



การศึกษากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากโคจิข้าวเหนียว

Study of Fermented Vinegar from Glutinous Rice Koji

ชินจิต จันทจรูญพงษ์^{1*} นัศดา ราชนิคม¹ และ ณัฐวัลย์ พลพันธุ์¹

¹ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนาการ คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร

59 หมู่ 1 ตำบลเชิงเครือ อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร 47000

*E-mail: csncjc@ku.ac.th

บทคัดย่อ

น้ำส้มสายชูเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักซึ่งนิยมใช้เป็นเครื่องปรุงรสอาหาร และยังสามารถนำมาแปรรูปเป็นเครื่องดื่ม วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากโคจิข้าวเหนียวโดยวิธีการหมักแบบดั้งเดิม โดยเริ่มต้นจากการทำโคจิข้าวได้แก่ ข้าวเหนียวขาว ข้าวเหนียวดำ และข้าวเหนียวดำ โดยใช้สปอร์ *Aspergillus oryzae* L 0.1% (w/w) จากนั้นนำโคจินำมาผ่านกระบวนการ Saccharification ที่อุณหภูมิ 60 °C กระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 1% (w/w) แล้วจึงเติม *Acetobacter aceti* 10% (v/v) ในขั้นตอนการหมักกรดแอซิติก จากการทดลองพบว่าการใช้ข้าวเหนียวดำเป็นวัตถุดิบมีความเหมาะสมมากกว่าข้าวเหนียวชนิดอื่น เนื่องจากให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 0.821 unit/g dry weight เมื่อใช้เวลามั่มโคจิ 3 วัน และเมื่อผ่านกระบวนการ Saccharification ที่ 60 °C เป็นเวลา 25 ชั่วโมง จะมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้สูงสุด 20 °Brix ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด 14% เมื่อผ่านกระบวนการหมักเป็นเวลา 5 วัน และให้ปริมาณกรดแอซิติกสูงสุด 5.16% เมื่อผ่านกระบวนการหมักเป็นเวลา 3 วัน อย่างไรก็ตาม ข้าวเหนียวทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักได้เนื่องจากให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ตามที่มีมาตรฐานกำหนด

คำสำคัญ: น้ำส้มสายชูหมักจากข้าว โคจิ ข้าวเหนียว

Received: August 10, 2017

Revised: January 22, 2018

Accepted: February 06, 2018

Abstract

Vinegar is fermented food product. It has been used as food condiment and also beverage. The aim of this study was to study the production of traditional fermented glutinous rice vinegar. Fermentation of glutinous rice vinegar started from rice koji production using 0.1 % (w/w) of *Aspergillus oryzae* L spore, followed by saccharification at 60 °C. After that, alcohol fermentation using 1 % (w/w) of *Sacharomyces cerevisiae*, and acetic acid fermentation using 10% (v/v) of *Acetobacter aceti* were processed, respectively. There were 3 types of rice used in the experiment, hang glutinous rice, white glutinous rice, and black glutinous rice. The result showed that black glutinous rice showed high potential to use for fermented rice vinegar. Using black glutinous rice showed high amylase activity at 0.821 unit / g dry weight at 3 days of koji production. It also showed the highest total soluble solid at 20 °Brix after 25 h of saccharification and 14 % alcohol content after 5 days of alcohol fermentation. Finally, vinegar from black glutinous rice contained 5.16% of acetic acid after 3 days of acetic acid fermentation. However, all of glutinous rice used in this study could be used as raw material of glutinous rice vinegar fermentation because they can provide product quality reach to the standard.

Keywords: Fermented rice vinegar, Koji, Glutinous rice

1. บทนำ

น้ำส้มสายชูหมักคือน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักเมล็ดธัญพืช ผลไม้ น้ำตาล หรือกากน้ำตาล (Molass) การผลิตน้ำส้มสายชูหมักโดยทั่วไปหากใช้วัตถุดิบที่มีน้ำตาลสูงเช่น ผลไม้ จะเป็นการหมักสองขั้นตอน คือ การหมักน้ำตาลให้เกิดแอลกอฮอล์ (Alcoholic fermentation) โดยใช้ยีสต์ (Yeast) ซึ่งมักจะมีการเติมน้ำตาลให้มีปริมาณที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูง ตามด้วยการหมักแอลกอฮอล์ให้เกิดกรดแอซิติก (Acetic acid fermentation) ด้วยแบคทีเรียในกลุ่ม *Acetobacter* และ *Gluconobacter* ในสภาวะที่มีออกซิเจน อย่างไรก็ตาม การหมักน้ำส้มสายชูซึ่งใช้วัตถุดิบที่มีแป้งสูง และเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูก เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด และข้าว จะเป็นการหมักแบบสามขั้นตอนโดยจะเริ่มจากการหมักวัตถุดิบประเภท

