P-ISSN 2586-9000
E-ISSN 2586-9027

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj
ปีที่ 30 ฉบับที่ 2 (มีนาคม-เมษายน 2565) หน้า [33-56]

การผลิตน้ำส้มสายชูจากฟักข้าวโดยใช้แบคทีเรีย *Acetobacter* sp. ต่างสายพันธุ์

Vinegar Production from Gac Fruit (*Momordica cochinchinensis* [Lour.] Spreng.) Using Different Strains of *Acetobacter* sp.

อรอนงค์ ไชยเชษฐ[1,*], น้ำฝน สายคำ[2], ลัดดา กลางประพันธ์[2]

[1]*สาขาวิชาชีววิทยา สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม มหาสารคาม 44000*

[2]*สาขาวิชาชีววิทยา คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม มหาสารคาม 44000*

Orn anong Chaiyachet[1,*], Namfon Saikum[2], Ludda Klangpraphan[2]

[1]*Division of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Maha Sarakham University, Maha Sarakham 44000*

[2]*Division of Biology, Faculty of Education, Rajabhat Maha Sarakham University, Maha Sarakham 44000*

Received 23 August 2021; Received in revised from 12 November 2021; Accepted 18 November 2021

บทคัดย่อ

ฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis* [Lour.] Spreng.) ผักผลไม้พื้นบ้านที่นิยมรับประทานผลเป็นพืชสมุนไพรได้รับความสนใจเนื่องจากการศึกษาทางการแพทย์ที่พบส่วนต่างๆ ของผลฟักข้าวมีสรรพคุณเด่นของสารต้านอนุมูลอิสระในเนื้อผลและเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวที่มีไลโคพีน ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในปริมาณสูง การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำฟักข้าวโดยใช้แบคทีเรียกรดอะซิติก 3 สายพันธุ์ ผลิตน้ำส้มสายชูด้วยการหมัก 2 ขั้นตอน กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ โดยปรับปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในน้ำฟักข้าว 20 องศาบริกซ์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5-4.6 ใช้หัวเชื้อยีสต์ทางการค้าสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ร้อยละ 5 บ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 วัน เมื่อสิ้นสุดการหมักแอลกอฮอล์ไวน์ฟักข้าวที่ได้มีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 9.67±0.58 (โดยปริมาตร) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 7.00±0.00 องศาบริกซ์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.06±0.00 ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดอะซิติก นำไวน์ฟักข้าวมาทำการหมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกต่างสายพันธุ์ *Acetobacter aceti* TISTR 354, *Acetobacter pasteurianus*

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** ornanong.ch@rmu.ac.th

doi: 10.14456/tstj.2022.20

TISTR 102 และ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 ปรับปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นร้อยละ 7 (โดยปริมาตร) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 7 องศาบริกซ์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.25 บ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 30 วัน ผลการวิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมีกายภาพของน้ำส้มสายชูหมักจากฟักข้าวด้วยแบคทีเรียกรดอะซิติก 3 สายพันธุ์ พบปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดในน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตด้วยสายพันธุ์ TISTR 102 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของปริมาณกรดอะซิติกระหว่างสายพันธุ์ TISTR 102 และ TISTR 354 ($p>0.05$) แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตโดย TISTR 1011 กับแบคทีเรียกรดอะซิติกอีก 2 สายพันธุ์ ($p<0.05$) ปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ TISTR 102, TISTR 354 และ TISTR 1011 มีค่าร้อยละ 3.50±0.07, 3.48±0.09 และ 2.27±0.04 ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับผลการศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดระหว่าง TISTR 102 และ TISTR 354 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) แต่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในน้ำส้มสายชูฟักข้าวระหว่าง TISTR 1011 กับแบคทีเรียกรดอะซิติกอีก 2 สายพันธุ์ ($p<0.05$) โดยปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำส้มสายชูผลิตด้วย TISTR 102, TISTR 354 และ TISTR 1011 มีค่าร้อยละ 0.47±0.06, 0.50±0.10 และ 1.10±0.17 ตามลำดับ และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่า (องศาบริกซ์) 11.00±0.00, 11.33±0.58 และ 10.00±0.00 ตามลำดับ และยังพบความแตกต่างของค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำส้มสายชูที่หมักโดย TISTR 102 และ TISTR 1011 กับ TISTR 354 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำส้มสายชูฟักข้าวที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ TISTR 102, TISTR 354 และ TISTR 1011 มีค่า 3.64±0.03, 3.69±0.01 และ 3.65±0.01 ตามลำดับ ผลการวัดค่าสี CIELAB ไม่พบความแตกต่างของค่าสี L* ระหว่างแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ($p>0.05$) ขณะที่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในค่าสี a* และค่าสี b* ระหว่าง TISTR 1011 และแบคทีเรียกรดอะซิติกอีก 2 สายพันธุ์ ($p<0.05$) การประเมินทางประสาทสัมผัสของน้ำส้มสายชูฟักข้าวโดยใช้แบบทดสอบ 9-point Hedonic scale พบว่าน้ำส้มสายชูฟักข้าวหมักด้วยแบคทีเรียกรดอะซิติก 3 สายพันธุ์ มีคะแนนการยอมรับด้าน กลิ่น สี รสชาติ ลักษณะปรากฏ และความชอบรวมไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) การนำฟักข้าวมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตน้ำส้มสายชูเป็นแนวทางในการส่งเสริมการใช้พืชสมุนไพรพื้นบ้านเพื่อแปรรูปผลิตภัณฑ์และเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตร

คำสำคัญ: น้ำส้มสายชูฟักข้าว; ฟักข้าว; *Momordica cochinchinensis* [Lour.] Spreng.; แบคทีเรียกรดอะซิติก

Abstract

Gac (*Momordica cochinchinensis* [Lour.] Spreng.), a local fruit/vegetable, and its fruit is the favorite part of eating. Increasing interest in Gac has gained more as a medicinal plant due to several medical studies revealing each part of Gac fruit had remarkable properties for its high antioxidant contents. Pulp and aril of Gac fruit contain high levels of lycopene, flavonoid, and total phenolic contents. This study aims to investigate the vinegar production from Gac fruit juice using three different strains of acetic acid bacteria. Vinegar production fermented with two different stages. Alcoholic fermentation was conducted by adjusting total soluble solids of Gac fruit juice to 20 °Brix and pH 4.5-4-6 and 5% of inoculum size by a commercial *Saccharomyces cerevisiae* strain. The

alcoholic fermentation was incubated under static conditions at 30°C for 15 days. After the end of the alcoholic fermentation, obtained Gac wine had an alcohol content of 9.67±0.58% (by volume), total soluble solids content 7.00±0.00 °Brix, and pH was 4.06±0.00. Acetous fermentation, the Gac wine was fermented with a different strain of acetic acid bacteria; *Acetobacter aceti* TISTR 354, *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102, and *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011. The condition was adjusted the initial alcohol content 7% (by volume), the inoculum sizes starter culture of 10% (by volume), total soluble solids content 7 °Brix, and pH 4.25 under static incubation at room temperature (30±1°C) for 30 days. The results for the physicochemical analysis of Gac vinegar using three different strains of acetic acid bacteria showed the highest acetic acid content in Gac vinegar produced by TISTR 102. No statistical difference was observed for the acetic acid content between vinegar produced by the bacterial strains of TISTR 102 and TISTR 354 ($p>0.05$). There were found statistical differences of the acetic acid content produced by TISTR 1011 with the two other strains of acetic acid bacteria ($p<0.05$). The acetic acid content produced by TISTR 102, TISTR 354, and TISTR 1011 were 3.50±0.07, 3.48±0.09, and 2.27±0.04 (% by volume), respectively. Similarly, there was no statistically significant difference in alcohol content and total soluble solids between TISTR 102 and TISTR 354 ($p>0.05$). And there were found statistically significant differences in the alcohol content and total soluble solids content of Gac vinegar between TISTR 1011 and the two others of acetic acid bacteria ($p<0.05$). The alcohol content in vinegar produced by TISTR 102, TISTR 354, and TISTR 1011 were 0.47±0.06, 0.50±0.10 and 1.10±0.17 (% by volume), respectively, and total soluble solids were 11.00±0.00, 11.33±0.58, and 10.00±0.00 °Brix, respectively. The pH values of vinegar fermented by three different strains of acetic acid bacteria found statistically significant differences between TISTR 354 and the two other strains of acetic acid bacteria ($p<0.05$). The pH values of Gac vinegar produced by bacterial strains TISTR 102, TISTR 354, and TISTR 1011 were 3.64±0.03, 3.69±0.01, and 3.65±0.01, respectively. The results of CIELAB colorimetric measurement revealed no difference in color values L* between the three bacterial strains ($p>0.05$). Significant differences in a* and b* values were detected between TISTR 1011 and the two other strains of acetic acid bacteria ($p<0.05$). Sensory evaluation using a 9-point Hedonic scale was no statistically significant difference found between the acceptance scores of odors, color, flavor, appearance, and overall liking to the Gac vinegar produced by the different acetic acid bacteria ($p>0.05$). The utilization of Gac fruit as a raw material for vinegar production is an approach to promoting the applications of local medicinal plants to process products and value-added agricultural products.

Keywords: Gac vinegar; Gac fruit; *Momordica cochinchinensis* [Lour.] Spreng.; Acetic acid bacteria

1. บทนำ

น้ำส้มสายชูหมัก คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำธัญพืช ผลไม้ หรือน้ำตาล มาหมักกับส่าเหล้าแล้วหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีธรรมชาติ การผลิตน้ำส้มสายชูมีกระบวนการหมัก 2 ขั้นตอน ขั้นแรกคือการหมักแอลกอฮอล์ (alcoholic fermentation) เป็นการเปลี่ยนน้ำตาลที่สามารถทำการหมักได้ไปเป็นเอทานอลโดยยีสต์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้โดยทั่วไปคือ *Saccharomyces* และขั้นที่สองคือการหมักกรดอะซิติก (acetic acid fermentation) เป็นการออกซิเดชันเอทานอลโดยแบคทีเรียในสกุล *Acetobacter* ในภาวะที่มีออกซิเจน แบคทีเรียผลิตน้ำส้มสายชูหรือแบคทีเรียกรดอะซิติก (acetic acid bacteria) สามารถออกซิไดซ์เอทานอลได้ผลิตภัณฑ์จากการหมักที่สำคัญ คือ กรดอะซิติก การหมักเป็นกระบวนการสำคัญในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากผลไม้ ทำให้ได้สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย สารโพลีฟีนอล และกรดอินทรีย์ โดยเกิดจากกิจกรรมการทำงานและเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก สำหรับการหมักแอลกอฮอล์ ปริมาณน้ำตาลหรือปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (องศาบริกซ์) จะกำหนดระดับของแอลกอฮอล์ที่ได้รับซึ่งขึ้นอยู่กับผลไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก รวมทั้งระยะเวลาในการหมักยังมาจากชนิดผลไม้ที่ใช้ ระดับน้ำตาลในผลไม้ วิธีการที่แตกต่างกันในการเตรียมน้ำผลไม้จากวัตถุดิบส่งผลต่อคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ตลอดจนคุณภาพของน้ำส้มสายชูซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย รวมทั้งพารามิเตอร์สำคัญที่มีผลต่อการหมักแอลกอฮอล์ ได้แก่ ปริมาณของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของน้ำตาล อุณหภูมิในการหมัก องค์ประกอบของซับสเตรท และค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อน้ำตาลถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลแล้วการหมักขั้นต่อไปคือการทำให้เกิดน้ำส้มสายชูด้วยการหมักกรดอะซิติกซึ่งเป็นการออกซิเดชันแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ไปเป็นกรดอะซิติกต่อไป [1-7] น้ำส้มสายชูที่หมักได้มีกลิ่นหอมตามธรรมชาติของกลิ่นตามวัตถุดิบและปริมาณกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่าร้อยละ 4 นิยมนำน้ำส้มสายชูหมักไปเป็นเครื่องดื่มผสมน้ำผึ้งและน้ำอุ่นเพื่อสุขภาพ ทำให้ระบบย่อยอาหารดีขึ้น มีประโยชน์ต่อสุขภาพ จึงจัดเป็นอาหารในกลุ่มผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ คุณสมบัติของน้ำส้มสายชูหมักจะมีสีเหลืองอ่อนตามธรรมชาติ มีรสหวานของน้ำตาลที่ตกค้าง มีกลิ่นของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก ความแตกต่างในด้านกลิ่นรส และความเข้มข้นขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก [8] และจากความนิยมในกลุ่มผู้บริโภคผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติเพื่อสุขภาพ ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการนำผลผลิตทางการเกษตรประเภทผักและผลไม้มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำส้มสายชูอย่างกว้างขวาง โดยทั้งในยุโรป สหรัฐอเมริกา ตะวันออกกลาง เอเชีย รวมทั้งในประเทศไทย ก็ได้มีการศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูจากผลผลิตทางการเกษตรอย่างหลากหลาย เช่น มอลต์ ข้าวบาร์เลย์ แอปเปิ้ล องุ่น เชอรี่และผลไม้ในตระกูลเบอรี่ และอินทผลัม [6, 9-11] หรือแม้กระทั่ง ข้าว น้ำตาลโตนด หอมหัวใหญ่ มะเขือเทศ อ้อย มะพร้าว มะม่วง ลูกหม่อน ส้ม กล้วย มะขาม สับปะรด และมะม่วงหิมพานต์ เป็นต้น [7, 12-19] ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นรสและคุณลักษณะเฉพาะของน้ำส้มสายชู ปริมาณกรดอะซิติก แอลกอฮอล์ที่หลงเหลือ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และค่าความเป็นกรด-ด่าง แตกต่างกันตามวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต

