การคัดเลือกหัวเชื้อแบคทีเรียจากน้ำตาลเมา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชู

BACTERIA INOCULUM SCREENING FROM PALM WINE TO IMPROVE THE FERMENTATION EFFICIENCY OF VINEGAR

กัญญารัตน์ วิศพันธ์[1] ธนพร ถาวรจิตร[1] วิภาวรรณ วงศ์สุดาลักษณ์[1] และนิศากร วิทจิตสมบูรณ์[2]*

Kanyarat Wissapan[1], Thanaporn Tawornchit[1], Wipawan Wongsudalak[1] and Nisakorn Witthajitsomboon[2]*

บทคัดย่อ

แบคทีเรียในน้ำตาลเมาจากการหมักน้ำตาลสดตามธรรมชาติ หลายกลุ่มสามารถนำมาหมักต่อเป็นน้ำส้มสายชูได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกหัวเชื้อจากน้ำตาลเมาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูให้ได้ปริมาณกรดมากขึ้น โดยแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่สร้างกรดได้จากน้ำตาลเมาที่ผ่านการหมักเป็นเวลา 30 วัน บนอาหาร glucose yeast extract calcium carbonate agar คัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 20 ไอโซเลท จากนั้นทดสอบการสร้างกรด โดยหาค่าผลต่างของขนาดวงใสกับโคโลนี และทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น พบว่าเชื้อที่ผลิตกรดได้มากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ Ssv.14, Ssv.13, Ssv.17, Ssv.8, และ Ssv.20 ตามลำดับ ทั้ง 5 ไอโซเลท มีลักษณะเบื้องต้นคล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Acetobacter* และ *Gluconobacter* เมื่อนำมาคัดเลือกหัวเชื้อ โดยการไทเทรตหาปริมาณกรดที่ได้จากการหมัก 30 วัน ในอาหาร glucose ethanol yeast extract broth ที่มีเอทานอลร้อยละ 5 ในสภาวะมีอากาศ ที่อุณหภูมิห้องพบว่าหัวเชื้อผสมทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถสร้างกรดได้มากที่สุดร้อยละ 15.3±0.46 w/v สูงกว่าหัวเชื้อธรรมชาติ ซึ่งสร้างกรดได้ร้อยละ 8.76±2.33 w/v และส้มสายชูกลั่น

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

[1]Faculty of Science and Technology, Rajabhat Songkhla University, Mueang District, Songkhla Province 90000

[2]ศูนย์ทรัพยากรจุลินทรีย์และการใช้ประโยชน์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

[2]Microbial Resources and Utilization center, Rajabhat Songkhla University, Mueang District, Songkhla Province 90000

*corresponding author e-mail: nisakorn.wi@skru.ac.th

Received: 14 May 2025; Revised: 24 June 2025; Accepted: 25 June 2025

DOI: https://doi.org/10.14456/lsej.2025.15

ที่มีกรดอะซิติกร้อยละ 5.00±0.54 w/v อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ขณะที่หัวเชื้อบริสุทธิ์สร้างกรดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.06±0.08-0.13±0.04 w/v และหัวเชื้อผสมให้ค่า pH เท่ากับ 3 หัวเชื้อธรรมชาติ และน้ำส้มสายชูกลั่น ให้ค่า pH เท่ากับ 4 ขณะที่หัวเชื้อบริสุทธิ์ให้ค่า pH เท่ากับ 8 ดังนั้น การใช้หัวเชื้อผสมที่ผ่านการคัดเลือกในการสร้างกรดอย่างมีประสิทธิภาพ จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยพัฒนาการผลิตน้ำส้มสายชูให้ดีขึ้นได้ในอนาคต

