การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเหนียวดำกล้อง

Development of Fermented Vinegar from Black Glutinous Brown Rice Process

ประวีณา ลาภา[1] เพ็ญขวัญ ชมปรีดา[1] และ วิชัย หฤทัยธนาสันติ์[1]

Praveena Lapa,[1] Penkwan Chompreeda[1] and Vichai Haruthaithanasan[1]

Abstract

Process development of new healthy fermented vinegar from black glutinous brown rice (BGBR) was performed. The aim of this study was to value-added BGBR. There are three steps of making fermented vinegar. The first step was done under saccharification from steamed BGBR which was soaked in water at the ratio of 1:1.25 for 4 hrs. Then, it was mixed with 0.4% koji of *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 and fermented for 3 days to obtain reducing sugar of 39.6%. Secondly, BGBR wine was made from the mixture of saccharified BGBR liquid and coconut water which was fermented by *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049 for 8 days to obtain alcohol of 11.5% v/v. Lastly, vinegar was made from BGBR wine which was adjusted to 5% alcohol, pH 5.5 and fermented with *Acetobacter aceti* TISTR 354 by shaking method for 3 days. The vinegar was clear, light orange color and contained 5.48 % acetic acid with pH 3.38 and 5.01 mg/100ml cyanidin-3-glucoside.

Keywords: Fermented vinegar, Black glutinous brown rice

[1]ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Products Development, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

รับเรื่อง : เมษายน 2554

Corresponding author: penkwan.c@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเหนียวดำกล้อง มีเป้าหมายเพื่อเพิ่มมูลค่าและแนวทางการใช้ประโยชน์จากข้าวเหนียวดำกล้องโดยนำมาผลิตเป็นน้ำส้มสายชูหมักเพื่อสุขภาพทางเลือกใหม่ ขั้นตอนในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนแรก เป็นการย่อยข้าวเหนียวดำให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ โดยนำข้าวเหนียวดำนึ่งที่ผ่านการแช่น้ำในอัตราส่วนข้าวต่อน้ำเท่ากับ 1:1.25 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มาผสมกับโคจิของเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ปริมาณ 0.4% ของน้ำหนักข้าวเหนียวดิบ ในการย่อยข้าวเหนียวดำ เป็นเวลา 3 วัน จะได้น้ำตาลรีดิวซ์ 39.6% ขั้นตอนที่สอง เป็นการหมักไวน์จากสารละลายน้ำตาลที่ได้ โดยนำสารละลายที่ได้มาผสมกับน้ำมะพร้าวหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049 เป็นเวลา 8 วัน จะได้ไวน์ข้าวเหนียวดำที่มีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 11.5% ขั้นตอนสุดท้าย คือ การหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ ด้วยการปรับปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นในไวน์ข้าวเหนียวดำให้เป็น 5% ค่า pH เท่ากับ 5.5 หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* TISTR 354 ด้วยวิธีการเขย่าให้อากาศ เป็นเวลา 3 วัน จะได้น้ำส้มสายชูที่มีลักษณะใส สีส้มอ่อน มีปริมาณกรดอะซิติกเท่ากับ 5.48% ค่า pH 3.38 และมีปริมาณไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ เท่ากับ 5.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

คำนำ

น้ำส้มสายชูเป็นผลิตภัณฑ์ที่มนุษย์ใช้บริโภคกันมาเป็นเวลานานแล้ว โดยใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร เป็นสารปรุงแต่งรส ช่วยในการถนอมอาหาร นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการบริโภคในรูปแบบของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชู มีคุณประโยชน์หลายด้าน เช่น ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวาน (Johnston *et al.*, 2004) ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด (Fushimi *et al.*, 2006) มีผลต่อการลดน้ำหนัก (Ostman *et al.* , 2005) เป็นต้น น้ำส้มสายชูสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบหลายชนิด เช่น ผลไม้ ธัญพืช แป้ง แอลกอฮอล์ เป็นต้น โดยข้าวเหนียวดำเป็นวัตถุดิบในประเทศ ที่สามารถนำใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักได้ ทั้งยังเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด ได้แก่ แกมมา-โอไรซานอล, แอนโทไซยานิน, โปรแอนโทไซยานิดิน และวิตามินอี (Ling *et al.*, 2002) โดยสารแอนโทไซยานินทั้งหมดที่มีในข้าวสีม่วงดำประมาณ 85% จะเป็นสาร cyanidin-3-glucoside และ peonidin-3-glucoside (Hu *et al.*, 2003) ซึ่งมีคุณสมบัติในการปรับระดับของสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งปัจจัยที่ทำให้เกิดการอักเสบได้ (Wang *et al.*, 2007) งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อใช้ประโยชน์จากข้าวเหนียวดำในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักซึ่งเป็นวัตถุดิบในประเทศเท่ากับเป็นการเพิ่มมูลค่าและเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักเพื่อสุขภาพให้เป็นทางเลือกใหม่