ฟักข้าว หรือ Gac (*Momordica cochinchinensis* [Lour.] Spreng.) มีถิ่นกำเนิดตั้งแต่ในประเทศจีนตอนใต้ พม่า ไทย ลาว เขมร เวียดนาม มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ และบังกลาเทศ โดยจัดเป็นพรรณไม้ล้มลุกเป็นไม้เถาเลื้อย ผลของฟักข้าวรวมถึงเนื้อเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีแดงสดมีคุณค่าทางโภชนาสูง ประกอบด้วยเบตาแคโรทีนและไลโคปีนสูงกว่าแครอทและมะเขือเทศ และกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง รวมทั้งมีวิตามินอี สารประกอบโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ [20-22] ผลของฟักข้าวสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วนทั้งในส่วนเยื่อหุ้มเมล็ด เมล็ดฟักข้าว เนื้อผล และเปลือกหรือส่วนผิวของฟักข้าว โดย

ผ่านการแปรรูปไปเป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบผง และผลิตภัณฑ์น้ำมันแคปซูล ในปัจจุบันฟักข้าวเป็นพืชสมุนไพรที่มีการศึกษาวิจัยพบว่าการบริโภคเยื่อหุ้มเมล็ดของผลสุกมีประโยชน์ต่อร่างกายมากมาย ในการช่วยเสริมภูมิคุ้มกันให้ร่างกาย มีส่วนช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ฤทธิ์ยับยั้งเนื้องอกและมะเร็ง ดังนั้นในเชิงพาณิชย์จึงมีการนำเยื่อฟักข้าวมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิด เพื่อทำให้เกิดความสะดวกต่อการบริโภค เยื่อหุ้มเมล็ดของฟักข้าว มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีจากการมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพปริมาณสูงซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงได้มีการนำผลฟักข้าวมาใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านอุตสาหกรรมเกี่ยวกับยา เครื่องสำอาง และอาหาร ในรูปของผลิตภัณฑ์ฟักข้าวเข้มข้น สารสกัดแบบผง แคปซูลน้ำมันฟักข้าว เครื่องดื่มน้ำฟักข้าว ที่มีจำหน่ายทั้งในประเทศเวียดนาม จีน และไทย [23-27] จากประโยชน์ของฟักข้าวที่กล่าวมาข้างต้น และการแปรรูปเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ทางเลือกมากขึ้น จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำมาผลิตน้ำส้มสายชูด้วยแบคทีเรียกรดอะซิติก ซึ่งเป็นการแปรรูปพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีประโยชน์มากมายอย่างฟักข้าวให้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่หลากหลายเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตร และเป็นการส่งเสริมทางการเกษตรกรรมให้มีการเพาะปลูกฟักข้าวมากยิ่งขึ้น อีกทั้งน้ำส้มสายชูหมักยังมีประโยชน์ต่อร่างกายในหลายด้าน อาทิเช่น ต้านแบคทีเรีย ต้านการติดเชื้อ ต้านออกซิเดชัน ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ควบคุมการเผาผลาญไขมัน ช่วยในการลดน้ำหนัก และกิจกรรมต้านมะเร็ง ความสามารถในการทำงานทางสรีรวิทยาเหล่านี้ของน้ำส้มสายชูมาจากการพบกรดอินทรีย์ โพลีฟีนอลและ melanoidins ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำส้มสายชู ซึ่งเกิดจากวัตถุดิบและกระบวนการหมัก และการควบคุมกลูโคสในเลือด เมแทบอลิซึมของลิปิด และควบคุมน้ำหนัก มาจากกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชู [28]

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำคั้นเนื้อผลและเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวโดยใช้แบคทีเรียกรดอะซิติก 3 สายพันธุ์ *A. aceti* TISTR 354, *A. pasteurianus* TISTR 102 และ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 วิเคราะห์คุณลักษณะทางทางเคมีกายภาพ และทางประสาทสัมผัสของน้ำส้มสายชูฟักข้าว สำหรับเป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์จากฟักข้าวซึ่งเป็นการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตรโดยใช้ความรู้ทางเทคโนโลยีชีวภาพในการเพิ่มมูลค่าพืชสมุนไพรพื้นบ้านสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูฟักข้าว

2. วิธีการศึกษา

2.1 การเตรียมน้ำฟักข้าว

ฟักข้าวที่ใช้ในการศึกษาได้มาจากเกษตรกรในจังหวัดมหาสารคามเป็นฟักข้าวสายพันธุ์ไทย (พันธุ์ผลรี) เก็บตัวอย่างผลฟักข้าวสุกเดือนสิงหาคม 2563 ในระยะพัฒนาการของผลสุกเต็มที่ อายุระหว่าง 140–150 วัน มีลักษณะเปลือกผิวด้านนอกสีแดงทั้งผล เปลือกชั้นในหรือเนื้อผลสีส้ม เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีแดง นำผลสุกฟักข้าวที่ได้มาล้างให้สะอาดแล้วแยกเปลือกออกจากส่วนเนื้อผ่าครึ่ง ใช้ช้อนคว้านเมล็ดทั้งหมดแยกออกจากส่วนเนื้อผลฟักข้าว นำเมล็ดฟักข้าวมาห่อด้วยผ้าขาวบางคั้นเอาเยื่อหุ้มเมล็ดแยกออกจากเมล็ดฟักข้าว กรองแยกเมล็ดออกจากเยื่อหุ้มจะได้เฉพาะส่วนเยื่อหุ้มเมล็ด เตรียมน้ำฟักข้าวโดยใช้เนื้อผลฟักข้าวและเยื่อหุ้มเมล็ดจำนวน 10 กิโลกรัม คั้นน้ำจากเนื้อผลและเยื่อหุ้มเมล็ดกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำน้ำฟักข้าวเข้มข้นผสมน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรโดยปริมาตร)

2.2 การผลิตแอลกอฮอล์จากน้ำฟักข้าว

นำน้ำฟักข้าวที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 มาวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดและค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น โดยพบมีค่าเท่ากับ 15.62 องศาบริกซ์ และ 6.63 จากนั้นทำการปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของน้ำฟักข้าวเท่ากับ 20 องศาบริกซ์ โดยใช้น้ำตาลทรายขาว และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 4.5–4.6 โดยใช้กรดอะซิติก เพื่อให้มีสภาวะที่เหมาะสม

ต่อการทำงานของยีสต์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดหรือปริมาณน้ำตาลคือซับสเตรทที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้างพลังงานในการเจริญเติบโตให้กับเซลล์ยีสต์จึงต้องปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดให้เพียงพอ และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยยีสต์สามารถเจริญได้ในช่วงของค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5-5 ซึ่งจำเป็นต่อการผลิตแอลกอฮอล์ให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการในผลิตภัณฑ์ไวน์เมื่อสิ้นสุดการหมัก แล้วทำการฆ่าเชื้อโดยเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ (potassium metabisulfite, KMS) ปริมาณ 0.2 กรัมต่อลิตร และพักน้ำฟักข้าวไว้ไม่ต่ำกว่า 12 ชั่วโมง ก่อนเติมหัวเชื้อยีสต์เพื่อไม่ให้ซัลไฟต์ที่ระเหยออกมาทำลายยีสต์ แบ่งน้ำฟักข้าวปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากน้ำฟักข้าวที่เตรียมสำหรับหมักแอลกอฮอล์ปริมาตร 10 ลิตร เติมลงในฟลาสก์ที่ฆ่าเชื้อ ในการศึกษานี้ใช้ยีสต์ผงทางการค้า (LALVIN EC 1118®, LALLEMAND Inc.) สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ได้จากตลาดในจังหวัดมหาสารคาม โดยเติมผงเชื้อยีสต์ปริมาณ 0.25 กรัม ต่อ 500 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับหมักแอลกอฮอล์ ปิดฟลาสก์ด้วยจุกสำลี บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อยีสต์ปริมาณร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) ลงในน้ำฟักข้าวส่วนที่เหลือจากการเตรียม ปิดฝาที่ต่อท่อสายยางหนึ่งด้านลงในถังหมัก และอีกด้านลงในถังที่บรรจุน้ำ เพื่อให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สามารถระเหยออกได้ หมักแอลกอฮอล์ ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างไวน์ฟักข้าวในวันที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 เพื่อวัดปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้ vinometer วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solids; TSS) โดยใช้ hand refractometer และวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย pH meter เมื่อหมักไวน์ครบ 15 วัน ทำการแยกเอาเฉพาะส่วนใสลงในขวดปลอดเชื้อใหม่ จากนั้นพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อนำไปหมักกรดอะซิติกในลำดับต่อไป

2.3 การผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ฟักข้าว

การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก (แบคทีเรีย *Acetobacter aceti* TISTR 354, *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102 และ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 ที่ใช้ในการศึกษา ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย คลองหลวง ปทุมธานี) โดยถ่ายเชื้อ *A. aceti* TISTR 345, *A. pasteurianus* TISTR 102 และ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 จำนวน 1 ลูป ตามลำดับ จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract agar (กลูโคส 100 กรัม, yeast extract 10 กรัม, $CaCO_3$ 10 กรัม, agar 20 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast broth (กลูโคส 100 กรัม, yeast extract 10 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงโดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ค่าเท่ากับ 0.5 ก่อนการถ่ายเชื้อลงในน้ำฟักข้าวในการทดลองขั้นต่อไป