แป้งด้วยเชื้อรา เช่น *Aspergillus oryzae* เพื่อให้เกิดการย่อยสลายแป้งหรือคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดเล็กลงเพื่อให้เหมาะกับการหมักแอลกอฮอล์ในขั้นตอนต่อไป จากนั้นจึงเป็นการหมักแอลกอฮอล์ด้วยเชื้อยีสต์ และการหมักกรดน้ำส้มด้วยแบคทีเรียกลุ่ม *Acetobacter* ตามลำดับ [1]

มาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูที่กำหนดโดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรมกำหนดว่า น้ำส้มสายชูต้องเป็นของเหลวใส อาจตกตะกอนเมื่อบวมทิ้งไว้ มีสีที่ติดตามธรรมชาติของน้ำส้มสายชูหมัก มีกลิ่นของกรดอะซิติกและอาจมีกลิ่นของวัตถุดิบที่หมักอยู่ด้วยก็ได้ ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ รวมทั้งต้องไม่พบสารปนเปื้อนตามที่กำหนด ห้ามใช้สีสังเคราะห์ทุกชนิด หากมีการแต่งสี ให้ใช้น้ำตาลเคี้ยวไหม้เท่านั้น หากมีการ

ใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ให้ใช้ได้ไม่เกิน 70 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม ปริมาณกรดแอสซิดิก ต้องไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้องไม่พบกรด กำมะถันหรือกรดเรอัสระ ปริมาณเมทานอลต้องไม่เกิน 420 มิลลิกรัมต่อลิตร [2]

ข้าวเหนียวเป็นที่นิยมบริโภคในประเทศไทย และเป็นอาหารหลักของประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ นอกจากการบริโภคโดยตรงแล้วยังมีการนำข้าวเหนียวมาเป็นวัตถุดิบในการแปรรูปอาหารในระดับอุตสาหกรรมด้วย ข้าวเหนียวมี 2 สี คือ สีขาวและสีดำ โดยเหนียวดำจะมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์คือ Oligomeric Proanthocyanidin หรือ “โอพีซี” (OPC) มีสรรพคุณช่วยชะลอการแก่ก่อนวัย และความเสื่อมถอยของร่างกาย นอกจากนี้ในข้าวเหนียวยังมีกรดไขมันดี และกรดโฟลิก การนำข้าวเหนียวดำไปทำข้าวหมากจะทำให้ได้วิตามินบี 12 ช่วยป้องกันโรคโลหิตจาง [3]

ข้าวฮางเป็นการแปรรูปข้าวจากภูมิปัญญาท้องถิ่นของชาวสกลนคร เป็นการนำข้าวที่ยังไม่แก่เป็นข้าวสาร มักเป็นข้าวระยะน้ำนมแก่เกินกว่าจะเป็นข้าวเฒ่าแต่ยังไม่สุกพอที่จะถึงระยะการเก็บเกี่ยว โดยการนำเอาข้าวเปลือกมาแช่น้ำเพื่อกระตุ้นให้สารอาหารต่างๆจากเปลือกข้าวซึมเข้าไปในเมล็ดข้าว และนำมานึ่งเพื่อจัดเก็บสารอาหารให้คงไว้แล้วนำข้าวเปลือกตากให้แห้ง สีดด้วยเครื่องสีข้าวกะเทาะเปลือก ทำได้ทั้งข้าวเจ้าและข้าวเหนียว เป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นในการแปรรูปข้าวเปลือกที่มีการเก็บเกี่ยวก่อนกำหนดให้มีอายุการเก็บรักษานานขึ้น ซึ่งปัจจุบันกลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มมูลค่าให้กับประชาชนในท้องถิ่น ปัจจุบันการแปรรูปข้าวฮางสามารถใช้ได้ทั้งข้าวหอมมะลิและข้าวเหนียวพันธุ์ กข.6 [4] แม้ว่าข้าวเหนียวและข้าวฮางจะมีการปลูก

และนิยมบริโภคอย่างแพร่หลายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ยังมีผลผลิตบางส่วนที่ไม่ได้คุณภาพตามที่ผู้ซื้อข้าวสารต้องการ เช่นเมล็ดข้าวไม่เต็มเม็ด ขนาดสม่ำเสมอ จึงมีราคาขายต่ำกว่าข้าวชั้นคุณภาพอื่น การแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มมูลค่า จึงเป็นการส่งเสริมอาชีพและสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกร

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการศึกษากรรมวิธีการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากโคจิข้าวเหนียว โดยใช้ข้าวฮาง ข้าวเหนียวขาว และข้าวเหนียวดำด้วยวิธีการหมักแบบดั้งเดิม เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากข้าวฮาง และข้าวเหนียวที่มีการผลิตมากในพื้นที่จังหวัดสกลนคร และจังหวัดใกล้เคียง เพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์และเป็นทางเลือกให้แก่กลุ่มผู้ผลิต และผู้บริโภค

2. วัตถุประสงค์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

ผงสปอร์ *Aspergillus oryzae* L. ที่ใช้ในการทดลอง ได้รับจาก Department of Food Science, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung Taiwan เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* ได้รับจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร

นำกล้ายีสต์ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast Maintenance Medium (YM Medium) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM Medium ใหม่ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C 24 ชั่วโมง เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อ

นำกล้ายเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) บ่มที่

อุณหภูมิ 30 °C 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ใหม่ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C 24 ชั่วโมง เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อ

2.2 ขั้นตอนการเตรียมโคจิข้าว

ข้าวที่ใช้ในการทดลอง 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวเหนียวข้าวสาง ข้าวเหนียวดำ และ ข้าวเหนียวขาว นำข้าวแต่ละชนิด 500 กรัม ล้างให้สะอาดและแช่น้ำเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนึ่งข้าวให้สุกเป็นเวลา 40 นาที ผสมสปอร์ *Aspergillus oryzae* L 0.1% (w/w) และบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างโคจิข้าวเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ โปรติเอส กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณ Reducing sugar ค่า pH และความชื้น [5]

2.3 ขั้นตอน Saccharification

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมในการบ่มโคจิข้าวแล้ว ทำการเตรียมโคจิตามสภาวะที่ได้จากข้อ 2.2 แล้วนำมาผ่านกระบวนการ Saccharification โดยนำโคจิผสมกับน้ำสะอาดอัตราส่วน 1:3 ปั่นให้ละเอียด จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ Reducing sugar ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ และค่า pH

2.4 ขั้นตอนการหมักแอลกอฮอล์

เตรียม โคจิ ซึ่ง ผ่าน กระบวนการ Saccharification ตามข้อ 2.2 และ 2.3 แล้วมาผสมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 1% (w/w) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ และปริมาณ Reducing sugar

2.5 ขั้นตอนการหมักกรดแอซิดิก

เตรียมตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2.2, 2.3 และ 2.4 มาใช้ในขั้นตอนนี้ โดยเติมเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* 10% (v/v) และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณกรดแอซิดิกโดยวิธีไทเทรต ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ และค่า pH [6]

2.6 วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

2.6.1 การสกัดเอนไซม์

นำโคจิข้าว ผสมกับ Phosphate buffer pH 6.9 อัตราส่วน 1:2 เขย่าด้วยเครื่องเขย่า อัตราเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกตะกอนโดยใช้ความเร็วที่ 10xg อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป [7]

2.6.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์-อะไมเลส

ปิเปตน้ำแป้ง (1.0 % Starch soluble) และ สารสกัดเอนไซม์มาอย่างละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 10 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เมื่อครบเวลาที่กำหนด ให้เติมสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที แล้วทำให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm โดยเปรียบเทียบกับ Blank [5]

2.6.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

ปิเปตสารละลายเคซีน (Casein solution, pH 6.9) มา 5 มิลลิลิตร และ ปิเปต สารสกัดเอนไซม์ มา 1 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา

10 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้บีบเปิด Trichloroacetic acid 5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 30 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วบีบเปิดสิ่งที่กรองได้มา 2 มิลลิลิตร เติม Na_2CO_3 5 มิลลิลิตร และเติม Folin – Ciocalteu reagent 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm โดยเปรียบเทียบกับ Blank [8]

2.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณ Reducing sugar

บีบเปิด สารสกัดเอนไซม์ มา 2 มิลลิลิตร และ DNS 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที และทำให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm โดยเปรียบเทียบกับ Blank

2.6.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแอซิก

นำตัวอย่าง 3 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Flask แล้วเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH จนสารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู อ่านค่าปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน NaOH ที่ใช้ในการไทเทรตแล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์กรดแอซิก [6]