อุปกรณ์และวิธีการ

วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วย ข้าวเหนียวดำกล้อง เชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049 เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* TISTR 102, 103 และ 354 และน้ำมะพร้าว

การวิเคราะห์คุณภาพวัตถุดิบ

การวัดค่าองค์ประกอบทางเคมีของข้าวเหนียวดำ ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เส้นใยหยาบ และคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ AOAC (2000)

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน ในข้าวเหนียวดำ (Lee *et al.*, 2005)

การย่อยข้าวเหนียวดำให้เป็นน้ำตาลกลูโคส

ขั้นตอนในการศึกษากรรมวิธีการย่อยข้าวเหนียวดำแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

1. การศึกษาอัตราส่วนของข้าวเหนียวดำต่อน้ำที่ใช้แช่และระยะเวลาในการย่อยที่เหมาะสม

วางแผนการทดลอง แบบสุ่มตลอดโดยสมบูรณ์ โดยศึกษาอัตราส่วนของข้าวเหนียวดำต่อน้ำที่ใช้แช่ 3 ระดับ คือ 1:1, 1:1.25, 1:1.5 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยนำข้าวเหนียวดำ 50 กรัม มาล้างและใส่ในขวดแช่น้ำเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำมานึ่งให้สุกโดยใช้ลังถึงเป็นเวลา 45 นาที เมื่อข้าวเหนียวดำสุก ทำให้เย็น (ดัดแปลงจาก Dung *et al*., 2005) นำเชื้อรา *A. rouxii* ที่เตรียมไว้ จำนวน 1 หลอด มาเพาะลงบนข้าวเหนียวดำนึ่งสุก ผสมให้เข้ากัน ปิดฝาขวดด้วยผ้าขาวบาง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักเป็นเวลา 4 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกวัน นำข้าวเหนียวดำที่ถูกย่อยแล้วมาคั้นและกรองแยกน้ำ เพื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคส ตามวิธีการของ Somogyi and Nelson (1952) นำผลปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญของการทดสอบเท่ากับ 0.05 คัดเลือกอัตราส่วนของข้าวเหนียวดำต่อน้ำที่ใช้แช่ ที่ให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดและระยะเวลาในการหมักที่สั้นที่สุด เพื่อศึกษาต่อไป

2. การศึกษาปริมาณโคจิของเชื้อ *A. rouxii* ที่เหมาะสมในการย่อยข้าวเหนียวดำ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดโดยสมบูรณ์โดยศึกษาปริมาณเปอร์เซ็นต์หัวเชื้อโคจิที่ใช้ 5 ระดับ คือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำโคจิแป้งข้าว (ดัดแปลงจาก Chou and Rwan, 1995) มาเพาะลงบนข้าวเหนียวดำนึ่งสุก (ดัดแปลงจาก Dung *et al*., 2005) ผสมให้เข้ากันแล้วหมักไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำข้าวเหนียวดำที่ถูกย่อยแล้วมาคั้นและกรองแยกน้ำ นำของเหลวที่ได้มาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปของน้ำตาลกลูโคส ตามวิธีการของ Somogyi and Nelson (1952) นำผลปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญของการทดสอบเท่ากับ 0.05 คัดเลือกระดับปริมาณโคจิที่ให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเพื่อศึกษาต่อไป

