กรัมต่อลิตร

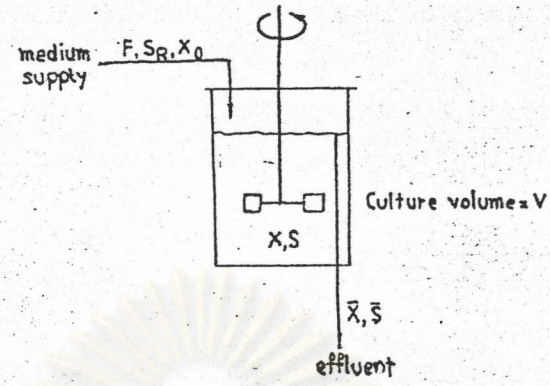
X = ความเข้มข้นของเซลในเครื่องปฏิกรณ์ , กรัมต่อลิตร

μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, ชม.$^{-1}$

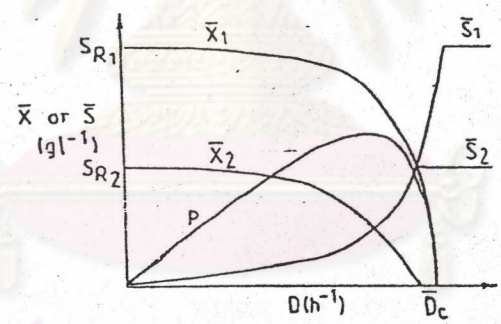
α = อัตราการตายจำเพาะ, ชม.$^{-1}$

สำหรับกรณีเคโมสแตทขั้นตอนเดียว (ดังแสดงในรูปที่ 2.14) เนื่องจากสารอาหารที่ป้อนเข้ามามีการฆ่าเชื้อแล้ว (สมมติว่าไม่มีการนำเซลย้อนกลับมาใช้) และ $\mu >> \alpha$ จึงสามารถจัดรูปสมการ (2.11) ได้ใหม่เป็น

$$\frac{dX}{dt} = \frac{-FX}{V} + \mu X \qquad (2.12)$$



รูปที่ 2.14 แสดงการไหลของสารอาหารและเซลในระบบการหมักแบบเคโมสแตทขั้นตอนเดียว



รูปที่ 2.15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเซล, สารอาหาร, กำลังการผลิต และอัตราการเจือจางที่สภาวะคงที่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เทอม F/V คืออัตราการเจือจาง ส่วน D ซึ่งหมายถึง ปริมาตรน้ำหมักที่ไหลผ่านเครื่องปฏิกรณ์ในเวลา 1 ชั่วโมง จึงเขียนสมการ (2.12) ได้ใหม่เป็น

$$\frac{dX}{dt} = -DX + \mu X = X(\mu - D) \qquad (2.13)$$

ในช่วงการเจริญที่สภาวะคงที่ ค่า dX/dt = 0 ดังนั้น μ =D สมการ (2.13) แสดงให้เห็นว่าถ้าแปรค่าอัตราการป้อนสารอาหารแล้ว อัตราการเจริญมีการเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวใช้ได้จนถึงจุดที่ D > μ_m (อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด) เนื่องจากเมื่อ D > μ_m ภายใต้สภาวะดังกล่าว สารอาหารมีไม่จำกัด (nutrient is no longer limiting) และเทอม (μ - D) จึงมีค่าเป็นลบ ผลที่ตามมาคือความเข้มข้นของเซลลดลง และเกิดการล้างเชื้อ (wash-out) ในทางปฏิบัติอัตราการเจือจางวิกฤต , D_c จะมีค่าประมาณเท่ากับ μ_m

เมื่ออัตราการเจือจางเข้าใกล้ D_c ระบบหมักแบบเคโมสแตทจะมีความเสถียรลดลง เนื่องจากถ้ามีการเปลี่ยนแปลงค่าอัตราการไหลแม้เพียงเล็กน้อย เช่น การปั๊มออกผิดพลาด และอื่น ๆ ก็จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า X อย่างมากมาย ทำให้เกิดสภาวะไม่คงที่ ซึ่งนำไปสู่การล้างเชื้ออย่างรวดเร็ว ดังนั้นข้อเสียเปรียบข้อใหญ่ของเคโมสแตทคือใช้งานได้ดีที่อัตราการเจือจางต่ำ ๆ ซึ่งทำให้การเปลี่ยนแปลงค่า X และ S มีเพียงเล็กน้อย และการเปลี่ยนแปลงค่าอัตราการไหลก็มีผลเพียงเล็กน้อยต่อสภาวะคงที่ (ดังแสดงในรูปที่ 2.15)