การเตรียมหัวเชื้อ ถ่ายเชื้อ *A. aceti* TISTR 345, *A. pasteurianus* TISTR 102 และ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 จากหลอดอาหารเหลว glucose yeast broth เชื้อละ 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำฟักข้าวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้จากขั้นตอนการเตรียมน้ำฟักข้าวซึ่งผ่านการปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 7 องศาบริกซ์ และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.25 โดยใช้กรดอะซิติก ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เมื่อผ่านกระบวนการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ส่งผลให้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดและค่าความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์ไวน์ฟักข้าวมีค่าลดลง ในขั้นตอนการหมักเพื่อให้ได้กรดอะซิติกนี้จึงมีการปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดและปรับค่าความ

เป็นกรด-ด่างในน้ำฟักข้าวสำหรับเตรียมหัวเชื้อเพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียกรดอะซิติก หลังจากเติมเชื้อลงในน้ำฟักข้าว นำฟลาสก์หัวเชื้อไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำไวน์น้ำฟักข้าวมาปรับปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับร้อยละ 7 โดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.25 โดยใช้กรดอะซิติก จากนั้นถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกลงในไวน์น้ำฟักข้าว โดยเติมหัวเชื้อร้อยละ 10 (ปริมาตรโดยปริมาตร) OD_{600}=0.5 ของแบคทีเรียกรดอะซิติกที่ใช้ในการทดลองแต่ละสายพันธุ์ (TISTR 345, TISTR 102 และ TISTR 1011) ลงในไวน์น้ำฟักข้าวปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ทำการทดลองจำนวนสามซ้ำ หมักในภาชนะโหลปากกว้าง ปิดด้วยผ้าขาวบาง บ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 30 วัน เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เพื่อวิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมี ค่าความเป็นกรด-ด่าง วิเคราะห์โดยเครื่อง pH meter ปริมาณความเป็นกรดทั้งหมด (total titratable acidity) ตามวิธี AOAC (2000) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solids; TSS) โดยใช้ hand refractometer ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้ vinometer และวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพด้วยการวัดค่าสีโดยเครื่องวัดสี Color Flex EZ วัดคุณลักษณะด้านสีของน้ำส้มสายชูฟักข้าวโดยเลือกโปรแกรม Hunter Lab (L* a* b*) ค่าที่วัดได้เป็น L* a* b* เมื่อหมักน้ำส้มสายชู ครบ 30 วัน แยกเฉพาะส่วนใสและหยุดกระบวนการหมักโดยการพาสเจอร์ไรซ์น้ำส้มสายชูที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สำหรับนำไปทดสอบทางประสาทสัมผัสในขั้นตอนต่อไป

2.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

การประเมินความพึงพอใจของผู้บริโภคเป็นการให้คะแนนความชอบ 1 ถึง 9 ระดับของความชอบ โดยที่ไม่ชอบมากที่สุด ระดับคะแนน คือ 1 และระดับของความชอบ ชอบมากที่สุด ระดับคะแนน คือ 9 โดยใช้แบบทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-hedonic scale ในด้าน กลิ่น สี รสชาติ ลักษณะปรากฏ และความชอบรวม ทำการทดสอบกับผู้บริโภคทั่วไปที่ไม่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 40 คน

2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางด้านเคมีกายภาพ และทางประสาทสัมผัส ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน Onaway-analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS

3. ผลการทดลอง

3.1 การผลิตแอลกอฮอล์จากน้ำฟักข้าว

ศึกษาการผลิตแอลกอฮอล์จากน้ำฟักข้าว โดยปรับปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 20 องศาบริกซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5-4.6 หัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ร้อยละ 5 (โดยปริมาตร) หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางเคมี พบปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ขณะที่ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดลงลดอย่างรวดเร็ว ในระหว่างการหมักวันที่ 0-6 และลดลงเพียงเล็กน้อยในวันที่ 9-15 ของการหมัก สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเท่านั้น (รูปที่ 1A, 1B และ 1C) โดยพบว่าไวน์จากน้ำฟักข้าวเมื่อสิ้นสุดการหมักในวันที่ 15 มีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 9.67±0.58 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 7.00±0.00 องศาบริกซ์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.06±0.00

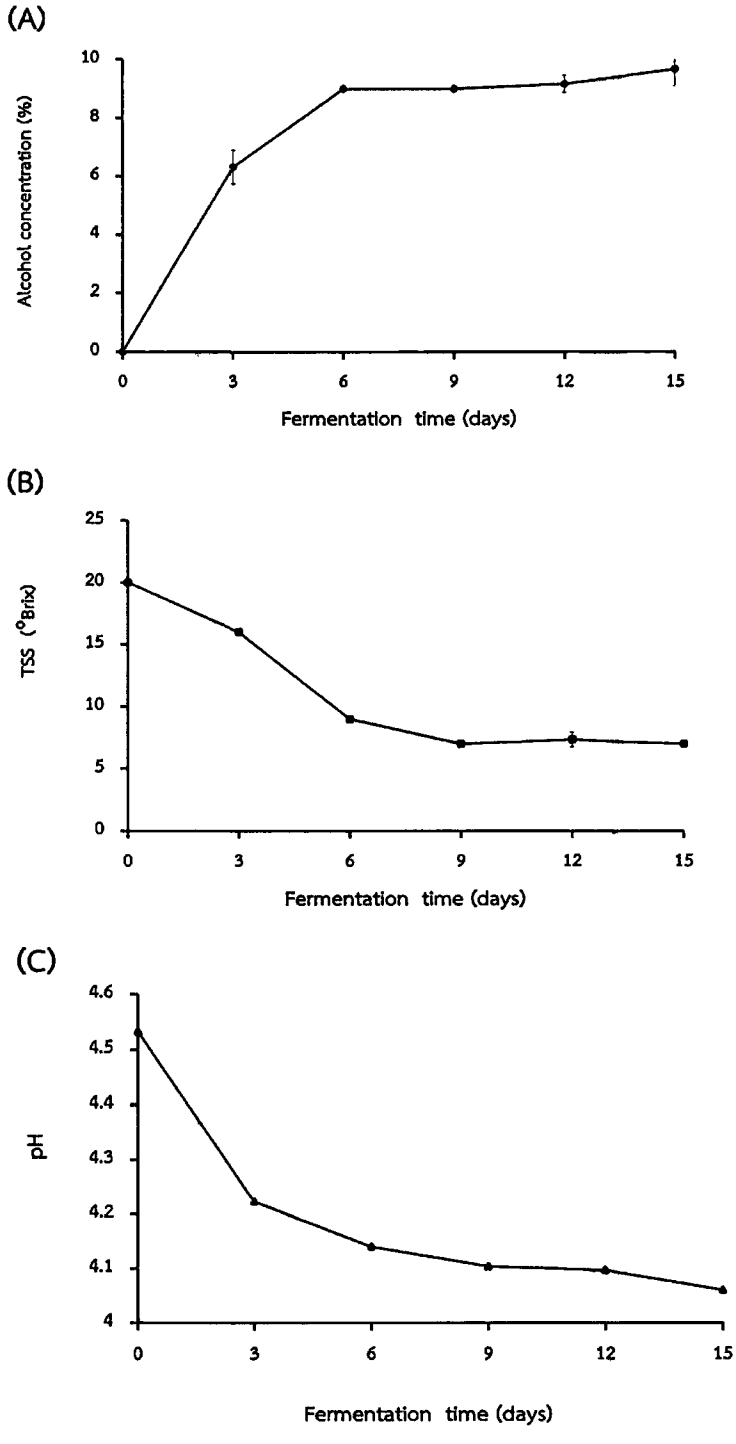

Figure 1 Chemical characteristics of Gac wine during alcoholic fermentation, alcohol concentration (A), total soluble solids (TSS) content (B), and pH (C) for the duration of fifteen-day fermentation time.

3.2 การผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์น้ำฟักข้าว

ภายหลังจากการหมักไวน์ 15 วัน เมื่อกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์สิ้นสุดลง พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น โดยเริ่มต้นร้อยละ 0 จากวันที่ 0 แล้วเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 9.67 ในวันที่ 15 ขณะที่ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดและค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลง (20 องศาบริกซ์ ลดลงเท่ากับ 7 องศาบริกซ์ และความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.53 ลดลงเป็น 4.06) จากนั้นทำการหมักแอลกอฮอล์เพื่อให้ได้กรดอะซิติก โดยกระบวนการผลิตกรดอะซิติกจากไวน์น้ำฟักข้าวที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้น 7 องศาบริกซ์ ปรับปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นร้อยละ 7 และค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.25 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 หมักในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 30 วัน ด้วยแบคทีเรียกรดอะซิติกต่างสายพันธุ์ *A. aceti* TISTR 354, *A. pasteurianus* TISTR 102 และ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกของแบคทีเรียอะซิติก 3 สายพันธุ์ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก วิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมีของน้ำส้มสายชูฟักข้าว ได้แก่ ปริมาณกรดอะซิติก ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และค่าความเป็นกรด-ด่าง

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางเคมีของน้ำส้มสายชูฟักข้าวโดยใช้แบคทีเรียอะซิติกต่างสายพันธุ์ พบว่าปริมาณกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตโดยแบคทีเรียอะซิติก 3 สายพันธุ์ มีระดับของกรดอะซิติกเพิ่มขึ้น (รูปที่ 2A) เมื่อสิ้นสุดการหมัก ในวันที่ 30 ปริมาณกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตโดย *A. pasteurianus* TISTR 102 ไม่มีความแตกต่างกับน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตโดย *A. aceti* TISTR 354 ($p>0.05$) ขณะที่ค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตโดย *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำส้มสายชูฟักข้าวที่ผลิตโดย *A. aceti* TISTR 354 และ *A. pasteurianus* TISTR 102 และพบว่าปริมาณกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูฟักข้าวที่ผลิตด้วย *A. pasteurianus* TISTR 102 มีค่าสูงสุดร้อยละ 3.50 รองลงมาคือ น้ำส้มสายชูฟักข้าวที่ผลิตด้วย *A. aceti* TISTR 354 และ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 ที่พบว่ามีปริมาณกรดอะซิติกร้อยละ 3.48 และ 2.27 ตามลำดับ

ปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำส้มสายชูหมักฟักข้าวโดยใช้แบคทีเรียอะซิติกต่างสายพันธุ์ มีระดับของแอลกอฮอล์ลดลงทั้ง 3 สายพันธุ์ (รูปที่ 2B) โดยพบว่าเมื่อสิ้นสุดการหมัก ในวันที่ 30 ปริมาณแอลกอฮอล์ของน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตโดย *A. aceti* TISTR 354 ไม่มีความแตกต่างกับน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตโดย *A. pasteurianus* TISTR 102 ($p>0.05$) ขณะที่ปริมาณแอลกอฮอล์ของน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตโดย *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตโดย *A. aceti* TISTR 354 และ *A. pasteurianus* TISTR 102 พบปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำส้มสายชูฟักข้าวต่ำสุดจากการหมักด้วย *A. pasteurianus* TISTR 102 เท่ากับร้อยละ 0.47 และน้ำส้มสายชูที่หมักด้วย *A. aceti* TISTR 354 และ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 0.50 และ 1.10 ตามลำดับ ซึ่งน้ำส้มสายชูที่ผลิตจากแบคทีเรียอะซิติกสายพันธุ์ *A. aceti* TISTR 354 และ *A. pasteurianus* TISTR 102 เป็นไปตามมาตรฐานคุณภาพน้ำส้มสายชูหมักตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 204) พ.ศ. 2543 ที่กำหนดให้มีแอลกอฮอล์ตกค้างได้ไม่เกินร้อยละ 0.5