การศึกษาชนิดของสารเจือจางในการหมักไวน์ข้าวเหนียวดำ

ทำการวางแผนการทดลอง แบบสุ่มตลอดโดยสมบูรณ์ โดยศึกษาชนิดของสารเจือจาง 2 ชนิด คือ น้ำ และ น้ำมะพร้าวแก่ โดยนำของเหลวที่ได้จากการย่อยข้าวเหนียวดำมาปรับด้วยสารเจือจางให้มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้เท่ากับ 20 องศาบริกซ์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซิตริก เติมกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* ปริมาณ 10% ของน้ำหมัก (Morakul, 2002) ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 14 วัน นำไวน์ที่ได้มาวัดปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Ebulliometer (Per Vinum J. Salleron Dujardin, Paris) นำผลปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญของการทดสอบเท่ากับ 0.05 ทำการคัดเลือกชนิดของสารเจือจางที่ทำให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดและใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดเพื่อศึกษาต่อไป

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำส้มสายชู

ขั้นตอนในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำส้มสายชู แบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

1. การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อ *Acetobacter aceti*

ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดโดยสมบูรณ์ โดยศึกษาสายพันธุ์เชื้อ *A. aceti* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ TISTR 102, 103 และ 354 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำไวน์ข้าวเหนียวดำ มาเจือจางด้วยน้ำต้มสุกให้มีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 5% ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 ด้วยสารละลาย NaOH 1 M และมีปริมาณกรดในไวน์เริ่มต้น 0.1% เติมกล้าเชื้อน้ำส้มสายชู *A. aceti* ที่เตรียมตามวิธีของ Worawuthipong (1974) ปริมาณ 5% นำไปหมักบน

เครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 150 ต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 5 วัน โดยวัดปริมาณกรดอะซิติกที่ได้ตามวิธีการของ AOAC (2000) นำผลปริมาณกรดที่วัดได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญของการทดสอบเท่ากับ 0.05 ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อที่ให้ปริมาณกรดอะซิติกสูงสุด ในระยะเวลาสั้นที่สุด เพื่อศึกษาต่อไป

2. การศึกษาปริมาณของไวน์ที่เหมาะสมในภาชนะหมัก

ทำการวางแผนการทดลอง แบบสุ่มตลอดโดยสมบูรณ์ แปรผันอัตราส่วนปริมาตรไวน์ต่อปริมาตรภาชนะ 5 ระดับ คือ 1:10, 1:5, 1:3.3, 1:2.5 และ 1:2 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำไวน์ที่ได้มามาเจือจางด้วยน้ำต้มสุกให้มีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 5% ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 ด้วยสารละลาย NaOH 1 M แล้วนำมาใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเชื้อ *A. aceti* TISTR 354 ที่คัดเลือกได้ ปริมาณ 5% และนำไปหมักบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 150 ต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน ทำการวัดปริมาณกรดอะซิติกที่ได้ตามวิธีการของ AOAC (2000) นำผลปริมาณกรดที่วัดได้ มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญของการทดสอบเท่ากับ 0.05 ทำการคัดเลือกอัตราส่วนปริมาตรไวน์ต่อปริมาตรภาชนะที่ทำให้ได้ปริมาณกรดสูงสุด

การศึกษาค่าคุณภาพทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมักข้าวเหนียวดำกล้อง

นำผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักข้าวเหนียวดำกล้องที่ผลิตได้มาทำการวัดค่าคุณภาพดังนี้

- การวัดค่าความเป็นกรด-เบส ด้วย pH meter
- การวัดปริมาณกรดอะซิติก (AOAC, 2000)
- การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน (Lee *et al*., 2005)
- การวัดค่าสี L* a* b* โดยเครื่อง Spectrophotometer CM-3500 d

ผลและวิจารณ์

ผลการวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบทางเคมี ของข้าวเหนียวดำกล้องที่ได้จากการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 1 พบว่ามี คาร์โบไฮเดรต 79.22% และมีปริมาณไซยานิน-3-กลูโคไซด์ 50.62 มก.ต่อ 100 กรัม โดย Karladee and Jamjod (2007) ได้ทำการศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินในรูปไซยานิน-3-กลูโคไซด์ในข้าวเหนียวดำพันธุ์ต่างๆ ที่ได้รวบรวมไว้ พบว่า มีปริมาณอยู่ในช่วงตั้งแต่ 16.2 ถึง 227.32 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของข้าวเหนียวดำกล้อง