สำหรับเทอร์บิโดสแตท ซึ่งเป็นระบบที่มีการรักษาความหนาแน่นของเซลโดยการควบคุมอัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก เพราะฉะนั้นระบบจึงมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงค่า X แม้เพียงเล็กน้อย และทำงานได้ดีที่อัตราการเจือจางสูง ๆ ดังนั้นเคโมสแตทและเทอร์บิโดสแตทจึงเป็นสิ่งที่ประกอบกันให้สมบูรณ์

2.13.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความเข้มข้นของสารอาหาร

ความสัมพันธ์ดังกล่าวได้จากการทำสมดุลมวลสารรอบระบบเคโมสแตทโดยพิจารณาสารอาหาร :

สารอาหารที่สะสม = สารอาหารเข้า - สารอาหารออก - สารอาหารที่ถูกใช้ไป - สารอาหารที่ใช้ในการบำรุงรักษา - สารที่เกิดขึ้น

$$\frac{dS}{dt} = \frac{FS_R}{V} - \frac{FS}{V} - \frac{\mu X}{Y_{x/s}} - mX - \frac{q_p X}{Y_{P/S}} \qquad (2.14)$$

เมื่อ S_R = ความเข้มข้นของสารอาหารในถังเก็บ, กรัมต่อลิตร

$Y_{x/s}$ = สัมประสิทธิ์ผลิตผลของเซล

= biomass yield coefficient

= กรัม นน.แห้งของเซลต่อกรัมสารอาหารที่ใช้

$Y_{p/s}$ = สัมประสิทธิ์ผลิตผลของผลิตภัณฑ์

= product yield coefficient

= กรัมผลิตภัณฑ์ที่เกิดต่อกรัมสารอาหารที่ใช้

S = ความเข้มข้นของสารอาหารในระบบเคโมสแตท, กรัมต่อลิตร

m = ความต้องการพลังงานในการบำรุงรักษา

= maintenance requirement

= กรัมสารอาหารที่ใช้ต่อกรัม นน.แห้งของเซลต่อชม.

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ

q_p = อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์จำเพาะ

= กรัมผลิตภัณฑ์ที่เกิดต่อลิตรต่อชม.

โดยทั่วไป $mX << \mu X/Y_{x/s}$ และสามารถตัดทิ้งได้ เมื่อพิจารณากรณีที่ไม่เกิดผลิตภัณฑ์สมการ (2.14) เหลือ

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F S_R}{V} - \frac{F \bar{S}}{V} - \frac{\mu X}{Y_{x/s}} \qquad (2.15)$$

ที่สภาวะคงที่ $D = F/V$ และ $dS/dt = 0$ จะได้ว่า

$$\frac{\mu \bar{X}}{Y_{x/s}} = D(S_R - \bar{S}) \qquad (2.16)$$

ที่สภาวะคงที่ $\mu = D$ สามารถจัดรูปได้ใหม่เป็น

$$\bar{X} = Y_{x/s}(S_R - \bar{S}) \qquad (2.17)$$

จะสังเกตได้ว่าที่สภาวะคงที่ จะแทน X และ S ด้วยสัญลักษณ์ $\bar{X}$ และ $\bar{S}$

สมการ (2.17) มีการตั้งสมมติฐานว่า สัมประสิทธิ์ผลิตผล, Y (yield coefficient) ไม่ขึ้นกับอัตราการเจริญซึ่งใช้ไม่ได้กับทุกกรณี และยังสมมติอีกว่าค่า X ไม่ขึ้นกับสารอาหารอื่นใด ยกเว้นสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญ (growth-limiting nutrient)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.13.4 สมการพื้นฐานสำหรับการหมักแบบต่อเนื่อง

สมการ (2.16) และ (2.17) เป็นสมการที่สภาวะคงที่อธิบายระบบการหมักแบบต่อเนื่อง แต่ก็ยังจำเป็นต้องหาแบบจำลอง ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง X และ S กับ D ซึ่งทำได้โดยแทนค่า ในสมการของ Monod