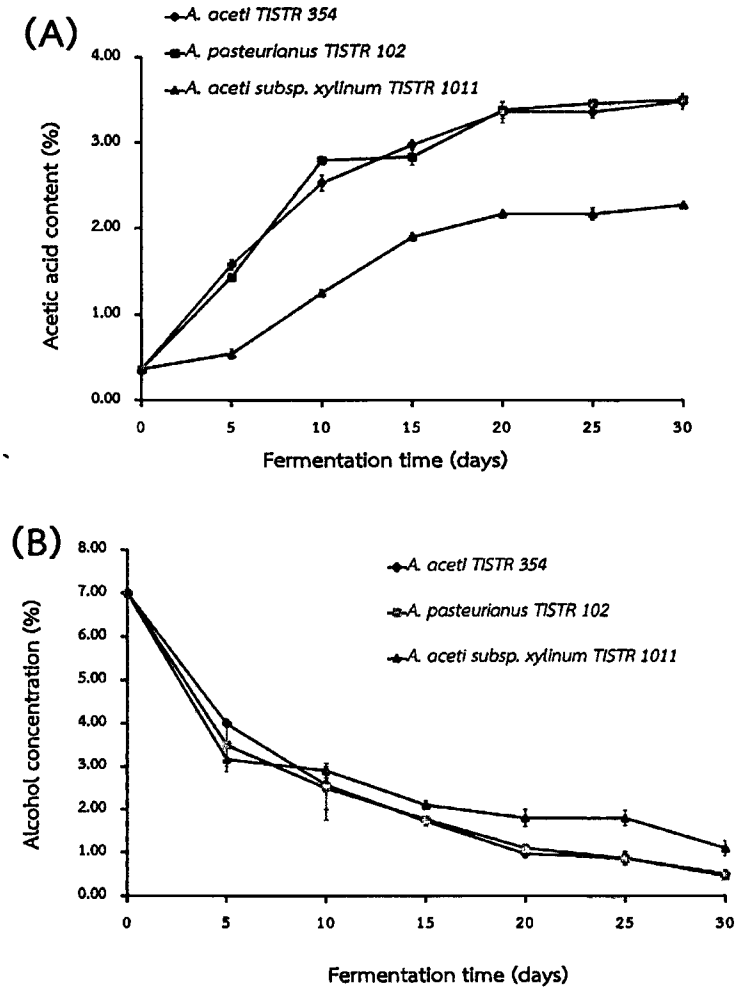

Figure 2 The acetic acid content (A) and alcohol concentration (B) of Gac vinegar produced by different strains of *Acetobacter* sp.

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของน้ำส้มสายชูฟักข้าวโดยใช้ *A. aceti* TISTR 354, *A. pasteurianus* TISTR 102 และ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 พบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดเพิ่มขึ้น (รูปที่ 3A) เมื่อสิ้นสุดการหมัก ในวันที่ 30 พบปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตโดย *A. aceti* TISTR 354, *A. pasteurianus* TISTR 102 และ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 มีค่าเท่ากับ 11.33, 11.00 และ 10.00 องศาบริกซ์ ตามลำดับ

ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตโดย *A. aceti* TISTR 354, *A. pasteurianus* TISTR 102 และ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 พบว่าลดลงอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 3B) เมื่อสิ้นสุดการหมักในวันที่ 30 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำส้มสายชูฟักข้าวโดย *A. aceti* TISTR 354, *A. pasteurianus* TISTR 102 และ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 มีค่าเท่ากับ 3.69, 3.64 และ 3.65 ตามลำดับ

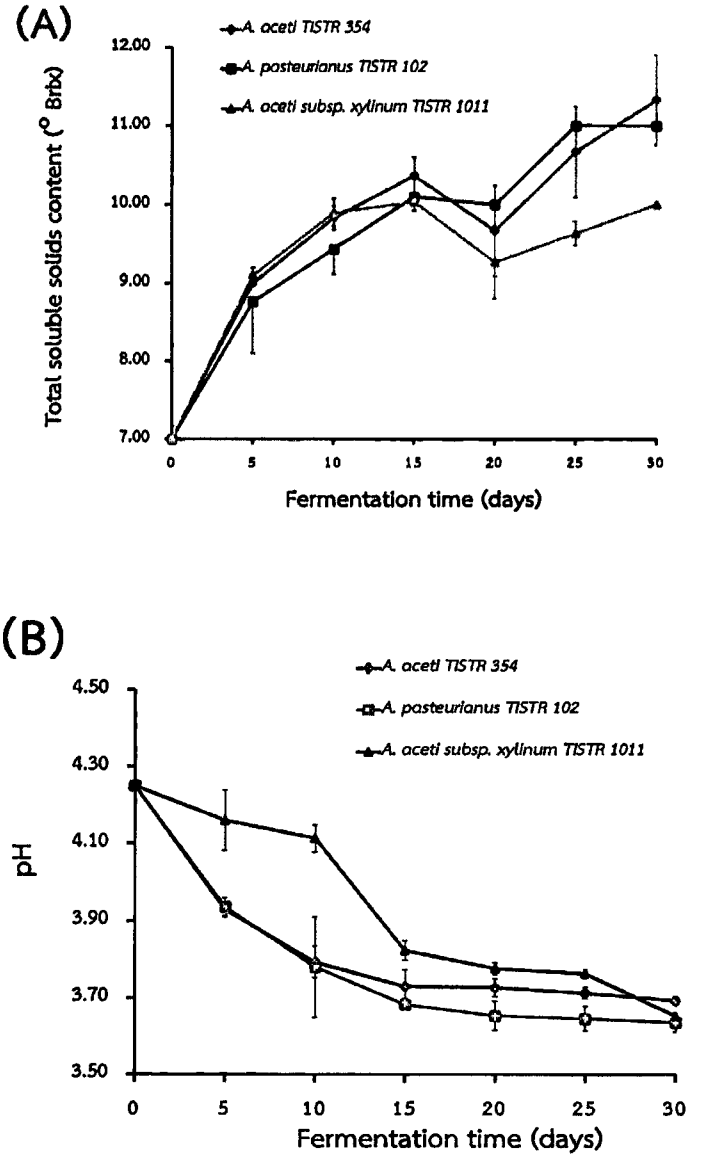

Figure 3 The total soluble solids content (A) and pH (B) of Gac vinegar produced by different strains of *Acetobacter* sp.

การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำส้มสายชูฟักข้าวด้วยการวัดสีโดยใช้เครื่องวัดสีแสดงในรูปของ CIELAB นำน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตโดย *A. aceti* TISTR 354, *A. pasteurianus* TISTR 102 และ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 มาวัดค่าสีด้วยเครื่อง Color Flex EZ โปรแกรม Hunter Lab โดยค่า L* บ่งบอกถึง ความสว่าง (lightness) มีค่าตั้งแต่ 0-100 โดย 0 คือ สีดำ และ 100 คือ สีขาว, ค่า a* บ่งบอกสีจากสีเขียว (-a*) จนถึงสีแดง (+a*), ค่า b* บ่งบอกสีจากสีน้ำเงิน (-b*) จนถึงสีเหลือง (+b*) จากผลการศึกษาพบว่าค่าสี a* และค่าสี b* แตกต่างกันระหว่างน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตโดย *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011

($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำส้มสายชูฟักข้าวที่ผลิตโดย *A. aceti* TISTR 354 และ *A. pasteurianus* TISTR 102 ดังแสดงในตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบสีของน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตด้วยแบคทีเรียอะซิติกต่างสายพันธุ์ พบว่าน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตด้วย *A. aceti* TISTR 354 มีค่าความสว่าง L* มากที่สุด โดยที่น้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตด้วยแบคทีเรียอะซิติกทั้งสามสายพันธุ์มีค่าสี a* ไปทางสีเขียว (-a*) และมีค่าสี b* ไปทางสีเหลือง (+b*)

Table 1 Color values of Gac vinegar produced by different strains of *Acetobacter* sp.

Bacterial strains	CIELab values		
	L*	a*	b*
A. aceti TISTR 354	6.18 ± 0.52[a]	-0.82 ± 0.05[a]	1.63 ± 0.21[a]
A. pasteurianus TISTR 102	5.92 ± 1.14[a]	-0.73 ± 0.07[a]	1.43 ± 0.04[a]
A. aceti subsp. *xylinum* TISTR 1011	4.73 ± 0.09[a]	-0.34 ± 0.04[b]	0.29 ± 0.06[b]

Values are means ± standard deviations. Mean values along the same column followed by different superscript letters indicate a statistically significant difference ($p<0.05$).

การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี hedonic scale 9 points ประเมินความพึงพอใจของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตจาก *A. aceti* TISTR 354, *A. pasteurianus* TISTR 102 และ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 โดยใช้แบบทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสในด้าน กลิ่น สี รสชาติ ลักษณะปรากฏ และความชอบโดยรวม ทำการทดสอบกับผู้บริโภคทั่วไปที่ไม่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 40 คน พบว่าระดับคะแนนของการยอมรับด้านกลิ่น สี รสชาติ ลักษณะปรากฏ และความชอบโดยรวม ของผู้ทดสอบไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) แสดงดังตารางที่ 2 ผลการประเมินการยอมรับทางประสาทสัมผัสของน้ำส้มสายชูฟักข้าวที่ผลิตโดย *A. pasteurianus* TISTR 102 มีคะแนนความชอบรวมสูงสุด คือ 6.23±1.69 รองลงมาคือ น้ำส้มสายชูที่ผลิตโดย *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 และ *A. aceti* TISTR 354 โดยมีคะแนนความชอบรวม 6.15±1.21 และ 5.90±1.30 ตามลำดับ การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยการทดสอบความชอบ หรือ hedonic test เป็นการทดสอบการยอมรับหรือทดสอบระดับความพอใจของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ มีสเกลแบบตัวเลขหรือตัวหนังสือเพื่อแสดงถึงระดับความชอบมากน้อย สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างในกลุ่มของลักษณะความชอบที่มีต่อผลิตภัณฑ์และยังสามารถช่วยกำหนดระดับการยอมรับผลิตภัณฑ์ได้

Table 2 Sensory assessment of Gac vinegar produced by different strains of *Acetobacter* sp.

Bacterial strains	Odor	Colors	Flavor	Appearance	Overall liking
A. aceti TISTR 354	5.10±1.63	7.25±6.02	5.45±1.63	6.25±1.68	5.90±1.30
A. pasteurianus TISTR 102	5.38±1.82	6.60±1.58	5.80±1.74	6.60±1.77	6.23±1.69
A. aceti subsp. *xylinum* TISTR 1011	5.18±1.80	6.13±1.44	5.75±1.61	6.18±1.84	6.15±1.21

Values are means ± standard deviations. No significant difference was observed between Gac vinegar produced by different strains of *Acetobacter* sp. tested by one-way ANOVA with Duncan's multiple range test.