องค์ประกอบทางเคมี	ค่าเฉลี่ย
ความชื้น (%)	7.00±0.05
ไขมัน (%)	2.14±0.32
เถ้า (%)	1.64±0.07
โปรตีน (%)	8.60±0.16
เส้นใย (%)	1.40±0.36
คาร์โบไฮเดรต (%) (คำนวณ)	79.22
ไซยานิน-3-กลูโคไซด์ (มก./100กรัม)	50.62±0.01

ตารางที่ 2 ค่าเปอร์เซ็นต์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากสารละลายน้ำย่อยข้าวเหนียวดำ

อัตราส่วนข้าวเหนียวดำต่อน้ำ	ระยะเวลาหมัก (วัน)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (%)
1:1	1	25.80d±0.11
	2	25.31e±0.12
	3	23.75f±0.15
	4	23.71f±0.20
1:1.25	1	28.51c±0.10
	2	30.00b±0.12
	3	31.64a±0.11
	4	30.09b±0.16
1:1.5	1	21.86g±0.12
	2	28.12c±0.12
	3	29.11b±0.10
	4	29.13b±0.11

หมายเหตุ: ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ผลการวัดค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในรูปน้ำตาลกลูโคส ที่ได้จากสารละลายน้ำย่อยข้าวเหนียวดำ ที่แปรผันอัตราส่วนข้าวเหนียวดำต่อน้ำและระยะเวลาในการหมักที่ระดับต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2 พบว่า การใช้อัตราส่วนเท่ากับ 1:1 หรือ 1:1.5 จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าการใช้อัตราส่วนเท่ากับ 1:1.25 โดยแนวโน้มของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จะเพิ่มขึ้นในระยะเวลา 3 วันแรกเท่านั้น และถึงแม้จะเพิ่มระยะเวลาในการย่อยจาก 3 วัน เป็น 4 วันก็ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เนื่องจากข้าวเหนียวดำถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์โดยสมบูรณ์แล้ว (Pakdeesupapol, 1980) ซึ่งใกล้เคียงกับ Dung *et al*. (2005) ที่ใช้อัตราส่วนของข้าวเหนียวดำต่อน้ำที่ใช้แช่เท่ากับ 1:1.2 และใช้เวลาในการย่อย 3 วัน ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนของข้าวเหนียวดำต่อน้ำที่ใช้แช่เท่ากับ 1 ต่อ 1.25 และระยะเวลาในการย่อย 3 วัน ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 31.64% เพื่อศึกษาต่อไป

ผลการศึกษาปริมาณโคจิข้าวที่ระดับต่างๆทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลาย แสดงดังตารางที่ 3 พบว่าเมื่อเพิ่มระดับหัวเชื้อโคจิจาก 0.1% ไปเป็น 0.3% ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อใช้ที่ระดับ 0.4% จะทำให้ได้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 39.6 % ในการย่อยเป็นเวลา 3 วัน และการเพิ่มระดับหัวเชื้อโคจิเป็น 0.5% ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งใกล้เคียงกับ Phadungsak (2007) ในการผลิตกล้าเชื้อข้าวหมากผงที่ใช้ปริมาณหัวเชื้อ 0.5% ในการผลิตข้าวหมาก ดังนั้นจึงเลือกปริมาณโคจิ 0.4% ของน้ำหนักข้าวเหนียว เพื่อการศึกษาต่อไป

ผลการศึกษาชนิดของสารเจือจางที่เหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์จากข้าวเหนียวดำ แสดงตารางที่ 4

พบว่า การใช้น้ำมะพร้าวเป็นสารเจือจางทำให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงกว่าการใช้น้ำ เนื่องจากในน้ำมะพร้าวมีสารอาหารหลายชนิดที่จำเป็นต่อการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์ ซึ่งในน้ำมะพร้าวแก่มีคุณค่าทางอาหารสูงเพราะประกอบไปด้วยน้ำตาลไขมัน สารประกอบไนโตรเจนและแร่ธาตุชนิดต่างๆ (Kuntiya, 2009) นอกจากนี้ยังสามารถหมักแอลกอฮอล์ได้ในระยะเวลาที่สั้นกว่า โดยการใช้น้ำมะพร้าวเป็นสารเจือจางจะได้ปริมาณแอลกอฮอล์ 11.5% ภายในเวลา 8 วัน ดังนั้นจึงเลือกน้ำมะพร้าวแก่เป็นสารเจือจางและระยะเวลาการหมัก 8 วัน ในการศึกษาต่อไป

ผลการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อ *A. aceti* สายพันธุ์ต่างๆ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ TISTR 102, 103 และ 354 ในการหมักน้ำส้มสายชูทำให้ได้ปริมาณกรดอะซิติกแสดงดังตารางที่ 5 พบว่า สายพันธุ์ TISTR 354เป็นสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณกรดอะซิติกสูงที่สุดเท่ากับ 5.46 % ภายในเวลา 3 วัน จึงเลือก *A. aceti* สายพันธุ์ TISTR 354 และระยะเวลาในการหมักน้ำส้มสายชู 3 วัน ในการศึกษาต่อไป

ผลการแปรผันระดับความสูงของไวน์ต่อปริมาตรภาชนะ ทำให้ได้ปริมาณกรดอะซิติก แสดงดังตารางที่ 6 พบว่า เมื่อเพิ่มระดับความสูงของไวน์จาก 1:10 เป็น 1:5 และ 1:3.3ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณร้อยละกรดอะซิติก แต่การเพิ่มระดับความสูงของไวน์เป็น 1:2.5 และ 1:2 ทำให้ปริมาณกรดอะซิติกลดลง เนื่องจากเมื่อเพิ่มระดับความสูงของไวน์ในภาชนะทำให้ปริมาตรอากาศในภาชนะลดลง แต่เชื้อ *A. aceti* ต้องการอากาศ (Krusong and Pongsawatmanit, 1989) สอดคล้องกับ Ninlanon and Puttame (2010) ที่พบว่าระดับความสูงของน้ำหมักที่มากขึ้นจะทำให้การเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซีติคด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลง โดยมาตรฐานผลิตภัณฑ์ของชุมชน มผช 326/2547 (Thai Industrial Standards Institute, 2004) ระบุไว้ว่าน้ำส้มสายชูหมักจะต้องมีปริมาณกรดอะซิติกไม่ต่ำกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ซึ่งระดับความสูงของไวน์ต่อภาชนะที่เหมาะสม คือ 1:5 ทำให้ได้กรดอะซิติกสูงสุดเท่ากับ 5.5% และมีความคุ้มค่าในการผลิตที่มากสุด

ตารางที่ 3 ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากสารละลายน้ำย่อยข้าวเหนียวดำที่ย่อยด้วยโคจิ

ปริมาณโคจิ (%)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (%)
0.1	36.62bc±0.13
0.2	35.59bc±0.14
0.3	35.16c±0.15
0.4	39.60a±0.20
0.5	38.62ab±0.11

หมายเหตุ: ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4 ค่าเปอร์เซนต์แอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลข้าวเหนียวดำโดยใช้น้ำและน้ำมะพร้าวเป็นสารเจือจาง

ระยะเวลาในการหมัก (วัน)	ชนิดสารเจือจาง	
	น้ำ	น้ำมะพร้าว
1	2.94p±0.15	5.73n±0.022
2	4.53o±0.21	8.37j±0.014
3	6.00m±0.18	10.87d±0.16
4	7.03l±0.21	11.15c±0.13
5	7.88k±0.17	11.22c±0.12
6	8.60i±0.15	11.33b±0.07
7	8.83h±0.13	11.33b±0.05
8	9.08g±0.11	11.50a±0.12
9	9.25f±0.22	11.50a±0.22
10	9.25f±0.01	11.50a±0.23
11	10.28e±0.02	11.50a±0.05
12	11.33b±0.01	11.50a±0.01
13	11.33b±0.03	11.50a±0.02
14	11.33b±0.03	11.50a±0.03

หมายเหตุ: ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 5 ค่าปริมาณเปอร์เซ็นต์กรดอะซิติกของน้ำส้มสายชูข้าวเหนียวดำที่หมักด้วยเชื้อ *A. aceti* 3 สายพันธุ์

ระยะเวลา	สายพันธุ์เชื้อ *A. aceti*		
(วัน)	TISTR 102	TISTR 103	TISTR 354
0	0.10k±0.02	0.10k±0.02	0.10k±0.02
1	1.50j±0.03	2.38i±0.01	3.12g±0.01
2	2.70h±0.04	3.32f±0.01	4.86de±0.01
3	4.86de±0.10	5.24c±0.03	5.46a±0.05
4	4.86de±0.01	5.32bc±0.01	5.44ab±0.04
5	4.80e±0.02	5.32bc±0.02	5.44ab±0.02