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \qquad (2.18)$$

ก. สมการสำหรับระบบที่สภาวะไม่คงที่

สำหรับเซล :

$$\frac{dX}{dt} = X(\mu - D) \qquad \text{จาก (2.13)}$$

แทนค่า μ จากสมการ (2.18) ลงในสมการ (2.13) จะได้

$$\frac{dX}{dt} = X(\mu_m \frac{S}{K_s + S} - D) \qquad (2.19)$$

สำหรับสารอาหาร :

$$\frac{dS}{dt} = D(S_R - S) - \frac{\mu X}{Y_{x/s}} \qquad \text{(จาก 2.15)}$$

แทนค่า μ จากสมการ (2.18) ลงในสมการ (2.15) จะได้

$$\frac{dS}{dt} = D\,(S_R - S) - \frac{X}{Y_{x/s}} \mu_m \frac{S}{K_s + S} \qquad (2.20)$$

สมการ (2.19) และ (2.20) ใช้น้อยมากในการศึกษาระบบหมักชนิดเคโมสแตท ยกเว้นเมื่อต้องการศึกษาสภาวะไม่คงที่ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงจากสภาวะคงที่หนึ่งไปสู่อีกสภาวะคงที่หนึ่ง

ข. สมการสำหรับระบบที่สภาวะคงที่

ที่สภาวะคงที่ dX/dt = 0 และ dS/dt = 0 ดังนั้น X และ S จึงเป็นค่าคงที่ และสามารถแทนได้ด้วย X และ S และ μ = D ดังนั้นสามารถเขียนสมการของ Monod สมการที่ (2.18) ได้ใหม่เป็น

$$D = \mu_m \frac{\bar{S}}{K_s + S} \qquad (2.21)$$

แก้สมการหาค่า S :

$$\bar{S} = \frac{K_s D}{\mu_m - D} \qquad (2.22)$$

จากสมการ (2.17) ที่สภาวะคงที่ได้

$$\bar{X} = Y_{x/s}(S_R - \bar{S}) \tag{2.23}$$

แทนค่า S จากสมการ (2.22) ลงไปใน (2.17) จะได้ว่า

$$\bar{X} = Y_{x/s}\left(S_R - \frac{K_s D}{\mu_m - D}\right) \tag{2.24}$$

สมการเหล่านี้อธิบายการเจริญที่สภาวะคงที่ สมการ (2.22) แสดงให้เห็นว่า S เป็นฟังก์ชันกับ D เท่านั้น ในขณะที่สมการ (2.24) แสดงให้เห็นว่า X เป็นฟังก์ชันกับ D และ S_R (ดังแสดงในรูปที่ 2.15)

2.13.5 อัตราการเจือจางวิกฤต

จากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นว่า อัตราการเจือจางวิกฤต, D_c คือค่า D ที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เกิดการล้างเชื้อ โดยทั่วไป D_c มีค่าประมาณเท่ากับ μ_m อย่างไรก็ตาม $D_c = \mu$ เมื่อ $S = S_R$ เนื่องจากเมื่อเกิดการล้างเชื้อจะไม่มีเซลเหลืออยู่ในระบบหมักเคโมสแตท ดังนั้นจึงไม่มีการใช้สารอาหาร หรือเขียนได้ว่า

$$D_c = \mu_m \frac{S_R}{K_s + S_R} \tag{2.25}$$

จากสมการ (2.25) จะเห็นได้ชัดว่า D_c เป็นฟังก์ชันกับ S_R เมื่อ S_R มีค่ามากเมื่อเทียบกับ K_s อาจเขียนเป็น

$$D_c = \mu_m \frac{S_R}{S_R} = \mu_m \tag{2.26}$$

อย่างไรก็ตาม เมื่อ S_R ลดลง เทอม K_s ตัดทิ้งไม่ได้ แล้ว D_c จะมีค่าน้อยกว่า μ_m

2.13.6 กำลังการผลิต

ในการหมักแบบต่อเนื่องกำลังการผลิตเซล (biomass productivity), PX (กรัมต่อลิตรต่อชม.) จะเท่ากับ

$$PX = D\bar{X} \tag{2.27}$$

แทนค่า X ด้วยสมการ (2.24) จะได้

$$PX = D\,Y_{x/s}\left(S_R - \frac{K_s D}{\mu_m - D}\right) \qquad (2.28)$$

นั่นคือกำลังการผลิตเป็นฟังก์ชันกับอัตราการเจือจาง (ดังรูปที่ 2.15) ค่าอัตราการเจือจางที่ทำให้ได้กำลังการผลิตสูงสุดหรือ D_m อาจคำนวณได้โดยให้สมการอนุพันธ์อันดับ 1 ของสมการ (2.28) เท่ากับ 0 จะได้ว่า

$$D_m = D_c\left[1 - \left(\frac{K_s}{K_s + S}\right)^{\frac{1}{2}}\right] \qquad (2.29)$$