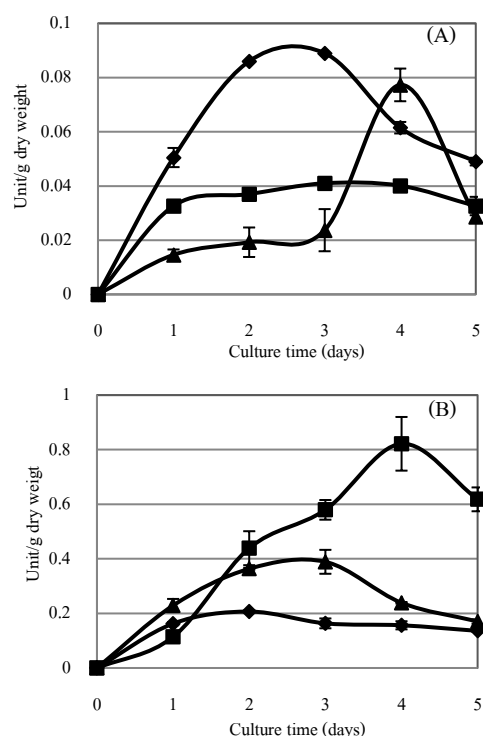
2.6.6 การวิเคราะห์ค่า pH และปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ในน้ำ

การวิเคราะห์ค่า pH ทำได้โดยใช้เครื่องวัด pH สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้นั้นทำได้โดยใช้ Hand refractometer (RHB-32ATC, Unbranded)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีในขั้นตอนการเตรียมโคจิข้าว

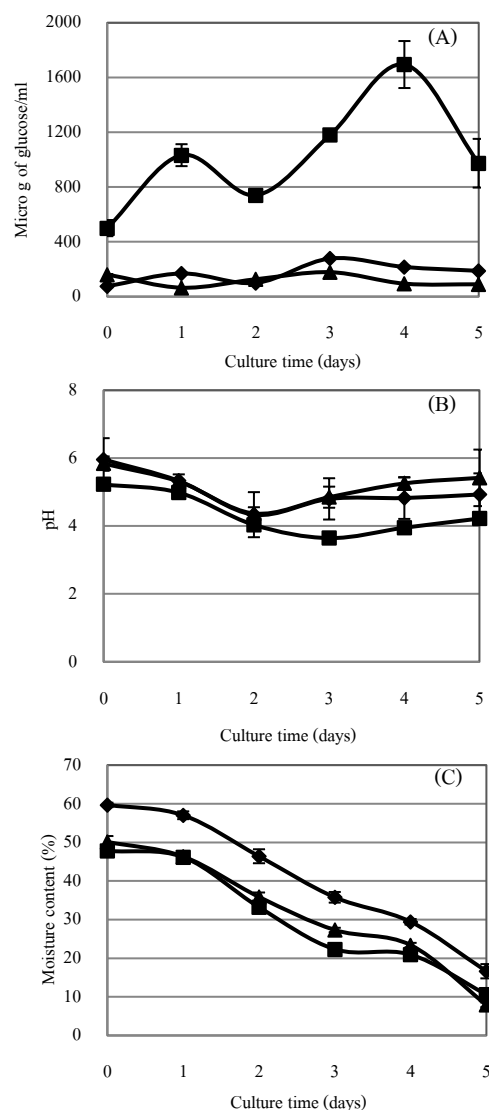
การผลิตโคจิข้าวจากข้าวเหนียวข้าวสาง ข้าวเหนียวดำ และข้าวเหนียวขาว พบว่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก และในวันที่ 3 ของการบ่มโคจิข้าวสางมีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด 0.089 unit/g dry weight และข้าวเหนียวดำมีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ 0.041 unit/g dry weight อย่างไรก็ตาม โคจิข้าวเหนียวขาวใช้เวลานานถึง 4 วัน จึงจะมีค่า กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ 0.077 unit/g dry weight (รูปที่ 1A)



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (A) และเอนไซม์อะไมเลส (B) ระหว่างการบ่มโคจิข้าวเหนียวข้าวสาง(◆), ข้าวเหนียวดำ(■) และข้าวเหนียวขาว (▲)

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสในระหว่างการผลิตโคจิข้าวพบว่า มีค่าเพิ่มขึ้นในช่วง 3 วันแรกของการบ่มโคจิ เช่นเดียวกัน โดยโคจิข้าวฮางมีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดที่ 0.206 unit/g dry weight ในวันที่ 2 โคจิข้าวเหนียวขาวมีค่าสูงสุดที่ 0.389 unit/g dry weight ในวันที่ 3 โคจิข้าวเหนียวดำมีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดในวันที่ 4 มีค่า 0.821 unit/g dry weight (รูปที่ 1B) การที่กิจกรรมเอนไซม์มีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นเนื่องจาก *Aspergillus oryzae* จัดเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้ เมื่อถึงจุดสูงสุดของกระบวนการผลิตเอนไซม์ เชื้อราจะค่อยๆ ลดการผลิตเอนไซม์ลง [9] นอกจากนี้ ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chancharoonpong และคณะ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นและลดลงเมื่อระยะเวลาในการบ่มโคจิเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับระยะการเจริญของเชื้อรา โดยการผลิตเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในช่วงที่เชื้อราเริ่มการสร้างสปอร์ [7]

สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณ Reducing sugar ในระหว่างการบ่มโคจิข้าว พบว่าปริมาณ Reducing sugar ในโคจิข้าวเหนียวดำมีค่ามากกว่าข้าวชนิดอื่น โดยปริมาณ Reducing sugar มีแนวโน้มลดลงในช่วงแรกของการบ่มโคจิ จากนั้นจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น (รูปที่ 2A) เนื่องจากในช่วงแรกเชื้อรามีการใช้ Reducing sugar ในการเจริญ และหลังจากนั้นในช่วงที่ค่า Reducing sugar เพิ่มขึ้นสูงสุด เนื่องจากเชื้อราผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยโมเลกุลของสตาร์ชให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide) และน้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharide) [1] ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ Reducing sugar (A), pH (B) และ ความชื้น (C) ระหว่างการบ่มโคจิข้าวเหนียวข้าวฮาง (◆), ข้าวเหนียวดำ (■) และข้าวเหนียวขาว (▲)

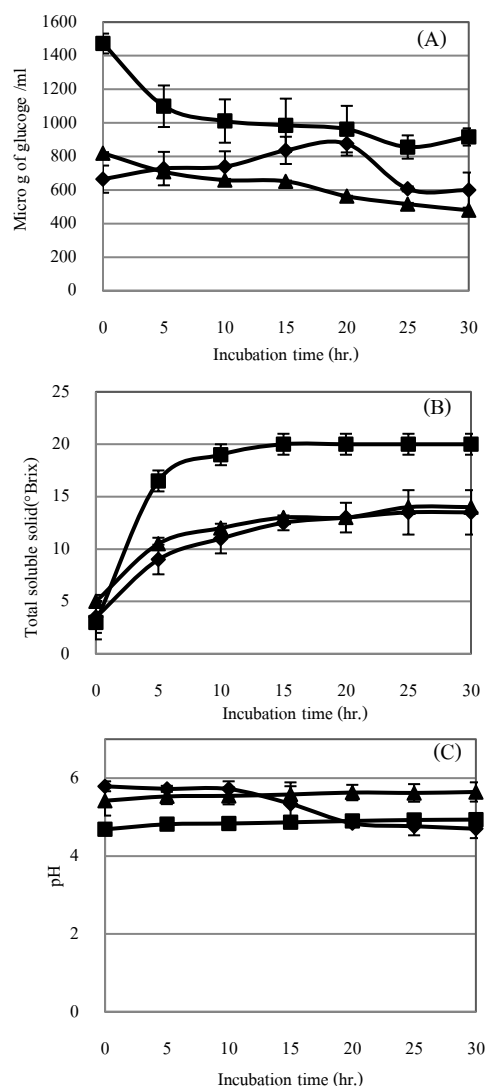
รูปที่ 2B แสดงถึงผลการเปลี่ยนแปลงค่ากรด – ด่าง (pH) ระหว่างการบ่มโคจิข้าว พบได้ว่าโคจิข้าวฮาง ข้าวเหนียวดำ และข้าวเหนียวขาว มีค่า pH เริ่มต้นที่ 5.92, 5.22 และ 5.84 ตามลำดับ หลังจากวันที่ 2 ของการบ่มโคจิข้าวมีค่า pH ลดลงแล้ว

เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนมีค่าคงที่ 4.8, 3.9 และ 5.4 เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการบ่มตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเพิ่มของค่า pH ระหว่างการหมัก เนื่องจากเชื้อรา มีกิจกรรมเมแทบอลิซึมโดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตโปรตีนสารต่าง ๆ [7]

รูปที่ 2C แสดงค่าความชื้นในระหว่างการบ่มโคจิข้าวฮาง ข้าวเหนียวดำ และข้าวเหนียวขาว โดยค่าความชื้นลดลงอย่างต่อเนื่อง จาก 59.69% เป็น 16.63%, 47.79% เป็น 10.59% และ 50.20% เป็น 7.92% ตามลำดับ เนื่องจากเชื้อราใช้น้ำในโคจิข้าวในการเจริญ [1]

3.2 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีในกระบวนการ Saccharification