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูจากฟักข้าวโดยกระบวนการหมัก 2 ขั้นตอน ขั้นแรกเป็นกระบวนการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์โดยใช้น้ำฟักข้าวเป็นวัตถุดิบและทำการหมักโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ตามด้วยกระบวนการหมักเพื่อให้ได้กรดอะซิติกของไวน์น้ำฟักข้าวโดยใช้แบคทีเรียกรดอะซิติก 3 สายพันธุ์ *A. aceti* TISTR 354, *A. pasteurianus* TISTR 102 และ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 ในการหมักแอลกอฮอล์ของน้ำฟักข้าวซึ่งปรับปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด 20 องศาบริกซ์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5-4.6 ใช้เชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 บ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 วัน เมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่าผลิตภัณฑ์ไวน์ฟักข้าวมีปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเท่ากับร้อยละ 9.67 ขณะที่ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (เริ่มต้น 20 องศาบริกซ์) มีค่าลดลงเท่ากับ 7 องศาบริกซ์ และค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงเท่ากับ 4.06 จากผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ในการหมักแอลกอฮอล์ การเพิ่มขึ้นในปริมาณแอลกอฮอล์มาจากการใช้น้ำตาลที่เป็นซับสเตรท โดยปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการหมัก จนถึงวันที่ 6 แล้วจึงคงที่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีสต์ได้ใช้น้ำตาลสำหรับการเจริญเติบโตและเปลี่ยนน้ำตาลที่มีในน้ำฟักข้าวไปเป็นแอลกอฮอล์ ดังนั้นปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดจึงลดลง ร่วมกันกับปริมาณของแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีระยะเวลาในการเปลี่ยนแปลงเหมือนกันกับการลดลงในปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด โดยพบลดลงอย่างรวดเร็วภายในสามวันแรกก่อนที่จะคงที่ในวันที่ 9 ไปจนถึงสิ้นสุดการหมัก พร้อมทั้งสัมพันธ์กับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการหมัก แล้วจึงลดลงทีละน้อยจนกระทั่งการหมักเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง แสดงถึงกิจกรรมเมแทบอลิซึมของยีสต์ ปัจจัยที่มีผลเป็นอย่างมากต่อการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในระหว่างการหมักของยีสต์เกิดจากกรดอินทรีย์ที่ขับออกมาและการดูดซึมกรดอะมิโนที่มีสมบัติเป็นเบส และส่วนน้อยเกิดจากคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปสารละลาย [29] สอดคล้องกับผลการศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำมะพร้าวโดยยีสต์ผงและใช้กล้าเชื้อแบบผงของแบคทีเรีย *A. aceti* TISTR 102 โดยระดับแอลกอฮอล์เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรกของการหมักแล้วจากนั้นจึงคงที่ ขณะที่การเพิ่มขึ้นของปริมาณแอลกอฮอล์ส่งผลในการลดลงของปริมาณน้ำตาล [12] เช่นเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ต่างๆ ในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์เพื่อผลิตน้ำส้มสายชูด้วยน้ำหวานของต้นจาก [30] และการหมักแอลกอฮอล์จากแอปเปิ้ลเพื่อให้ได้กรดอะซิติกในการผลิตน้ำส้มสายชูแอปเปิ้ล [31] เอทานอลเป็นผลผลิตสำคัญของกระบวนการเมแทบอลิซึมของยีสต์ซึ่งเปลี่ยนรูปของน้ำตาลที่หมักได้ไปเป็นแอลกอฮอล์ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เมื่อการหมัก

ดำเนินไป มีจำนวนเพียงเล็กน้อยของน้ำตาลที่เหลืออยู่ที่สามารถไปมีผลต่อความเสถียรของจุลินทรีย์ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เพื่อทำให้จุลินทรีย์มีเสถียรภาพ จึงจำเป็นต้องเติมน้ำตาลลงไปในกรณีที่มีปริมาณน้ำตาลไม่เพียงพอในน้ำผลไม้หรือวัตถุดิบในการหมัก เพื่อที่จะเพิ่มปริมาณแอลกอฮอล์ เนื่องจากร้อยละ 55 ของน้ำตาลที่พบในผลไม้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์เมื่อกระบวนการหมักสมบูรณ์ [32] และปริมาณแอลกอฮอล์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 3-6 จากนั้นปริมาณแอลกอฮอล์เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในวันที่ 9-15 เนื่องจากปริมาณน้ำตาลที่เป็นแหล่งอาหารและพลังงานของยีสต์ลดน้อยลง และอาจเกิดจากการยับยั้งด้วยเอทานอล โดยทั่วไปพบว่าการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์จะถูกยับยั้งด้วยเอทานอล เมื่อมีปริมาณเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 1-2 โดยน้ำหนัก จะทำให้การเจริญของยีสต์ลดลง และการเจริญของยีสต์จะหยุดเมื่อมีปริมาณเอทานอลร้อยละ 4.7 - 7.8 โดยน้ำหนัก [33] และมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยในการศึกษาครั้งนี้เมื่อสิ้นสุดการหมักไวน์ฟักข้าวค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.06 ซึ่งมีความเป็นกรดทำให้ยีสต์หยุดการเจริญเติบโตได้ โดยปกติยีสต์จะเจริญเติบโตได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 4.5-5.5 สำหรับปริมาณแอลกอฮอล์ในไวน์ฟักข้าวที่ผลิตได้จากการศึกษานี้ มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์จากมะขามป้อมด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* var. *montache* และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ก็มีการลดลงตามระยะเวลาการหมักเช่นเดียวกัน ขณะที่ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 9 ของการหมัก และได้ปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 8.57 ในวันที่ 14-16 ของการหมัก [34] ในการวิจัยนี้ทำการหมักน้ำฟักข้าวเพื่อให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ต้องการเป็นระยะเวลา 15 วัน การหมักไวน์โดยทั่วไปใช้ระยะเวลา 10-15 วัน สำหรับการหมักของยีสต์เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์ ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นและปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในกระบวนการหมัก [35] ในกระบวนการผลิตไวน์ผลไม้ ชนิดของผลไม้ และปริมาณการหมัก มีผลต่อระยะเวลาในการหมักแตกต่างกัน สำหรับการหมักน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์ที่สมบูรณ์ สำหรับการศึกษานี้ในการหมักไวน์น้ำฟักข้าว ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามพารามิเตอร์ของกระบวนการหมัก เมื่อยีสต์ *S. cerevisiae* ทำงานได้อย่างเต็มที่และมีกระบวนการหมักอย่างสมบูรณ์ จะได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์โดยการหมักจนเป็นไวน์ใช้ระยะเวลา 15 วัน ผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักไวน์ฟักข้าว พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มสูงขึ้นจากวันที่ 3 จนถึงวันที่ 6 และปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มคงที่ในวันที่ 6 ถึงวันที่ 15 ของการหมัก ขณะที่ปริมาณของแข็งละลายได้ลดลงอย่างต่อเนื่องในวันที่ 3 จนถึงวันที่ 6 และเริ่มคงที่ ในวันที่ 9 ถึง 15 ของการหมัก เช่นเดียวกันกับค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ลดลง จนมีค่าคงที่ จึงสามารถหยุดกระบวนการหมัก โดยพบปริมาณแอลกอฮอล์เมื่อสิ้นสุดการหมักร้อยละ 9.67 ระยะเวลาการหมักที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณของแข็งละลายได้ และค่าความเป็นกรด-ด่างคงที่ เกิดจากยีสต์มีการเจริญเติบโตช้าลงและเป็นช่วงที่ยีสต์เข้าสู่ระยะ stationary phase ของการเจริญเติบโต สารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิส่วนใหญ่ซึ่งเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นและรสจะถูกผลิตออกมาจำนวนมากในช่วงนี้ รวมทั้งแอลกอฮอล์ที่มีมวลโมเลกุลสูง (fusel alcohols) สารประกอบเอสเทอร์ (ester) ที่เป็นสารให้กลิ่นสำคัญของไวน์ รวมทั้งกรดอินทรีย์ และสารประกอบซัลเฟอร์ [36-37] อีกทั้งได้ปริมาณแอลกอฮอล์ตามที่ต้องการ เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนการหมักน้ำส้มสายชูต่อไป

การวิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมีของน้ำส้มสายชูฟักข้าวโดยแบคทีเรียกรดอะซิติก 3 สายพันธุ์ ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นร้อยละ 7 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด 7 องศาบริกซ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.25 ปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นร้อยละ 0.36 ทำการหมักในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 30 วัน มีการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางเคมีของน้ำส้มสายชูฟักข้าว

ดังนี้ ปริมาณกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูฟักข้าวที่ผลิตโดยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องไปจนตลอดการหมักกรดอะซิติกซึ่งมีแนวโน้มเหมือนกันทั้ง 3 สายพันธุ์ และเมื่อสิ้นสุดการหมัก ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างปริมาณกรดอะซิติกของสายพันธุ์ TISTR 354 และ TISTR 102 แต่พบว่าปริมาณกรดอะซิติกของสายพันธุ์ TISTR 354 และ TISTR 102 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตจากสายพันธุ์ TISTR 1011 โดยที่แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ในช่วงร้อยละ 2.27-3.50 ในขั้นตอนการหมักกรดอะซิติกนี้เป็นการเปลี่ยนแอลกอฮอล์ที่เป็นซับสเตรทให้ได้กรดอะซิติกทำให้ปริมาณแอลกอฮอล์ลดลง ซึ่งปริมาณแอลกอฮอล์ของน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตโดยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกันกับปริมาณกรดอะซิติกที่เพิ่มสูงขึ้นไปจนตลอดระยะเวลาการหมัก เมื่อสิ้นสุดการหมักปริมาณแอลกอฮอล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ในช่วงร้อยละ 0.47–1.10 และไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตโดยสายพันธุ์ TISTR 354 และ TISTR 102 แต่มีความแตกต่างระหว่างปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตโดยสายพันธุ์ TISTR 354 และ TISTR 102 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ TISTR 1011 โดยในช่วงเริ่มต้นมีการเกิดปฏิกิริยาการหมักอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นสภาพแวดล้อมจะเป็นกรดมากขึ้น แอลกอฮอล์มีปริมาณลดลง ส่งผลให้การเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติกเกิดขึ้นน้อยลงกว่าช่วงแรก และความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลง เกิดจากกระบวนการหมักมีการสร้างกรดมากขึ้น สำหรับปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตโดยแบคทีเรียกรดอะซิติก 3 สายพันธุ์ มีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก เมื่อสิ้นสุดการหมักมีค่าอยู่ในช่วง 10.00-11.33 องศาบริกซ์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างระหว่างปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดที่ผลิตโดยสายพันธุ์ TISTR 354 และ TISTR 102 แต่มีความแตกต่างในปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดระหว่างสายพันธุ์ TISTR 354 และ TISTR 102 เมื่อเปรียบเทียบกับ TISTR 1011 ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำมะม่วง (*Mangifera indica*) และน้ำมะละกอ (*Carica papaya*) ในระหว่างการหมักเพื่อผลิตกรดอะซิติก ระดับของปริมาณกรดที่ไทเทรตได้เพิ่มขึ้นในน้ำผลไม้ทั้งสองชนิด โดยการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ในระหว่างการหมักเนื่องจากการสะสมของกรดอินทรีย์ชนิดหลักคือกรดอะซิติกที่ถูกผลิตโดยแบคทีเรียกรดอะซิติก รวมทั้งแลคติก อีกทั้งยังสามารถผลิตกรดออกซาลิก และกรดซิตริกได้ในปริมาณน้อยอีกด้วยเช่นกัน [38] และสอดคล้องกับการศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูจากมะม่วงที่ใช้วิธีการหมักต่อเนื่อง 2 ขั้นตอน ทำการหมักแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์และการหมักกรดอะซิติกด้วยแบคทีเรีย *Acetobacter* sp. ที่แยกได้จากไวน์แดง ซึ่งการพัฒนาของกรดอะซิติกและเอทานอลระหว่างขั้นตอนที่แตกต่างกันของการผลิตน้ำส้มสายชู แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของการผลิตกรดอะซิติกเป็นสัดส่วนผกผันต่อการลดลงของเอทานอลในระหว่างการหมักกรดอะซิติก [39] นอกจากนี้รายงานผลการศึกษาข้อมูลการเปลี่ยนเอทานอลเป็นกรดอะซิติกในการหมักเพื่อให้ได้กรดอะซิติกจากไวน์ส้ม มะม่วง เชอรี่ และกล้วย ได้รายงานผลการที่น้ำส้มสายชูจากผลไม้มีปริมาณกรดอะซิติกต่ำเนื่องมาจากกรดอินทรีย์ที่พบในผลไม้ [13] และจากรายงานการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกของแบคทีเรีย *A. aceti* TISTR 354 แสดงถึงความสามารถของสายพันธุ์นี้ที่มีการผลิตกรดอะซิติกได้สูงสุดถึงร้อยละ 4.03 หลังจาก 11-15 วันของการหมักเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดอะซิติกที่คัดแยกได้จากผลไม้และน้ำผลไม้หมักสำหรับการผลิตน้ำส้มสายชู และแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ยังมีคุณสมบัติทนทานต่อระดับแอลกอฮอล์ได้ในช่วงกว้างอยู่ระหว่างร้อยละ 4-10 แสดงให้เห็นว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำส้มสายชู [40]