อัตราการเจือจางที่ทำให้ได้กำลังการผลิตสูงสุด มักไม่ใช่ค่าเดียวกับที่ทำให้ได้ผลิตผลสูงสุด เพราะฉะนั้นในการพิจารณากำลังการผลิตอาจจะต้องพิจารณาถึงสารอาหารที่เหลืออยู่ในน้ำหมักที่ออกไปด้วย

กำลังการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สัมพันธ์กับการเจริญ (productivity of growth related products) (Pp) สามารถเขียนได้ในทำนองเดียวกัน คือ

$$Pp = Dp \qquad (2.30)$$

เมื่อ p = ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่สภาวะคงที่ , กรัมต่อลิตร

2.13.7 การหาค่าผลิตผลและค่าคงที่อัตราเร็ว

เนื่องจากเป็นการยากที่จะรักษาความเสถียรของสภาวะคงที่ เมื่อเข้าใกล้ค่า μ_m วิธีการง่ายที่สุดในการหาค่า μ_m คือใช้สมการของ Monod แล้วแก้หาค่า Ks :

$$D = \mu_m \frac{\bar{S}}{K_s + S} \qquad (2.31)$$

และ

$$K_s = \bar{S}\,\frac{(\mu_m - D)}{D} \qquad (2.32)$$

ทำการควบคุมระบบหมักเคโมสแตทให้ทำงานที่สภาวะเหมือนกัน แต่แปรค่าอัตราการเจือจางต่ำ ๆ 2 ค่า แล้วหาค่า S สำหรับแต่ละค่า D จึงสามารถแก้สมการหาค่า μ_m ได้ดังต่อไปนี้

$$\bar{S}_1\frac{(\mu_m - D_1)}{D_1} = \frac{\bar{S}_2\,(\mu_m - D_2)}{D_2} \qquad (2.33)$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อรู้ค่า μ_m ก็หาค่า K_s โดยแทนค่า μ_m ลงในสมการ (2.32)

ผลิตผลของเซล (biomass yield), $Y_{x/s}$ สามารถหาได้ที่แต่ละสภาวะคงที่ โดยการวัดค่า S และ X จากสมการ

$$Y_{x/s} = \frac{\bar{X}}{(S_R - \bar{S})} \qquad (2.34)$$

ในระบบการหมักชนิดเคโมสแตท ภายใต้สภาวะที่คาร์บอนเป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญ เมื่อทำการเขียนกราฟระหว่าง $1/Y_{x/s}$ กับ 1/D จะได้สมการเส้นตรงมีความชันเท่ากับ m หรือพลังงานที่ต้องการในการบำรุงรักษา ดังแสดงในรูป 2.16 ความชันดังกล่าวไม่ได้ผ่านจุดกำเนิดเนื่องจากเซลต้องใช้สารอาหารส่วนหนึ่งในการรักษาเซลให้มีความมั่นคงและอยู่รอดได้ และจากสมการของ Pirt ที่ว่า

$$1/Y_{x/s} = m/\mu + 1/Y_G \qquad (2.35)$$

ที่สภาวะคงที่ D = μ ดังนั้นจุดตัดแกน $1/Y_{x/s}$ จึงมีค่าเท่ากับ $1/Y_G$

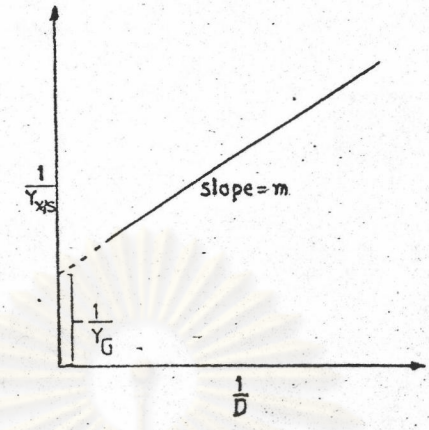
เมื่อ Y_G = ผลิตผลการเจริญจริง (true growth yield)

จะเห็นได้ชัดว่า ค่าต่าง ๆ เช่น μ_m, Ks และ m ซึ่งหาได้ยากในการหมักแบบเป็นครั้งนั้น สามารถหาได้โดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากการทดลองหมักที่สภาวะคงที่