การศึกษากระบวนการ Saccharification หลังจากการบ่มโคจิข้าว ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นการไฮโดรไลซ์โมเลกุลของสตาร์ช ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว [1] เพื่อให้มีปริมาณเพียงพอในขั้นตอนการหมักแอลกอฮอล์ในขั้นตอนต่อไป จากรูปที่ 3A พบว่าปริมาณ Reducing sugar มีค่าลดลงในช่วงเวลาชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 5 หลังจากนั้นปริมาณ Reducing sugar จะคงที่ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของแข็งที่ละลายได้ จากรูปที่ 3B พบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายเพิ่มขึ้น โดยโคจิข้าวฮางมีค่าสูงสุดที่ 13.5 °Brix ที่ 20 ชั่วโมง ใน โคจิข้าวเหนียวดำมีค่าสูงสุดที่ 20 °Brix ที่ 25 ชั่วโมง และในโคจิข้าวเหนียวขาวมีค่าสูงสุดที่ 14 °Brix ที่ 25 ชั่วโมงหลังจากนั้นปริมาณของแข็งที่ละลายได้จะมีค่าคงที่ เนื่องจากข้าวมีแป้งเป็น โพลีแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกด้วยพันธะไกลโคไซด์ ในระหว่างการบ่มจึงเกิดการสลายตัวของพันธะไกลโคไซด์ จึงทำให้ โมโนแซคคาไรด์หรือไดแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้เพิ่มขึ้น



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ Reducing sugar (A), ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (B) และ pH (C) ระหว่างกระบวนการ Saccharification ของโคจิข้าวเหนียวข้าวฮาง (◆), ข้าวเหนียวดำ (■) และข้าวเหนียวขาว (▲)

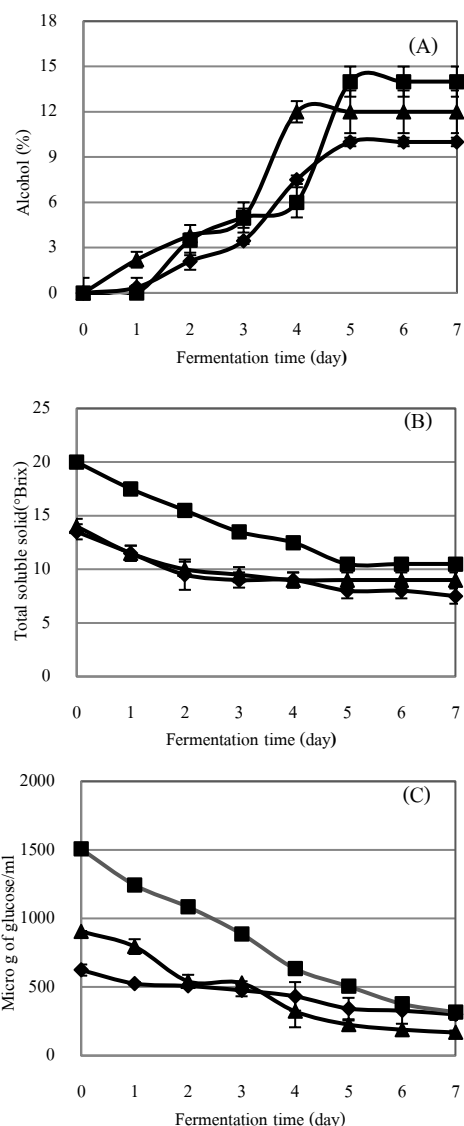
จนกระทั่งปริมาณของแข็งที่ละลายได้มีค่าคงที่เพราะเกิดการหยุดการสลายตัวของพันธะไกลโคไซด์ [1] แต่เมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่างกระบวนการ Saccharification พบว่า ค่า pH มีแนวโน้มคงที่ (รูปที่ 3C)

3.3 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีใน ขั้นตอนการหมักแอลกอฮอล์

การหมักแอลกอฮอล์ในโคจิข้าวสาง พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด 10% ในวันที่ 5 ในโคจิข้าวเหนียวดำพบปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น 14% ในวันที่ 5 และในโคจิข้าวเหนียวขาวพบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นสูงสุด 12% ในวันที่ 4 ของการหมักหลังจากนั้นปริมาณแอลกอฮอล์ในทุกตัวอย่างมีค่าคงที่ (รูปที่ 4A) การที่ปริมาณแอลกอฮอล์มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น เนื่องมาจากในระยะแรกของการหมักนั้น ยีสต์มีการแตกหน่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นยีสต์จะทำให้เกิดกระบวนการหมัก (Alcoholic – fermentation) จึงทำให้ยีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์ [10]

การที่ปริมาณแอลกอฮอล์จากการหมักโคจิข้าวเหนียวมีค่าสูงเนื่องจากในข้าวเหนียวประกอบไปด้วยอะไมโลเพคตินเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นโมเลกุลของกลูโคสที่ต่อเป็นสายยาวและแตกกิ่งก้าน ละลายน้ำได้ จึงทำให้ยีสต์สามารถนำอะไมโลเพคตินในข้าวเหนียวมาใช้ในการหมักให้เกิดเป็นเอทานอลได้ง่าย [11] นอกจากนี้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ของข้าวเหนียวดำที่ได้จากกระบวนการ Saccharification มีค่าสูงจึงเป็นปัจจัยที่ทำให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงกว่าข้าวอีกสองชนิด

การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในโคจิข้าวสางมีปริมาณลดลงจาก 13.5 เป็น 7.5 °Brix ในโคจิข้าวเหนียวดำ และโคจิข้าวเหนียวขาวก็มีปริมาณลดลงจาก 20 เป็น 10.5 °Brix และ 14 เป็น 9 °Brix



รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ (A), ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (B) และ Reducing sugar (C) ระหว่างกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ของโคจิข้าวเหนียวข้าวสาง (♦), ข้าวเหนียวดำ (■) และข้าวเหนียวขาว (▲)

ตามลำดับ (รูปที่ 4B) ซึ่งการที่ปริมาณของแข็งที่ละลายได้มีแนวโน้มที่ลดลงเนื่องมาจากในระหว่างการหมัก ยีสต์ *S. cerevisiae* มีการเปลี่ยน

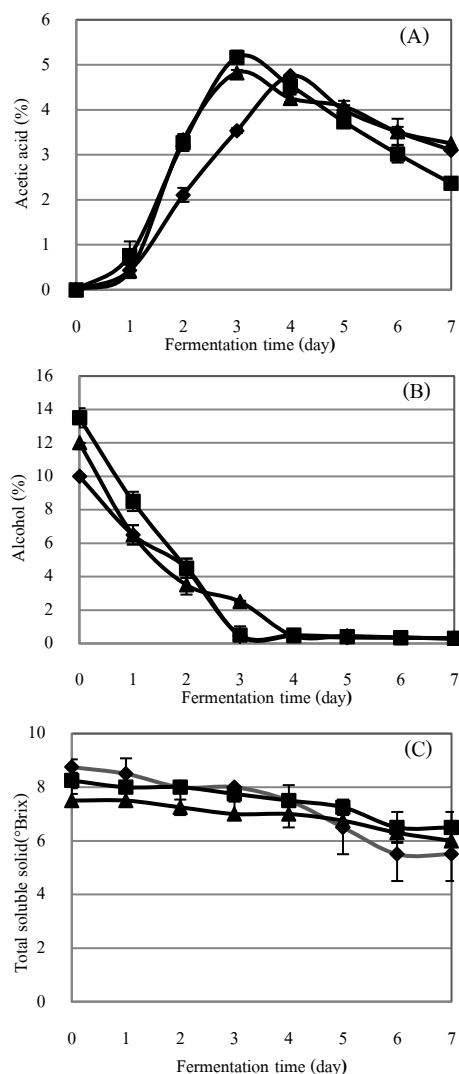
น้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ในสภาพที่มีออกซิเจน ดังนั้นจึงส่งผลให้ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้มีค่าลดลง [12]

การเปลี่ยนแปลงปริมาณ Reducing sugar ในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ พบว่าปริมาณ Reducing sugar ในโคจิข้าวสาง มีค่าลดลงจาก 623.7 เป็น 300 μg of glucose/ml ในโคจิข้าวเหนียวดำ มีค่าลดลงจาก 1506.2 เป็น 316.35 μg of glucose/ml และในข้าวเหนียวขาวมีค่าลดลงจาก 905.15 เป็น 168.29 μg of glucose/ml เมื่อผ่านการหมักเป็นเวลา 7 วัน (รูปที่ 4C) การที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มที่ลดลงเนื่องจากยีสต์ จะนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ [13]

3.4 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีในขั้นตอนการหมักกรดน้ำส้ม

ระหว่างการหมักพบว่าปริมาณกรดแอซิดิกในโคจิข้าวสางมีปริมาณกรดแอซิดิกสูงสุดในวันที่ 4 มีค่า 4.8% ในโคจิข้าวเหนียวดำมีปริมาณกรดแอซิดิกสูงสุดในวันที่ 3 มีค่า 5.2% และในโคจิข้าวเหนียวขาวมีปริมาณกรดแอซิดิกสูงสุดในวันที่ 3 มีค่า 4.8% (รูปที่ 5A) ซึ่งจะเห็นได้ว่าโคจิข้าวเหนียวดำและข้าวเหนียวขาวเกิดกระบวนการหมักกรดน้ำส้มอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรก ส่วนโคจิข้าวสางจะมีปริมาณกรดแอซิดิกสูงสุดในวันที่ 4 ระยะเวลาดังกล่าวของข้าวทั้ง 3 ชนิด จึงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักกรดน้ำส้มเพื่อให้ได้น้ำส้มสายชูหมักที่ได้มาตรฐาน เนื่องจากเชื้อ *A. aceti* สามารถเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดแอซิดิกในสภาพที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 15-34 °C [12] ซึ่งถ้าปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอและมีความเข้มข้นของกรดแอซิดิกสูง และเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นจะทำให้ปริมาณกรด แอซิดิกลดลงเนื่องจาก เกิดการออกซิเดชันเกิน (Over-Oxidation)