คำสำคัญ: น้ำส้มสายชูหมัก น้ำตาลเมา แบคทีเรียอะซิติก หัวเชื้อน้ำส้มสายชู

Abstract

Bacteria found in spontaneously fermented palm wine derived from fresh sugar sap can undergo further fermentation to yield vinegar. Therefore, this research aims to isolate the inoculums from palm wine to increase the efficiency of vinegar fermentation to obtain more acid. A total of 20 isolates cultured on glucose yeast extract calcium carbonate agar medium were isolated from palm wine fermented for 30 days. The efficiency of the acid production was screened by the difference between the diameter of the colony and the clear zone on the medium. The morphological and biochemical properties were studied. It was found that the five isolates that had the widest clear zones were Ssv.14, Ssv.13, Ssv.17, Ssv.8, and Ssv.20, respectively. All isolates showed the similar basic characteristics of bacteria of the *Acetobacter* and *Gluconobacter* bacteria. These isolates were investigated for the potential to be vinegar inoculum based on the ability of acid production. The amount of acid was evaluated by titration of the cultures grown in the glucose ethanol yeast extract broth with 5% ethanol under aerobic conditions at room temperature for 30 days. It was found that the mixed inoculum of five isolates showed the most acidity (15.3±0.46% w/v), which was higher than the natural inoculum, palm wine (8.76±2.33% w/v), and distilled vinegar (5.00±0.54% w/v) with statistically significant ($p \leq 0.05$), respectively. While the pure inoculum from each isolate produced acid in the range 0.06±0.08% w/v - 0.13±0.04% w/v. The mixed inoculum showed a pH value of 3, and the natural inoculum and the distilled vinegar gave a pH of 4. The pure inoculums gave a pH of 8. Therefore, the use of a selectively mixed inoculum with efficient acid production may be another approach that could enhance the production of vinegar in the future.

Keywords: fermented vinegar, palm wine, acetic acid bacteria, vinegar inoculum

บทนำ

น้ำตาลโตนดหรือน้ำตาลสดเป็นน้ำหวานที่ได้จากต้นตาลโตนด พบได้นับจากจังหวัดเพชรบุรีลงไปจนถึง อำเภอสทิงพระ จังหวัดสงขลา และยังพบได้ในจังหวัดอื่น ๆ เช่น จังหวัดปัตตานี และจังหวัดนราธิวาส น้ำหวานนี้ประกอบไปด้วยแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น โซเดียม (Na), โพแทสเซียม (K), แคลเซียม (Ca) และธาตุเหล็ก (Fe) รวมถึงกรดแอสคอร์บิกและโพลีฟีนอล ซึ่งดีต่อสุขภาพ (Khadka et al, 2024) น้ำตาลโตนดสามารถนำมาหมักเป็นน้ำส้มสายชูหมัก เรียกว่า “น้ำส้มโหนด” นิยมใช้ในการปรุงแต่งรสอาหารพื้นบ้านในแกงส้ม ต้มส้ม น้ำจิ้ม และอาจาด ฯลฯ การทำน้ำส้มสายชูหมักตามภูมิปัญญาท้องถิ่นมีลักษณะคล้ายกัน โดยอาศัยกระบวนการหมักจากจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ เช่น อำเภอสทิงพระจะนำน้ำตาลสดมาหมักในไหดินเผา หรือโอ่งดินเผา เป็นเวลา 1 เดือน ขั้นตอนนี้เป็นกระบวนการหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ (alcoholic fermentation) ซึ่งเป็นกระบวนการหมักแบบไม่ใช้อากาศ น้ำตาลสดจะเริ่มเปลี่ยนรสชาติจากน้ำตาลหวานเป็นน้ำตาลเมา และเริ่มเป็นน้ำตาลเปรี้ยวมีสีขาวขุ่น โดยหมักต่อไปอีก 2–3 เดือน จะได้น้ำส้มหมักที่เปรี้ยว ซึ่งเกิดจากการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก (acetous fermentation) ด้วยแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียอะซิติก (acetic acid bacteria) น้ำส้มสายชูหมักที่ได้มีสีเหลืองอ่อนใสหอมน่ารับประทาน ในน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักน้ำตาลอาจมีตะกอนเล็กน้อยตามธรรมชาติ มีปริมาณกรดอะซิติกไม่น้อยกว่าร้อยละ 4 (Saha & Kumar, 2023) เนื่องจากน้ำส้มสายชูหมักมีคุณค่าทางโภชนาการ และเป็นที่นิยมในการบริโภค จึงมีการศึกษากระบวนการหมักนี้ เพื่อที่จะสามารถปรับปรุงและพัฒนากระบวนการผลิตดังกล่าวให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การเพิ่มปริมาณกรดอะซีติก และการลดระยะเวลาการหมัก เป็นต้น จากการศึกษาแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดอะซิติกได้ พบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้พบได้ตามธรรมชาติบนผักและผลไม้ จัดอยู่ในวงศ์ Acetobacteraceae โดยสกุลหลักของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ *Acetobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบหรือแกรมแปรผัน (gram-variable bacteria) ต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต มีรูปร่างเป็นทรงรีหรือแท่ง ไม่สร้างสปอร์ และมีแฟลกเจลลา สามารถหมักแบบออกซิเดชันอย่างรวดเร็ว สามารถเปลี่ยนเอทานอลให้เป็นกรดอะซิติก รวมถึงออกซิไดซ์น้ำตาลและแอลกอฮอล์น้ำตาลหลากหลายชนิดให้เป็นกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Sengun & Karabiyikli, 2011) จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีแนวคิดที่จะใช้แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นหัวเชื้อในการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก จากการศึกษาการหมักน้ำส้มสายชูจากเปลือกและกากส้มเหลือใช้ พบว่าแบคทีเรียจากธรรมชาติบางชนิดมีความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกจำนวนมากในเวลารวดเร็ว ซึ่งสามารถนำมาเป็นหัวเชื้อในการหมักน้ำส้มสายชูได้ (Wongsudalak & Nunieam, 2013) นอกจากนี้มีรายงานถึงการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตสับปะรดไซเดอร์ในรูปแบบการผลิตแบคทีเรียน้ำส้มสายชูสำเร็จรูป โดยใช้แบคทีเรียน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* TISTR354 และ *Acetobacter pasteurianus* TISTR521 (Punyanunt et al., 2021) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกแบคทีเรียจากน้ำตาลเมาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพใน

การหมักน้ำส้มสายชู โดยจะช่วยให้ได้ปริมาณกรดสูงขึ้น หรือลดเวลาในการหมักลง สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นหัวเชื้อหรือลูกแป้ง นำไปผลิตเป็นน้ำส้มสายชูหมักหรือน้ำส้มโหนด และอาจจะสามารถต่อยอดสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกให้บริสุทธิ์

เก็บตัวอย่างน้ำตาลเมาจากตำบลบางขุนทอง อำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส จำนวน 5 ตัวอย่าง ซึ่งนำมาหมักต่อเป็นเวลา 1 เดือน แยกเชื้อโดยใช้อาหาร glucose yeast extract calcium carbonate agar (GYC agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วทำการแยกโคโลนีเดี่ยวที่มีการสร้างกรด ซึ่งให้วงใสรอบโคโลนี (ดัดแปลงจาก Thongluedee et al., 2019)

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้น และการทดสอบการสร้างกรดของเชื้อบนอาหาร GYC agar

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ มาย้อมสีแกรมและดูลักษณะการติดสี รูปร่าง และการจัดเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทดสอบปฏิกิริยา catalase และ oxidase และทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างกรด โดยปรับปริมาณเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland (ประมาณ $1.5x10^8$ cell/ml) จากนั้นหยดสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร GYC agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2 วัน ทำทั้งหมด 3 ซ้ำการทดลอง บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสและโคโลนี จากนั้นลบด้วยขนาดโคโลนี จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของผลต่างที่ได้ ทดสอบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของผลต่างของขนาดวงใสกับโคโลนีโดยโปรแกรม SPSS ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) (ดัดแปลงจาก Thongluedee et al., 2019)