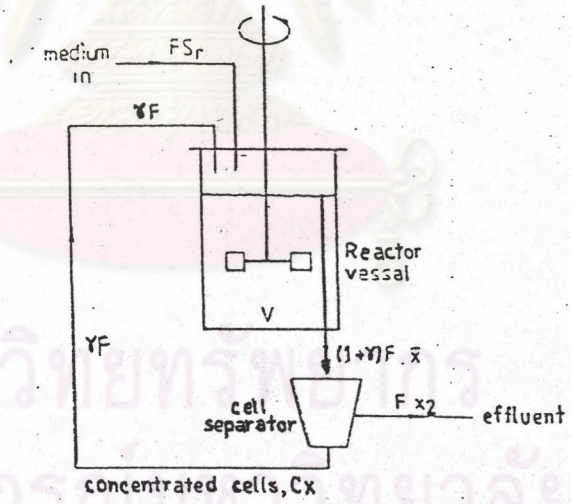
2.13.8 การปรับปรุงระบบเคโมสแตทพื้นฐาน

เป็นเวลานานมาแล้วที่มีแต่การกล่าวถึงเคโมสแตท ทั้งในทางทฤษฎีและทางปฏิบัติโดยไม่ได้มีการปรับปรุง การปรับปรุงประสิทธิภาพของเคโมสแตทสามารถทำได้โดยการนำเอาเซลในน้ำหมักที่ไหลออกกลับมาป้อนย้อนกลับเข้าสู่เครื่องปฏิกรณ์ หรือโดยการใช้ระบบเคโมสแตทจำนวนหนึ่งมาต่ออนุกรมกัน

การนำเซลมาป้อนย้อนกลับเป็นวิธีการสำคัญ ในการเติมเชื้ออย่างต่อเนื่องลงในเคโมสแตท เพื่อรักษาระบบให้เสถียรและเป็นการทำให้การรบกวนระบบเนื่องจากการใช้ $D > \mu_m$ ลดน้อยลง ข้อดีอื่น ๆ ของการนำเซลมาป้อนย้อนกลับก็คือทำให้สามารถให้เครื่องทำงานที่สภาวะเข้าใกล้ Dm ซึ่งเป็นค่าอัตราการเจือจางที่ทำให้เกิดเซลมากที่สุด โดยปราศจากสารอาหารเหลือใช้ในน้ำหมักที่ทางออก โดยทั่วไปที่สภาวะ Dm นั้นจะมีสารอาหารเหลืออยู่ในน้ำหมักที่ทางออก เมื่อมีการนำเซลมาป้อนย้อนกลับจะช่วยสามารถรักษาความเข้มข้นของเซลที่มากขึ้นที่สภาวะคงที่ ซึ่งมีผลทำให้สามารถใช้สารอาหารเพิ่มขึ้น รูปแบบดังกล่าวมีประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากทำให้ค่า COD ลดลง ในอัตราที่สูงกว่าการขาดการนำเซลมา



รูปที่ 2.16 แสดงการหาค่าผลิตผลการเจริญจริง, Y_G และพลังงานที่ต้องการในการบำรุงรักษาเซล



รูปที่ 2.17 แสดงระบบหมักเคโมสแตทที่มีการนำเซลมาป้อนย้อนกลับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ป้อนย้อนกลับ

แผนผังแสดงระบบหมักเคโมสแตทที่มีการนำเซลมาป้อนย้อนกลับ แสดงอยู่ในรูปที่ 2.17 ทฤษฎีที่ใช้คล้ายกับทฤษฎีเคโมสแตทพื้นฐาน เว้นแต่ว่ามีเทอมเพิ่มเข้ามา 2 เทอม คือ อัตราส่วนการป้อนย้อนกลับ (recycle ratio, γ) และ C' เป็นแฟคเตอร์ซึ่งนำน้ำหมักขาออกมาทำให้เข้มข้นก่อนป้อนกลับสู่เคโมสแตท ทำสมดุลมวลสารของเซลและสารอาหารรอบเครื่องหมักและเครื่องทำให้เซลเข้มข้น (separator) ได้เป็น

สำหรับเซล :

เซลสะสม = เซลเข้า + เซลที่ป้อนย้อนกลับ + เซลที่เจริญ - เซลออก

$$\frac{dX}{dt} = \frac{FX_0}{V} + \frac{\gamma FCX}{V} + \mu X - \frac{(1+\gamma)FX}{V} \qquad (2.36)$$

เซลที่บำรุงรักษาและเซลที่ตายสามารถตัดทิ้งได้ ถือว่าน้อยมาก

ภายใต้สภาวะคงที่ $dX/dt = 0$ และ $D = F/V$ ดังนั้นจัดรูปสมการใหม่ได้เป็น

$$\mu = D(1+\gamma-\gamma C) \qquad (2.37)$$

สมการ (2.37) แสดงให้เห็นว่า ค่า D จะมีค่าน้อยกว่า μ เสมอ เนื่องจาก C' จะมีค่ามากกว่า 1 ทำให้เทอม $(1+\gamma-\gamma C')$ มีค่าน้อยกว่า 1 เสมอ