หมายเหตุ: ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 6 ค่าปริมาณเปอร์เซ็นต์กรดอะซิติกของน้ำส้มสายชูข้าวเหนียวดำ

ปริมาตรไวน์ (มล.)	ปริมาณกรดอะซิติก(%)
25 (1:10)	4.98a±0.01
50 (1:5)	5.5a±0.02
75 (1:3.3)	3.66ab±0.01
100 (1:2.5)	2.04b±0.03
125 (1:2)	1.94b±0.01

หมายเหตุ: ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 7 ค่าคุณภาพทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมักข้าวเหนียวดำกล้อง

ค่าคุณภาพทางเคมี	ค่าโดยประมาณ
ความเป็นกรด-เบส	3.38±0.01
กรดอะซิติก (%)	5.48±0.05
ไซยานิน-3-กลูโคไซด์ (มก./100 มล.)	5.01±0.05
L*	76.38±0.01
a*	9.21±0.01
b*	13.13±0.01

ผลการศึกษาค่าคุณภาพทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเหนียวดำกล้องแสดงดังตารางที่ 7 พบว่าน้ำส้มสายชูหมักมีลักษณะใส มีสีส้มอ่อน ปริมาณกรดอะซิติก 5.48% ปริมาณไซยานิน-3-กลูโคไซด์เท่ากับ 5.01 มก. ต่อ 100 มล. โดยปริมาณแอนโทไซยานินมีปริมาณลดลงจากข้าวเหนียวดำที่เป็นวัตถุดิบเริ่มต้น (50.62 มก. ต่อ 100 ก.) เนื่องจากมีการสูญเสียแอนโทไซยานินไปในขั้นตอนการผลิต ตั้งแต่การแยกกากข้าวเหนียวดำซึ่งยังมีสีม่วงอยู่มากออก การทำการเจือจางตัวอย่างเพื่อปรับสภาวะเริ่มต้นให้เหมาะสมในการทำไวน์และน้ำส้มสายชู เช่นเดียวกับ Su and Chien (2007) ที่พบว่าน้ำส้มสายชูหมักจากบลูเบอร์รี่มีปริมาณแอนโทไซยานินลดลง เป็น 3.22 มก.ต่อ 100 มล. เมื่อเทียบกับผลบลูเบอร์รี่ (363 มก. ต่อ 100 ก.) นอกจากนี้สภาวะแวดล้อมอื่นๆในการผลิต เช่น อุณหภูมิ ออกซิเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง ก็มีผลต่อการสูญเสียแอนโทไซยานินได้ (Kalt *et al.*, 2000)

สรุป

องค์ประกอบทางเคมีของข้าวเหนียวดำกล้องประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 79.22 และมีปริมาณไซยานิน-3-กลูโคไซด์ 50.62 มก.ต่อ 100 กรัม ในการย่อยข้าวเหนียวดำให้เป็นน้ำตาลด้วยโคจิเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ในปริมาณ 0.4% ของน้ำหนักข้าวเหนียวดำ เป็นเวลา 3 วัน จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 39.6% เมื่อนำสารละลายที่ได้มาผสมกับน้ำมะพร้าวทำการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049 เป็นเวลา 8 วัน จะได้ไวน์ข้าว

เหนียวดำที่มีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับ 11.5% ในการนำไปผลิตน้ำส้มสายชูหมักให้มีปริมาณไวน์เท่ากับ 1 ใน 5 ส่วนของภาชนะที่ใช้ ทำการหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* TISTR 354 ด้วยวิธีการเขย่าให้อากาศ เป็นเวลา 3 วัน จะได้น้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเหนียวดำที่มีสีส้ม ปริมาณกรดอะซีติก 5.48% และมีปริมาณไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ เท่ากับ 5.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ และระดับนานาชาติ (พ.ศ. 2551) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ให้ความอนุเคราะห์สายพันธุ์จุลินทรีย์ และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้อุปกรณ์วิจัย

เอกสารอ้างอิง

AOAC. 2000. Official Method of Analysis of AOAC International. 17th ed. The Association of Official analytical Chemists, Virginia.