3. การคัดเลือกหัวเชื้อจากความสามารถในการผลิตกรด

คัดเลือกเชื้อที่สร้างกรดบนอาหาร GYC ได้ดีที่สุด ซึ่งให้ผลต่างขนาดวงใสกับโคโลนีมากที่สุด จำนวน 5 ไอโซเลท มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นเช่นเดียวกับเชื้อแบคทีเรียอะซิติก (Acetobacteraceae) มาทดสอบความสามารถการผลิดกรด นำเชื้อแต่ละไอโซเลทเลี้ยงในอาหาร glucose ethanol yeast extract broth (GYE broth) เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-2 วัน ปรับค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.5 (ประมาณ 10^8 CFU/ml) จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท เชื้อผสมทั้ง 5 ไอโซเลท และหัวเชื้อตามธรรมชาติ (น้ำตาลเมาจากตำบลบางขุนทอง อำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส) ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม อย่างละร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว (GYE broth) ที่ปรับให้มีเอทานอลร้อยละ 5 เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างปริมาตร 10 ml เพื่อวัดปริมาณกรดอะซิติกด้วยการไทเทรต และวัดค่า pH เมื่อครบ 30 วัน ซึ่งการหาปริมาณกรดอะซิติก สามารถหาได้ดังสูตรต่อไปนี้

(ดัดแปลงจาก Chanthima et al., 2015)

ปริมาณกรดอะซิติก (g/100ml) = C x V x MW x 100/1,000x10

โดย C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน NaOH (mol/dm3)

V = ปริมาตร (ml) ของสารละลายมาตรฐาน NaOH ที่ไทเทรต

MW = น้ำหนักโมเลกุลของกรดอะซิติก (g)

ผลการวิจัย

1. การแยกเชื้อบริสุทธิ์

จากการนำตัวอย่างน้ำตาลเมาที่หมักเป็นระยะเวลา 1 เดือน มาทำการคัดแยกเชื้อบนอาหาร GYC agar พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท ลักษณะของโคโลนีเหมือนกันทุกไอโซเลท คือ สีขาวขุ่น ขอบเรียบผิวนูน และทึบแสง และสร้างวงใสเมื่อเจริญในอาหาร GYC agar ดังภาพที่ 1 (Figure 1)

Figure 1 Colonies isolated from palm wine on GYC agar, incubated at 30°C for 2 days.

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อในการสร้างวงใสบนอาหาร GYC agar

จากการวัดขนาดวงใสของเชื้อที่เจริญบนอาหาร GYC agar สามารถแยกไอโซเลทที่สร้างวงใสได้กว้างที่สุด 5 อันดับแรก จำนวน 5 ไอโซเลท คือ Ssv.14, Ssv.13, Ssv.17, Ssv.8, และ Ssv.20 ตามลำดับ ซึ่งเชื้อที่แยกได้ทั้ง 20 ไอโซเลท สามารถสร้างวงใสที่มีความกว้างตั้งแต่ 0.09±0.07-0.94±0.32 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 2 (Figure 2) และตารางที่ 1 (Table 1)

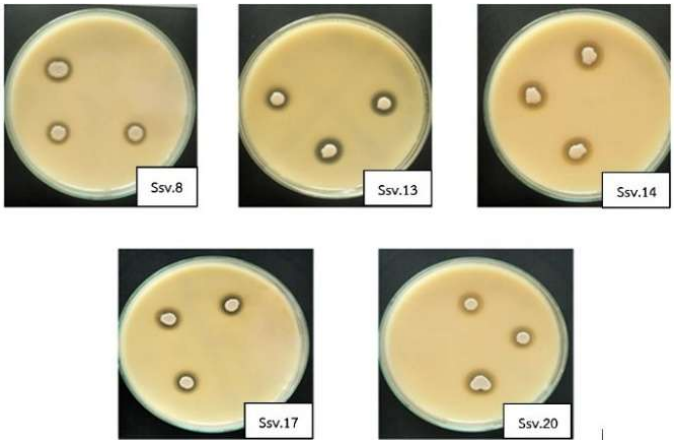

Figure 2 Clear zones produced by bacteria isolated from palm wine grown on GYC agar.

3. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้น

จากการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีเบื้องต้น พบว่าไอโซเลท Ssv.1, Ssv.4, Ssv.8, Ssv.10, Ssv.13, Ssv.14, Ssv.17, Ssv.19 และ Ssv.20 เชื้อติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น จัดเรียงตัวเป็นคู่ หรือเป็นสาย ดังภาพที่ 3 (Figure 3) เมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ผลของ catalase ให้ผลเป็นบวก (+) และ oxidase ให้ผลเป็นลบ (-)

Table 1 The difference between the diameter of the colony and the clear zone produced by isolates from palm wine grown on GYC agar and incubated at 30°C for 2 days.

Isolate	The difference between the diameter of the colony and the clear zone (mm.)
Ssv. 1	0.50 ± 0.40^{b}
Ssv. 2	0.31 ± 0.26^{b}
Ssv. 3	0.09 ± 0.07^{d}
Ssv. 4	0.26 ± 0.08^{b}
Ssv. 5	0.46 ± 0.11^{b}
Ssv. 6	0.51 ± 0.24^{b}
Ssv. 7	0.49 ± 0.10^{b}
Ssv. 8	0.61 ± 0.32^{b}
Ssv. 9	0.35 ± 0.13^{b}
Ssv. 10	0.25 ± 0.02^{b}
Ssv. 11	0.34 ± 0.09^{b}
Ssv. 12	0.23 ± 0.10^{c}
Ssv. 13	0.83 ± 0.37^{a}

Table 1 The difference between the diameter of the colony and the clear zone produced by isolates from palm wine grown on GYC agar and incubated at 30°C for 2 days. (cont)

Isolate	The difference between the diameter of the colony and the clear zone (mm.)
Ssv. 14	0.94±0.32[a]
Ssv. 15	0.16±0.12[c]
Ssv. 16	0.50±0.20[b]
Ssv. 17	0.81±0.06[a]
Ssv. 18	0.25±0.08[c]
Ssv. 19	0.13±0.05[d]
Ssv. 20	0.64±0.07[b]

Remark Means ± standard deviation followed different letters in the same column denote significant differences at the 95% confidence level ($p \leq 0.05$)

Figure 3 Shape and gram strain characteristics of the isolates from palm wine.

4. ผลการคัดเลือกหัวเชื้อจากความสามารถในการผลิตกรด

จากการไทเทรตเพื่อหาปริมาณกรดในตัวอย่างที่ทำการทดลอง เมื่อทำการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน พบว่าหัวเชื้อผสมให้ปริมาณกรดมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 15.3±0.46 w/v หัวเชื้อธรรมชาติจากน้ำตาลเมาให้ค่ารองลงมาเท่ากับร้อยละ 8.76±2.33 w/v ซึ่งหัวเชื้อทั้งสองสามารถผลิตกรดได้สูงกว่าน้ำส้มสายชูกลั่นที่จำหน่ายตามท้องตลาดที่วัดได้ร้อยละ 5.00±0.54 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) สำหรับหัวเชื้อบริสุทธิ์พบว่าสร้างกรดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.06±0.08-0.13±0.04 w/v และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) สำหรับค่า pH พบว่าหัวเชื้อผสมให้ค่า pH เท่ากับ 3 หัวเชื้อธรรมชาติ และน้ำส้มสายชูกลั่นร้อยละ 5 ให้ค่า pH เท่ากับ 4 ขณะที่หัวเชื้อบริสุทธิ์ pH เท่ากับ 8 ดังตารางที่ 2 (Table 2)

Table 2 pH and the amount of acid produced by pure inoculum, mixed inoculum, and natural inoculum (control) after 30 days of fermentation.

Samples	The amount of acid (% w/v)	pH
Ssv.08	0.13±0.04[d]	8±0
Ssv.13	0.08±0.08[d]	8±0
Ssv.14	0.13±0.04[d]	8±0
Ssv.17	0.08±0.08[d]	8±0
Ssv.20	0.06±0.08[d]	8±0
mixed inoculum	15.3±0.46[a]	3±0
natural inoculum	8.76±2.33[b]	4±0
vinegar	5.00±0.54[c]	4±0

Remark Means ± standard deviation followed different letters in the same column denote significant differences at the 95% confidence level ($p \leq 0.05$).