สำหรับสารอาหาร :

สารอาหารสะสม = สารอาหารในน้ำหมักที่ป้อน + สารอาหารในน้ำหมักย้อนกลับ - สารอาหารที่ใช้ - สารอาหารที่ออกไป

$$\frac{dS}{dt} = \frac{FS_R}{V} + \frac{FS}{V} - \frac{\mu X}{Y_{x/s}} - \frac{(1+\gamma)F_s}{V} \qquad (2.38)$$

ที่สภาวะคงที่ $dS/dt = 0$ และ $D = F/V$ เขียนสมการ (2.38) ได้ใหม่เป็น

$$\bar{X} = \frac{D}{\mu} Y_{x/s} (S_R - \bar{S}) \qquad (2.39)$$

แทนค่า μ จากสมการ (2.37) จะได้ว่า

$$\bar{X} = \frac{Y_{x/s}(S_R - \bar{S})}{(1+\gamma-\gamma C)} \qquad (2.40)$$

จากสมการ (2.40) จะเห็นว่า X จะมีค่าสูงขึ้นเสมอเมื่อมีการป้อนย้อนกลับ เนื่องจากถูกหารด้วยเทอม (1+ϒ-ϒC') ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 1 เสมอ

เมื่อแทนค่า μ จากสมการ (2.37) ลงในสมการของ Monod จะได้ว่า

$$\bar{S} = K_s \frac{\mu}{\mu_m - \mu} = K_s \frac{D(1+\gamma-\gamma C')}{\mu_m - D(1+\gamma-\gamma C')} \qquad (2.41)$$

และเมื่อแทนค่าสมการ (2.41) ลงในสมการ (2.40) จะได้ว่า

$$\bar{X} = \frac{Y_{x/s}}{(1+\gamma-\gamma C')} \left[S_R - K_s \frac{D(1+\gamma-\gamma C')}{\mu_m - D(1+\gamma-\gamma C')} \right] \qquad (2.42)$$

สมการ (2.41) และสมการ (2.42) สามารถเขียนเป็นกราฟได้ดังรูป 2.18 เปรียบเทียบกับระบบหมักชนิดเคโมสแตทที่ไม่มีการป้อนย้อนกลับ

สำหรับการหมักแบบต่อเนื่องหลายขั้นตอน โดยน้ำหมักที่ออกจากถังที่ 1 จะไหลเข้าสู่ถังที่ 2 (ดังรูปที่ 2.19 ซึ่งแสดงระบบหมักเคโมสแตท 2 ขั้นตอน) อย่างต่อเนื่อง และถังหมักที่ 2 ยังอาจรับน้ำหมักใหม่ที่ป้อนเข้ามาทำให้ D มากกว่า μ_m ดังนั้นในแต่ละถังหมักจึงมีสารอาหารแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ถังหมักที่ 1 อาจเป็นถังที่จุลินทรีย์ใช้สารอาหารสำหรับผลิตเชื้อให้มีปริมาณมากที่สุด และถังหมักที่ 2 หรือถังหมักลำดับถัดมาก็ใช้เป็นที่เกิดของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังอาจนำเซลมาป้อนย้อนกลับเข้าสู่แต่ละถังได้ตามต้องการอีกด้วย

การทำสมดุลมวลสารของสารอาหารหรือของเซล สำหรับระบบหมัก 2 ขั้นตอนที่ไม่มีการนำเซลมาป้อนย้อนกลับและไม่มีน้ำหมักป้อนเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 ตลอดเวลา สำหรับสมดุลของขั้นตอนที่ 1 จะเหมือนกับสมดุลของระบบหมักเคโมสแตทที่มีขั้นตอนเดียว ส่วนในขั้นตอนที่ 2 ทำสมดุลย์ได้ดังนี้

สำหรับเซล :

เซลสะสม = เซลเข้า - เซลออก + เซลที่เจริญ

$$\frac{dX_2}{dt} = \frac{FX}{V_2} - \frac{FX_2}{V_2} + \mu_2 X_2 \qquad (2.43)$$