เป็นผลทำให้กรดแอซิดิกเปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ดังนั้นออกซิเจนจึงเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดปฏิกิริยานี้ [14]



รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแอซิดิก (A), ปริมาณแอลกอฮอล์ (B) และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (C) ระหว่างกระบวนการหมักกรดน้ำส้มของโคจิข้าวสางข้าวเหนียว (◆), ข้าวเหนียวดำ (■) และข้าวเหนียวขาว (▲)

การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ระหว่างการหมักกรดน้ำส้มพบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ค่อย ๆ ลดลง (รูปที่ 5B) เนื่องจากกรดแอซิดิกเกิดจากกระบวนการหมักเอทิลแอลกอฮอล์ด้วยแบคทีเรีย *Acetobacter* ซึ่งสามารถออกซิไดซ์เอทิลแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดแอซิดิกในสภาวะที่มีอากาศ [1] สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายได้ระหว่างการหมักกรดน้ำส้มพบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้มีแนวโน้มลดลงจากนั้นจะคงที่ (รูปที่ 5B) เนื่องจากในกระบวนการหมักกรดน้ำส้มนี้ เชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* สามารถออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดแอซิดิกได้ แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์น้ำตาลได้ จึงทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้เกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยในระหว่างกระบวนการหมักกรดแอซิดิก [12]

4. สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเหนียวพบว่า การใช้ *A. oryzae* ในกระบวนการผลิตโคจิจากข้าวเหนียวค่านั้นให้ประสิทธิภาพในการหมักน้ำส้มสายชูได้ดี โดยให้ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ ปริมาณแอลกอฮอล์ และปริมาณกรดแอซิดิกสูงกว่าการใช้ข้าวเหนียวชนิดอื่น

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหารอนุภูมิภาคุ่มน้ำโขง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Center for Advanced Studies on Agriculture and Food in Greater Mekong Subregion (CASAF-GMS), Kasetsart University, Thailand.)

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] จารุวรรณ มณีสรี. เทคโนโลยีอาหารหมัก. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์โฟฟเพช. 2551.
- [2] สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำส้มสายชูหมัก. มอก. 326-2547. 2547.
- [3] กฤษดา ศิรามพุช. 2552. สรรพคุณข้าวเหนียว. แหล่งที่มา: <http://kulc.lib.ku.ac.th/blog/?p=946>, 4 กันยายน 2558.
- [4] วุฒิพงษ์ ฮามวงศ์. 2557. ข้าวฮาง. แหล่งที่มา: <http://natres.skc.rmuti.ac.th/kaowhang.pdf>. 3 กันยายน 2558.
- [5] Chutmanop J., Chuichulcherm S., Chisti Y. and Srinophakun P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *J Chem Technol Biotechnol*. 2008. 83 : 1012-1018.
- [6] AOAC. Official Method of Analysis of AOAC International Volume 2, 17th ed., Association of official chemists, Inc., Arlington, Virginia, U.S.A. 2000.
- [7] Chancharoonpong C., Hsieh P.C. and Sheu S.C. Enzyme production and growth of *Aspergillus oryzae* S on soybean koji fermentation. *APCBEE Procedia* 2012. 2 : 57-61.

- [8] Garcia-Gomez M.J., Ochoa S.H., Corral O.L. and Barragan L.A.P. Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem*, 2009. 112 : 604-608.
- [9] รวิศรา รื่นไวย และ อนุวัฒน์ เตชะฤทธิ์. 2548. การเพิ่มผลผลิตการสังเคราะห์โปรตีนในรา *Aspergillus oryzae* โดยการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส. แหล่งที่มา: <http://www.kmutt.ac.th/rippc/hetero2.htm>. 5 พฤศจิกายน 2558.
- [10] ไพบูลย์ ด้านวิรุทัย และพัฒนา เหล่าไพบูลย์. 2548. ไขว้ผลไม้และสาโท ผิดด้วยความมั่นใจได้อย่างไร. ศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, ขอนแก่น. 2548.
- [11] กฤษณา ชูติมา. 2549. โครงสร้างอะไมโดสและอะไมโดเพคติน. แหล่งที่มา: www.biomiami.edu, 14 พฤศจิกายน 2558.
- [12] ดุษณี ชนะบริพัฒน์. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 2546.
- [13] Yuan D., Rao K., Relue P. and Varanasi S. Fermentation of biomass sugars to ethanol using native industrial yeast strains. *Bioresour Technol*. 2011. 102 : 3246-3253.
- [14] สุมณฑา วัฒนสินธุ์. จุลชีววิทยาทางอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ. 2545.