ในการศึกษาครั้งนี้ปริมาณกรดอะซิติกของน้ำส้มสายชูฟักข้าวที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดอะซิติกทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่าต่ำกว่ามาตรฐานตามประกาศกระทรวง

สาธารณสุข (ฉบับที่ 204) พ.ศ. 2543 เรื่องน้ำส้มสายชู จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตน้ำส้มสายชูเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูฟักข้าวต่อไป อย่างเช่น ปริมาณออกซิเจน และปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นในการหมักกรดอะซิติก เนื่องจากปริมาณกรดอะซิติกเป็นเกณฑ์คุณภาพพื้นฐานที่ผู้ผลิตและและผู้บริโภคให้ความสำคัญ ระดับของกรดอะซิติกที่สูงขึ้นหมายถึงความเป็นกรดของน้ำส้มสายชูก็มากด้วยเช่นเดียวกัน เกณฑ์มาตรฐานโดยทั่วไปของน้ำส้มสายชูกำหนดปริมาณกรดอะซิติกที่ร้อยละ 4 (น้ำหนักโดยปริมาตร) โดยเป็นปริมาณขั้นต่ำ ซึ่งเป็นเกณฑ์สำหรับผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูทั้งในประเทศสหรัฐอเมริกา สหราชอาณาจักร และในภูมิภาคเอเชีย รวมทั้งในประเทศไทย ในบางประเทศระดับกรดอะซิติกขั้นต่ำในน้ำส้มสายชูอาจแตกต่างกัน แต่การยอมรับโดยทั่วไปจะมีปริมาณกรดอะซิติกอยู่ระหว่างร้อยละ 4-5 (น้ำหนักโดยปริมาตร) จากการที่น้ำส้มสายชูผลิตจากเอทานอลเป็นซับสเตรทซึ่งปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดที่หลงเหลือหรือตกค้างในน้ำส้มสายชูที่กำหนดไว้ได้เพียงร้อยละ 0.5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) ยกเว้นสำหรับน้ำส้มสายชูจากไวน์ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ตกค้างได้ที่ร้อยละ 1.5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) [41-43] ปริมาณกรดอะซิติกและแอลกอฮอล์ที่หลงเหลือในผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูจากผลไม้มีการแปรผันแตกต่างกันตามวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต การใช้วัตถุดิบที่แตกต่างสำหรับการผลิตน้ำส้มสายชูมีผลต่อคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ จากการศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูจากผลไม้ (ส้ม, กล้วย, มะขาม, ผลมะม่วงหิมพานต์ และ สับปะรด) มีปริมาณกรดอะซิติกแตกต่างกันในช่วง 3.50-7.24 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร [14] และน้ำส้มสายชูจากมะม่วงมีปริมาณกรดอะซิติกร้อยละ 5.6 [13] ความแตกต่างของปริมาณกรดอะซิติกที่ได้ อาจจะเนื่องมาจากการมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน รวมทั้งปริมาณน้ำตาลที่มีในผลไม้ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการผลิตน้ำส้มสายชู เนื่องจากปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่เกี่ยวข้องโดยตรงต่อปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้รับในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ และทำให้ได้ปริมาณกรดทั้งหมดที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูระหว่างการหมักกรดอะซิติก [7] อุณหภูมิในการหมักมีผลต่อปริมาณกรดอะซิติกด้วยเช่นกัน ในการศึกษานี้ทำการหมักน้ำส้มสายชูฟักข้าวที่อุณหภูมิห้อง จากรายงานการศึกษาผลของอุณหภูมิในการหมักต่อการผลิตกรดอะซิติกในการหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำส้มสายชูและการเจริญสูงสุดของแบคทีเรียกรดอะซิติกคือ 30 องศาเซลเซียส ถ้าหากอุณหภูมิสูงเกินนี้จะเพิ่มการทำลายเซลล์แบคทีเรียเนื่องจากความเข้มข้นของกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการหมัก ทำให้ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้ลดลง [9, 44-45] ในการหมักน้ำส้มสายชูด้วยแบคทีเรียกรดอะซิติกต้องการปริมาณออกซิเจนสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย สำหรับการศึกษาครั้งนี้ทำการหมักน้ำส้มสายชูฟักข้าวในภาชนะโหลปากกว้าง ปิดด้วยผ้าขาวบาง เนื่องจากแบคทีเรียกรดอะซิติกเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในที่มีอากาศเท่านั้น ออกซิเจนจึงเป็นปัจจัยจำกัดสำหรับการเจริญเติบโต การใช้ออกซิเจนของแบคทีเรียสัมพันธ์กับปริมาณกรดอะซิติกที่ได้รับ ซึ่งเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาออกซิเดชันเอทานอล ออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนเพื่อออกซิไดซ์เอทานอลโดยแบคทีเรียกรดอะซิติกในระหว่างการหมักเพื่อให้ได้กรดอะซิติก [46-48] ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นอีกปัจจัยสำคัญในการผลิตน้ำส้มสายชูแสดงถึงจำนวนของอิออนไฮโดรเจนที่พบในสารละลาย เป็นการวัดคุณสมบัติทางเคมีของน้ำส้มสายชูอย่างง่าย โดยน้ำส้มสายชูกับกรดอ่อน หรือ non-volatile buffering มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้จากสารละลายกรดอะซิติก การหมักน้ำส้มสายชูเมื่อใช้น้ำตาลเพิ่มขึ้นในการหมักจะได้ปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้น จากรายงานการวิจัยการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักจากเปลือกและกากส้มเหลือใช้อาศัยกระบวนการหมักตามธรรมชาติหมักที่อุณหภูมิห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) เมื่อสิ้นสุดการหมักเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสภาวะการหมักต่อการผลิตน้ำส้มสายชูหมักโดยอาศัยกระบวนการ

หมักตามธรรมชาติ น้ำส้มสายชูหมักที่ใช้สภาวะการหมักแบบมีอากาศทำให้ได้รับปริมาณกรดอะซิติกสูงกว่าการใช้สภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศ [49] ในการศึกษานี้ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้มีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (ปริมาณน้ำตาล) เป็นการวัดของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในสารตัวอย่าง ประกอบไปด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ ซึ่งละลายได้ในน้ำ ปริมาณของแข็งละลายได้ในน้ำส้มสายชูจึงประกอบไปด้วยน้ำตาลอิสระ (กลูโคส ฟรักโตส และซูโครส) นอกจากนี้ยังมีกรดอินทรีย์ที่ละลายในน้ำได้ดี (กรดซิตริก กรดมาลิก กรดทาร์ทาริก กรดอะมิโน และวิตามินซี) ซึ่งค่าที่วัดได้เป็นค่ารวมของความเข้มข้นน้ำตาลทุกชนิด และกรดอินทรีย์ที่ละลายได้ในสารตัวอย่างนั้นๆ ปริมาณของแข็งละลายได้และค่าความเป็นกรด-ด่าง มีความสำคัญในการประเมินคุณภาพของน้ำส้มสายชู ซึ่งจะรวมไปเป็นคุณลักษณะในผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วย ปริมาณของแข็งละลายได้ ความเป็นกรด-ด่าง กรดอะมิโน น้ำตาลรีดิวซ์ กรดกลูโคนิก โปรตีน และอื่นๆ การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดรายงานเป็นค่าบริกซ์ซึ่งแสดงถึงร้อยละของปริมาณของแข็งละลายได้ในตัวอย่างที่เป็นของเหลวและเป็นคุณลักษณะที่เปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำส้มสายชู โดยค่าบริกซ์ถูกรายงานพบอยู่ในช่วงระหว่าง 1.02–20.80 สำหรับผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักจากผลไม้ [50-51] ระดับของบริกซ์ยังบ่งบอกร้อยละปริมาณของสารที่สามารถละลายในน้ำได้ส่วนใหญ่ ปัจจัยซึ่งอาจกำหนดค่าบริกซ์ของน้ำส้มสายชู ประกอบด้วย การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ถูกนำมาใช้สำหรับกระบวนการหมักและวัตถุดิบที่ใช้สำหรับการผลิตน้ำส้มสายชู ค่าบริกซ์เชื่อมโยงกับกระบวนการหมักโดยเป็นปริมาณน้ำตาลที่ลดลงร่วมกันกับการเพิ่มขึ้นในกิจกรรมการหมักของจุลินทรีย์และอาจมีค่าแปรผันได้เป็นอย่างมาก [52] องค์ประกอบของน้ำส้มสายชูหมักจากผลไม้โดยหลักเป็นผลมาจากวัตถุดิบ เทคโนโลยีการผลิต และวิธีการหมักแบบดั้งเดิมของแต่ละประเทศ โดยองค์ประกอบหลักของน้ำส้มสายชูเป็นสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายนอกเหนือจากกรดอะซิติก ยังมีสารประกอบอินทรีย์ซึ่งให้กลิ่นรสและความหอมแก่น้ำส้มสายชู สารประกอบอินทรีย์ในน้ำส้มสายชูหมักมีปริมาณสูงขึ้นมาจากเมแทบอลิซึมของยีสต์ในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ ส่วนประกอบอื่นๆ พบในปริมาณน้อยเพิ่มขึ้นจากการออกซิเดทีฟโดยกระบวนการแคตาบอลิซึมในแบคทีเรียกรดอะซิติกต่อสารประกอบที่พบในน้ำผลไม้ [53-55] จากรายงานปริมาณน้ำตาลอิสระของน้ำส้มสายชูทางการค้ามีปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของผลไม้ที่ถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบ นอกจากนี้ปริมาณของแข็งละลายได้ทั้งหมดของน้ำส้มสายชูเนื่องมาจากการพบส่วนประกอบอื่นๆ ที่มีอยู่ในปริมาณน้อย เช่น กรดอินทรีย์และกรดอะมิโนอิสระได้ด้วยเช่นเดียวกัน [56]

คุณสมบัติทางกายภาพของน้ำส้มสายชูฟักข้าว ลักษณะสีน้ำส้มสายชูฟักข้าวจากการวัดค่าสี พบว่าค่า L* บ่งบอกถึง ความสว่าง (lightness) มีค่าตั้งแต่ 0-100 โดย 0 คือ สีดำ และ 100 คือ สีขาว มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง ค่าคุณภาพ ค่า a* บ่งบอกสีจากสีเขียว (-a*) จนถึงสีแดง (+a*) การวัดค่าสีในวันที่ 30 ของการหมักน้ำส้มสายชูฟักข้าวด้วยแบคทีเรียอะซิติก 3 สายพันธุ์ มีค่า a* อยู่ในช่วง -0.3 ถึง -0.8 แสดงให้เห็นว่าน้ำส้มสายชูมีลักษณะสีเขียว ค่า b* บ่งบอกสีจากสีน้ำเงิน (-b*) จนถึงสีเหลือง (+b*) การวัดผลในวันที่ 30 ค่า b* อยู่ในช่วง 0.3 ถึง 1.6 แสดงให้เห็นว่าน้ำส้มสายชูมีลักษณะสีเหลือง จากรายงานค่าสีของน้ำส้มสายชูตามท้องตลาดที่วัดค่าสีโดยเครื่อง Color Quet XT ค่าคุณภาพ L* a* b* มาตรฐานน้ำส้มสายชูที่จำหน่ายตามท้องตลาด โดย L* มีค่าเท่ากับ 100.4 ค่า a* มีค่าเท่ากับ -0.2 และค่า b* เท่ากับ 0.2 [57] การเปรียบเทียบสีของน้ำส้มสายชูฟักข้าวโดยใช้แบคทีเรียอะซิติกต่างสายพันธุ์ มีค่า L* ไม่แตกต่างกัน มีค่าสี a* ไปทางสีเขียว (-a*) และมีค่าสี b* ไปทางสีเหลือง (+b*) ค่าสีมีช่วงที่แตกต่างกันของคุณสมบัติทางด้านสีสำหรับน้ำส้มสายชูหลายชนิด สีของน้ำส้มสายชูเป็นปัจจัยสำคัญซึ่งมีผลต่อการตัดสินใจซื้อโดยผู้บริโภค ค่าพารามิเตอร์ของสีขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ของผลไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำส้มสายชู โดยมี