อภิปรายผล

จากการนำตัวอย่างน้ำตาลเมาหมักมาทำการคัดแยกเชื้อบนอาหาร GYC agar สามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท ลักษณะของโคโลนีเหมือนกันทุกไอโซเลท คือ สีขาวขุ่น ขอบเรียบผิวนูนและทึบแสง และสร้างวงใสเมื่อเจริญในอาหาร GYC agar ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Artnarong และ Maneesri (2015) ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติกจากเส้นใยผลตาลโตนดสุก โดยใช้อาหาร GYC agar เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติก ตรวจพบแบคทีเรียที่ผลิตกรดจำนวน 250 ไอโซเลทที่สร้างโซนใสรอบโคโลนี อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ได้ใช้อาหารกลุ่ม enrichment เพิ่มจำนวนแบคทีเรียก่อนการทดสอบการสร้างกรดด้วย GYC agar ดังนั้นหากมีการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียจากตัวอย่างด้วย อาหารกลุ่ม enrichment อาจทำให้ได้สายพันธุ์ที่หลากหลายมากขึ้น

จากการหาค่าผลต่างของขนาดวงใสกับโคโลนีโดยเฉลี่ยที่เจริญบนอาหาร GYC agar สามารถแยกไอโซเลทที่สร้างกรดได้มากที่สุด 5 อันดับแรก จำนวน 5 ไอโซเลท คือ Ssv.14, Ssv.13, Ssv.17, Ssv.8, และ Ssv.20 ตามลำดับ ซึ่ง 5 ไอโซเลทนี้ ไอโซเลท Ssv.13 และ Ssv.14 ผลต่างของขนาดวงใสกับโคโลนีแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับไอโซเลทที่ Ssv.8, Ssv.17 และ Ssv.20 นอกจากนี้ยังพบว่าทั้ง 5 ไอโซเลท เป็นเชื้อติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น จัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสาย ผลของ catalase ให้ผลเป็นบวก (+) และ oxidase ให้ผลเป็นลบ (-) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของเชื้อจีนัส *Acetobacter* และ *Gluconobacter* (Phutubtim & Saejun, 2016) จึงมีความเป็นไปได้สูงว่าไอโซเลทที่แยกได้จะอยู่ในจีนัสดังกล่าว ซึ่งสายพันธุ์ของเชื้อทั้งสองจีนัสนี้นิยมนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตกรดอะซิติก ได้แก่ *Acetobacter aceti*,