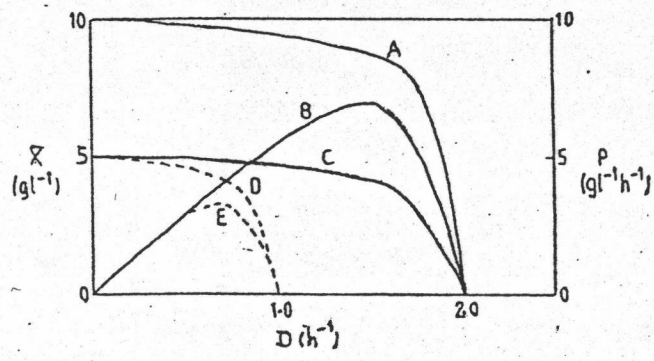
ภายใต้สภาวะคงที่ $dX_2/dt = 0$ และ $D_2 = F/V_2$ จะได้ว่า

$$\mu_2 = D_2 \left(1 - \frac{\bar{X}_2}{X}\right) \qquad (2.44)$$

สำหรับสารอาหาร :

สารอาหารสะสม = สารอาหารเข้า - สารอาหารออก - สารอาหารที่ใช้

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{FS}{V_2} - \frac{FS_2}{V_2} - \frac{\mu_2 X_2}{Y_{x/s}} \qquad (2.45)$$



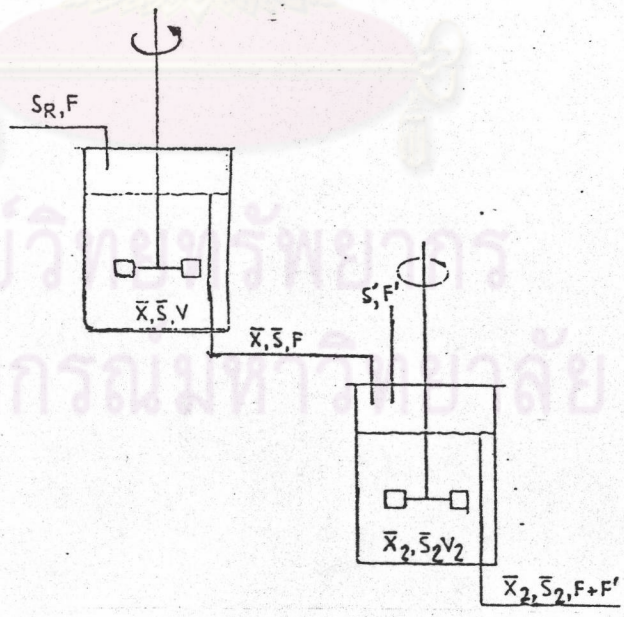
รูปที่ 2.18 แสดงกำลังการผลิต (productivity,P) และจำนวนเซล (X) สำหรับระบบหมักเคโมสแตทขั้นตอนเดียว เส้นกราฟ A,B,C แทนระบบที่มีการนำเซลมาป้อนย้อนกลับ ส่วนเส้นกราฟ D,E แทนระบบที่ไม่มีการป้อนย้อนกลับ โดยระบบที่แสดงนี้มี μ_m = 1 ชม.$^{-1}$, $Y_{x/s}$ = 0.5, Ks = 0.2 กรัมต่อลิตร, S_R = 10 กรัมต่อลิตร, C = 2, θ = 0.5

โดยที่เส้นกราฟ B และ E คือ กำลังการผลิตเชิงปริมาตร

(volumetric productivities)

เส้นกราฟ A และ D คือ ความเข้มข้นของเซล

เส้นกราฟ C คือ ความเข้มข้นของเซลในน้ำหมักออก



รูปที่ 2.19 ระบบหมักเคโมสแตท 2 ขั้นตอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่สภาวะคงที่ จะได้ว่า

$$\bar{X}_2 = \frac{D_2}{\mu_2} Y_{x/s} (\bar{S} - \bar{S}_2) \qquad (2.46)$$

จากสมการเหล่านี้จะเห็นว่า ถ้าไม่มีน้ำหมักป้อนเพิ่มเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 ค่า μ จะน้อย D และการเจริญในขั้นตอนที่ 2 จะมีค่าน้อย

การเติมน้ำหมักเพิ่มเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 ทำให้ความหนาแน่นของเซลเพิ่มขึ้นที่สภาวะคงที่ และอัตราการเจริญมีค่ามากกว่า μ_m ดังแสดงในสมการ (2.47)และ (2.48)

$$\mu = D_2 - \frac{F}{V_2} \frac{\bar{X}}{\bar{X}_2} \qquad (2.47)$$

$$\bar{X}_2 = \frac{Y_{x/s}}{\mu_2} \left(\frac{F}{V_2} \bar{S} + \frac{F'}{V_2} S' - D_2 \bar{S}_2 \right) \qquad (2.48)$$

เมื่อ F' = อัตราการไหลของสารอาหารที่ป้อนเข้าสู่ถังหมักในขั้นตอนที่ 2, ลิตรต่อชม.