รายงานว่าน้ำส้มสายชูที่มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงกว่ามีแนวโน้มที่จะมีค่าความสว่างความมืดต่ำกว่า แต่มีองค์ประกอบค่าความเป็นสีแดงสูง [58] ทั้งนี้คุณสมบัติด้านสีของน้ำส้มสายชูหมักจากผลไม้มีค่าแตกต่างตามวัตถุดิบและตามกรรมวิธีการผลิต สีเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการรับรู้ของผู้บริโภคเมื่อตัดสินใจในการซื้อน้ำส้มสายชู [59-61] โดยทั่วไปคุณสมบัติทางด้านสีของน้ำส้มสายชูถูกประเมินได้โดยการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสและวิธีการวัดด้วย Spectrophotometric methods [62] จากรายงานการศึกษาคุณลักษณะของน้ำส้มสายชูหมักโดยวิธีดั้งเดิม พบว่าคุณสมบัติทางด้านสีของน้ำส้มสายชูทางการค้าและน้ำส้มสายชูหมักแบบวิธีดั้งเดิมมีความแตกต่างกันเป็นอย่างมากจากตัวอย่างแต่ละชนิด [51]

การทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำส้มสายชูฟักข้าวพบว่า ผู้บริโภคให้คะแนนความชอบต่อผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูฟักข้าวโดย *A. pasteurianus* TISTR 102 ได้รับคะแนนความชอบรวมสูงสุด รองลงมาคือ น้ำส้มสายชูฟักข้าวที่หมักด้วย *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 และ *A. aceti* TISTR 354 ตามลำดับ ในการประเมินคุณภาพของน้ำส้มสายชูมีหลักเกณฑ์ในการพิจารณา ได้แก่ คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และทางประสาทสัมผัส สำหรับเกณฑ์ทางด้านเคมีกายภาพเป็นคุณสมบัติที่สามารถจำแนกความแตกต่างของน้ำส้มสายชูจากน้ำส้มสายชูที่ถูกทำให้เจือจางหรือเครื่องปรุงรสรูปแบบซองผสมอาหารอื่นๆ ขณะที่เกณฑ์เกี่ยวข้องกับคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสเป็นการประเมินศักยภาพในการนำออกขายได้ของผลิตภัณฑ์ การวิเคราะห์การยอมรับผลิตภัณฑ์ เป็นวิธีการที่ผู้บริโภคเท่านั้นบอกได้และวัดโดยวิธีอื่นทางวิทยาศาสตร์ไม่ได้ ถึงแม้จะวัดได้แต่อาจจะไม่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ เพราะถือว่าข้อมูลการยอมรับผลิตภัณฑ์มาจากขั้นตอนการตอบสนองของมนุษย์ การทดสอบการยอมรับเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบผู้บริโภคมากกว่าการทดสอบความชอบ ข้อมูลที่ได้ทำให้ทราบว่าผู้บริโภคชอบผลิตภัณฑ์แค่ไหน จะซื้อหรือไม่อย่างไร การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้เพื่อประเมินว่าผู้ทดสอบชอบผลิตภัณฑ์ใดมากน้อยแค่ไหน โดยการหาค่าเฉลี่ยของคะแนนความชอบ หากมีผลิตภัณฑ์ตั้งแต่ 2 ตัวอย่างขึ้นไป ก็สามารถนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างต่อไป [63-64] สำหรับผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชู เกณฑ์ทางด้านประสาทสัมผัสสัมพันธ์กับลักษณะปรากฏที่สามารถมองเห็นได้ (ความขุ่นและสี) การได้กลิ่น (การดมกลิ่น) คุณลักษณะเชิงประสาทสัมผัส (รสชาติ ความเปรี้ยว) โดยผลการประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูฟักข้าวจากแบคทีเรียอะซิติกต่างสายพันธุ์ มีระดับคะแนนความชอบในช่วงระหว่าง 5-7 อยู่ในระดับของความชอบเล็กน้อยจนถึงความชอบปานกลาง อาจเนื่องจากผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูมีคุณลักษณะเฉพาะทางด้านกลิ่นและรสที่แรง สอดคล้องกับการศึกษาทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูสตรอเบอร์รี่โดยผลิตจากสตรอเบอร์รี่ที่เตรียมด้วยการบดในเครื่องปั่นและน้ำสตรอเบอร์รี่ถูกทำให้เข้มข้นโดยผ่านความร้อน ทำการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ไวน์ที่ได้นำมาผลิตน้ำส้มสายชูด้วยแบคทีเรียกรดอะซิติก เปรียบเทียบการยอมรับทางประสาทสัมผัสกับน้ำส้มสายชูจากไวน์ในท้องตลาด โดยผู้บริโภคให้ระดับคะแนนการยอมรับผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูสตรอเบอร์รี่ในช่วงคะแนน 5.6-6.6 ซึ่งไม่แตกต่างกันระหว่างน้ำส้มสายชูสตรอเบอร์รี่ 4 ชนิด และมีระดับความชอบมากกว่าคะแนนที่ได้รับจากการทดสอบน้ำส้มสายชูจากไวน์ในท้องตลาดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [65] จากการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของน้ำส้มสายชูฟักข้าวที่ผลิตด้วยแบคทีเรีย TISTR 354, TISTR 102 และ TISTR 1011 ในด้าน กลิ่น สี รสชาติ ลักษณะปรากฏ และความชอบโดยรวม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยในการวิจัยนี้ระดับคะแนนการยอมรับของผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสในแต่ละด้านเท่ากับ 5 ขึ้นไป สามารถนำไปใช้เป็นเกณฑ์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูจากฟักข้าวให้มีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และทางประสาทสัมผัส ที่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานในการพิจารณาผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูต่อไป

5. สรุป

การผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำคั้นเนื้อผลและเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวโดยใช้แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก 3 สายพันธุ์ *A. aceti* TISTR 354, *A. pasteurianus* TISTR 102 และ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 พบคุณลักษณะทางเคมีของน้ำส้มสายชูฟักข้าว มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ลดลง เนื่องจากแบคทีเรียกรดอะซิติกเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก โดยมีปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำสุดในน้ำส้มสายชูฟักข้าวผลิตโดย *A. pasteurianus* TISTR 102 มีค่าร้อยละ 0.47 และ *A. aceti* TISTR 354 มีค่าร้อยละ 0.50 ขณะที่ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 มีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 1.10 สอดคล้องกับปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติก มีปริมาณเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาของการหมัก โดยมีปริมาณกรดอะซิติกของน้ำส้มสายชูฟักข้าวสูงสุดจากการผลิตโดย *A. pasteurianus* TISTR 102 มีค่าร้อยละ 3.50 รองลงมาคือ *A. aceti* TISTR 354 และ *A. aceti* subsp. *xylinum* TISTR 1011 มีค่าร้อยละ 3.48 และร้อยละ 2.27 ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างของการทดสอบทางประสาทสัมผัสในน้ำส้มสายชูจากฟักข้าวผลิตด้วยแบคทีเรียกรดอะซิติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ผลการศึกษาที่ได้นี้จะเป็นแนวทางสำหรับใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูฟักข้าวซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรพื้นบ้านนำมาแปรรูปเพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรต่อไป

6. References

[1] Adams, M.R., 1998, Vinegar, pp. 1-44, In Wood, B.J.B. (Ed.), Microbiology of Fermented Foods, Springer, Boston, MA.

[2] Guillamón, J.M. and Mas, A., 2009, Acetic Acid Bacteria, pp. 31-46, In König, H., Unden, G. and Fröhlich, J. (Eds.), Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine, Springer, Berlin, Heidelberg.

[3] Gullo, M., Verzelloni, E. and Canonico, M., 2014, Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects, Process Biochem. 49(10): 1571-1579.

[4] Gomes, R.J., Borges, M.F., Rosa, M.F., Castro-Gómez, R.J.H. and Spinosa, W.A., 2018, Acetic acid bacteria in the food industry: Systematics, characteristics and applications, Food Technol. Biotechnol. 56(2): 139-151.

[5] Lynch, K.M., Zannini, E., Wilkinson, S., Daenen, L. and Arendt, E.K., 2019, Physiology of acetic acid bacteria and their role in vinegar and fermented beverages, Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 18(3): 587-625.

[6] Solieri, L. and Giudici P., 2009, Vinegars of the World. Springer Science and Business Media LLC, Berlin/Heidelberg, Germany, 297 p.

[7] Luzón-Quintana, L.M., Castro, R. and Durán-Guerrero, E., 2021, Biotechnological processes in fruit vinegar production, Foods. 10(5): 945.

[8] Luangphithak, P., 2009, Functional Food, Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, 6 p. (in Thai)

[9] Grewal, H.S., Tewari, H.K. and Kalra, K.L., 1988, Vinegar production from substandard fruits, Biological Wastes. 26(1): 9-14.

[10] Özen, M., Özdemir, N., Ertekin Filiz, B., Budak, N.H. and Kök-Taş, T., 2020, Sour cherry (*Prunus cerasus* L.) vinegars

produced from fresh fruit or juice concentrate: Bioactive compounds, volatile aroma compounds and antioxidant capacities, Food Chem. 309(23): 125664.

[11] Mehaia, M.A. and Cheryan, M., 1991, Fermentation of date extracts to ethanol and vinegar in batch and continuous membrane reactors, Enzyme Microb. Technol. 13(3): 257-261.

[12] Ngoc, T.N.T., Masniyom, P. and Maneesri, J., 2016, Preparation of vinegar from coconut water using baker's yeast and *Acetobacter aceti* TISTR 102 starter powder, KKU Res. J. 21(2): 385-396.

[13] Coelho, E., Genisheva, Z., Oliveira, J.M., Teixeira, J.A. and Domingues, L., 2017, Vinegar production from fruit concentrates: Effect on volatile composition and antioxidant activity, J. Food Sci. Technol. 54(12): 4112-4122.

[14] Maldonado, O., Roll, C., Cabrera, S.S. and Schneider de Cabrera, S., 1975, Wine and vinegar production from tropical fruits, J. Food Sci. 40(2): 262-265.

[15] Horiuchi, J., Kanno, T. and Kobayashi, M., 1999, New vinegar production from onions, J. Biosci. Bioeng. 88(1): 107-109.

[16] Lee, J.H., Cho, H.D., Jeong, J.H., Lee, M.K., Jeong, Y.K., Shim, K.H. and Seo, K.I., 2013, New vinegar produced by tomato suppresses adipocyte differentiation and fat accumulation in 3T3-L1 cells and obese rat model, Food Chem. 141(3): 3241-3249.