Acetobacter malorum, Acetobacter cerevisiae, Gluconobacter oxydans (Gomes et al., 2018) ในการจำแนกชนิดของเชื้อในระดับสปีชีส์ สามารถจำแนกตามลักษณะเฉพาะทางชีวเคมีของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ และปัจจุบันนิยมตรวจสอบโดยใช้วิธีทางพันธุศาสตร์โมเลกุล โดยอาศัยการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจง เช่น ยีน D1/D2 บน 26S rDNA (Artnarong & Maneesri, 2015) จากการหาปริมาณกรดในตัวอย่างที่ทำการทดลอง เมื่อทำการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน พบว่าหัวเชื้อผสมให้ค่าปริมาณกรดมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 15.3±0.46 w/v หัวเชื้อธรรมชาติจากน้ำตาลเมาให้ค่าปริมาณกรดรองลงมาเท่ากับร้อยละ 8.76±2.33 w/v ซึ่งหัวเชื้อทั้งสองสามารถผลิตกรดได้สูงกว่าน้ำส้มสายชูกลั่นที่จำหน่ายตามท้องตลาดที่วัดได้ร้อยละ 5.00±0.54 w/v และค่ามาตรฐานขั้นต่ำของน้ำส้มสายชูที่ร้อยละ 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) หัวเชื้อบริสุทธิ์พบว่าสร้างกรดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.06±0.08-0.13±0.04 w/v และแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ซึ่งต่ำกว่าค่ามาตรฐานขั้นต่ำของน้ำส้มสายชูที่ร้อยละ 4 สำหรับค่า pH พบว่าหัวเชื้อผสมให้ค่า pH เท่ากับ 3 และหัวเชื้อธรรมชาติ และน้ำส้มสายชูกลั่นให้ค่า pH เท่ากับ 4 ซึ่งอยู่ในช่วงมาตรฐานของน้ำส้มสายชู ขณะที่หัวเชื้อบริสุทธิ์ pH เท่ากับ 8 สูงกว่าค่ามาตรฐานของน้ำส้มสายชู ซึ่งให้ผลที่แตกต่างกับรายงานของ Artnarong & Maneesri (2015) ซึ่งทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่แยกได้จากเส้นใยผลตาลโตนดสุกในการผลิตกรดอะซิติก โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว GYE broth ที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 และร้อยละ 8 เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30°C พบว่าการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกในอาหารที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้เร็วที่สุด 4.00-4.35 g/100ml ภายในระยะเวลา 35 วัน และใช้เชื้อบริสุทธิ์เพียงเชื้อเดียวเป็นหัวเชื้อ สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงสุด 5.64±0.18 g/100 ml เมื่อผ่านไป 55 วัน จะเห็นได้ว่าในการทดลองนี้ หัวเชื้อชนิดเดี่ยวสร้างกรดได้ต่ำกว่า อย่างไรก็ตามการใช้หัวเชื้อผสมสามารถสร้างกรดได้สูงถึงร้อยละ 15.3±0.46 w/v ดังนั้นการใช้หัวเชื้อผสมที่ผ่านกระบวนการคัดเลือกในการสร้างกรดอย่างมีประสิทธิภาพเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าจะช่วยให้การผลิตน้ำส้มสายชูมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยสามารถสร้างกรดได้สูงกว่าการใช้หัวเชื้อตามธรรมชาติในเวลาเท่ากันที่ 30 วัน จากปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมดที่มีปริมาณสูง เป็นไปได้ว่าการเกิดกรดอะซิติกจะเร็วกว่า 30 วัน สอดคล้องกับการศึกษากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำตาลสดของ Khaing (2020) พบว่าในการหมักน้ำส้มสายชูโดยใช้หัวเชื้อจากธรรมชาติเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ร้อยละของกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 1-5 จากนั้นคงที่ในสัปดาห์ที่ 6 คือ 3.02, 5.80, 11.20, 17.81, 23.65 และ 23.65 w/v ตามลำดับ ทั้งนี้ส้มสายชูหมักโดยทั่วไปมักจะพบกรดอินทรีย์หลายชนิด ซึ่งพบปริมาณกรดอะซิติกมากที่สุด เมื่อเทียบกับกรดอินทรีย์ทั้งหมดที่พบ รองลงมาเป็นกรดชนิดอื่นอีกเล็กน้อย ได้แก่ ซิตริก มาลิก และแลคติกตามลำดับ จากการศึกษานี้ปริมาณกรดอินทรีย์ที่รายงานทำให้ทราบถึงแนวโน้มการสร้างกรดอะซิติกของเชื้อที่คัดเลือกได้ อย่างไรก็ตามเพื่อให้ทราบถึงปริมาณและชนิดของ

กรดอินทรีย์จากการหมักที่ถูกต้องแม่นยำ จำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ผ่านวิธี gas chromatography ต่อไป (Garcia-Parrilla et al., 2017) น้ำส้มโหนดนี้นอกจากจะนำมาใช้ประกอบอาหารพื้นบ้านทางภาคใต้แล้ว ยังสามารถนำไปใช้ในอาหารชนิดอื่น เช่น เป็นส่วนผสมของน้ำสลัด และผสมกับข้าวทำเป็นซูชิ เป็นต้น และสามารถนำมาดื่มเป็นเครื่องดื่มเสริมสุขภาพ ซึ่งช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ต้านเชื้อก่อโรค และต้านอนุมูลอิสระ เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ เช่น กรดอินทรีย์ ทริปโตฟอล และโพลีฟีนอล เมลาโนดินส์ และลิกัสตราซีน ซึ่งมีคุณประโยชน์ทางเภสัชวิทยาและช่วยในการเผาผลาญของร่างกาย (Perumpuli & Dilrukshi, 2022) ดังนั้นในการพัฒนาการผลิต สำหรับหัวเชื้อผสมควรศึกษาระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมที่จะได้กรดอะซิติกตามมาตรฐานร้อยละ 4 ซึ่งอาจจะใช้เวลาน้อยกว่า 30 วัน สามารถนำหัวเชื้อผสมไปผลิตเป็นลูกแป้ง และทดลองนำไปผลิตเป็นน้ำส้มสายชูหรือน้ำส้มโหนดต่อไป