S' = ความเข้มข้นของสารอาหารในน้ำหมักที่ป้อนเข้าสู่ถังหมักในขั้นตอนที่ 2, กรัมต่อลิตร

2.13.9 ข้อดีของการหมักแบบต่อเนื่องเทียบกับการหมักแบบเป็นครั้ง

ข้อได้เปรียบหลัก ๆ ได้แก่

1. สามารถควบคุมและรักษาอัตราการเจริญของเชื้อได้
2. สามารถตรวจสอบผลกระทบที่มีต่อการเจริญและการเกิดผลิตภัณฑ์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ทางกายภาพและทางเคมี
3. สามารถรักษาความเข้มข้นของเซลให้คงที่ โดยการแปรค่าอัตราการเจือจาง
4. สามารถรักษาความเข้มข้นสารอาหารที่มีผลต่อการเจริญให้คงที่ และสามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเซลและขบวนการเมตาโบลิซึมได้โดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอาหารที่มีผลต่อการเจริญ
5. อาศัยเทคนิคการกระตุ้นและเลื่อน (pulse and shift technic) ทำให้สามารถหาปริมาณน้ำหมักที่เหมาะสม สำหรับการเกิดเซลและ

ผลิตภัณฑ์ เทคนิคดังกล่าวใช้วิธีฉีดน้ำหมักโดยตรงเข้าสู่เคโมสแตท แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของ X และ S ถ้า X เพิ่มขึ้นก็จะเติมน้ำหมักเพิ่มลงไป จนเข้าสู่สภาวะคงที่

6. สามารถใช้หาค่าคงที่อัตราเร็ว พลังงานที่ใช้ในการบำรุงรักษาเซล และผลิตผลการเจริญจริง (Y_g) ได้
7. ผลที่ได้จากการหมักแบบต่อเนื่องมักเชื่อถือได้และสามารถทำซ้ำได้
8. การหมักแบบต่อเนื่องมักให้ผลคุ้มค่าในเชิงเศรษฐศาสตร์ เนื่องจากให้กำลังการผลิตต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรสูงกว่า เสียเวลาน้อยกว่าในการทำความสะอาด "down time" คือ ล้างทำความสะอาดเตรียมเครื่องและฆ่าเชื้อ นอกจากนี้ยังใช้แรงงานคนน้อยกว่าและใช้เงินลงทุนเริ่มต้นน้อยกว่าด้วย
9. สามารถใช้ระบบหมักเคโมสแตท ในการเลี้ยงรักษาสายพันธุ์ผสมที่สภาวะคงที่ ถ้าใช้การหมักแบบเป็นครั้งแล้ว มักมีจุลินทรีย์สายพันธุ์หนึ่งที่เจริญเติบโตเด่นชัดออกมากกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ

2.13.10 <u>ข้อเสียเปรียบของการหมักแบบต่อเนื่องเทียบกับการหมักแบบเป็นครั้ง</u>

ข้อเสียเปรียบหลัก ๆ ได้แก่

1. การผลิตผลิตภัณฑ์ที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญมักไม่ได้ผลดีเท่าที่ควรและนิยมผลิตโดยใช้การหมักแบบเป็นครั้งมากกว่า
2. การสร้างผนังเซล และการรวมตัวของเซล สามารถทำให้เกิดการล้างเชื้อ และป้องกันไม่ให้เกิดสภาวะคงที่ของการเจริญที่แท้จริง
3. การเจริญอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ทำให้สายพันธุ์ดั้งเดิมสูญไปเนื่องจากมีสายพันธุ์อื่นที่เจริญได้ดีกว่า
4. การเจริญของจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยจะเกิดได้ยาก เนื่องจากธรรมชาติของน้ำหมักที่มีความหนืดและไม่เป็นเนื้อเดียวกัน จะป้องกันไม่ให้เกิดสภาวะคงที่ของการเจริญ
5. การเจริญเป็นระยะเวลานาน ๆ ทำให้เกิดการปนเปื้อนได้
6. เพื่อขยายช่วงเวลาในการเจริญโรงงานและอุปกรณ์ต่าง ๆ ต้องมีคุณภาพดี น่าเชื่อถือ เพื่อป้องกันการเสียหายของเครื่องจักร