[17] Murooka, Y., Nanda, K. and Yamashita, M., 2009, Rice Vinegars, pp. 121-133, In Solieri L. and Giudici, P. (Eds), Vinegars of the World. Springer, Milano.

[18] Gupta, R.C., Jain, V.K. and Shanker, G., 1980, Palm sap as a potential starting material for vinegar production, Res. Ind. 25(1): 5-7.

[19] Yim, E.J., Jo, S.W. Lee, E.S. Park, H.S., Ryu, M.S., Uhm, T.B., Kim, H.Y. and Cho, S.H., 2015, Fermentation characteristics of mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit vinegar produced by acetic acid bacteria isolated from traditional fermented foods, Korean J. Food Preserv. 22(1): 108–118.

[20] Kha, T.C., Nguyen, M.H., Roach, P.D., Parks, S.E. and Stathopoulos, C., 2013, Gac fruit: Nutrient and phytochemical composition, and options for processing, Food Rev. Int. 29(1): 92–106.

[21] Müller-Maatsch, J., Sprenger, J., Hempel, J., Kreiser, F., Carle, R. and Schweiggert, R.M., 2016, Carotenoids from Gac fruit aril (*Momordica cochinchinensis* [Lour.] Spreng.) are more bioaccessible than those from carrot root and tomato fruit, Food Res. Int. 99(Pt 2): 928-935.

[22] Kubola, J. and Siriamornpun, S., 2011, Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng), Food Chem. 127(3): 1138-1145.

[23] Wimalasiri, D., Dekiwadia, C., Fong, S.Y., Piva, T.J. and Huynh, T., 2020, Anticancer

activity of *Momordica cochinchinensis* (Red Gac) aril and the impact of varietal diversity, BMC Complement. Med. Ther. 20(1): 365.

[24] Tien, P.G., Kayama, F., Konishi, F., Tamemoto, H., Kasono, K., Hung, N.T., Kuroki, M., Ishikawa, S.E., Van, C.N. and Kawakami, M., 2005, Inhibition of tumor growth and angiogenesis by water extract of Gac fruit (*Momordica cochinchinensis* Spreng), Int. J. Oncol. 26(4): 881-889.

[25] Chuyen, H.V., Nguyen, M.H., Roach, P.D., Golding, J.B. and Parks, S.E., 2015, Gac fruit (*Momordica cochinchinensis* Spreng.): A rich source of bioactive compounds and its potential health benefits, Int. J. Food Sci. Technol. 50(3): 567-577.

[26] Do, T.V.T., Fan, L., Suhartini, W. and Girmatsion, M., 2019, Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) fruit: A functional food and medicinal resource, J. Funct. Foods. 62: 103512.

[27] Klungsupya, P., Saenkhum, J., Muangman, T., Rerk-Am, U., Laovitthayanggoon, S. and Leelamanit, W., 2012, Non-cytotoxic property and DNA protective activity against H2O2 and UVC of Thai Gac fruit extracts in human TK6-cells, J. App. Pharm. Sci. 02(04): 4-8.

[28] Chen, H., Chen, T., Giudici, P. and Chen, F., 2016, Vinegar functions on health: Constituents, sources, and formation mechanisms, Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 15(6): 1124–1138.

[29] Coote, N. and Kirsop, B.H., 1976, Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations, J. Inst. Brew. 82: 149-153.

[30] Saithong, P., Nitipan, S. and Permpool, J., 2019, Optimization of vinegar production from nipa (*Nypa fruticans* Wurmb.) sap using surface culture fermentation process, Appl. Food Biotechnol. 6(3): 193-200.

[31] Sung, N.H., Woo, S.M., Kwon, J.H., Yeo, S.H. and Jeong, Y.J., 2014, Quality characteristics of high acidity apple vinegar manufactured using two stage fermentation, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 43(6): 877-883.

[32] Loesecke, V., 1972, Fermented of Juices and Waste Liquors, p. 534, In Sinclair, W.B. (Ed.), The Grapefruit: Its Composition, Physiology and Products. USA.

[33] Sree, N.K., Sridhar, M., Suresh, K., Banat, I.M. and Rao, L.V., 2000, High alcohol production by repeated batch fermentation using an immobilized osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae,* J. Ind. Microbiol. 24(3): 222-226.

[34] Thabloga, W., Penrum, J. and Yaibua, N., 2013, Effect of Alcohol Concentrations and Aeration Conditions on Vitamin C Contents and Fermented Makhampom Vinegar Production, In Proceedings of 51st Kasetsart University Annual Conference: Agricultural Extension and Home Economics, Agro-Industry Bangkok, Thailand, The Thailand Research Fund, Bangkok, Thailand, 463 p. (in Thai)

[35] Krusong, W. and Pongsawatmanit, R., 1989, Industrial Fermentation Technology, O.S. Printing House, Bangkok, 209 p. (in Thai)

[36] Ingledew, W.M., 1999, Alcohol Production by *Saccharomyces cerevisiae:* A Yeast Primer, pp. 49-87, In Lyons, T.P. and Kelsall, D.R. (Eds.), The Alcohol Textbook, 3rd Ed., Nottingham University Press, Nottingham, UK.

[37] Walker, G.M. and Stewart, G.G., 2016, *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages, Beverages. 2(4): 30.

[38] Bouatenin, K.M., Kouamé, K.A., GueuKehi, M.E., Djéni, N.T. and Djé, K.M., 2021, Organic production of vinegar from mango and papaya, Food Sci. Nutr. 9(1): 190-196.

[39] Ameyapoh, Y., Leveau, J.Y., Karou, S.D., Bouix, M., Sossou, S.K. and De Souza, C., 2010, Vinegar production from togolese local variety mangovi of mango *Mangifera* indica Linn. (Anacardiaceae), Pak. J. Biol. Sci. 13(3): 132-137.

[40] Klawpiyapamornkun, T., Bovonsombut, S. and Bovonsombut, S., 2015, Isolation and characterization of acetic acid bacteria from fruits and fermented fruit juices for vinegar production, FAB Journal. 3(1): 30-38.

[41] Mas, A., Torija, M.J., García-Parrilla Mdel, C. and Troncoso, A.M., 2014. Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar, Sci. World J. 2014: 394671.

[42] Johnston, C.S. and Gaas, C.A., 2006, Vinegar: Medicinal uses and antiglycemic effect, MedGenMed. 8(2): 61.

[43] Bhat, S.V., Akhtar, R. and Amin, T., 2014, An overview on the biological production of vinegar, Int. J. Fermented Foods. 3(2): 139-155.

[44] Fregapane, G., Rubio-Fernández, H. and Salvador, M., 2001, Influence of fermentation temperature on semi-continuous acetification for wine vinegar production, Eur. Food. Res. Technol. 213(1): 62–66.

[45] Arifuzzaman, M., Hasan, M.Z., Rahman, S.M.B. and Pramanik, M.K., 2014, Isolation and characterization of *Acetobacter* and *Gluconobacter* spp from sugarcane and rotten fruits, Biosci. 8(9): 359-365.

[46] Qi, Z., Yang, H., Xia, X., Xin, Y., Zhang, L., Wang, W. and Yu, X., 2013, A protocol for optimization vinegar fermentation according to the ratio of oxygen consumption versus acid yield, J. Food Eng. 116(2): 304–309.

[47] Park, Y.S., Ohtake, H., Fukaya, M., Okumura, H., Kawamura, Y. and Toda, K., 1989, Effects of dissolved oxygen and acetic acid concentrations on acetic acid production in continuous culture of *Acetobacter aceti*, J. Ferment. Bioeng. 68(2): 96-101.

[48] Rubio-Fernández, H., Salvador, M.D. and Fregapane, G., 2004, Influence of fermentation oxygen partial pressure on semicontinuous acetification for wine vinegar production, Eur. Food. Res. Technol. 219(4): 393–397.

[49] Wongsudalak, W. and Nooniam, T., 2013, Development of fermented vinegar from tangerine peels and pomaces, SDU Res. J. 6(1): 159-170. (in Thai)

[50] Budak, N.H., 2015, Total antioxidant activity and phenolic contents with advanced analytical techniques in the mulberry vinegar formation process, Fruit Sci. 2(2): 27-31.

[51] Ozturk, I., Caliskan, O., Tornuk, F., Ozcan, N., Yalcin, H., Baslar, M. and Sagdic, O., 2015, Antioxidant, antimicrobial, mineral, volatile, physicochemical and microbiological characteristics of traditional home-made Turkish vinegars, LWT-Food Sci. Technol. 63(1): 144-151.

[52] Sáiz-Abajo, M.J., Gonzáles-Sáiz, J.M. and Pizarro C., 2004, Classification of wine and alcohol vinegar samples based on near-infrared spectroscopy. Feasibility study on the detection of adulterated vinegar samples, J. Agric. Food Chem. 52(25): 7711–7719.

[53] Joshi, V.K. and Sharma, S., 2009, Cider Vinegar: Microbiology, Technology and Quality, pp. 179-207, In Solieri, L. and Giudici, P. (Eds.), Vinegars of the World, Springer, Milano.

[54] Chen, F., Li, L., Qu, J. and Chen, C., 2009, Cereal Vinegars Made by Solid-State Fermentation in China, pp. 243-259, In Solieri, L. and Giudici, P. (Eds.), Vinegars of the World, Springer, Milano.

[55] Kim, G.R., Yoon, S.R., Lee, J.H., Yeo, S.H., Jeong, Y.J., Young, Y.K. and Kwon, J.H., 2010, Physicochemical properties of and volatile components in commercial fruit vinegars, Korean J. Food Preserv. 17(5): 616-624.

[56] Kang, M., HA, J.H. and LEE, Y., 2020, Physicochemical properties, antioxidant activities and sensory characteristics of commercial gape vinegars during long-term storage, Food Sci. Technol, Campinas, 40(4): 909-916.

[57] Chantima, N., Thanthong, S. and Srisuwaramat, B., 2015, Production and qualification analysis of vinegar from banana, Sci. Technol. Nakhon Sawan Rajabhat University J. 7(7): 57-76. (in Thai)

[58] Cruz, M., Correia, A.C., Gonc¸alves, F.J. and Jorda˜o, A.M., 2018, Phenolic composition and total antioxidant capacity analysis of red wine vinegars commercialized in Portuguese market, Ciência Téc. Vitiv. 33(2): 102-115.

[59] Sengun, I.Y., Kilic, G. and Ozturk, B., 2019, Screening physicochemical, microbiological and bioactive properties of fruit vinegars produced from various raw materials, Food Sci. Biotechnol. 29(3): 401–408.

[60] Petchpoung, K., Soiklom, S., Siri-anusornsak, W., Khlangsap, N., Tara, A. and Maneeboon, T., 2020, Predicting antioxidant activity of wood vinegar using color and spectrophotometric parameters, MethodsX. 7: 100783.

[61] López, F., Pescador, P., Güell, C., Morales, M.L., García-Parrilla, M.C. and Troncoso, A.M., 2005, Industrial vinegar clarification by cross-flow microfiltration: Effect on

colour and polyphenol content, J. Food Eng. 68(1): 133–136.

[62] Tesfaye, W., Morales, M.L., García-Parrilla, M.C. and Troncoso, A.M., 2002, Wine vinegar: Technology, authenticity and quality evaluation, Trends Food Sci. Technol. 13(1): 12–21.

[63] Wiriyachari, P., 2002, Sensory Evaluation, 1st Ed., Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Chiang Mai, 542 p. (in Thai)

[64] Hutkins, R.W. 2018. Microbiology and Technology of Fermented Foods, 2nd Ed., Wiley-Blackwell Publishing, Chicago, USA, 624 p.

[65] Ubeda, C., Callejón, R.M., Troncoso, A.M. and Morales, M.L., 2017, Consumer acceptance of new strawberry vinegars by preference mapping, Int. J. Food Prop. 20(11): 2760-2771.