Chou, C.C. and J.H. Rwan. 1995. Mycelial propagation and enzyme production in koji prepared with *Aspergillus oryzae* on various rice extrudates and steamed rice. Journal of Fermentation and Bioengineering 79: 509-512.

Dung, NTP., F.M. Rombouts, and M.J.R. Nout. 2005. Development of defined mixed culture fungal fermentation starter granulate for controlled production of rice wine. Innovative Food Science and Emerging Technology 6:429-441

Fushimi, T., K. Suruga, Y. Oshima, M. Fukiharu, Y. Tsukamoto and T. Goda. 2006. Dietary acetic acid reduces serum cholesterol and triacylglycerols in rats fed a cholesterol-rich diet. British Journal of Nutrition 95: 916–924.

Hu, C., J. Zawistowski, W. H. Ling, and D. D Kitts. 2003. Black rice (*Oryza sativa* L. *indica*) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. Journal of Agriculture and Food Chemistry 51: 5271-5277.

Johnston, C., C. Kim, and A. Buller. 2004. Vinegar improves insulin sensitivity to a high carbohydrate meal in subjects with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. Diabetes Care 27:281-282.

Kalt, W., J. E. McDonald, and H. Donner . 2000. Anthocyanins phenolics and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products. Journal of Food Science 65: 390-393.

Karladee D. and S. Jamjod. 2007. Genotypic Variation in Grain Nutrition in Local Purple Rice Genotypes, pp. 138-140. *In* Proceedings of the 2nd International Conference on Rice for the Future 2007. 5 - 9 November 2007, Queen Sirikit National Convention Center Bangkok, Thailand. (in Thai)

Krusong, W. and R. Pongsawatmanit. 1989. Fermentation Technology in the Industry. Odean Store Publishing, Bangkok. (in Thai)

Kuntiya, A. 2009. The Utilization of Agricultural and Agro-Industrial Wastes: Ripe Coconut Juice. Review article in Agro-Industry, Chiang Mai University 1(1):1-3. http://www.agro.cmu.ac.th/Service50/Review%5CPVol01_May09.pdf. 10 December 2010. (in Thai)

Lee,J., R.W. Durst and R.E. Wrolstad. 2005. Determination of monomeric anthocyanin pigment Content of fruit juices, beverages natural colorants, and wines by the pH Dierential method:collaborative study. Journal of AOAC International 88(5): 1269-1278.

Ling, W.H., L. L. Wang and J. Ma. 2002. Supplementation of the black rice outer layer fraction to rabbits decreases atherosclerotic plaque formation and increases antioxidant status. Journal of Nutrition 132: 20-26.

Morakul, S. 2002. Process development in rice wine production. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)

Ninlanon, W. and K. Puttame. 2010. Condition optimization for tray acetic acid fermentation from rambutan. Proceedings of 48th Kasetsart University Annual Conference: Agro-Industry. Bangkok. (in Thai)

Ostman, E., Y. Granfeldt , L. Persson and I. Bjorck . 2005. Vinegar supplementation lowers glucose and insulin responses and increases satiety after a bread meal in healthy subjects. Eur. J. Clin. Nutr. 59(9):983-8.

Pakdeesupapol, S. 1980. Fermentation of sweetened rice by pure culture. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)

Phadungsak C. 2007. Effect of cinnamon on *Bacillus cereus* and *Amylomyces rouxii* in starter powder for Khao-mak production. Thesis, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang. (in Thai)

Somogyi, S. and N. Nelson. 1952. A photometric adaption of Somogyi and method for the determination of cellulose. Biol Chem. 153: 1.

Su, M.S. and P.J. Chien. 2007. Antioxidant activity anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. Food Chemistry 104: 182-187.

Thai Industrial Standards Institute. 2004. Thai Community fermented vinegar product standard 326/2004. source:http://app.tisi.go.th/otop/pdf_file/tcps326_47.pdf. 15 Jan 2011. (in Thai)

Wang, Q., P. Han, M. Zhang, M. Xia, H. Zhu, J. Ma, M. Hou, Z. Tang, and W. Ling. 2007. Supplementation of black rice pigment fraction improves antioxidant and anti-inflammatory status in patients with coronary heart disease. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 16 (Suppl 1): 295-301

Worawuthipong, N. 1974. Selection of Acetic acid Bacteria Suitable for Vinegar Industry. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)