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยสามารถคัดเลือกเชื้อจากน้ำตาลเมาที่สามารถสร้างกรดได้ จำนวน 20 ไอโซเลท และไอโซเลทที่สร้างกรดได้ดีที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ Ssv.14, Ssv.13, Ssv.17, Ssv.8, และ Ssv.20 ตามลำดับ ทั้ง 5 ไอโซเลทมีหลายลักษณะที่สอดคล้องกับลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียในกลุ่ม *Acetobacter* และ *Gluconobacter* และพบว่าเชื้อผสม 5 ไอโซเลทนี้ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชูได้ โดยสามารถสร้างกรดได้มากกว่าในปริมาณใกล้เคียง 2 เท่า เมื่อเทียบกับใช้หัวเชื้อตามธรรมชาติที่ใช้เวลาหมัก 30 วันเท่ากัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่อนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Artnarong S, Maneesri C. Isolation of yeasts and acetic acid bacteria from vinegar of palmyra palm fruit pulp (*Borassus flabellifer*) for salad dressing product. Master of Food Science and Nutrition, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkhla University; 2015.

Chanthima N, Tantong S, Srisuworamas B. Production and qualification analysis of vinegar from banana. Science and Technology Nakhon Sawan Rajabhat University Journal 2015;7(7):57-76.

Garcia-Parrilla MC, Torija MJ, Mas A, Cerezo AB, Troncoso AM. “Chapter 25: Vinegars and other fermented condiments”, In fermented foods in health and disease prevention, Edited by Frias J, Martinez-Villaluenga C, & Peñas E, Academic Press; 2017.

Gomes RJ, Borges MD, Rosa MF, Castro-Gómez RJH, Spinosa WA. Acetic acid bacteria in the food industry: Systematics, characteristics and applications. Food Technology and Biotechnology 2018;56(2):139-151.

Khadka N, Acharya DR, Dangal A, et al. Study on the changes during the fermentation of the wine prepared from palm (*Phoenix sylvestris*) sap. Heliyon 2024;10(15):e35799.

Khaing NN. Preparation and characterization of toddy palm wine and vinegar. University of Mandalay, Research Journal, 2020;11:213-220.

Perumpuli P, Dilrukshi DMN. Vinegar: A functional ingredient for human health. International Food Research Journal 2022;29(5):959-974.

Phutubtim N, Saejun W. Selection of lactic acid bacteria and using as a starter culture in Thai Traditional Fermented Fish (Pla-som). Thammasat Journal of Science and Technology 2016;24(6):952-967.

Punyanunt S, Chalermsanyakorn W, Phadungath C, MeunSritharam L. Development of instant acetic acid bacteria model for pineapple cider production. King Mongkut's Agricultural Journal 2021;39(2):141-147.

Saha D, Kumar DP. "Perspective Chapter: Bioconversion of Agricultural and Food Wastes to Vinegar", In Functional Food – Upgrading Natural and Synthetic Sources, Edited by Novo BA, Campos J, & Vilela A. IntechOpen; 2024.

Sengun I, Karabiyikli S. Importance of acetic acid bacteria in food industry. Food Control 2011;22:647-656.

Sirirak P. Whag, from palm juice to be palm wine, 2012. Available at https://www.gotoknow.org/posts/373108 Accessed November 1, 2024.

Wongsudalak W, Nunieam T. Development of fermented vinegar from tangerine peels and pomaces. SUD Research Journal Sciences and Technology 2013;6(1):159-170.